

REESTABLECIMIENTO DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL Y DEL FENOTIPO METABÓLICO INDUCIDO POR LA SEÑALIZACIÓN DE VEGF/sFlt-1 Y VEGF/TNF- α EN PREECLAMPSIA

Autora:

LISSETTE CAROLINA COROMOTO SÁNCHEZ ARANGUREN
Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia

UNIVERSIDAD DEL VALLE
Facultad de Salud
Departamento de Ciencias Fisiológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas



Santiago de Cali, Colombia
Abril de 2017

REESTABLECIMIENTO DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL Y DEL FENOTIPO METABÓLICO INDUCIDO POR LA SEÑALIZACIÓN DE VEGF/sFlt-1 Y VEGF/TNF- α EN PREECLAMPSIA

Presentado por:
LISSETTE CAROLINA COROMOTO SÁNCHEZ ARANGUREN
Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia

Tesis presentada a:
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS

En cumplimiento al requisito para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biomédicas

Director:
MARCOS LÓPEZ CASILLAS, PhD.
Director de Grupo de Investigación Biomédica Traslacional
Fundación Cardiovascular de Colombia, Bucaramanga, Colombia.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
Facultad de Salud
Departamento de Ciencias Fisiológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Santiago de Cali, Colombia
Abril de 2017

Firma del presidente del jurado

Jurado evaluador

Jurado evaluador

Jurado evaluador

Santiago de Cali,

DEDICATORIA

A ti Dios, maestro y amigo incondicional que me ha acompañado en toda mi vida y en mi travesía profesional. Esperé años para dedicarte estas palabras, pues tu amor incondicional ha permitido lograr hoy esta meta de culminar mi tesis, que como sabes, sentí en muchas ocasiones que no iba a ser capaz de lograr. Diosito, este libro es tuyo, lo dedico a ti y a Tu nombre.

Dios, durante mi formación en el doctorado, me confiaste tu más hermoso ángel y me lo entregaste. Durante meses pensé que era mucho para mí. Pero hoy me termino de dar cuenta que me diste la más hermosa herramienta para ser fuerte y para luchar. Gracias Dios por ser el pilar de mi vida y el pilar de esta tesis. Gracias Dios por darme a mi hijo Luis Carlos, a quien quiero compartir mi más sincera dedicatoria.

Luis Carlos o LuCa, como me gusta llamarte, eres la manifestación divina de Dios y de Su amor hacia mí. Por ello, quiero dedicarte esta tesis. Tú aún no lo sabes, pero me acompañaste en cada letra, palabra y análisis. Y como digno ángel de Dios, no recibí de ti más que sonrisas y cariño. Si pudiera compartir la autoría de este libro, tú estarías allí conmigo. Te dedico este libro por cada vez que te sentaste en mis piernas mientras yo estaba ocupada estudiando o analizando. Te dedico esta tesis por cada vez que te daba de comer con una mano y con la otra pasaba las hojas de los papers que leía para estudiar y prepararme en mis estudios.

A ti, Luis Carlos, por cada día que salía del apartamento, rumbo al CTE a trabajar y estudiar y te dejaba en el cuidado de la niñera y moría por renunciar a todo, sólo por verte sonreír. A ti Luca, por toda tu paciencia y apoyo incondicional.

Lisette Sánchez-Aranguren.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia, mi esposo Luis Carlos y a nuestro hermoso hijo, Luis Carlos Jr. Por su presencia en mi vida y por el apoyo incondicional que recibí de ustedes durante estos largos años que he tenido la fortuna de tenerlos en mi vida. Luis Carlos, siempre confiaste en mí y nunca me permitiste renunciar. Me enseñaste a ser perseverante y a luchar por mis sueños. Sé lo orgulloso que estás de mí por este logro y quiero agradecerte profundamente, porque a tu lado, el disfrute de este logro no tiene medida ni precio. Gracias, mil veces gracias a los dos hombres de mi vida que siempre estuvieron allí, siempre me miraron con ojos de admiración y de seguridad. Ustedes estuvieron siempre más seguros de mí que yo misma y nunca dejaré de agradecerles por estar siempre ahí para mí.

A mi madre, padre y hermanos, quienes están lejos de mí en distancia, pero no del corazón. Padres, ustedes sabían que este día llegaría y me acompañaron en cada meta y cada sueño desde mucho antes de yo tener conciencia. Gracias por darme los valores y la enseñanza que me motiva a ser quien quiero ser. Eduardo y Daniel, cada uno de ustedes en países distintos, les agradezco por su presencia en mi vida y por todo lo que aprendí de ustedes.

Gracias a Colombia, país que me acogió cuando quedé metafóricamente sin nación.

Colombia, me diste la oportunidad de formarme en este doctorado y todas las herramientas para ser la profesional que quise ser. A pesar de las diferencias en nuestra idiosincrasia, aprendí a valorarte y te agradezco por permitirme vivir y hacer mi vida profesional aquí.

A mi estimado tutor y a quien deseo llamar mi amigo, Dr. Marcos López. Gracias, infinitas gracias porque confiaste en mí a pesar de ser una extranjera. Fuiste la primera persona que me dio una oportunidad en este país, gracias por darme la oportunidad de pensar científicamente y en la medida de las posibilidades, sin límites.

Colciencias y Fundación Cardiovascular de Colombia, gracias por la oportunidad de formarme y de tener la dicha de escribir este libro.

Lisette Sánchez-Aranguren.

TABLA DE CONTENIDO

	Págs.
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE ABREVIACIONES.....	13
RESUMEN	17
ABSTRACT	18
Introducción.....	19
1.1 Preeclampsia: Problema de salud pública global	19
1.2 Enigma en la etiología de PE.....	20
1.2.1 Función de la placenta	20
1.2.2 Teoría de dos estadios en la aparición de PE	20
1.3 Señalización de VEGF y TGF- β . Papel de los FAAs y su relación con PE.....	22
1.3.1 VEGF.....	22
1.3.2 sEng	24
1.4 FAAs y su función en PE	24
1.5 Factores pro-inflamatorios en PE	27
Función de TNF- α	27
1.6 Estrés oxidativo en PE	27
1.7 Preeclampsia: una enfermedad de origen metabólico	28
1.7.1 Papel de la mitocondria en PE.....	29
1.7.2 Mitocondria y FAAs	30
1.8 Disfunción endotelial en PE	31
1.9 Función del óxido nítrico en PE	32
1.10 Metabolismo en PE	37
Metabolismo de carbohidratos en PE	37
Metabolismo y FAAs	37
1.11 Sepiapterina: Potencial agente terapéutico en PE	38
Tetrahidrobiopterina (BH4) y eNOS.....	38
BH4 como molécula antioxidante	40
Sepiapterina	41
1.12 Tratamiento y prevención de la hipertensión en PE	41
2. Razonamiento del estudio	43
2.1 Planteamiento del problema	43
2.2 Justificación.....	46

2.3 Objetivos	48
2.3.1 General.....	48
2.3.2 Específicos	48
3. Materiales y métodos.....	49
3.1 Diseño del estudio.....	49
3.2 Población	49
3.3 Tamaño de la muestra	49
3.4 Reclutamiento de pacientes.....	49
3.4.1 Criterios de inclusión	49
3.4.2 Criterios de exclusión.....	51
3.5 Colección de muestras de sangre	52
3.6 Medidas antropométricas.....	52
3.7 Cultivo celular.....	52
3.8 Ensayo de migración (<i>Wound Healing Assay</i>)	54
3.9 Ensayo de viabilidad celular	54
3.10 Ensayo de proliferación.....	56
3.11 Determinación de niveles de TNF- α y sFlt-1 a través de inmunoensayo enzimático (ELISA)	56
Procedimientos previos al ensayo de ELISA:	57
Determinación de niveles de sFlt-1:.....	58
Determinación de niveles de TNF- α :	59
Curvas de calibración y resultados:	60
3.12 Función bioenergética mitocondrial y metabolismo.....	61
Evaluación de la actividad bioenergética mitocondrial:	62
Evaluación del metabolismo glucolítico:	63
3.13 Fenotipo energético celular.....	64
3.14 Potencial de membrana mitocondrial.....	66
3.15 Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante HPLC.....	67
Análisis de HPLC:	68
3.16 Detección de especies reactivas de oxígeno de origen mitocondrial (mROS).....	68
3.17 Medición de $\bullet$ NO	69
Lecturas:.....	70
3.18 Niveles de peroxinitrito (ONOO $\cdot$)	71
Análisis de resultados:	73
3.19 Determinación de niveles de biopterinas (BH4/BH2)	73
Análisis de HPLC:	74
3.20 Expresión de proteínas determinada por western blot	74
Ensayo de western blot:.....	75

3.21 Contenido total de proteínas	76
Ensayo de Bradford:	76
Ensayo de Pierce BCA:.....	77
3.22 Aspectos éticos	78
3.23 Procesamiento de los datos.....	79
3.24 Análisis estadístico.....	79
4. Resultados	80
Capítulo I. El factor anti-angiogénico: soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) causa disfunción endotelial, favorece el desacoplamiento de eNOS e induce cambios en el fenotipo metabólico en preeclampsia, al interferir en la señalización dependiente de VEGF.	80
4.1 Introducción.....	80
4.2 Establecimiento de las concentraciones de trabajo de sFlt-1 para el modelo <i>in vitro</i> de PE.	82
4.3 sFlt-1 disminuye los niveles de •NO <i>in vitro</i> al reducir la biodisponibilidad de VEGF en CEs y trofoblastos.	85
4.4 sFlt-1 afecta la activación de eNOS en CEs y HTR-8/SVneo.	86
4.5 sFlt-1 desacopla la enzima eNOS en CEs y trofoblastos.	88
4.6 El factor anti-angiogénico sFlt-1 afecta la función bioenergética mitocondrial en CEs.	91
4.7 El factor anti-angiogénico sFlt-1 no afecta la función bioenergética mitocondrial en células HTR-8/SVneo.	96
4.8 sFlt-1 induce cambios en el fenotipo metabólico en células endoteliales, pero no en trofoblastos.....	98
4.9 sFlt-1 en altas concentraciones conlleva a disfunción mitocondrial en células endoteliales, pero no en HTR-8/SVneo.....	106
5. Resultados	111
Capítulo II. Modelo de correlación <i>in vitro</i> de PE. sFlt-1 y TNF- α como moduladores del metabolismo, función endotelial y función bioenergética mitocondrial en PE.	111
5.1 Introducción.....	111
5.2 Establecimiento del modelo de correlación <i>in vitro</i> de PE. Reclutamiento de pacientes para el estudio.	112
5.3 Papel de la señalización de VEGF en el establecimiento de DE en PE.	114
5.4 Modelo de correlación <i>in vitro</i> de PE. Efectos en la función bioenergética mitocondrial en CEs y trofoblastos.	115
5.5 La administración exógena de VEGF no reestablece la actividad bioenergética mitocondrial de CEs y HTR-8/SVneo.....	118
5.6 VEGF no disminuye la producción de mROS ni restablece los cambios en el Ψ_m inducidos por la administración de sueros de pacientes preeclámpticas en CEs y trofoblastos.	122
5.7 Efectos de TNF- α en la función endotelial y función bioenergética mitocondrial de CEs y trofoblastos.....	125
5.8 El mantenimiento de la viabilidad y proliferación celular en presencia de TNF- α no dependen de la reprogramación metabólica celular.	134

5.9 TNF- α aumenta la producción de mROS y la disipa el Ψ_m en CEs, pero no en HTR-8/SVneo.....	138
5.10 VEGF, regulador maestro de la producción de sFlt-1 y TNF- α	141
6. Resultados	146
Capítulo III. Sepiapterina, análogo precursor de tetrahidrobiopterina, restablece la función endotelial, acoplamiento de eNOS y el fenotipo metabólico en CEs.	146
6.1 Introducción.....	146
6.2 SEPI restablece la producción de •NO, al favorecer el acoplamiento de eNOS en CEs y HTR-8/SVneo.	147
6.3 El aumento en la producción de •NO mediado por SEPI no conlleva a la producción de especies reactivas de nitrógeno.	151
6.4 SEPI disminuye la producción de mROS en modelo <i>in vitro</i> de PE.	154
6.5 SEPI reestablece la función bioenergética mitocondrial y el fenotipo metabólico en modelo <i>in vitro</i> de PE.	156
6.6 SEPI reestablece la función endotelial en el modelo de correlación <i>in vitro</i> de PE.	175
6.7 SEPI reestablece la función bioenergética mitocondrial y fenotipo metabólico en el modelo de correlación <i>in vitro</i> de PE.	177
6.8 SEPI disminuye la producción de mROS en el modelo de correlación <i>in vitro</i> de PE.	180
7. Resultados	183
Capítulo IV. La sepiapterina, a través de la vía salvaje, reestablece el fenotipo metabólico en CEs tratadas con sFlt-1, al funcionar como un potencial agente antioxidante.....	183
7.1 Introducción.....	183
7.2 Papel del •NO en el restablecimiento del fenotipo metabólico en CEs, luego de la administración exógena de sFlt-1.	184
7.3 La conversión de BH2 a BH4 vía DHFR es esencial para el restablecimiento del fenotipo metabólico en CEs en el modelo <i>in vitro</i> de PE.....	195
8. Discusión.....	201
8.1 El factor anti-angiogénico soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) causa disfunción endotelial; favorece el desacoplamiento de eNOS e induce cambios en el fenotipo metabólico en preeclampsia, al interferir en la señalización dependiente de VEGF.	201
8.1.1 Modelo <i>in vitro</i> de PE con administración exógena de sFlt-1. Líneas celulares y determinación de concentraciones de trabajo.	201
8.1.2 sFlt-1 afecta la función endotelial en CEs y trofoblastos al reducir la biodisponibilidad de VEGF.....	204
8.1.3 sFlt-1 desacopla la enzima eNOS al disminuir los niveles de tetrahidrobiopterina (BH4).	206
8.1.4 El factor anti-angiogénico sFlt-1 afecta la función bioenergética mitocondrial y conlleva a un cambio de fenotipo metabólico en CEs, pero no en trofoblastos.	213
8.1.5 sFlt-1 conlleva a disfunción mitocondrial en células endoteliales, pero no en trofoblastos.	220
8.2 Modelo de correlación <i>in vitro</i> de PE. sFlt-1 y TNF- α como moduladores del metabolismo, función endotelial y función bioenergética mitocondrial en PE.....	221
8.2.1 Modelo de correlación <i>in vitro</i> de PE. Reclutamiento de pacientes para el estudio.....	221

8.2.2 Papel de la señalización de VEGF en el establecimiento de disfunción endotelial en PE.	222
8.2.3 La administración exógena de VEGF no reestablece la función bioenergética mitocondrial de CEs y HTR-8/SVneo expuestas al modelo de correlación <i>in vitro</i> de PE.	223
8.2.4 Efectos de TNF- α en la función endotelial y función bioenergética mitocondrial de CEs y trofoblastos.....	226
8.2.5 VEGF, regulador maestro de la producción de sFlt-1 y TNF- α .	228
8.3 Sepiapterina, análogo precursor de tetrahidrobiopterina, reestablece la función endotelial, acoplamiento de eNOS y el fenotipo metabólico en CEs.	231
8.3.1 SEPI reestablece la producción de •NO al favorecer el acoplamiento de eNOS en CEs y HTR-8/SVneo.	232
8.3.2 Efectos de la administración de SEPI en la formación de ROS y RNS.	234
8.3.3 SEPI reestablece la función bioenergética mitocondrial y fenotipo metabólico <i>in vitro</i> .	237
8.4 La sepiapterina, a través de la vía salvaje, reestablece el fenotipo metabólico en CEs tratadas con sFlt-1, al funcionar como un potencial agente antioxidante.....	238
8.4 La sepiapterina, a través de la vía salvaje, reestablece el fenotipo metabólico en CEs tratadas con sFlt-1, al funcionar como un potencial agente antioxidante.....	239
8.4.1 Papel del •NO en el restablecimiento del fenotipo metabólico de CEs.	239
8.4.2 La conversión de BH2 a BH4 vía DHFR es esencial para el restablecimiento del fenotipo metabólico en CEs en el modelo <i>in vitro</i> de PE.....	241
9. Consideraciones finales.....	244
10. Perspectivas futuras	245
11. Conclusiones	246
12. Anexos	248
1. Aval de Comité de Ética de la Fundación Cardiovascular de Colombia.....	248
2. Aval del Comité de Ética de la Clínica Materno Infantil San Luis.	250

LISTA DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1.1 El escaso flujo sanguíneo materno hacia la placenta está asociado a una alterada invasión y migración de células trofoblásticas en PE (Primer estadio).....	21
Figura 1.2 Las células trofoblásticas liberan una serie de factores placentarios al torrente sanguíneo en respuesta a un ambiente de extrema hipoxia en PE (Segundo estadio).	22
Figura 1.3 Principales receptores celulares de VEGF.	23
Figura 1.4 Papel de los factores anti-angiogénicos en PE.	26
Figura 1.5 Representación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS).	32
Figura 1.6 Síntesis de BH4 a través de vías de novo y salvaje.....	39
Figura 1.7 El desacoplamiento de la enzima eNOS, debido a una disponibilidad baja de BH4, resulta en baja producción de •NO.	40
Figura 3.1 Diagrama de reclutamiento de pacientes.	51
Figura 3.2 Montaje del ensayo de migración (Wound Healing Assay).	55
Figura 3.3 Representación esquemática de los procedimientos previos al ELISA.	58
Figura 3.4 Curva de calibración de sFlt-1 (VEGF-R1). $r^2=0.98696$	60
Figura 3.5 Curva de calibración de TNF- α bovino. $r^2=0.9998$	60
Figura 3.6 Flujo de trabajo para la evaluación de la función bioenergética mitocondrial y metabolismo.	62
Figura 3.7 Parámetros evaluados en el metabolismo glucolítico y en la función bioenergética mitocondrial.	64
Figura 3.8 Representación gráfica de (A) Fenotipo energético celular y (B) Potencial metabólico.	65
Figura 3.9 Oxidación de HE.	67
Figura 3.10 Calibración de nitritos.	71
Figura 3.11 Representación esquemática del montaje del ensayo para la detección de niveles de ONOO ⁻	72
Figura 3.12 Curvas de calibración de la determinación de proteínas por el método de Bradford. ..	77
Figura 3.13 Curva de calibración de la determinación de proteínas por el método de Pierce BCA.	78
Figura 4.1 Efectos de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en la migración celular de CEs y trofoblastos.	83
Figura 4.2 Efectos de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en la viabilidad celular de CEs y trofoblastos.	84
Figura 4.3 Efectos de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en la proliferación celular de CEs y trofoblastos.	84
Figura 4.4 Efectos de sFlt-1 en la producción de •NO en CEs y HTR-8/SVneo.	86
Figura 4.5 Efectos de sFlt-1 en la expresión de eNOS y p-eNOS en CEs y HTR-8/SVneo.	87
Figura 4.6 Efectos de sFlt-1 en la activación de eNOS en CEs y HTR-8/SVneo.	88
Figura 4.7 Detección de superóxido (O ₂ ⁻) en respuesta a sFlt-1 en CEs.	89
Figura 4.8 Efectos de sFlt-1 en los niveles de tetrahidrobiopterina (BH4) en CEs.	90
Figura 4.9. Efectos de sFlt-1 en la expresión de GTPCH-1 en CEs y HTR-8/SVneo.	91

Figura 4.10 Parámetros de OCR y ECAR para la estandarización de la densidad celular de HTR-8/SVneo.....	92
Figura 4.11 Estandarización de las concentraciones de las drogas a emplear en los ensayos de bioenergética mitocondrial de Seahorse en HTR-8/SVneo.	93
Figura 4.12 Efecto de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en la función bioenergética mitocondrial de CEs.	95
Figura 4.13 Efecto de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en la función bioenergética mitocondrial de HTR-8/SVneo.	97
Figura 4.14 Efectos en la actividad glucolítica de CEs expuestas a tratamiento con proteína rh sFlt-1.	98
Figura 4.15 Efectos de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en el fenotipo metabólico de CEs.....	100
Figura 4.16 Efectos de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en el fenotipo metabólico de trofoblastos.....	101
Figura 4.17 sFlt-1 ejerce cambios metabólicos que afectan la viabilidad y proliferación celular en CEs y HTR-8/SVneo.	105
Figura 4.18 Efectos de sFlt-1 en la formación de mROS en CEs.	107
Figura 4.19 Cambios en el Ψm inducidos por la administración exógena de sFlt-1 en CEs.	108
Figura 4.20 Efectos de sFlt-1 en la formación de mROS en HTR-8/SVneo.....	109
Figura 4.21 Cambios en el Ψm inducidos por la administración exógena de sFlt-1 en trofoblastos.	110
Figura 5.1 Niveles circulantes de sFlt-1 en sueros de pacientes en estudio.....	114
Figura 5.2 Efectos de la administración exógena de VEGF en la producción de $\bullet NO$ en CEs tratadas con sueros provenientes de pacientes normotensas y preeclámpticas.	115
Figura 5.3 Efectos de la administración de sueros provenientes de pacientes en estudio, en la actividad bioenergética mitocondrial de CEs.	117
Figura 5.4 Efectos de la administración de sueros provenientes de pacientes en estudio, en la actividad bioenergética mitocondrial de HTR-8/SVneo.	119
Figura 5.5 Cambios en la función bioenergética mitocondrial luego de la administración exógena de proteína rh VEGF al tratamiento con sueros de pacientes en CEs y trofoblastos.	122
Figura 5.6 Efecto de la administración exógena de proteína rh VEGF en la formación de mROS y en la disminución del Ψm , inducido por el tratamiento con sueros de pacientes en estudio en CEs.	123
Figura 5.7 Efecto de la administración exógena de proteína rh VEGF en la formación de mROS y en la disminución del Ψm , inducido por el tratamiento con sueros de pacientes en estudio en HTR-8/SVneo.....	124
Figura 5.8 Niveles circulantes de TNF- α en sueros de pacientes gestantes.	126
Figura 5.9 Efectos de TNF- α en la expresión y activación de eNOS en CEs y HTR-8/SVneo.	127
Figura 5.10 Efectos de TNF- α en la activación de eNOS en CEs y HTR-8/SVneo.	128
Figura 5.11 Efectos de la administración exógena de proteína rh TNF- α en la viabilidad y proliferación celular de CEs y HTR-8/SVneo.	129
Figura 5.12 Efecto de la administración exógena de proteína rh TNF- α en la función bioenergética mitocondrial de CEs.	131

Figura 5.13 Efecto de la administración exógena de rh TNF- α en la función bioenergética mitocondrial de HTR-8/SVneo.	133
Figura 5.14 Efectos de la administración exógena de proteína rh TNF- α en el fenotipo metabólico de CEs.....	136
Figura 5.15 Efectos de la administración exógena de proteína rh TNF- α en el fenotipo metabólico de HTR-8/SVneo.	137
Figura 5.16 Efectos de TNF- α en la formación de mROS en CEs y trofoblastos.	139
Figura 5.17 Cambios en el Ψ_m inducidos por la administración exógena de TNF- α en CEs y HTR-8/SVneo.....	140
Figura 5.18 Regulación de la producción de sFlt-1 mediada por VEGF en CEs y HTR-8/SVneo.	142
Figura 5.19 Regulación de la producción de TNF- α mediada por VEGF en CEs.	143
Figura 5.20 Regulación de la producción de sFlt-1 mediada por TNF- α en CEs y HTR-8/SVneo.	144
Figura 5.21 Regulación de la producción de TNF- α mediada por sFlt-1 en CEs.	145
Figura 6.1 Efectos de la administración de SEPI en el restablecimiento de la producción de •NO en CEs y HTR-8/SVneo expuestas a tratamiento con sFlt-1 y TNF- α	148
Figura 6.2 Efectos de la administración de SEPI en la expresión de eNOS y activación de eNOS (p-eNOS) expuestas a sFlt-1 en CEs.....	149
Figura 6.3 Efectos de la administración de SEPI en el restablecimiento de los niveles de tetrahidrobiopterina (BH4) en CEs expuestas a tratamiento con sFlt-1 y TNF- α	150
Figura 6.4 Efectos de la administración de SEPI en el restablecimiento de los niveles de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en CEs tratadas con sFlt-1.	151
Figura 6.5 Detección de ONOO $^-$ en CEs y trofoblastos tratados con sFlt-1, TNF- α y SEPI.	154
Figura 6.6 Efecto de la administración exógena de SEPI en la formación de mROS en modelo <i>in vitro</i> de PE, inducido por el tratamiento con sFlt-1 en CEs.	155
Figura 6.7 Efecto de la administración exógena de SEPI en la formación de mROS en modelo <i>in vitro</i> de PE, inducido por el tratamiento con TNF- α en CEs.....	156
Figura 6.8 Efecto de la administración de SEPI (50 μ M) en la función bioenergética mitocondrial de CEs en modelo <i>in vitro</i> de PE inducido por la administración de sFlt-1.	158
Figura 6.9 Efectos de la administración exógena de SEPI (50 μ M) en el restablecimiento del fenotipo metabólico de CEs expuestas a sFlt-1.	160
Figura 6.10 Efecto de la administración de SEPI (100 μ M) en la función bioenergética mitocondrial de CEs en modelo <i>in vitro</i> de PE inducido por la administración de sFlt-1.	163
Figura 6.11 Efectos de la administración exógena de SEPI (100 μ M) en el restablecimiento del fenotipo metabólico de CEs expuestas a sFlt-1.....	164
Figura 6.12 Efecto de la administración de SEPI (100 μ M) en la función bioenergética mitocondrial de HTR-8/SVneo en modelo <i>in vitro</i> de PE inducido por la administración de sFlt-1.	166
Figura 6.13 Efectos de la administración exógena de SEPI (100 μ M) en el restablecimiento del fenotipo metabólico de trofoblastos expuestos a sFlt-1.....	168
Figura 6.14 Efecto de la administración de SEPI (100 μ M) en la función bioenergética mitocondrial de CEs en modelo <i>in vitro</i> de PE inducido por la administración de TNF- α	170
Figura 6.15 Efectos de la administración exógena de SEPI (100 μ M) en el restablecimiento del fenotipo metabólico de CEs expuestas a TNF- α	173

Figura 6.16 Efecto de la administración de SEPI (100µM) en la función bioenergética mitocondrial de trofoblastos en modelo <i>in vitro</i> de PE inducido por la administración de TNF-α.	174
Figura 6.17 Efecto de la administración de SEPI (100µM) en la función bioenergética mitocondrial de trofoblastos en modelo <i>in vitro</i> de PE inducido por la administración de 50 ng/mL de TNF-α.	176
Figura 6.18 Restablecimiento de la función endotelial en modelo de correlación <i>in vitro</i> empleando sueros de pacientes en cultivo de CEs.	177
Figura 6.19 Cambios en la función energética mitocondrial luego de la administración de SEPI en modelo de correlación <i>in vitro</i> de PE establecido con el tratamiento con sueros de pacientes en CEs y trofoblastos.	179
Figura 6.20 Efecto de la administración de SEPI en la formación de mROS en modelo de correlación <i>in vitro</i> de PE establecido con el tratamiento con sueros de pacientes en estudio en CEs.	181
Figura 6.21 Efecto de la administración de SEPI en la formación de mROS en modelo de correlación <i>in vitro</i> de PE establecido con el tratamiento con sueros de pacientes en estudio en trofoblastos.	182
Figura 7.1 Representación esquemática de los posibles mecanismos moleculares a través de los cuáles SEPI restablece el fenotipo endotelial en el modelo <i>in vitro</i> de PE.	184
Figura 7.2 Función bioenergética mitocondrial de CEs tratadas con sFlt-1, SEPI y L-NAME.	187
Figura 7.3 Fenotipo metabólico de CEs tratadas con sFlt-1, SEPI y L-NAME.	189
Figura 7.4 Función bioenergética mitocondrial de CEs tratadas con sFlt-1, GTN y L-NAME.	192
Figura 7.5 Fenotipo metabólico de CEs tratadas con sFlt-1, GTN y L-NAME.	194
Figura 7.6 Viabilidad celular de CEs expuestas a diferentes concentraciones de MTX.	196
Figura 7.7 Función bioenergética mitocondrial de CEs tratadas con sFlt-1, SEPI y MTX.	198
Figura 7.8 Fenotipo metabólico de CEs tratadas con sFlt-1, SEPI y MTX.	200
Figura 8.1 sFlt-1 afecta la función endotelial en CEs y trofoblastos al reducir la biodisponibilidad de VEGF.	206
Figura 8.2 Señalización de VEGF y producción de •NO.	208
Figura 8.3 Posibles mecanismos moleculares mediante los cuales se explicaría la producción reducida de •NO en el modelo <i>in vitro</i> de PE con la administración exógena de sFlt-1.	211
Figura 8.4 VEGF falla en restablecer los niveles de tetrahidrobiopterina (BH4) en CEs tratadas con sFlt-1.	213
Figura 8.5 VEGF, como potencial agente regulador maestro de la producción de sFlt-1 y TNF-α.	229
Figura 8.6 Metabolismo de SEPI a tetrahidrobiopterina (BH4).	241

LISTA DE TABLAS

	Págs.
Tabla 1.1 Diferencias entre las concentraciones de •NO en diferentes estudios.....	36
Tabla 4.1 Contaje de CEs viables tratadas con sFlt-1 y expuestas a glucosa y galactosa.	103
Tabla 4.2 Contaje de HTR-8/SVneo viables tratadas con sFlt-1 y expuestas a glucosa y galactosa.	103
Tabla 5.1 Datos clínicos de las pacientes vinculadas al estudio.	113
Tabla 5.2 Niveles de OCR-Máximo en células CEs tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE, suplementados con VEGF.....	120
Tabla 5.3 Niveles de OCR-Reserva en células CEs tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE, suplementados con VEGF.....	120
Tabla 5.4 Niveles de OCR-Máximo en células HTR-8/SVneo tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE, suplementados con VEGF..	121
Tabla 5.5 Niveles de OCR-Reserva en células HTR-8/SVneo tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE, suplementados con VEGF. VEGF.	121
Tabla 6.1 Niveles de NO ₂ ⁻ determinados en sobrenadante de células CEs tratadas con sFlt-1, TNF-α y SEPI.	147
Tabla 6.2 Niveles NO ₂ ⁻ de determinados en sobrenadante de células HTR-8/SVneo tratadas con sFlt-1, TNF-α y SEPI.	148
Tabla 6.3 Niveles de ONOO ⁻ determinados en CEs.	152
Tabla 6.4 Niveles de ONOO ⁻ determinados en HTR-8/SVneo.	153
Tabla 6.5 Consumo de oxígeno (OCR) de células CEs tratadas con sFlt-1 y SEPI (100μM).....	162
Tabla 6.6 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de células CEs tratadas con sFlt-1 y SEPI (100μM).	162
Tabla 6.7 Consumo de oxígeno (OCR) de células HTR-8/SVneo tratadas con sFlt-1 y SEPI (100μM).	165
Tabla 6.8 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de células HTR-8/SVneo tratadas con sFlt-1 y SEPI (100μM).	167
Tabla 6.9 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de células CEs tratadas con TNF-α (50 ng/mL) y SEPI (100μM).	171
Tabla 6.10 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de células HTR-8/SVneo tratadas con TNF-α (50 ng/mL) y SEPI (100μM).	175
Tabla 6.11 Niveles de OCR-Máxima en células CEs tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE además de la suplementación de SEPI (100 μM).	178
Tabla 6.12 Niveles de OCR-Reserva en células CEs tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE además de la suplementación de SEPI (100 μM).	178
Tabla 6.13 Niveles de OCR-Máxima en células HTR-8/SVneo tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE además de la suplementación de SEPI (100 μM).	179
Tabla 6.14 Niveles de OCR-Reserva en células HTR-8/SVneo tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE además de la suplementación de SEPI (100 μM).	179
Tabla 7.1 Consumo de oxígeno (OCR) de CEs tratadas con sFlt-1, SEPI y L-NAME.....	185

Tabla 7.2 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de células CEs tratadas con sFlt-1, SEPI y L-NAME.....	188
Tabla 7.3 Consumo de oxígeno (OCR) de células CEs tratadas con sFlt-1, GTN y L-NAME.	191
Tabla 7.4 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de CEs tratadas con sFlt-1, GTN y L-NAME.	193
Tabla 7.5 Consumo de oxígeno (OCR) de células CEs tratadas con sFlt-1, SEPI y MTX.	196
Tabla 7.6 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de células CEs tratadas con sFlt-1, SEPI y MTX.....	197

LISTA DE ABREVIACIONES

2-DG:	2-desoxi-D-glucosa.
2-OH-E ⁺ :	2-hidroxietidio.
ACOG:	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists.</i>
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
AHA:	<i>American Heart Association.</i>
ARN:	Ácido ribonucleico.
ARNm:	ARN mensajero.
BAEC:	Células endoteliales aórticas bovinas.
BCA:	Ácido bicinconínico.
BH2:	7,8-dihidrobiopterina.
BH4:	(6R)-5,6,7,8-Tetrahidrobiopterina.
BMP9:	<i>Bone Morphogenic Protein 9.</i>
BSA:	Albúmina bovina.
CAT:	Catalasa.
CBA:	Boronato de cumarina.
CEs:	Células endoteliales.
cGMP:	Enzima guanilato monofosfato cíclica.
CMISL:	Clínica Materno Infantil San Luis.
CO:	Monóxido de carbono.
CO ₃ ⁻ :	Trióxido de carbono.
CRF:	Formato de reporte de caso.
CTB:	Citotrofoblastos.
CTE:	Cadena transportadora de electrones.
CTL:	Grupo de pacientes control no embarazadas.
DE:	Disfunción endotelial.
DETA NONOate:	Diethylenetriamine NONOate.
DHFR:	Dihidrofolato reductasa.
DM:	Disfunción mitocondrial.
DPBS:	<i>Dulbecco's Phosphate Saline Buffer.</i>
DTPA:	Ácido dietilen triamino pentaacético.
DTT:	Ditiotreitol.
e ⁻ :	electrones.
E ⁺ :	Etidio.
E ⁺ -E ⁺ :	Dímeros de etidio.
ECAR:	Tasa de acidificación extracelular.
EDTA:	Ácido etilen diaminotetraacético.
EGTA:	Ácido etilen glicol tetraacético.
ELISA:	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.</i>
Eng:	Endoglina.
eNOS:	Sintasa de óxido nítrico endotelial.
ET-1:	Endotelina-1.
FAAs:	Factores anti-angiogénicos.

FABP4:	Proteína de unión a ácidos grasos 4.
FAD:	Flavina adenina dinucleótido.
FCCP:	<i>Carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazina.</i>
FCV:	Fundación Cardiovascular de Colombia.
FDA:	Food and Drug Administration.
Flk-1/KDR:	Forma soluble del receptor 2 de VEGF.
FMN:	Flavina mononucleótido.
FPIs:	Factores pro-inflamatorios.
GC-MS:	Cromatografía de gas acoplado a espectrómetro de masas.
GLUT:	Transportadores de glucosa.
GTN:	Nitroglicerina.
GTPCH-1:	GTP ciclohidrolasa 1.
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno.
H4N:	Tetrahidroneopterina.
HBSS:	<i>Hank's Balanced Salt Solution.</i>
HClO ₄ :	Ácido perclórico.
HE:	Hidroxietidio.
HELLP:	<i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelet count.</i>
HIF-1 α :	Factor inducible por hipoxia 1 alfa.
HO-1:	Hemo oxigenasa 1.
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución.
HRP:	Peroxidasa de rábano.
HTR-8/SVneo:	Trofoblastos de las extra vellosidades de placenta aislados e inmortalizados a partir placentas de primer trimestre.
HUVEC:	Células endoteliales umbilicales humanas.
ICAM-1:	Molécula de adhesión celular 1.
iNOS:	Sintasa de óxido nítrico inducible.
IUGR:	Restricción del crecimiento intrauterino.
LC-MS:	Cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas.
L-NAME:	L ω -monometil-L-arginina éster.
L-NIO:	L-N5-(1-iminoethyl) ornithine dihydrochloride.
LPS:	Lipopolisacáridos.
MeOH:	Metanol.
MgSO ₄ :	Sulfato de magnesio.
MitoSOX Red:	C ₄₃ H ₃₄ N ₃ IP.
mROS:	Especies reactivas de oxígeno de origen mitocondrial.
MTT:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.
MTX:	Metotrexato.
Na ₃ VO ₄ :	Ortovanadato de sodio.
NAD ⁺ :	Nicotinamida adenina dinucleótido.
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno.
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NaF:	Fluoruro de sodio.
NaI:	Ioduro de sodio.
NaOH:	Hidróxido de sodio.

NK uterinas: Células *natural killer* uterinas.
 nNOS: Sintasa de óxido nítrico neuronal.
 •NO: Óxido nítrico.
 NO₂⁻: Nitritos.
 NO₃⁻: Nitratos.
 non-mitoOCR: Respiración no mitocondrial.
 NOR: Grupo de pacientes normotensas.
 NOS: Sintetasas de óxido nítrico.
 NRP 1 y 2: Neuropilinas 1 y 2.
 O₂: Oxígeno molecular.
 O₂^{•-}: Radical superóxido.
 OCR: Tasa de consumo de oxígeno.
 OCR-ATP: Consumo de oxígeno vinculado a la producción de ATP.
 OCR-Basal: Consumo de oxígeno basal.
 OCR-Máximo: Máximo consumo de oxígeno al complejo IV.
 OCR-Protones: Fuga de protones.
 OCR-Reserva: Reserva respiratoria.
 OH[•]: Radical hidroxil.
 OMS: Organización Mundial de la Salud.
 ONOO⁻: Peroxinitrito.
 P/E: Penicilina/estreptomicina.
 PBS: Buffer fosfato salino.
 PCR: Proteína C reactiva.
 PE: Grupo de pacientes preeclámpticas.
 PE: Preeclampsia.
 PFK-1: 6-fosfofructo-1-quinasa.
 PFKFB3: Fosfofructoquinasa-2/fructosa-2-6-bifosfatasa, isoenzima 3.
 PI-3K: Fosfatidilinositol-3 quinasa.
 PIGF: Factor de crecimiento placentario.
 PTPS: Piruvato tetrahidropterina sintasa.
 rh: Proteína recombinante humana.
 RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer.
 RNS: Especies reactivas de nitrógeno.
 ROS: Especies reactivas de oxígeno.
 Rot/AntA: Mezcla rotenona-Antimicina A.
 RPM: Revoluciones por minuto.
 RTK: Receptores tipo tirosina quinasas.
 RUPP: Reduced uterine perfusión pressure.
 SDS: Sodium dodecil sulfato.
 sEng: Forma soluble del receptor endoglina.
 SEPI: Sepiapterina.
 SFB: Suero fetal bovino.
 sFlt-1: Forma soluble del receptor 1 de VEGF o *soluble Fms-like tyrosine kinase-1*.
 sGC: Guanilato ciclasa soluble.

SI:	Sistema inmune.
SOD:	Superóxido dismutasa.
SR:	Sepiapterina reductasa.
STB:	Sincitiotrofoblastos.
sVEGFR-1:	Forma soluble del receptor 1 de VEGF o soluble Fms-like tyrosine kinase-1.
sVEGFR-2:	Forma soluble del receptor 2 de VEGF.
TAOC:	Capacidad antioxidante total.
TFA:	Ácido trifluoroacético.
TGF- β :	Factor de crecimiento transformante beta.
TGF- β 1:	Receptor beta 1 de TGF- β .
TGF- β 3:	Receptor beta 3 de TGF- β .
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral alfa.
VEGF:	Factor de crecimiento vascular endotelial.
VEGF-A:	Isoforma A de VEGF.
VEGF-B:	Isoforma B de VEGF.
VEGFR-1:	Receptor 1 de VEGF.
VEGFR-2:	Receptor 2 de VEGF.
WHA:	Wound Healing Assay.
Ψ_m :	Potencial de membrana mitocondrial.
$\Delta\Psi_m$:	Cambios en el potencial de membrana mitocondrial.

RESUMEN

La preeclampsia (PE) es una complicación cardiovascular asociada al embarazo, responsable del 8% de todos los eventos de morbi-mortalidad materna en el mundo. A pesar de su impacto a nivel global, no existe un tratamiento efectivo para la enfermedad. Diversas teorías soportan que un proceso de placentación defectuoso, seguido de un incremento desproporcionado de factores anti-angiogénicos (FAAs) circulantes, están implicados en la fisiopatología de la enfermedad. En condiciones normales, FAAs tales como la forma soluble del receptor-1 del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) o *fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1); regulan la señalización dependiente de VEGF. En PE, niveles aumentados de sFlt-1, conllevan a disfunción endotelial materna generalizada y compromiso multi-sistémico. Para entender mejor los mecanismos a través de los cuales, los FAAs afectan la función endotelial; se investigó el papel de sFlt-1 en el metabolismo de células endoteliales aórticas bovinas (CEs) y células trofoblásticas de las extra vellosidades de placenta (HTR-8/SVneo). En este estudio se demostró que sFlt-1 afecta la función bioenergética mitocondrial dosis dependientemente en CEs, conllevando a un cambio de fenotipo metabólico hacia glucólisis. En contraste, las células HTR-8/SVneo, demostraron poseer un metabolismo basal principalmente glucolítico. El impacto de sFlt-1 en la función bioenergética mitocondrial de trofoblastos, fue mucho menor que lo observado en CEs. Para confirmar el impacto de sFlt-1 en la mitocondria, se llevaron a cabo estudios de viabilidad y proliferación celular en presencia de galactosa, donde se forzó la obtención de energía a través de la maquinaria mitocondrial. Se demostró que sFlt-1 afecta la habilidad de las células de obtener sus demandas metabólicas a través de la mitocondria. Dada la necesidad de un tratamiento efectivo para PE, en esta investigación, se postuló el uso de sepiapterina (SEPI), como un potencial agente farmacológico en el tratamiento de la enfermedad. Se estudió el papel de SEPI para restablecer la función endotelial, afectada por sFlt-1. SEPI, molécula análoga y precursora del cofactor de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), denominado tetrahidrobiopterina (BH4), es un fármaco seguro de administrar durante el embarazo. SEPI restableció el fenotipo metabólico de CEs en el modelo *in vitro* de PE establecido con sFlt-1 y en el modelo de correlación *in vitro*, establecido con sueros provenientes de pacientes preeclámplicas. SEPI, limitó la formación de especies reactivas de oxígeno de origen mitocondrial (mROS) en CEs y trofoblastos. Los hallazgos de esta investigación proponen a SEPI como una potencial droga con habilidad pleiotrópica que favorece la biodisponibilidad de BH4/•NO y previene la formación de mROS. A través de esta investigación se propone el uso de SEPI para el tratamiento efectivo de PE, ya que demostró la capacidad de mejorar la función endotelial y metabólica en el modelo *in vitro* de PE.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is an often-fatal cardiovascular complication related to pregnancy, responsible of almost 8% of all pregnancy associated morbidity and mortality events worldwide. As the leading cause of maternal and neonatal deaths, PE is a challenge to public health. Despite its global impact, there is no current effective way of treatment available. Several theories support that a defective placentation followed by an aberrantly increase of circulating anti-angiogenic factors (AAFs) levels are implicated in PE physiopathology. In normal conditions, AAFs such as the soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) modulates vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. In PE, circulating sFlt-1 abnormally augmented levels, induce a multi-systemic damage and widespread maternal endothelial dysfunction. There is no current way of treatment to ameliorate AAFs detrimental effects in the maternal vasculature observed in PE. To better understand the mechanisms by which AAFs affect the endothelial function, we investigated the role of sFlt-1 on endothelial cells (ECs) and extravillous trophoblast immortalized cell line (HTR-8/SVneo) energy response. We found that sFlt-1 affected mitochondrial respiratory capacity and spare respiratory capacity in ECs in a dose dependent manner, leading to a metabolic phenotype switch to glycolysis. In contrast, HTR-8/SVneo, demonstrate a basal glycolytic metabolic profile. sFlt-1 did not disturb HTR-8/SVneo mitochondrial metabolic phenotype with the same impact as in ECs. To confirm the impact of sFlt-1 in mitochondria, cell viability assays forcing the cells mitochondrial metabolism with galactose, reveal an impaired cell ability to obtain the metabolic demands through mitochondria, induced by sFlt-1. Given the necessity of an effective treatment to PE, here, we postulate the use of sepiapterin (SEPI), as a potential therapeutic approach for PE. We studied the ability of SEPI to restore the endothelial function impaired by AAFs. SEPI, a precursor of eNOS' co-factor tetrahydrobiopterin (BH4), known to be safe during pregnancy, restored the metabolic phenotype switch induced by sFlt-1 in ECs and restored the reserve capacity and spare respiratory capacity in an *in vitro* model of PE induced by maternal preeclamptic serum. In addition, SEPI protected ECs and HTR8/SVneo cells from AAFs induced mitochondrial superoxide formation as detected by flow cytometry MitoSOX fluorescence. SEPI probably acting as a pleiotropic drug, enhance BH4/ $\bullet$ NO bioavailability and diminish mitochondrial superoxide formation. Our results demonstrate that AAFs are mitochondrial and bioenergetics disruptors in both, ECs and trophoblast cells. SEPI, by enhancing endothelial and mitochondrial function, is postulated a promising therapeutic drug to effectively treat PE.

Introducción

1.1 Preeclampsia: Problema de salud pública global

Una cifra estimada de 830 mujeres fallecen cada día a nivel mundial, debido a complicaciones asociadas al embarazo y al alumbramiento (1). El 99% de estas muertes ocurre en países en vía de desarrollo, lo cual refleja la inequidad socioeconómica existente en estas naciones, en comparación con países industrializados (1). Entre las principales causas de mortalidad materna se encuentran: a) sangrado post-parto, b) infecciones, c) complicaciones asociadas a abortos e, d) hipertensión durante el embarazo (1, 2). En Colombia, los desórdenes hipertensivos durante la gestación, son la principal causa de mortalidad materna y perinatal (3).

La preeclampsia (PE), es la complicación más enigmática del embarazo, debido a su efecto multi-sistémico (4). Se caracteriza por la aparición de hipertensión *de novo*, a partir de la semana 20 de gestación (5, 6), que generalmente se acompaña de proteinuria (7). Al momento, se estima que afecta del 2 al 8% de todos los embarazos a nivel mundial (8). La problemática en salud asociada a PE es más relevante en países en vía de desarrollo, donde la incidencia de hipertensión en el embarazo es alta. La tasa de mortalidad materna es veinte veces mayor que las reportadas en países desarrollados, lo cual convierte a PE en un desafío de alta prioridad en salud pública (9). En Latinoamérica, la morbilidad perinatal relacionada a PE puede llegar a cifras del 45%, mientras que la mortalidad se mantiene en entre el 1-33% (9).

La diversidad de condiciones que predisponen a PE parecen estar vinculadas a diferencias regionales, sociales y étnicas de cada población (10). En países desarrollados, es usual que se relacione con obesidad, resistencia a la insulina e hiperlipidemias (11). Mientras que en países de bajo y mediano ingreso, el estilo de vida poco saludable junto a la accesibilidad a dietas con alto porcentaje calórico, se relaciona fuertemente a la aparición de PE (12). La mayoría de estos factores de riesgo, se relacionan a un estatus nutricional materno deficiente, que impactan directamente en el desarrollo del feto (13) y en el crecimiento y desarrollo de la placenta (14). La liberación de factores placentarios (angiogénicos e inflamatorios) al torrente sanguíneo materno, de forma aumentada y desproporcionada, también se relacionan a la aparición de los síntomas de PE (15).

Clínicamente, la enfermedad se detecta por la aparición de hipertensión, que generalmente se acompaña de proteinuria, a partir de la segunda mitad del embarazo. Además, se asocia a otras manifestaciones clínicas como edema e hiperuricemia (7). En su inicio, la PE puede ser asintomática, con la presentación de algunos signos inespecíficos, tales como: dolor de cabeza, alteraciones visuales, edema en manos y pies, ganancia rápida de peso, entre otras (16). En

complicaciones más severas de PE, se denota la falla renal, edema y hemorragias cerebrales, convulsiones y fallo hepático entre las manifestaciones más resaltantes (16). Para el manejo de PE, se emplean generalmente medicamentos anti-hipertensivos. La administración intravenosa o intramuscular de sulfato de magnesio (MgSO_4) es la primera elección para la prevención y tratamiento de casos de PE (17). Sin embargo, ante situaciones en donde peligre la vida de la madre o el feto, el parto con el alumbramiento de la placenta resulta ser el procedimiento efectivo (18).

1.2 Enigma en la etiología de PE

1.2.1 Función de la placenta

A pesar de los múltiples esfuerzos para entender la etiología de PE, ésta sigue siendo desconocida (19, 20). En el embarazo normal, las primeras fases de la implantación mantienen al saco gestacional en un ambiente de relativa baja tensión de oxígeno (O_2), que favorece la proliferación de las células trofoblásticas (15). Durante el desarrollo de la placenta, el flujo sanguíneo materno hacia el espacio intermedio de las vellosidades coriónicas incrementa la tensión de O_2 (15). Este estallido de O_2 genera estrés oxidativo (21) y favorece la diferenciación de los trofoblastos proliferativos a trofoblastos invasores, permitiendo el intercambio de nutrientes y desechos entre la madre y el feto (15).

Los citotrofoblastos (CTB) fetales migran hacia la decidua materna e invaden la decidua (15) remodelando la capa de células endoteliales de las arteriolas deciduales (22, 23), estableciendo la interfase materno-fetal durante el primer trimestre de gestación. Este ambiente de relativa hipoxia conlleva a la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) en la placenta (15), que regula la expresión de genes inducibles por hipoxia (24). Hoy en día, se propone que la placenta es el órgano desencadenante de la PE (18, 25). Inclusive, se ha presentado la enfermedad con ausencia de feto (ejemplo: mola hidatiforme) (26-28). En casos severos de PE, se han observado evidencias patológicas de hipo-perfusión e isquemia del tejido placentario que se correlacionan con la severidad de la enfermedad (29).

1.2.2 Teoría de dos estadios en la aparición de PE

En PE, el proceso de migración e invasión trofoblástica está alterado (30), la remodelación deficiente de las arterias espirales maternas provoca que el flujo sanguíneo hacia la placenta sea escaso, afectando el suplemento de O_2 y nutrientes (15). **Figura 1.1.** Normalmente, los trofoblastos se adentran en el tejido materno y transforman los vasos sanguíneos uterinos a partir de estructuras de bajo calibre, a estructuras de mayor capacitancia (31). Esto permite aumentar el flujo de sangre hacia los tejidos fetales y promover el desarrollo y crecimiento de la placenta (31).

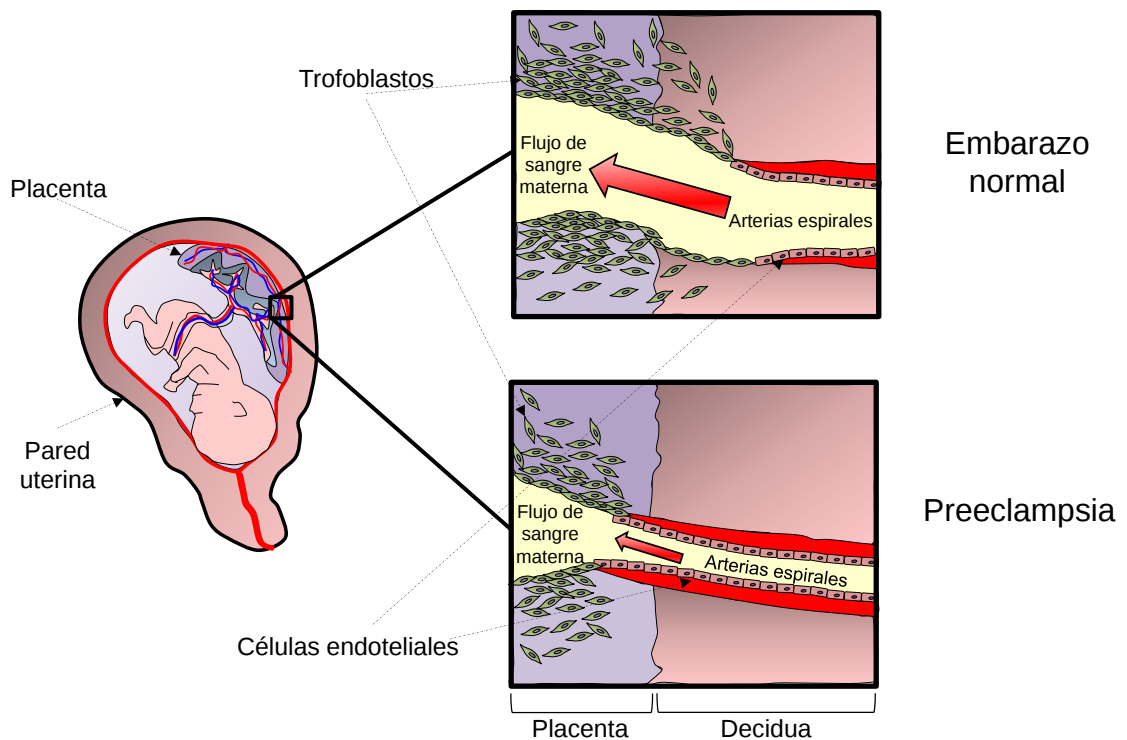


Figura 1.1 El escaso flujo sanguíneo materno hacia la placenta está asociado a una alterada invasión y migración de células trofoblásticas en PE (Primer estadio).

Zhou et al., 1993 y 1997; demostraron que en el desarrollo normal del embarazo, los CTB invasores adoptan un fenotipo endotelial al expresar moléculas de adhesión en su superficie celular, que les permite llevar a cabo un proceso de pseudo-vasculogénesis (32, 33). En PE, los CTB carecen de esa habilidad y con ello la invasión y remodelación de la túnica íntima de las arteriolas espirales maternas es insuficiente (33). Entre los factores que regulan este proceso; se encuentran mecanismos fisiológicos como la hipoxia (34) y la expresión e interacción de moléculas angiogénicas y sus receptores, tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento placentario (PlGF) y el receptor 1 de VEGF o soluble Fms-like tyrosine kinase 1 (VEGFR-1 o sFlt-1) (35). Además, las células natural killer uterinas (NK uterinas), presentes en la decidua materna, regulan la invasión trofoblástica y la remodelación vascular (36).

En base a lo anterior, el Dr. Christopher Redman en 1991 describió la “teoría de dos estadios” en el origen de PE (18). En su propuesta, Redman planteó que el primer estadio de la enfermedad incluiría una remodelación vascular deficiente de la decidua materna, que conllevaría a estados isquémicos/hipóxicos prolongados y con ello la placenta se presentaría como un órgano extremadamente hipóxico (18). A continuación, en un segundo estadio, la placenta liberaría una serie de factores placentarios al torrente sanguíneo materno (18), regulados por un incremento en la

expresión de genes inducidos por hipoxia (37), que en asociación a factores de riesgo poblacionales (10), conllevarían a la aparición de signos y síntomas de PE (18, 38, 39), incluyendo disfunción endotelial (DE) materna generalizada (38, 39).
Figura 1.2.

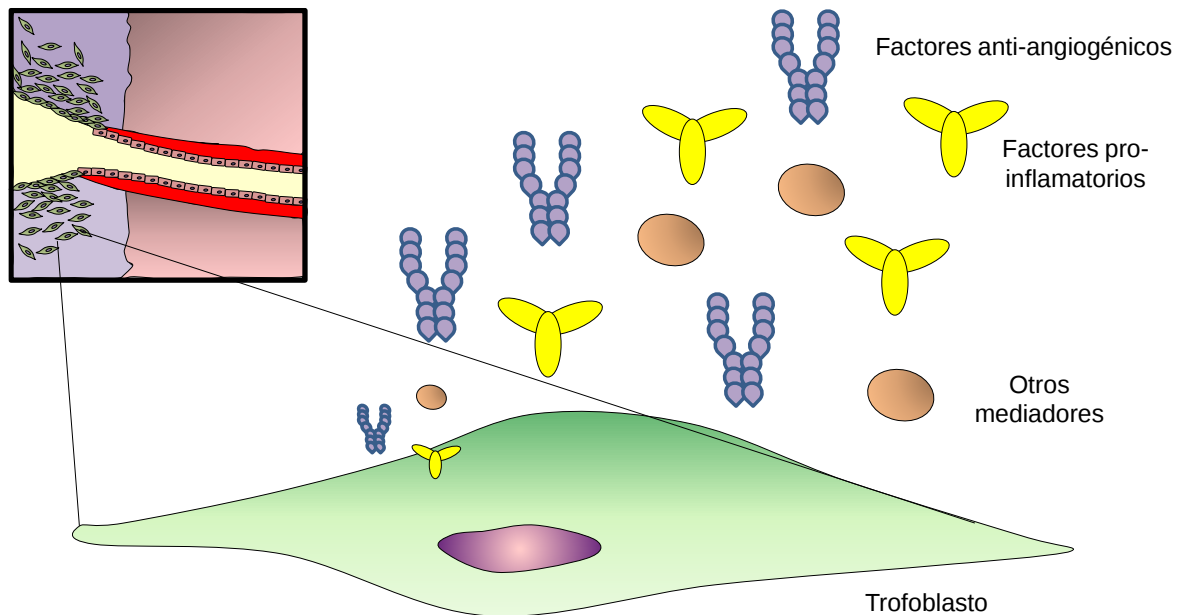


Figura 1.2 Las células trofoblásticas liberan una serie de factores placentarios al torrente sanguíneo en respuesta a un ambiente de extrema hipoxia en PE (Segundo estadio).

Se ha demostrado que la DE (40, 41) y el aumento de niveles circulantes de factores anti-angiogénicos (FAAs); tal como sFlt-1 y la forma soluble del receptor endoglina (sEng) del factor de crecimiento transformante beta ($\text{TGF-}\beta$), están involucradas en la patogénesis de PE (42-45). Por otra parte, se ha señalado un incremento en los niveles de moléculas pro-inflamatorias y citoquinas en placentas mujeres preeclámpicas (46), lo cual sugiere una relación del estatus inmunológico materno en el inicio y/o desarrollo de PE (47).

1.3 Señalización de VEGF y $\text{TGF-}\beta$. Papel de los FAAs y su relación con PE

1.3.1 VEGF

La angiogénesis es un proceso de generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de estructuras pre-existentes (48), que permite la formación y crecimiento de un nuevo organismo durante el embarazo (49, 50). Como fue comentado anteriormente, el desarrollo de la placenta cursa con períodos de isquemia o hipoxia relativa mediados por $\text{HIF-1}\alpha$ (15), este evento favorece la transcripción VEGF (51, 52). Por otra parte, VEGF ha demostrado ser un factor de supervivencia de células endoteliales (CEs) (53). La activación de las rutas de señal dependientes de VEGF,

dependen de su interacción con diversos receptores celulares; entre los cuales se encuentran:

- VEGFR-1 o Flt-1 (fms-like tyrosine kinase 1) y el receptor 2 de VEGF (VEGFR-2) o KDR (kinase domain region): Flt-1 y KDR son receptores tipo tirosina quinasas (RTKs) (54). Flt-1 ha demostrado que es activado débilmente en respuesta a VEGF (55), por lo que se ha postulado como un receptor secundario, que favorece la activación del receptor KDR (56). Por su parte, KDR se considera el mayor modulador de la actividad de VEGF (54), su fosforilación permite la activación de fosfolipasa C- γ (57), fosfatidilinositol-3 kinasa (PI-3K) (58), proteínas Ras GTPasa (59) y proteínas de la familia Src (60).
- VEGFR-3: Este receptor se encuentra principalmente en el endotelio venoso, asociado a VEGFR-2, en etapas iniciales del desarrollo embrionario. Finalmente en tejido adulto, se encuentra en el endotelio linfático (61).
- Neuropilinas 1 y 2 (NRP 1 y 2, respectivamente; Estos funcionan como co-receptores de KDR, para potenciar la señalización de VEGF, favoreciendo la sobrevivencia, quimiotaxis de CE y angiogénesis (62). **Figura 1.3.**

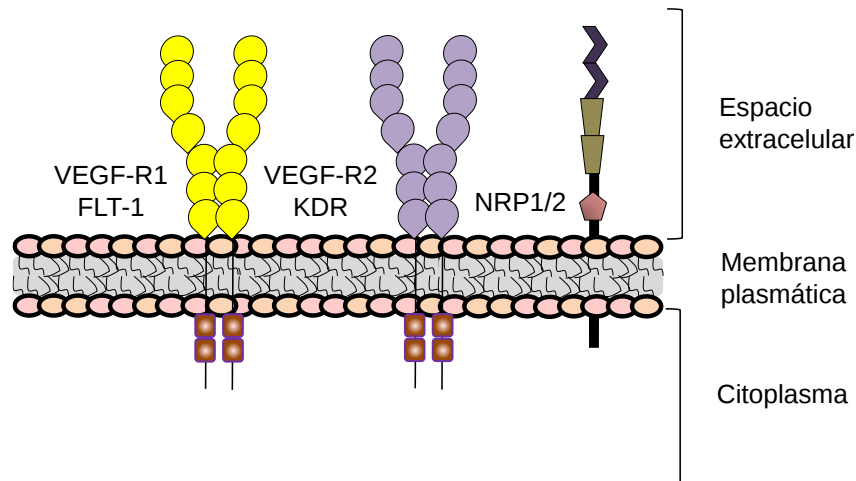


Figura 1.3 Principales receptores celulares de VEGF. VEGF-R1/FLT-1: Receptor 1 del factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF-R2/KDR: Receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial. NRP1/2: Neuropilinas 1 y 2.

Los FAAs, al antagonizar la señalización dependiente de VEGF (63), afectan negativamente la relajación microvascular en el tejido renal (64), aumentan los niveles de la molécula de adhesión celular 1 (ICAM-1), endotelina 1 (ET-1), factor de von Willebrand, y llevan a la disminución de la fosforilación de PKB (Protein kinase B) o Akt, en el residuo de serina 473 y de la fosforilación de la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) en el residuo de serina 1177 (65). Por otra parte,

el antagonismo de VEGF, también impacta en la vía de señalización de las MAP quinasas (Mitogen-Activated Protein Kinases) también conocida como la señalización de Raf-Mek-Erk y en la activación de la vía del fosoinositol 3-quinasa/Akt (PI-3K/Akt), afectando el crecimiento y proliferación del endotelio (66). Una función importante de VEGF corresponde a la inducción de relajación vascular dosis dependiente, como producto del incremento en la producción de óxido nítrico ($\bullet$ NO) y de la expresión de eNOS (67, 68).

1.3.2 sEng

La forma soluble del receptor endoglina (sEng) del factor de TGF- β , también actúa indirectamente como un importante antagonista en la señalización dependiente de los receptores de TGF- β (receptores II (T β RII) y receptor tipo 1 ALK5) en CEs (69). Ambos receptores actúan en forma de complejos y son influenciados por moléculas de endoglina (Eng) adheridas a la membrana celular, capaces de interactuar con varias moléculas de la superfamilia de TGF- β (69). De esta manera, Eng puede estimular y/o inhibir varias respuestas en la señalización de TGF- β actuando como ligando o como receptor (70).

Normalmente, la activación de los receptores T β RII y ALK5 permiten la fosforilación y activación de cascadas de señalización intracelular que permite la activación de proteínas SMAD 1,5,8 en CEs (69). Estas SMADs forman complejos con moléculas co-SMADs que se acumulan en el núcleo para participar como factores de transcripción en la regulación de la expresión génica (69). A pesar que sEng ha sido considerada como antagonista en la señalización de TGF- β , estudios *in vitro* que emplearon sEng recombinante y la forma soluble del T β RII, indican que sEng tiene un efecto débil en el bloqueo de la fosforilación de SMADs 1,5,8 (70). Por otra parte, sEng también bloquea la activación de BMP9 (Bone Morphogenic Protein 9) y la consecuente fosforilación de SMADs 1,5,8 por esta vía, demostrando su habilidad de interferir con la señalización de la superfamilia de TGF- β vía BMP9. Bajo esta premisa, sEng al antagonizar con BMP9 es capaz de afectar la función vascular (70).

1.4 FAAs y su función en PE

Un área de extensa investigación en la patogénesis de PE, involucra el estudio de la vía de señalización dependiente de VEGF (42, 64, 71-74), debido a que su señalización es necesaria para función endotelial normal, angiogénesis y crecimiento celular durante el embarazo (49, 50). Un ligero desbalance en su señalización, puede desencadenar efectos sistémicos. Estos efectos se han demostrado en otros escenarios, por ejemplo ante ciertos tipos de cáncer, en donde se emplea el bevacizumab (antagonista de VEGF isoforma A (VEGF-A) como tratamiento, los pacientes han mostrado el desarrollo de signos de hipertensión y proteinuria (75). Asimismo, estudios *in vivo* en ratones, han demostrado que el

silenciamiento de un alelo de VEGF-A resulta en degeneración progresiva del endotelio, que es fatal a los 11-12 días de vida (76). Por otra parte, en lo concerniente a la señalización de TGF- β , se ha mostrado que mutaciones en el gen ENG que codifica para sEng, resultan en malformaciones vasculares (77), desarrollo insuficiente de la musculatura lisa vascular y arresto de la remodelación endotelial (78), control de la invasión y migración de trofoblastos (79). Estas observaciones muestran la implicación de las vías de señal dependientes de VEGF y TGF- β en el funcionamiento correcto del sistema vascular, incluso durante el embarazo.

En el embarazo normal, los niveles circulantes de sFlt-1 aumentan progresivamente mientras avanza la edad gestacional (64) y junto a VEGF, regulan el complejo proceso de angiogénesis (80). En general, el incremento de los niveles de FAAs en el embarazo tiene el efecto de aumentar el tono vascular materno y mantener la perfusión uterina normal (15), actuando también como un regulador angiogénico (80). En PE, los niveles circulantes de sFlt-1, se encuentran significativamente elevados, comparado con mujeres normotensas (45, 81-83) debido a mecanismos aún desconocidos (84). sFlt-1, antagoniza la señalización de VEGF e incrementa la sensibilidad de CEs a moléculas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (65). sFlt-1 también puede alterar los efectos vasodilatadores de VEGF mediados por la producción de $\bullet$ NO (15), lo cual resulta en hipertensión (81). De hecho, los niveles circulantes de sFlt-1 se correlacionan adversamente con los niveles plasmáticos de nitritos en PE (85) **Figura 1.4.**

Por otra parte, los niveles circulantes de sEng también aumentan en suero de mujeres preeclámpticas y este incremento se correlaciona con la severidad de la enfermedad (42, 70). Para estos efectos, la placenta juega un papel importante en la producción de sEng (42, 70). En PE, se ha identificado que los niveles circulantes de sEng aumentan en mujeres preeclámpticas de 8 a 10 semanas antes de la aparición de síntomas (45). Las implicaciones moleculares de este aumento en los niveles de sEng conllevan al antagonismo en la señalización dependiente de TGF- β 1 y TGF- β 3 (69) y a la disminución de la activación de eNOS (42).

En PE existen niveles significativamente más elevados de sFlt-1 en plasma/suero de pacientes con este trastorno, con respecto a mujeres normotensas (45, 81, 86), junto a bajos niveles circulantes de; VEGF libre (71, 82, 87) y del PIGF (82, 86, 88). Para entender el papel de sFlt-1, VEGF y PIGF en la aparición de PE, un estudio *in vitro* que empleó sueros de pacientes normotensas y preeclámpticas, demostró que el suero de pacientes preeclámpticas conlleva a efectos anti-angiogénicos, observado mediante la inhibición de la formación de tubos (ensayo *in vitro* de angiogénesis); mientras que el empleo de VEGF y PIGF recombinante, demostró el restablecimiento de la angiogénesis (81). Por otra parte, en modelos animales con sobreexpresión del gen sFlt-1 murino (empleo de vector adenoviral para la transferencia génica del gen de sFlt-1), se encontró hipertensión, proteinuria y endoteliosis glomerular capilar (81), signos característicos de PE (7). Finalmente, ya que la placenta es el principal órgano productor de sFlt-1 (25), en PE, los niveles

de mRNA sFlt-1 *in situ* se encuentran elevados comparados a tejidos de mujeres normales (25). El aumento de la biodisponibilidad de sFlt-1 en PE, tiene efectos en el tejido renal, que conllevan a proteinuria al bloquear los efectos de VEGF (81).

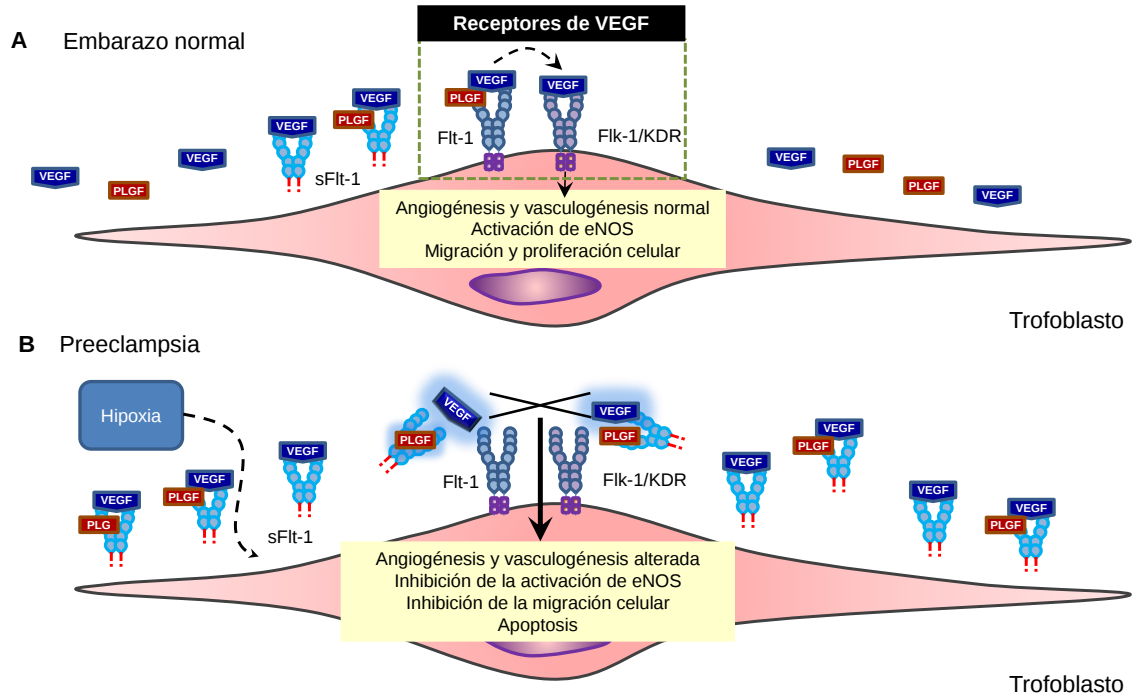


Figura 1.4 Papel de los factores anti-angiogénicos en PE (11). A: Flt-1 y KDR son receptores de VEGF tipo tirosina quinasa (RTKs) involucrados en el proceso angiogénico. sFlt-1 en condiciones normales, regula la señalización de VEGF. B: En condiciones hipóxicas, elevadas concentraciones de sFlt-1 (forma soluble del receptor Flt-1) compiten y antagonizan con VEGF y el PLGF, interfiriendo con el enlace de estos ligandos por sus receptores; Flt-1 y KDR. Figura tomada y adaptada de: Sanchez-Aranguren LC, Prada CE, Riano-Medina CE, Lopez M. *Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. Frontiers in physiology.* 2014;5:372. Epub 2014/10/28.

Además de sFlt-1, la implicación de sEng en PE resulta de la observación de niveles elevados de sEng en sangre de mujeres preeclámpticas (42, 45). Estudios *in vivo* en un modelo animal con sobreexpresión de sEng (con el empleo de adenovirus como vectores de transfección) mostraron el desarrollo de signos clínicos de PE (42). Además, estudios *in vitro* con sEng recombinante muestran que esta proteína causa inhibición del ensayo de formación de tubos, lo cual da evidencia del impacto de este sEng en la función vascular normal y su implicación en PE (42). Estas observaciones reiteran el impacto que las moléculas anti-angiogénicas tienen en la instauración de la fase sintomática de PE.

1.5 Factores pro-inflamatorios en PE

Función de TNF- α

El embarazo se considera un proceso inmune complejo, en donde la madre tolera inmunológicamente al feto a través de la gestación (89, 90). Un desbalance en este delicado proceso inmune puede afectar la invasión trofoblástica (91, 92); proceso clave en la aparición de PE (30). En PE, hay una activación aumentada de células inmunes (93). Se ha demostrado que un desbalance en la señalización del sistema inmune (SI), que implica el aumento de los niveles circulantes de factores pro-inflamatorios (FPIs) como TNF- α (94), juegan un papel en la proliferación, migración e invasión trofoblástica en PE (95). La PE, se ha asociado a una respuesta inflamatoria excesiva, que involucra un aumento en producción de citoquinas pro-inflamatorias de la respuesta inmune tipo Th1, tal como TNF- α (96) y una reducida respuesta inmune de tipo Th2 (97), tal como IL-10. Estos cambios conllevan a una alteración del balance Th1/Th2, favoreciendo una respuesta predominantemente de tipo Th1 en PE (96, 98); mientras que los embarazos normales se caracterizan por una respuesta preferentemente de tipo Th2 (99). La respuesta tipo Th1 en PE, conlleva a una menor tolerancia del SI materno por el nuevo ser vivo en formación, que resulta en una invasión trofoblástica deficiente y placentación alterada (91, 92).

TNF- α es producido principalmente por macrófagos y monocitos en respuesta a la activación del SI (100). En relación al embarazo, TNF- α es producido por células de las vellosidades coriónicas, por CTB, sincitiotrofoblastos (STB) y trofoblastos invasivos de la placenta (101). Se ha demostrado en estudios *in vivo* en ratones, que la infusión de TNF- α resulta en un incremento en los niveles de presión arterial y proteinuria (102). En mujeres preeclámpticas, los niveles de TNF- α están aumentados (94, 103). Además, otros FPIs, tal como la proteína C reactiva (PCR) también están aumentados en PE (104, 105). Incluso, estudios con explantes de placentas, han demostrado un incremento en los niveles de sFlt-1 (106, 107) y TNF- α (108-110) bajo condiciones que simulan PE. Un reporte, de Xu et al., 2009 indica que sFlt-1 favorece la producción de TNF- α en tejido placentario (98). Otros reportes han postulado que el antagonismo de VEGF mediado por sFlt-1 en CEs, genera mayor sensibilidad de estas células a FPIs (65).

1.6 Estrés oxidativo en PE

Cuando las defensas antioxidantes de los tejidos no son capaces de sobreponerse a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), resulta en estrés oxidativo (111). Durante el embarazo normal, hay producción de ROS como condición fisiológica (112). Sin embargo, en PE, el incremento en la producción de ROS resulta en estrés oxidativo y se considera un factor determinante en la fisiopatología de la enfermedad (113, 114). Los períodos intermitentes isquemia/reperfusión e hipoxia relativa, en las placentas preeclámpticas ocasionan un incremento en la

producción de ROS (114, 115), que conllevan a peroxidación de lípidos (114, 116), aumento en la formación de isoprostanos (productos de oxidación del ácido araquidónico) y reducción de las defensas antioxidantes en PE (114, 117).

El estrés oxidativo causa alteraciones covalentes post-transcripcionales en proteínas, ADN (118) y lípidos (119); lo cual conlleva a cambios estructurales y funcionales en las proteínas y lípidos (119). La existencia de ROS durante el embarazo normal es un hecho (120), lo cual indica que un desbalance de las defensas antioxidantes naturales, es probablemente un mecanismo fisiopatológico implicado en PE (121). Consistentemente, concentraciones elevadas de tioredoxina-1 (proteína sensitiva a cambios redox), está asociada a un aumento en el estrés oxidativo en mujeres embarazadas (122). Otros marcadores de estrés oxidativo como el malondialdehído (marcador de peroxidación lipídica), se han encontrado elevados en suero de pacientes preeclámpticas, medidos entre las semanas de gestación 10-14 y de la 20-24; estos hallazgos indican que existen cambios que favorecen el estrés oxidativo, incluso antes de la aparición de síntomas de PE (123).

La administración exógena de sFlt-1 en modelos animales establecido en ratas embarazadas, conlleva a un incremento en la producción de ROS e hipertensión (124). Recientemente, en un modelo murino con administración exógena de sFlt-1, se asoció a este FAAs con estrés oxidativo y apoptosis, los investigadores demostraron que tras la administración de sFlt-1, se presentaban cambios histológicos en la mitocondria de células trofoblásticas y aumento de marcadores pro-apoptóticos; lo cual sugirió que sFlt-1 juega un papel importante en el estrés oxidativo y apoptosis en trofoblastos (125). Además de la determinación de estrés oxidativo y el daño que esto acarrea en los tejidos, muchos investigadores han evaluado la capacidad antioxidante en la circulación materna, al determinar la concentración de antioxidantes específicos o la actividad de enzimas antioxidantes (126). Sin embargo, los métodos de determinación no son siempre posibles de ser comparados y podrían no representar el verdadero estatus antioxidante materno (126). Esto ha permitido que exista cierta ambigüedad en los hallazgos, pero el consenso sugiere que la capacidad antioxidante en la circulación materna, está disminuida (126). El glutatión, es ampliamente reconocido como el mayor antioxidante intracelular y ha sido analizado en sangre a través de diversas metodologías (127). Las mujeres con PE reportan concentraciones en plasma más bajas de glutatión en comparación con pacientes normotensas (128) y menores niveles de la razón glutatión:hemoglobina, al comparar también con pacientes normotensas (129).

1.7 Preeclampsia: una enfermedad de origen metabólico

El desarrollo de un nuevo ser vivo es un proceso metabólico dinámico (130). En los embarazos normales, existen dos etapas metabólicas (130); la primera, ocurre

durante los dos primeros tercios del embarazo. En ésta, el crecimiento del feto no es tan marcado, en comparación el proceso de diferenciación y organogénesis, que son dominantes (130). El metabolismo materno durante la primera etapa es principalmente anabólico, dirigido a almacenamiento de nutrientes; esto ha sido evidenciado por la acumulación de tejido graso (131). En la segunda etapa; que ocurre durante el tercer y último tercio del embarazo, el crecimiento del feto es rápido. Este crecimiento acelerado del feto, ocurre debido a un cambio en el metabolismo materno, a un metabolismo principalmente catabólico, para permitir la transferencia de nutrientes al feto, a través de la placenta (130). En esta segunda etapa metabólica, existe un incremento del desdoblamiento de lípidos almacenados, aumento en la cetogénesis y gluconeogénesis, principalmente en condiciones de donde la ingesta alimenticia es reducida (132). El balance metabólico durante el embarazo está idealmente diseñado para permitir un suplemento continuo de nutrientes al feto y la placenta, incluso en condiciones cuando la ingesta de alimentos por parte de la madre es limitada (130).

Hoy en día, en países de bajo y mediano ingreso, el desenfrenado acceso a dietas poco saludables y a alimentos de porcentaje calórico elevado y altos en grasas, ha contribuido a desregulación metabólica y a obesidad materna (12). El estatus nutricional materno es muy importante durante la gestación, ya que predispone a la aparición de enfermedades metabólicas como la diabetes gestacional (133). La nutrición materna tiene un impacto directo en la placenta y en la salud del feto en etapas post-parto, más adelante en su vida adulta (13). Basado en esta propuesta, Barker et al., 1986 propuso la teoría del “*Thrifty phenotype*”, que postula que una nutrición deficiente en etapas tempranas de la vida, conllevaría a cambios permanentes en el metabolismo de los individuos en su vida adulta (13). Esta teoría relaciona a un crecimiento fetal restringido o limitado con la aparición de enfermedades metabólicas en esos individuos más tarde, en su vida adulta. Todo esto como resultado de adaptaciones que el feto durante su desarrollo, adquiere en respuesta a un limitado suplemento de nutrientes.

1.7.1 Papel de la mitocondria en PE

La mitocondria, considerada la principal maquinaria energética celular (134), tiene una función determinante en la aparición de enfermedades cardiovasculares (135) y en complicaciones en el embarazo, tal como PE (136). Torbergson et al. 1989, fueron los primeros en reportar una elevada incidencia de PE, en una familia a la cual se le había diagnosticado disfunción mitocondrial (DM) (137). Esta observación, conllevó a la hipótesis de que la fisiopatología de PE estaría asociada a la función mitocondrial (138).

Por otra parte, el proceso de diferenciación de trofoblastos en etapas tempranas del embarazo, junto a la invasión trofoblástica hacia el endometrio materno, es un proceso que consume gran cantidad de energía, esto implica la migración celular y

síntesis de proteínas (138). Por lo tanto, un defecto en el proceso de obtención de energía en los trofoblastos, podría afectar gravemente el proceso de placentación normal durante el embarazo (138). Estudios funcionales y morfológicos han demostrado una asociación entre la mitocondria y PE; en mujeres preeclámpticas se evidenciaron cambios histológicos en mitocondrias de CEs, con pérdida de las crestas mitocondriales, estos cambios son sugestivos de un desorden sistémico de tipo metabólico (139). Otros investigadores han reportado una disminución de la actividad (140) y expresión de ARN mensajero (141) de citocromo c oxidasa (complejo IV) de la cadena transportadora de electrones (CTE) en placentas provenientes de mujeres preeclámpticas, en comparación a aquellas provenientes de mujeres normotensas (140).

Un estudio de Illsinger et al. 2010, demostró una asociación entre DM, PE y síndrome de hemólisis, elevados niveles de enzimas hepáticas y recuento plaquetario disminuido o síndrome “HELLP” (Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelet count, por sus siglas en inglés) en un estudio *in vitro* con células endoteliales umbilicales humanas (HUVEC, “Human Umbilical Vein Endotelial Cells por sus siglas en inglés). Este estudio demostró una reducción en las enzimas de la CTE y en las involucradas en la oxidación de ácidos grasos en la unidad feto-placentaria (142). Por otra parte, la mitocondria es considerada una de las mayores fuentes de producción de ROS en las células (136, 143). Los ROS de origen mitocondrial (mROS), podrían conllevar a la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) y con ello exacerbar defectos en respiración mitocondrial, que a su vez promoverían mayor acumulación de mROS y estrés oxidativo en la mitocondria (143). También, se ha demostrado que en PE, existen cambios degenerativos indicativos de apoptosis en placentas (136), así como en STB (144) en comparación con tejido proveniente de mujeres normotensas (136, 144).

1.7.2 Mitocondria y FAAs

Entre los factores angiogénicos asociados a la función mitocondrial, se encuentra VEGF (145). Se ha demostrado que VEGF promueve el metabolismo mitocondrial con la subsecuente formación de ROS, para soportar la migración de células HUVEC. En un estudio de Wright et al. 2008, se empleó una concentración de VEGF de 20 ng/mL y se determinó que el efecto de VEGF ocurre vía Akt (homólogo Akt3) (145). Se ha demostrado que la homeostasis de VEGF activa la señalización de PI-3K/Akt, resultando en la inhibición de la apoptosis por vía intrínseca mitocondrial (146). Estas observaciones de Chen et al., 20016, demostraron que VEGF juega un papel crucial en el mantenimiento de la viabilidad celular, en aquellas células que están expuestas a periodos de isquemia/reperfusión (146).

Recientemente, un estudio *in vivo*, en ratones, demostró que la infusión exógena de sFlt-1 conduce a los bien definidos signos clínicos de PE, tal como; hipertensión y proteinuria (125). Además, demostraron que sFlt-1 induce cambios histológicos en

la mitocondria detectados por microscopía electrónica, junto a un aumento en marcadores de apoptosis en el tejido placentario (125). Hasta el momento, no se ha comprobado si sFlt-1 o en su defecto, la disponibilidad de VEGF, pueden conllevar a cambios o perturbaciones metabólicas tempranas en la mitocondria que promuevan la DE y con ello la aparición de la enfermedad.

1.8 Disfunción endotelial en PE

Durante el embarazo normal ocurren variaciones hemodinámicas, existe aumento del volumen sanguíneo y del gasto cardíaco, con disminución en la resistencia vascular (147). El funcionamiento apropiado del endotelio, involucra la producción de óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) y la habilidad de esta molécula de llegar a su receptor intracelular, la guanilato ciclasa soluble (sGC) que a su vez activa la enzima guanilato monofosfato cíclica (cGMP), bloqueando la entrada de calcio (Ca^{2+}) al sarcómero, permitiendo la relajación del músculo liso (148). El $\bullet\text{NO}$ se genera enzimáticamente por las sintasas de óxido nítrico (NOS), familia de enzimas que catalizan la reducción de 9-electrones (e^-) de L-arginina a $\bullet\text{NO}$, L-citrulina y agua (149).

Al momento, tres isoformas de NOS han sido identificadas, caracterizadas y clonadas y se han nombrado de acuerdo al tejido en donde fueron originalmente identificadas (150);

- Dos isoformas, la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS) que se expresan constitutivamente (150). Ver representación esquemática de eNOS en la **Figura 1.5**.
- La forma inducible (iNOS), identificada en macrófagos es inducida por citoquinas y productos bacterianos; por ejemplo: lipopolisacáridos (LPS) (150).

La nNOS y la eNOS están reguladas por el flujo de Ca^{2+} en el citoplasma, lo cual resulta en concentraciones nanomolares a picomolares de $\bullet\text{NO}$ (150). Se ha demostrado que además de la función vasodilatadora, el $\bullet\text{NO}$ juega un papel central en la implantación del blastocisto y la diferenciación, motilidad e invasión de las células trofoblásticas (33). El papel del $\bullet\text{NO}$ en PE no ha sido definido como en otros sistemas vasculares; los niveles plasmáticos, séricos y urinarios de nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-), representativos de la disponibilidad de $\bullet\text{NO}$, son variables y controversiales (11). Con respecto al cGMP, en PE se han identificado niveles disminuidos en plasma y orina con respecto a mujeres normotensas (151).

En PE, las manifestaciones clínicas de la enfermedad y los hallazgos de *estudios in vitro* e *in vivo*, reflejan una pérdida de la función endotelial materna (64, 81). Se ha propuesto de la DE en PE está mediada por diversas moléculas, entre ellas el factor de von Willebrand (152), fibronectina celular (153), endotelina-1 (154), entre otras.

En estudios *in vivo* se encontró que existe una relajación vascular alterada, dependiente del endotelio, en vasos sanguíneos maternos (155). Además, se ha demostrado que sFlt-1 es capaz de alterar la biodisponibilidad del $\bullet\text{NO}$, al antagonizar la señalización dependiente de VEGF (63), que es capaz de inducir la transcripción y síntesis de eNOS (156) y la activación de eNOS vía fosforilación del residuo de serina 1177 (65). Entre otros FAAs, la sEng, al igual que sFlt-1, cooperan para inducir DE *in vitro* y PE *in vivo* (42).

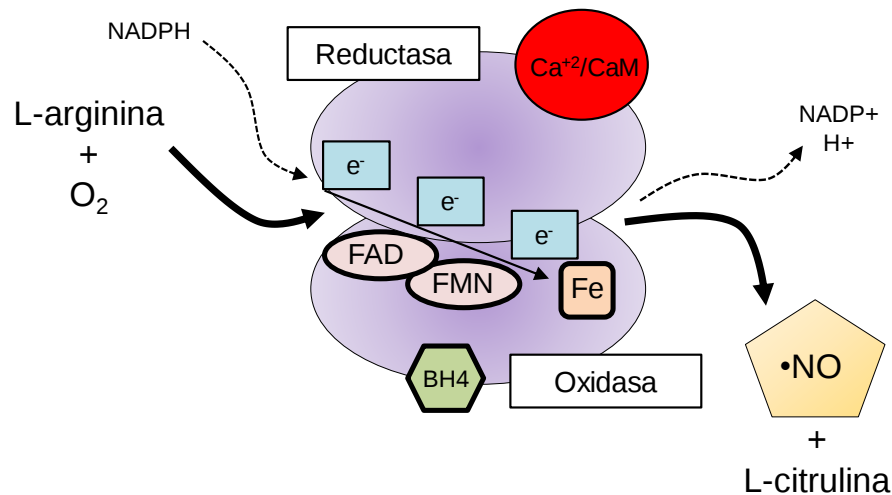


Figura 1.5 Representación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). La L-arginina es el sustrato enzimático que en presencia de oxígeno y los co-factores enzimáticos; NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, FMN/FAD: Flavina mononucleótido/Flavina adenina dinucleótido, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$: Calcio/calmodulina y BH_4 : Tetrahidrobiopterina, facilitan la transferencia de electrones (e^-) del dominio reductasa al dominio oxidasa de eNOS y con ello la formación de L-arginina y óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$).

1.9 Función del óxido nítrico en PE

La función del $\bullet\text{NO}$ en PE no ha sido tan bien establecida como en otros modelos patológicos (11). Los resultados obtenidos de estudios que han detectado niveles de $\bullet\text{NO}$ en plasma, suero y orina de mujeres con preeclampsia son controversiales y variables (11). Al momento, se han reportado niveles de $\bullet\text{NO}$ en diferentes fluidos corporales, como plasma, suero u orina; medidos a través de técnicas desde colorimétricas hasta quimioluminiscentes (13). Tal como se resume en la **Tabla 1**, diversos grupos de investigación han reportado diferentes niveles de NO_3^- y NO_2^- . Los resultados varían entre estudios y a través del tejido o fluidos empleados para el estudio. A pesar de estas discrepancias, en líneas generales, muchos estudios apuntan a que los niveles de $\bullet\text{NO}$ se encuentran disminuidos en PE, otros indican que no existen diferencias, mientras que otros han reportado niveles aumentados en comparación a los medidos en mujeres normotensas (**Tabla 1**).

Estudios de cohorte llevados a cabo en México y Brasil, demostraron que los niveles plasmáticos de •NO en mujeres preeclámpticas son significativamente mayores que en mujeres normotensas (157, 158). En contraste, estudios *in vitro* en CEs cultivadas con sueros provenientes de pacientes preeclámpticas indicó que la expresión de iNOS en respuesta a suero preeclámptico fue significativamente mayor en comparación a la respuesta vista en pacientes normotensas (159). Otros estudios han propuesto que la expresión y actividad de eNOS en CEs expuestas a plasma de mujeres preeclámpticas, fue significativamente mayor con respecto a las determinaciones en células expuestas a plasma de mujeres normotensas (160, 161). Además, tal como ya ha sido indicado, el desacoplamiento de eNOS ha sido demostrado como una fuente importante de producción de ROS, relacionada a una baja disponibilidad de •NO (162, 163). Esto se ha observado cuando existe una disponibilidad reducida del cofactor BH4 (164) o en presencia de cambios post-transcripcionales de eNOS (165); en estos caso, se ve afectada su función enzimática y por ende, la producción de •NO.

Referencia	Metodología	Tejido	Niveles de •NO					País
			Preeclámpticas	n	Normotensas	n	P	
Seligman et al., 1994 (166).	Reacción de Greiss	Suero	4.65 ± 0.85 µmol/L	26	3.46 ± 1.43 µmol/L	26	0.02	Estados Unidos
Baker et al., 1995 (167).	Reacción de Greiss	Células B88	97.3± 9.6 nmol/mg	10	71.9 ± 4.3 nmol/mg	10	<0.05	Estados Unidos
Lyll et al. , 1995 (168).	Reacción de Greiss	Suero	29.5 ± 1.06 µmol/L	32	29.8 ± 1.07 µmol/L	36	NS	Reino Unido
Davidge et al., 1996 (169).	Reacción de Greiss	Plasma	32.7 ± 3.1 µmol/L	14	25.8 ± 2.4 µmol/L	20	NS	Estados Unidos
		Orina	0.37 ± 0.06 µmol NO ₂ /mg creatinina	14	0.69 ± 0.11 µmol NO ₂ /mg creatinina	20	<0.05	
Nobunaga et al., 1996 (170).	Reacción de Greiss	Plasma	45.6 ± 2.3 µmol/L	23	30.3 ± 1.0 µmol/L	23	<0.01	Japón
Pathak et al., 1999 (171).	Reacción de Greiss	Suero	11.82 ± 1.16 µmol/L	50	5.08 ± 0.47	50	<0.01	India
Choi et al., 2002 (172).	Reacción de Greiss	Suero	43.1 ± 12.7 µM	52	249.7 ± 51.3 µM	80	<0.05	Korea

Aydin et al., 2004 (173).	Reacción de Greiss modificada	Plasma	48.11 $\pm$ 3.77 μ mol/L	35	63.14 $\pm$ 7.08 μ mol/L	34	<0.001	Turquía
Diejomaoh et al., 2004 (174).	Reacción de Greiss modificada	Suero	19.189 $\pm$ 16.805 μ mol/L	34	19.157 $\pm$ 13.407 μ mol/L	39	NS	Kuwait
Sandrim et al., 2010 (175).	Quimioluminiscencia (NOA Sievers)	Plasma	102 $\pm$ 7.1 nmol/L	47	214.8 $\pm$ 26.1 nmol/L	47	<0.05	Brasil
Ehsanipoor et al. 2013 (176).	Reacción de Greiss	Plasma	36.6 μ M	12	58.1 μ M	12	<0.000 ₁	Estados Unidos
Conrad et al., 1999 (177).	Reacción de Greiss	Plasma	35 $\pm$ 2 μ M	15	34 $\pm$ 2 μ M	22	NS	Estados Unidos
Nishikawa et al., 2000 (178).	Reacción de Greiss	Suero	43.23 $\pm$ 3.55 μ M	17	23.63 $\pm$ 1.87 μ M	16	NS	Japón
Shaamash et al., 2000 (179).	Reacción de Greiss	Suero	28.3 $\pm$ 2.6 μ mol/L	31	20.5 $\pm$ 6.7 μ mol/L	32	<0.001	Egipto
Vural et al., 2002 (180).	Reacción de Greiss	Plasma	88.83 $\pm$ 5.67 μ mol/L	19	62.63 $\pm$ 9.52 μ mol/L	20	<0.001	Turquía

Terán et al., 2006 (181).	Quimioluminiscencia	Plasma	15.8 ± 1.1 μM	30	23.4 ± 1.9 μM	60	<0.01	Ecuador
Mao et al., 2010 (182).	GC-MS	Plasma	23.42 ± 2.86 μmol/L	60	28.83 ± 2.44 μmol/L	30	<0.01	China

Tabla 1.1 Diferencias entre las concentraciones de •NO en diferentes estudios (11). Tabla tomada y adaptada de: Sánchez-Aranguren LC, Prada CE, Riano-Medina CE, Lopez M. *Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress*. Frontiers in physiology 2014;5:372. Epub 2014/10/28.

1.10 Metabolismo en PE

Metabolismo de carbohidratos en PE

La asociación entre PE y ciertos factores de riesgo como la diabetes mellitus, previa al período de gestación, sugiere que defectos en el metabolismo, podrían contribuir a la aparición de PE (183). La glucosa, es el principal carbohidrato transportado a través de la placenta, desde la circulación materna hacia el feto (130). El proceso de gluconeogénesis es limitado en el feto, motivo por el cual, la glucosa debe ser transportada desde la madre, hacia el feto a través de la placenta (184). Durante las primeras etapas del embarazo, la tolerancia a la glucosa en la madre es normal o ligeramente aumentada, debido a un aumento de la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos; la producción de glucosa a nivel hepática también es normal (185). A medida que el embarazo avanza, del mismo modo se ve incrementada la tolerancia de la madre a la glucosa (186).

Varios estudios han reportado que la asociación entre resistencia a la insulina y la aparición de PE durante el embarazo (187-189). Hasta la fecha, no se han identificado las causas de esta asociación (130). Sin embargo, el incremento en los niveles de citoquinas en PE (94) y la relación entre inflamación y resistencia a la insulina (190), podría explicar la asociación con el aumento de la tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, vista en PE (130). Por otra parte, se han reportado diferencias entre los transportadores de glucosa (GLUT) en placentas provenientes de pacientes preeclámpticas con respecto a aquellas provenientes de embarazos normales (130).

En otro orden de ideas, el metabolismo del glucógeno, ha sido esporádicamente estudiado en PE (133). Robb et al., 1976 encontraron que los niveles de glucógeno en tejido placentario proveniente de placentas preeclámpticas tendía a ser mayor en comparación a tejidos de pacientes normotensas. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (191). Dada la relación entre PE e hipoxia y hallazgos previos que asocian a la hipoxia placentaria con un alterado consumo de glucosa y el transporte de glucosa hacia la placenta (192); la hipoxia podría influenciar el metabolismo de carbohidratos en complicaciones como PE.

Metabolismo y FAAs

Entre los factores angiogénicos asociados a la función mitocondrial, se encuentra VEGF (145). Se ha demostrado que VEGF promueve el metabolismo mitocondrial con la subsecuente formación de ROS, para soportar la migración de células HUVEC. Un estudio de Wright et al. 2008, empleó una concentración de VEGF de 20 ng/mL para determinar los efectos de esta proteína en la actividad mitocondrial y demostró, que este efecto ocurre vía Akt (homólogo Akt3) (145). Se ha demostrado que la homeostasis de VEGF activa la señalización de PI-3K/Akt,

resultando en la inhibición de la apoptosis por vía intrínseca mitocondrial, lo cual demuestra que VEGF juega un papel crucial en el mantenimiento de la viabilidad celular, en células expuestas a periodos de isquemia/reperfusión (146).

Algunos autores han propuesto una conexión entre el metabolismo de carbohidratos, particularmente el metabolismo de la glucosa, con el desbalance angiogénico característico en PE (133). La deficiencia de PlGF, ha demostrado tener un papel importante en la resistencia a la insulina (193). Un estudio en ratones con deficiencia de PlGF (PlGF^{-/-}) demostró que estos presentaban resistencia a la insulina y una sensibilidad aumentada a la glucosa (193). Thadhani et al., 2004 también demostraron una asociación entre niveles bajos de PlGF, resistencia a la insulina y PE (194). Mientras, en un estudio en ratones se encontró que la inhibición de PlGF conducía a obesidad y metabolismo alterado de lípidos, dichas observaciones ocurrían en parte, como resultado de una función angiogénica alterada en respuesta a PlGF (193).

Por su parte, la deficiencia de VEGF isoforma B (VEGF-B) está asociada a un incremento en el consumo de glucosa y baja producción de glucógeno, esto se demostró en células HUVEC tratadas con inhibidor de VEGF (133). Estos hallazgos sugieren que un desbalance angiogénico podría tener serias implicaciones en el metabolismo placentario (133). Aun así, hasta el momento, no se ha abordado la posibilidad de que FAAs como sFlt-1 sean capaces de inducir cambios metabólicos tempranos capaces de inducir DE y con ello la aparición de PE.

1.11 Sepiapterina: Potencial agente terapéutico en PE

Tetrahidrobiopterina (BH4) y eNOS

(6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) es una pteridina producida endógenamente, que actúa como cofactor de enzimas hidroxilasas de aminoácidos aromáticos y de las NOS (195). Es sintetizada principalmente en CEs, células de la musculatura lisa, fibroblastos y trofoblastos a través de la vía biosintética *de novo* y la vía salvaje (196) (*salvage pathway* o vía salvaje) (195) **Figura 1.6.**

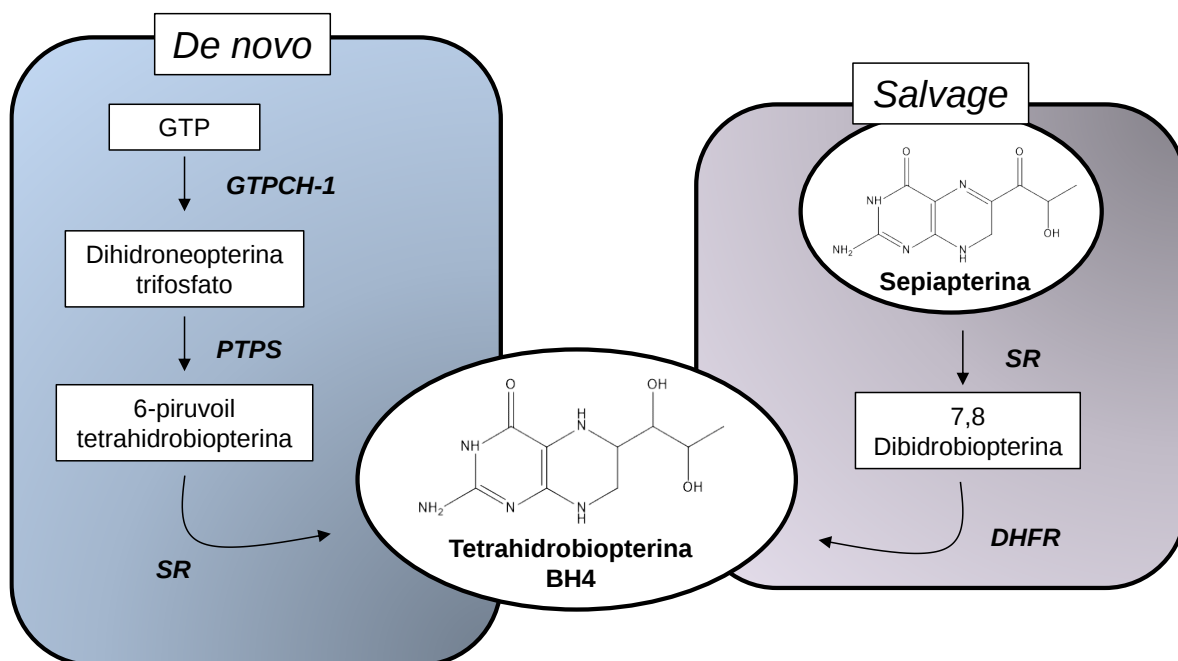


Figura 1.6 Síntesis de BH4 a través de vías de novo y salvaje (195). En la vía de novo, las enzimas GTPCH-1: GTP ciclohidrolasa 1, PTPS: Piruvil tetrahidrobiopterina sintasa y SR: Sepiapterina reductasa y en la vía salvaje, las enzimas SR: Sepiapterina reductasa y DHFR: Dihidrofolato reductasa, permiten la síntesis de tetrahidrobiopterina. Figura adaptada de: Alp NJ, Channon KM. *Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(3):413-20. Epub 2003/12/06 (197).

La primera enzima de la vía biosintética y también la enzima limitante es la GTP ciclohidrolasa 1 (GTPCH-1), a continuación, las enzimas piruvil tetrahidrobiopterina sintasa (PTPS) y la sepiapterina reductasa (SR) permiten la conversión de GTP a BH4. Además, la vía salvaje permite la regeneración de BH4 a partir de su producto oxidado 7,8-dihidrobiopterina (BH2) en donde participa la actividad de las enzimas SR y dihidrofolato reductasa (DHFR) (195).

BH4 es un cofactor esencial para el acoplamiento de eNOS (198, 199), promueve la síntesis de $\bullet\text{NO}$ facilitando la transferencia de electrones del dominio reductasa de eNOS, con la participación de flavín mononucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD), que permiten la transferencia electrones del NADPH al grupo hemo en el dominio oxidasa de eNOS. El dominio oxidasa contiene sitios de enlace para la L-arginina y BH4 (195). Una vez activada, la enzima adquiere una conformación homodimérica que incrementa la eficiencia en la oxidación de la L-arginina a L-citrulina en presencia de O_2 y permite la formación de $\bullet\text{NO}$ (200) **Figura 1.7.**

La formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por el desacoplamiento de eNOS ha sido implicada en DE, asociado a enfermedades cardiovasculares como hipertensión y diabetes (163,

201). **Figura 1.7.** En un modelo animal de hipertensión en el embarazo en ratas, se demostró que la suplementación con sepiapterina, análogo precursor de BH4, aumentó la producción de •NO, la relajación vascular dependiente de •NO y disminuyó la formación de ROS (202).

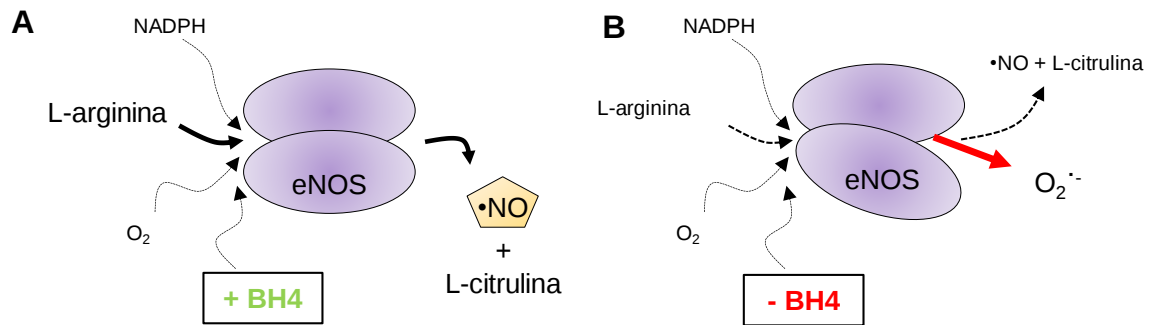


Figura 1.7 El desacoplamiento de la enzima eNOS, debido a una disponibilidad baja de BH4, resulta en baja producción de •NO. A: Enzima eNOS acoplada. B: Desacoplamiento de eNOS por baja disponibilidad de BH4.

BH4 como molécula antioxidante

Las actividades regulatorias de estrés oxidativo celular, mediadas por BH4, sugieren que esta molécula podría actuar como “scavenger”, es decir, como un estabilizador o neutralizador de ROS (203). Esto se infiere a partir de estudios cinéticos de la reacción de BH4 con radicales libres, que mostraron que a pH neutro, BH4 neutraliza rápidamente las especies reactivas (204). Sin embargo, esta teoría aun esta por ser complementada ya que las reacciones subsiguientes de los radicales derivados de BH4 siguen siendo desconocidas (203). Se ha propuesto que la combinación de BH4 con otros antioxidantes como el ácido ascórbico, preserva su poder reductor a través de la conversión rápida de radicales de BH4, a su forma totalmente reducida (204). Por ello, se ha sugerido que el reciclaje de BH4 podría estar acoplado a la actividad antioxidante del ácido ascórbico (203). Además de estas observaciones, químicamente, la estructura de BH4 se basa en una molécula de pteridina, asociada previamente con propiedades antioxidantes (205).

Algunos estudios citados a continuación, se han enfocado en conocer las propiedades antioxidantes de la molécula de BH4, empleando tetrahidroneopterina (H4N), un compuesto con propiedades antioxidantes similares a BH4 pero que no funciona como cofactor para eNOS. No obstante, los resultados obtenidos al comparar esta molécula con BH4, han sido ambiguos. Wunderlich et al., 2008 emplearon un modelo animal de DE empleando ratones deficientes de caveolina-1, en este estudio, el empleo de BH4, pero no H4N disminuyó la producción de O₂^{•-} (206). Por otra parte, un estudio con fumadores crónicos, demostró que la administración de BH4, pero no de H4N, mejora la vasodilatación en respuesta a

acetilcolina (207). En contraste, en estudios de hipoxia/reperfusión; tanto la administración de BH4 como H4N, causaron efectores protectores (208).

Más recientemente, Sethumadhavan et al., 2016 encontraron en un modelo *in vivo* en ratones con sobreexpresión específica de GTPCH-1 en cardiomiocitos, que altos niveles de BH4, debido a la sobreexpresión de GTPCH-1, disminuye significativamente el estatus redox celular sin afectar los niveles celulares de •NO (209). Es posible que BH4, en situaciones independientes de la actividad de eNOS, pueda actuar como un potente agente antioxidante.

Sepiapterina

En el año 2007, la “Food and Drug Administration” (FDA) aprobó el uso de la primera formulación de BH4 (dicloruro de sapropterina, Kuvan), para su uso en pacientes con fenilcetonuria (210), enfermedad genética que causa la acumulación de fenilalanina en la sangre (211). El dicloruro de sapropterina es el primer fármaco aprobado con funciones análogas a BH4 (210).

Experimentalmente, la administración oral de L-sepiapterina, precursor de BH4, ha demostrado restablecer la DE y reducir el estrés oxidativo en un modelo *in vivo* empleando arterias mesentéricas aislada de ratones diabéticos (db/db) (212). La sepiapterina (SEPI), funciona como precursor de BH4 por la vía salvaje (195). Su administración oral a las 6 horas demostró restablecer los niveles de BH4 en conejos previamente alimentados con una dieta rica en colesterol (modelo de DE *in vivo*). Basado en sus hallazgos, los autores proponen que el empleo de sepiapterina podría mejorar el tono vasomotor durante la aterosclerosis (213). SEPI, como precursor de BH4, funciona como agente acoplante de eNOS *in vitro* en CEs, donde ha demostrado restablecer la producción de •NO (203).

1.12 Tratamiento y prevención de la hipertensión en PE

Existen diferentes enfoques para el tratamiento de PE (214). En primer lugar, se encuentran las drogas con función anti-hipertensiva, tal como la hidralazina, nefidipina y aldomet (metildopa), que han demostrado promover la vasodilatación sin ocasionar efectos desfavorables en la madre o en el feto (215). Entre otras drogas, beta-bloqueantes como el labetalol se consideran tratamientos apropiados en PE (216). Se ha administrado aspirina de manera profiláctica, con la reducción de la aparición de PE en un 15% (217) y 17% (218). Sin embargo, aún no es bien conocido en qué grupos de mujeres la aspirina es una terapia adecuada (217). Por otra parte, está el empleo de sulfato de magnesio (MgSO₄), éste ha demostrado reducir la mortalidad materna en PE y el riesgo de eclampsia en un 50% (17, 219).

La administración de antioxidantes como la vitamina C y E se ha asociado con la reducción de la incidencia de la PE, en ciertas poblaciones en riesgo (220). Sin

embargo, también se ha observado que no existe evidencia que la suplementación con vitamina C y E reduzca la aparición de PE en mujeres de bajo riesgo de presentar la enfermedad (221). También se ha administrado suplementación con Ca^{2+} en mujeres con bajo riesgo de presentar la enfermedad, provenientes de países en vías de desarrollo. En estos casos, se ha reportado que el Ca^{2+} es efectivo para prevenir PE (222). En líneas generales, los hallazgos con respecto a la administración de Ca^{2+} para el tratamiento de PE han sido reportados como contradictorios (223).

Ya que la PE ha sido asociada a elevados niveles de sFlt-1 (45, 81, 82), se ha propuesto el empleo de una terapéutica basada en contrarrestar esta condición. Maynard et al., 2003 sugieren que el uso de una terapia con administración exógena de moléculas pro-angiogénicas, tal como VEGF o PlGF podría ser beneficiosas para el tratamiento de PE (81). Sin embargo, este enfoque podría ser muy arriesgado, considerando que el balance angiogénico que soporta al proceso gestacional es delicado. En relación a sFlt-1, la nicotina del cigarrillo ha sido observada que es capaz de estimular la angiogénesis, al disminuir el efecto de sFlt-1 en PE (224).

Más recientemente, el procedimiento de remoción de FAAs por aféresis ha cobrado interés en el tratamiento y prevención de PE. Hoy en día se considera a la remoción terapéutica de FAAs por aféresis un procedimiento terapéutico potencialmente efectivo para disminuir los síntomas de la enfermedad (225). Thadhani et al., 2016 demostraron que la remoción de sFlt-1 por aféresis redujo los niveles circulantes de sFlt-1 y previno la proteinuria en mujeres con PE y dió indicios de prolongar el embarazo sin mayores efectos adversos o consecuencias en el feto (225). Aun así, se sugieren otros estudios complementarios que soporten estos hallazgos (225). No obstante, la aféresis es un proceso invasivo, que tal como cualquier procedimiento extracorpóreo, conlleva a la necesidad de acceso a vías vasculares, traumas asociados al proceso de colocación de catéteres, infecciones, problemas de coagulación y sangrado (226). Estos eventos adversos podrían representar una desventaja para la aplicación de esta técnica en el manejo de pacientes preeclámpticas.

2. Razonamiento del estudio

2.1 Planteamiento del problema

La preeclampsia (PE) es una de las complicaciones más frecuentes en los embarazos a nivel mundial (1). Su diagnóstico clínico se efectúa a partir de la semana 20 de gestación (5-7) y se caracteriza por la aparición de hipertensión *de novo*, acompañada generalmente de proteinuria (7). Esta complicación afecta del 2 al 8% de todos los embarazos (8), siendo significativamente más prevalente en subpoblaciones étnicas específicas (10). En países en desarrollo, la incidencia de hipertensión en el embarazo es alta y la tasa de mortalidad materna es 20 veces mayor que las reportadas en países desarrollados, lo cual convierte a la PE en una complicación de alta prioridad en salud pública (9). En Colombia, es la mayor causa de mortalidad materna y perinatal (3); estos hechos denotan el gran impacto socio-económico de la enfermedad en nuestro país.

A pesar de los múltiples esfuerzos en investigación para entender el origen de PE, su etiología sigue siendo un enigma (19, 20). Hasta la fecha, se ha propuesto que la PE aparece en dos etapas (18). En la primera etapa, una invasión trofoblástica deficiente hacia la decidua materna (30), acompañada de una remodelación anormal de los vasos sanguíneos maternos (15), conllevaría a la liberación de una serie de factores placentarios; entre ellos FAAs y FPIs que inducen la aparición de la segunda etapa de la enfermedad, caracterizada por hipertensión y proteinuria, síntomas clave y característicos de PE (18, 38, 39). Aunque la etiología de PE es desconocida, se ha demostrado que la DE (38, 39) y alteraciones en los niveles circulantes de FAAs, tal como sFlt-1 (45, 81-83) y sEng (42, 70) están involucradas en su patogénesis y en la aparición de signos y síntomas de la enfermedad.

Se ha propuesto el monitoreo de los niveles circulantes de moléculas pro y anti-angiogénicas, tal como sFlt-1 y el factor de crecimiento placentario (PIGF), respectivamente, junto con la razón sFlt-1/PIGF como potenciales marcadores biológicos de detección temprana en el diagnóstico oportuno de PE (43). Dichos FAAs, por mecanismos aún desconocidos, incrementan significativamente sus niveles en la circulación materna e impactan directamente en la función endotelial, conllevando a DE materna generalizada. Además, se ha demostrado que una alteración en la señalización del SI, que implica niveles elevados de FPIs, como TNF- α (94), juega un papel importante en proliferación, migración e invasión trofoblástica en PE (91, 92). No obstante, los mecanismos moleculares a través de los cuales los FAAs aumentados en la circulación materna, son capaces de instaurar un proceso de DE y conllevar a la aparición de PE, aunado a los elevados niveles de FPIs en sangre de maternas preeclámpticas, aún son desconocidos.

El desarrollo de un nuevo ser vivo es un proceso metabólico dinámico (130). El balance metabólico durante el embarazo está idealmente diseñado para permitir un

suplemento continuo de nutrientes al feto y la placenta, incluso en condiciones limitadas de ingesta de alimentos (130). Basado en esto, el estatus nutricional materno es muy importante durante la gestación, no sólo desde el punto de vista fisiológico sino que predispone a la aparición de enfermedades metabólicas como la diabetes gestacional (133). La nutrición materna tiene un impacto directo en la placenta y en la salud del feto en etapas post-parto, más adelante en su vida adulta (13). Basado en esta propuesta, Barker et al., 1986 propuso la teoría del “Thrifty phenotype”, que postula que una nutrición deficiente en etapas tempranas de la vida, conllevaría a cambios permanentes en el metabolismo de los individuos en su vida adulta (13). Desde el punto de vista celular, la mitocondria es considerada la principal maquinaria energética celular (134) y con ello es responsable de la obtención de energía y del metabolismo de células animales. Incluso, se ha demostrado que la mitocondria tiene una función determinante en la aparición de ciertas enfermedades, entre ellas enfermedades cardiovasculares (135), tal como PE (136).

En este orden de ideas, en estudios funcionales y morfológicos, se ha demostrado una asociación entre la mitocondria y PE; en mujeres preeclámpticas se han evidenciado cambios histológicos en las mitocondrias de CEs, con pérdida de las crestas mitocondriales, estos cambios son sugestivos de un desorden sistémico de tipo metabólico (139). Recientemente, un estudio *in vivo*, en ratones, demostró que la infusión exógena de sFlt-1 conduce a los bien definidos signos clínicos de PE, tal como; hipertensión y proteinuria (125). Además, demostraron que sFlt-1 induce cambios histológicos en la mitocondria detectados por microscopía electrónica, junto a un aumento en marcadores de apoptosis en el tejido placentario (125). Hasta el momento, no se ha comprobado si sFlt-1 o en su defecto, la disponibilidad de VEGF, pueden conllevar a cambios o perturbaciones metabólicas tempranas en la mitocondria, que promuevan la DE y con ello la aparición de la enfermedad.

Por otra parte, la mitocondria es considerada una de las mayores fuentes de producción de ROS en las células (136, 143). Los ROS de origen mitocondrial (mROS), podrían conllevar a la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) y con ello, exacerbar defectos en respiración mitocondrial, que a su vez promoverían mayor acumulación de mROS y estrés oxidativo en la mitocondria (143). Se ha demostrado que la homeostasis de VEGF, activa la señalización de PI-3K y Akt (PI-3K/Akt) resultando en la inhibición de la apoptosis por vía intrínseca mitocondrial (146). Además, se ha demostrado que VEGF promueve la migración de células endoteliales vía Akt (145). A pesar de estos hallazgos, hasta el momento no se ha comprobado el papel de sFlt-1 en la función mitocondrial, que se asocien a la aparición de la enfermedad.

La PE, representa un problema de salud pública global. Aun así, no existe un tratamiento terapéutico, no invasivo, que permita la resolución de la enfermedad. Al momento, se ha propuesto que la remoción terapéutica de FAAs por aféresis como procedimiento terapéutico para disminuir los síntomas de la enfermedad. Sin

embargo, el impacto que este tipo de procedimiento invasivo podría tener en la madre y en el feto aún está por ser esclarecido en futuras investigaciones (225). No obstante, ya que la DE ha mostrado ser uno de los principales mecanismos responsables de la instauración de PE, una droga capaz de impactar directamente en el restablecimiento de la función endotelial, parece ser prometedora y eficaz para prevenir PE.

La sepiapterina (SEPI), precursor de la tetrahidrobiopterina (BH4), es un análogo precursor del cofactor esencial para la actividad de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) (198, 199). Se ha demostrado que SEPI ser un precursor efectivo y sustituto de BH4 (210, 212). Este cofactor estabiliza la actividad de eNOS, permitiendo la formación del óxido nítrico ($\bullet$ NO) y con ello la relajación vascular (198, 199). En PE, las determinaciones de los niveles de $\bullet$ NO en plasma, suero y orina de mujeres con preeclampsia son controversiales y variables (11). Dado el efecto beneficioso de SEPI como agente potenciador de la función endotelial vía el restablecimiento de la actividad de eNOS (198, 199) y la biodisponibilidad de $\bullet$ NO (203), su uso podría presentarse como un agente terapéutico potencial en el tratamiento de la DE ocasionada por los elevados niveles de FAAs en PE.

Por tales motivos, y para entender mejor la dinámica de los procesos hipertensivos del embarazo, tal como la PE, es necesario indagar en los mecanismos moleculares que se vinculan a su fisiopatología. Entender el papel de los FAAs como moléculas moduladoras de cambios o perturbaciones metabólicas tempranas que establecen un desorden multi-sistémico endotelial generalizado es esencial para poder establecer y proponer estrategias terapéuticas que permitan prevenir efectivamente la aparición de PE. Finalmente, el empleo de una terapéutica eficaz y de bajo riesgo para prevenir la PE podría disminuir el gran impacto que esta enfermedad acarrea en la sociedad de nuestro país y en todo el mundo. De allí que la SEPI se presenta como una droga de uso potencial, demostrada previamente ser segura durante el embarazo, para tratar oportunamente la aparición de la enfermedad.

Este estudio evalúa el papel de sFlt-1 y de TNF- α como potenciales perturbadores metabólicos de la función bioenergética mitocondrial en PE y evalúa el uso de SEPI como potencial agente terapéutico en PE.

2.2 Justificación

Desde hace más de 15 años, la PE fue catalogada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una complicación del embarazo de alta prioridad en salud pública (9). Esta patología de origen desconocido, afecta más del 8% de todos los embarazos a nivel mundial (8). La PE es responsable de elevadas tasas de mortalidad materna y perinatal, principalmente en países de medianos y bajos ingresos (1, 3), donde es motivo de hospitalizaciones prolongadas y repercusiones económicas para las familias y para las instituciones de salud. La OMS estima que las muertes asociadas a PE ascienden a 166 mil por año. En Latinoamérica, la morbilidad perinatal relacionada a PE puede llegar a cifras del 45%, mientras que la mortalidad se mantiene en entre el 1-33% (9). Además, en Colombia, la PE es la principal causa de mortalidad materna y perinatal (3), afectando a miles de familias y ocasionando graves repercusiones sociales y económicas en nuestra sociedad.

A pesar de los muchos esfuerzos enfocados en conocer la patogénesis de PE, esta sigue siendo un enigma (19, 20). Hoy en día, la DE (38, 39) y alteraciones en los niveles circulantes de FAAs, tal como sFlt-1 (45, 81-83) y sEng (42, 70), han demostrado estar involucradas en la patogénesis de PE y en la aparición de signos y síntomas de la enfermedad. Inclusive, se ha reportado que la determinación de los niveles circulantes de sFlt-1, junto con la relación sFlt-1/PIGF es un marcador biológico de detección de PE, en etapas tempranas del embarazo (43). Más recientemente, se ha propuesto la realización de un procedimiento invasivo, como lo es la aféresis, para remover sFlt-1 de la circulación materna (225). Este procedimiento, a pesar de no haber demostrado mayores efectos secundarios, aún está en estudio y se ha sugerido posterior confirmación en estudios de cohorte con mayor población en estudio (225).

Es indiscutible la íntima relación existente entre los FAAs y PE. Se ha relacionado que la DE, signo clave en el desarrollo de PE, es originada por niveles elevados de sFlt-1 y sus efectos en el sistema renal materno, y la aparición de signos y síntomas de la enfermedad. Sin embargo, aún no son bien conocidos los eventos moleculares derivados de los FAAs que conllevan a la aparición de PE. Por otra parte, la PE también ha sido considerada una enfermedad de base inmunológica. Estudios *ex vivo* con explantes de placentas, han demostrado un incremento en los niveles de sFlt-1 y TNF- α bajo condiciones que simulan PE (106, 108, 109). Además, se ha sugerido una relación entre TNF- α y sFlt-1. Por una parte, TNF- α favorece la producción de sFlt-1, demostrado en estudios *ex vivo* con explantes de placenta (110).

En contraste, existe al momento un reporte, de Xu et al., 2009 que indica que sFlt-1 también puede favorecer la producción de TNF- α en tejido placentario. Esto sugiere una posible asociación entre el incremento de FAAs y FPIs. Este mismo estudio sugiere que sFlt-1 y TNF- α , podrían contribuir de forma sinérgica en el establecimiento de DE (77). Sin embargo, esta teoría permanece sin haber sido

probada. En base a este supuesto, se ha postulado que el antagonismo de VEGF mediado por sFlt-1 en CEs, genera mayor sensibilidad de estas células a FPIs como TNF- α (65).

Uno de los bien establecidos preceptos de los FAAs como moléculas desencadenantes de PE sostiene que dichas moléculas, por ejemplo, sFlt-1, dada su propiedad antagonista de la señalización de VEGF (63), afecta la activación de rutas de señal pro-angiogénicas, tal como la señalización dependiente de VEGF. La activación de rutas de señal vía VEGF, es fundamental durante el embarazo. VEGF activa la señalización de PI-3K y Akt (PI-3K/Akt) resultando en la inhibición de la apoptosis por vía intrínseca mitocondrial (146). Además, VEGF tiene un impacto directo en el metabolismo mitocondrial. En el embarazo normal, la demanda energética que conlleva el desarrollo de un nuevo ser exige un aumento de los requerimientos metabólicos para el crecimiento y la proliferación. Es allí donde la homeostasis de VEGF juega un papel clave en sostener los requerimientos metabólicos a través de la mitocondria. A pesar de esto, hasta el momento no se ha propuesto estudiar cómo sFlt-1, al desestabilizar el balance angiogénico, podría inducir cambios o perturbaciones metabólicas tempranas en la mitocondria que promuevan la DE y con ello la aparición de la enfermedad.

La PE hoy día continúa siendo un grave problema de salud pública. A pesar que existen diversos enfoques terapéuticos para tratar PE, es clave conocer los mecanismos moleculares que la desencadenan para poder encontrar la mejor estrategia que permita prevenirla. Recientemente, la remoción de sFlt-1 por aféresis mostró una luz al final túnel, sin embargo, para prevenir la enfermedad no se trata únicamente de impartir procedimientos invasivos, con potenciales efectos dañinos para la madre y el feto. Es necesario encontrar una terapéutica que combata la enfermedad de raíz. Para ello, es imperativo conocer más a fondo de qué manera los FAAs son capaces de inducir DE y centrarse en estos mecanismos para encontrar estrategias factibles, accesibles y universales para tratar PE.

Basado en este enfoque, con esta investigación se propuso conocer los mecanismos moleculares y potenciales cambios o perturbaciones metabólicas que los FAAs y FPIs son capaces de desencadenar en PE. Conociendo más a fondo el impacto a nivel molecular y metabólico de los FAAs y FPIs en PE, se podría establecer y proponer mejores y más adecuadas terapéuticas para esta grave enfermedad. Asimismo, esta investigación propone evaluar el uso de SEPI, análogo precursor de BH4, cofactor de eNOS, segura de administrar durante el embarazo y evaluar su capacidad de restablecer la función endotelial y metabolismo mitocondrial como agente terapéutico potencial para prevenir la aparición de PE.

2.3 Objetivos

2.3.1 General

Evaluar la función del factor anti-angiogénico sFlt-1 y del factor pro-inflamatorio TNF- α , como potenciales perturbadores metabólicos de la función endotelial y bioenergética mitocondrial en preeclampsia y valorar el uso de sepiapterina como droga terapéutica de uso potencial en el tratamiento oportuno de preeclampsia.

2.3.2 Específicos

- 1) Determinar los efectos de sFlt-1 en la función endotelial, formación de $\bullet$ NO, acoplamiento de eNOS y en la función bioenergética mitocondrial y metabolismo en un modelo *in vitro* establecido en células endoteliales aórticas de bovino (CEs) y trofoblastos extravillosos de primer trimestre (HTR-8/SVneo), tratadas con sFlt-1 recombinante exógena.
- 2) Conocer el papel de sFlt-1 y TNF- α en la regulación de la función endotelial, formación de $\bullet$ NO, acoplamiento de eNOS y en la función bioenergética mitocondrial y metabolismo en un modelo de correlación *in vitro* establecido en células endoteliales aórticas de bovino (CEs) y trofoblastos extravillosos de primer trimestre (HTR-8/SVneo) tratadas con TNF- α recombinante y sueros provenientes de pacientes preeclámpicas.
- 3) Evaluar el efecto de la suplementación con sepiapterina en la biodisponibilidad de $\bullet$ NO, acoplamiento de eNOS y función bioenergética mitocondrial en células endoteliales aórticas de bovino (CEs) y trofoblastos extravillosos de primer trimestre (HTR-8/SVneo), al establecer un modelo *in vitro* de preeclampsia inducido por la administración exógena de sFlt-1, TNF- α y sueros provenientes de pacientes preeclámpicas.
- 4) Valorar el uso de sepiapterina como droga terapéutica de uso potencial para el restablecimiento de la función endotelial, acoplamiento de eNOS y función bioenergética mitocondrial en células endoteliales aórticas de bovino (CEs), al establecer un modelo *in vitro* de preeclampsia inducido por la administración exógena de sFlt-1 y sueros provenientes de pacientes preeclámpicas.

3. Materiales y métodos

3.1 Diseño del estudio

Estudio observacional con correlación en modelo *in vitro*.

3.2 Población

Gestantes provenientes de las unidades obstétricas de la Fundación Cardiovascular de Colombia (FCV) (Floridablanca) y Clínica Materno Infantil San Luis (CMISL) (Bucaramanga), Santander, Colombia.

3.3 Tamaño de la muestra

En este estudio se buscó conocer el papel de sFlt-1 como perturbador del metabolismo en PE. Hoy en día, los niveles circulantes de sFlt-1 son considerados marcadores biológicos de detección de PE (43, 45). Dado que el presente es un estudio observacional con correlación *in vitro*, el método empleado para la determinación del tamaño de la muestra se basó en el método de evaluación de diferencias específicas para dos medias de los niveles de sFlt-1 (45). Se determinó asumiendo un error tipo I del 1% y error tipo II del 20%. El cálculo indicó un tamaño de muestra de 20 pacientes normotensas y 20 preeclámpticas. Además, se incluyó una muestra de 10 pacientes no gestantes incluidas en el estudio como grupo control.

3.4 Reclutamiento de pacientes

El propósito del reclutamiento de pacientes fue la obtención de muestras de suero para la correlación del estudio *in vitro*. Las pacientes incluidas en el estudio fueron reclutadas en las unidades obstétricas de la FCV y la CMISL. En ambas instituciones, se obtuvo el aval de los Comités de Ética en Investigaciones. Además, las pacientes firmaron consentimiento informado como requisito para participar en el estudio. El diagnóstico de PE se hizo en función a los criterios del *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) (7). Se recolectaron muestras de suero de pacientes normotensas (n=20), preeclámpticas (n=20) y no gestantes sanas, como grupo control (n=10); según los siguientes criterios de selección.

3.4.1 Criterios de inclusión

Fueron elegibles para participar en el estudio las pacientes que cumplieron los siguientes criterios: **Figura 3.1.**

- Control ginecológico en las unidades obstétricas de la FCV y CMISL.
- Pacientes aparentemente sanas al momento de la evaluación clínica.

- Disposición de participar en el estudio mediante autorización firmada a través de consentimiento informado.

En gestantes, además de lo anterior;

- Decisión de terminación electiva del embarazo por cesárea programada.
- Edad gestacional mayor a 20 semanas.

La inclusión en los diferentes grupos de estudio se hizo según los siguientes criterios:

3.4.1.1 Grupo control: Pacientes no gestantes aparentemente sanas al momento de evaluación clínica con disposición de participar en el estudio mediante firma de consentimiento informado.

3.4.1.2 Grupo normotensas: Pacientes gestantes con tensión arterial $\leq 140/90$ mmHg y proteinuria negativa.

3.4.1.3 Grupo preeclámpticas: Pacientes gestantes que presentaron:

- Presión sanguínea: $\geq 140/90$ mmHg, a partir de la semana 20 de gestación en una mujer con presión sanguínea normal previa,

y

- Proteinuria: ≥ 300 mg/24 horas en orina.

o

En ausencia de proteinuria, se consideró además de hipertensión la aparición de alguno de los siguientes:

- Trombocitopenia: Recuento de plaquetas menor de $100.000/\mu\text{L}$.
- Creatinina sérica: $>97\mu\text{mol/L}$ o duplicación de los niveles de creatinina sérica.
- Duplicación de los niveles normales de transaminasas hepáticas.
- Edema pulmonar.
- Síntomas visuales o cerebrales.

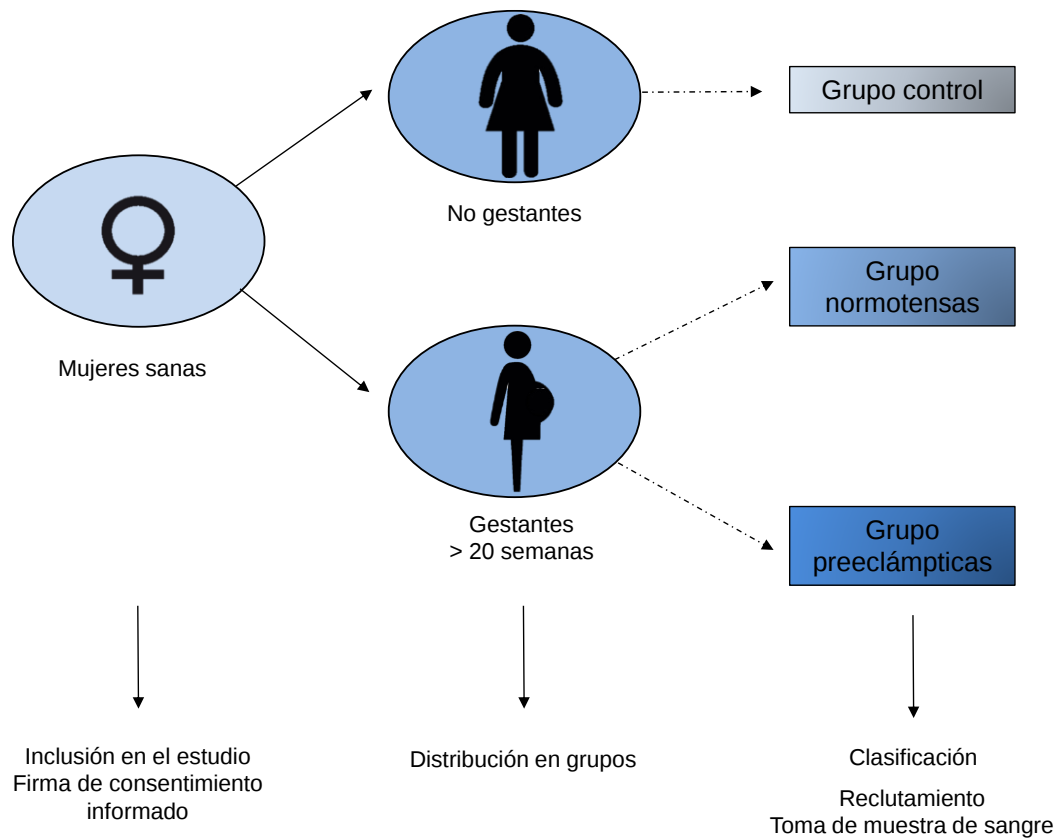


Figura 3.1 Diagrama de reclutamiento de pacientes.

3.4.2 Criterios de exclusión

- Pacientes en tratamientos con medicamentos distintos a los suplementos nutricionales indicados durante la gestación.
- Antecedente de hipertensión arterial.
- Diabetes gestacional.
- Antecedente de enfermedades cardiovasculares, renales y endocrinas agudas o crónicas.
- Cáncer.
- Enfermedades autoinmunes.
- Infecciones agudas o crónicas, por ejemplo; sífilis, toxoplasmosis, HIV, Hepatitis C.
- Enfermedad mental incapacitante.
- Detección de anomalías fetales y/o malformación uterina.
- Historia de alcoholismo o consumo de drogas.
- Deseo expreso de no participar en la investigación.

3.5 Colección de muestras de sangre

Se tomaron muestras de sangre de 10 ml de volumen en tubos de sangre sin anticoagulante. Las pacientes no gestantes incluídas en el estudio fueron reclutadas y la muestra tomada el mismo día de su inclusión en el estudio. Las gestantes fueron reclutadas antes del parto y la toma de la muestra se hizo momentos antes de la cesárea. Seguidamente, se separó el suero en viales para criopreservación que fueron almacenados a -80°C hasta el momento de su utilización en las diversas pruebas de correlación *in vitro*.

3.6 Medidas antropométricas

Se tomaron mediciones antropométricas de cada participante al momento del ingreso al estudio. La presión arterial fue medida siguiendo las recomendaciones de la *American Heart Association* (AHA), con un esfigmómetro de mercurio (DFG Mercury Corporation, USA) en el brazo derecho en 2 ocasiones diferentes, espaciadas 5 minutos entre sí, con las participantes sentadas en una posición confortable después de 10 minutos de reposo. Las presiones arteriales sistólica y diastólica se registraron con el primer y el quinto sonido de Korotkoff, respectivamente. El peso fue medido en una báscula calibrada y registrado en kilogramos (Kg) y la talla se midió en centímetros (cm), ubicando a la participante de pie, en posición recta y de espalda contra la pared.

3.7 Cultivo celular

Para esta investigación, se utilizaron dos líneas celulares provenientes de tejidos clave en el desarrollo de PE. En primer lugar, las células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) se emplearon como modelo de células endoteliales (CEs). Previamente, las CEs han sido ampliamente utilizadas como modelo de endotelio celular, basado en que presentan 100% de homología con las NOS de origen humano, además que comparten una serie de factores de transactivación basal del promotor de eNOS (227). Las CEs fueron obtenidas de Cell Applications, Inc. (San Diego, CA, USA). Fueron cultivadas y mantenidas en crecimiento en medio Bovine Endothelial Cell Growth Medium (B211-500, Cell Applications) y en medio DMEM (Cellgro, Manassas, VA, USA) suplementado con 5.5 mM de glucosa, 10% de SFB, 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (P/E). Las células fueron cultivadas a 37 °C y atmósfera de 5% CO₂. Las CEs fueron empleadas en pases 5-8 para las diversas pruebas y experimentos.

Además, se empleó la línea de trofoblastos inmortalizados aislados de placentas de primer trimestre, HTR-8/SVneo. Dichos trofoblastos, fueron un amable obsequio del Dr. Charles Graham de Queen's University, ON, Canadá. Las HTR-8/SVneo son trofoblastos aislados de las extra vellosidades de placentas de primer trimestre e

inmortalizados mediante transfección por electroporación con el plásmido pSV3neo (204). Las HTR-8/SVneo mantienen una morfología similar a los trofoblastos parentales HTR-8, además son 100% positivos para citoqueratina, lo cual confirma que mantienen un fenotipo epitelial. El empleo de esta línea celular fue muy importante para establecer los efectos de sFlt-1 y para la correlación *in vitro* de PE usando sueros provenientes de pacientes. Al ser células derivadas de placentas de primer trimestre, las HTR-8/SVneo son representativas del comportamiento metabólico de los trofoblastos en etapas tempranas del embarazo, a diferencia de trofoblastos a término, que por su condición terminal, constitutivamente están sujetas a muerte celular. Las HTR-8/SVneo fueron cultivadas en RPMI-1640 suplementado con 5% de SFB y 100 U/ml de P/E a 37 °C y atmósfera de 5% CO₂, tal como ha sido descrito previamente (228). Las HTR-8/SVneo fueron utilizadas en pases 75-82 para los diversos experimentos.

Previo al inicio de los experimentos, las células CEs fueron mantenidas en medio de cultivo de ensayo suplementado con 2% de SFB por 24 horas, este paso previo se realizó con la finalidad de adecuar las células a concentraciones de suero similares a las encontradas *in vivo*, tal como ha sido descrito previamente (160). Las HTR-8/SVneo en los ensayos fueron mantenidas con el mismo medio de cultivo estándar de crecimiento. Seguidamente, al iniciar los experimentos, las células CEs y HTR-8/SVneo fueron tratadas con diversas concentraciones de proteína recombinante humana (rh) de sFlt-1, rh TNF- α y rh VEGF adquiridas de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Además, para establecer el modelo de correlación *in vitro*, ambas líneas celulares fueron tratadas con sueros de pacientes de los grupos control (CTL), normotensas (NOR) y preeclámpticas (PE) al 2%, tal como ha sido descrito previamente (218).

En otros escenarios, fue importante evaluar la contribución del metabolismo mitocondrial en la viabilidad y proliferación celular, una vez las células eran tratadas con sFlt-1, con la finalidad de comprobar su impacto como potencial perturbador metabólico. Con este fin, las células CEs y HTR-8/SVneo fueron forzadas a sobrevivir en condiciones dependientes exclusivamente de fosforilación oxidativa, al cultivarlas en medio libre de glucosa y con galactosa como principal fuente de carbono. La oxidación de galactosa a piruvato por vía glucolítica no genera la producción neta de ATP, esto fuerza a las células a depender de la fosforilación oxidativa para generar suficiente ATP para la sobrevivencia celular (229). Para ello, las células CEs y HTR-8/SVneo fueron cultivadas en medio suplementado con D-galactosa (sin glucosa) en concentraciones de 5.5 mM para CEs y 11.11 mM de galactosa en HTR-8/SVneo, igualando las concentraciones de glucosa presentes en los medios de cultivo empleados para cada línea celular.

3.8 Ensayo de migración (Wound Healing Assay)

Un primer enfoque en este estudio y determinante para alcanzar los objetivos propuestos, fue utilizar concentraciones de rh sFlt-1 para el modelo *in vitro*, que no demostraran inducción de respuesta anti-angiogénica. Para encontrar las concentraciones óptimas que cumplieran con esta condición, se utilizó el ensayo de migración, *Wound Healing Assay* (WHA) por sus siglas en inglés. El WHA es un ensayo muy bien descrito en donde se puede observar la migración celular, tal como ocurriría en un proceso de cicatrización de heridas (230). Útil para demostrar la potencial respuesta angiogénica de las células CE y HTR-8/SVneo ante el tratamiento exógeno con sFlt-1. Basado en el ensayo propuesto por Liang et al., 2007 con modificaciones (231), se sembraron las células CE y HTR-8/SVneo en placas de 24 pozos en densidad de 5.0×10^4 células/pozo hasta alcanzar confluencia de 70-80%. Las células CE fueron sembradas en medio de cultivo de ensayo (Para CE, DMEM suplementado con 2% SFB y para las HTR-8/SVneo, medio de cultivo estándar con 5% SFB).

Una vez alcanzada la confluencia de la monocapa de células, se removió el medio de cultivo y se lavaron las células dos veces con PBS estéril a 37 °C. Seguidamente, utilizando una punta de 200 µL estéril, se realizó una rasgadura de la monocapa celular, en línea recta. Esta marca de la rasgadura sirvió como línea base para la medición de la capacidad de migración celular. Para ello, utilizando el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-S y el software NiS Elements (USA), se midió el ancho de la línea base, en tres réplicas distintas. A continuación, las células fueron tratadas con concentraciones de sFlt-1 de 10, 25, 50 y 100 ng/mL de rh sFlt-1 en medio de cultivo de ensayo. Al cabo de 24 horas, se visualizó el cierre de la rasgadura realizada y se midió la distancia remanente de la herida que fue nuevamente cuantificada con el software NiS Elements, para calcular el porcentaje de cierre de la herida. **Figura 3.2.**

3.9 Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar los efectos del tratamiento con rh sFlt-1 y sueros de pacientes en la viabilidad de las CE y HTR-8/SVneo, se llevó a cabo el ensayo de metil tiazol tetrazolio (MTT). El ensayo de MTT es una prueba colorimétrica que evalúa la actividad metabólica celular de enzimas oxidorreductasas celulares dependientes de NADPH, capaces de reducir el colorante tetrazolio MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide a su forma insoluble formazan, de color púrpura. Dado que el primer enfoque del estudio fue definir concentraciones de rh sFlt-1 que no indujeran una respuesta anti-angiogénica; a través del ensayo de MTT se constató que dichas concentraciones ya evaluadas a través del ensayo de migración, no afectarían la viabilidad celular.

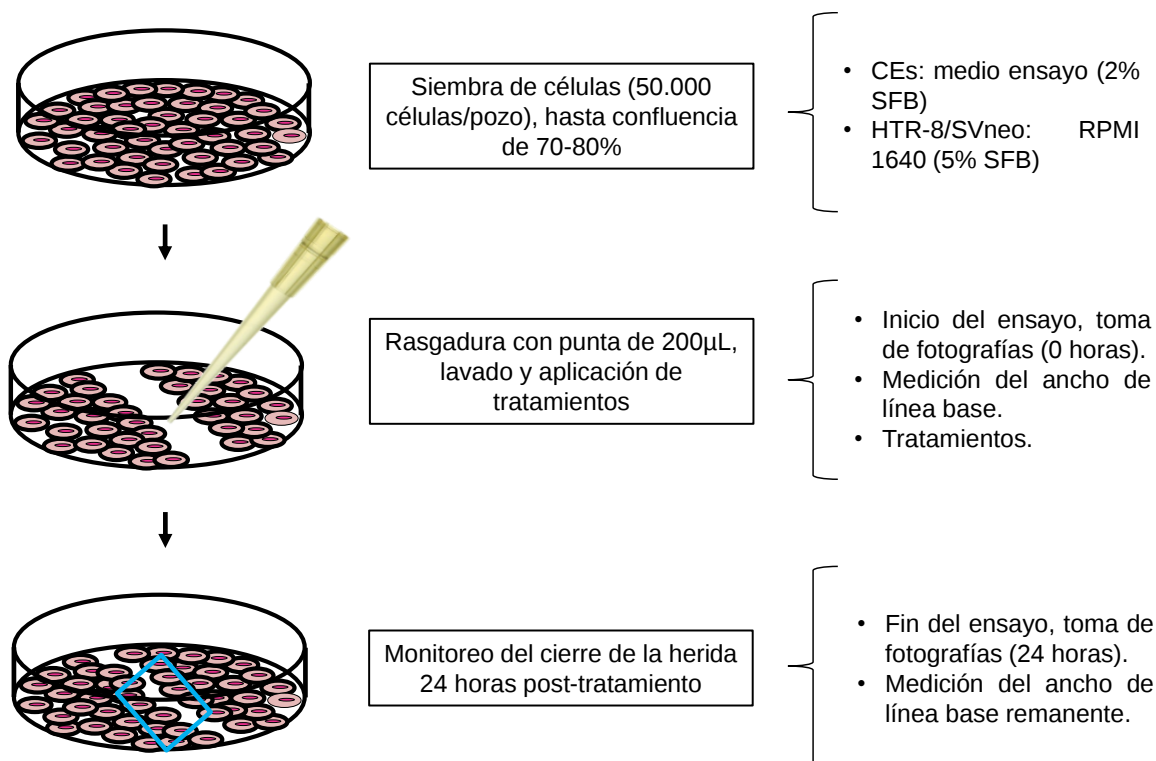


Figura 3.2 Montaje del ensayo de migración (Wound Healing Assay).

Las CEs y HTR-8/SVneo fueron sembradas en placas de 96 pozos en densidad celular de 2.0×10^4 células/pozo. Las CEs fueron sembradas en medio de cultivo de ensayo (suplementado con 2% SFB y las HTR-8/SVneo en medio de cultivo estándar con 5% SFB). Al cabo de 24 horas, se ensayaron concentraciones de rh sFlt-1 de 10, 25, 50 y 100 ng/mL, previamente probadas en ensayo de migración que no indujeron respuesta anti-angiogénica y se incubaron por un período de 24 horas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. En otros escenarios, fue importante evaluar la contribución del metabolismo mitocondrial para el mantenimiento de viabilidad celular luego del tratamiento con sFlt-1. Para ello, las células cultivadas en medio suplementado con galactosa, fueron tratadas con rh sFlt-1 a 50 ng/mL por 24 horas en iguales condiciones de cultivo. Además, para conocer los mecanismos moleculares de sepiapterina (SEPI) (Schircks Laboratories, Switzerland) que permitieron el restablecimiento de la función endotelial y mitocondrial, se evaluó por esta técnica el IC₅₀ de drogas como metotrexato (MTX), para definir concentraciones de trabajo que fueran capaces de inducir un efecto sin afectar la viabilidad celular, para este fin se empleó el software CalcuSyn.

Para completar el ensayo de MTT, a las células una vez cumplido el tiempo de incubación con los diversos tratamientos, se les removió el medio de cultivo y se les incubó con 100 µL de medio de cultivo de la respectiva línea celular, conteniendo 5 mg/mL del reactivo de MTT, se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% CO₂ por 1

hora, en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se removió el medio conteniendo MTT y se agregó 100 μ L de DMSO para detener la reacción. Se colocó la placa en agitación por 10 minutos, protegida de la luz a 500 RPM en un agitador de placas Titramax 1000 (Heidolph). Finalmente, se leyó la absorbancia a 570 nm utilizando el lector de placas Thermo Scientific VarioSkan Flash Plate Reader.

3.10 Ensayo de proliferación

Para constatar el efecto del tratamiento exógeno de sFlt-1 y TNF- α ; se utilizó el ensayo de proliferación con colorante de exclusión azul de tripán. Para este ensayo, las CEs y HTR-8/SVneo fueron sembradas en medio de ensayo correspondiente a cada línea celular, en placas de 24 pozos a densidad celular de 1.0×10^4 células/pozo. Al cabo de 24 horas, las células fueron tratadas con concentraciones de sFlt-1 de 10, 25, 50 y 100 ng/mL, mientras que para TNF- α , se evaluaron concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 ng/mL. También, para evaluar la contribución del metabolismo mitocondrial en el mantenimiento de la proliferación celular y el potencial papel de sFlt-1 como perturbador metabólico, las células también fueron cultivadas en medio suplementado con galactosa y tratadas con rh sFlt-1 a 50 ng/mL por 24 horas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂.

Para completar el ensayo de proliferación, una vez transcurrido el tiempo definido para los tratamientos; tres réplicas de cada línea celular y tratamiento fueron contadas a las 0, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento utilizando un hematocitómetro (cámara de Neubauer) y microscopio de luz convencional (Nikon). El conteo de células discriminó las células viables de las no viables basado en el principio de exclusión del colorante azul de tripán. La media de tres conteos independientes se utilizó para el análisis de los resultados.

3.11 Determinación de niveles de TNF- α y sFlt-1 a través de inmunoensayo enzimático (ELISA)

Para la determinación de los niveles circulantes de TNF- α y sFlt-1 y además para la cuantificación de estas proteínas en sobrenadante de medio de cultivo celular se empleó la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) utilizando los kits comerciales:

- Human VEGF R1/Flt-1 Quantikine ELISA Kit (catálogo # DVR100B, lote # 337060) de R & D Systems,
- Bovine TNF-alpha DuoSet ELISA (catálogo # DY2279, lote # 326027) y el kit DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 3 (catálogo # DY009, lote # 342181) de R & D Systems; y
- Human TNF-alpha DuoSet ELISA (CATÁLOGO # DY210-05) de R & D Systems.

El empleo de los kits de ELISA permitió la determinación de los niveles séricos de sFlt-1 y TNF- α . Además, para establecer una relación entre estos dos factores, se cultivaron CEs y HTR-8/SVneo en presencia de sFlt-1 y TNF- α , para cuantificar en el sobrenadante del medio de cultivo, la producción de TNF- α y sFlt-1, respectivamente.

Procedimientos previos al ensayo de ELISA:

Para las determinaciones se empleó suero de las pacientes y sobrenadantes obtenidos a partir del cultivo celular de CEs y HTR-8/SVneo. Las células fueron sembradas en placas de Petri de 100 mm en medio de cultivo de ensayo (DMEM 2% SFB para CEs y medio estándar con 5% SFB para HTR-8/SVneo). Al momento de obtener confluencia de 70-80%, las células fueron lavadas con PBS estéril a 37°C y su medio se cambió a medio estándar sin SFB toda la noche. Seguidamente se aplicaron tratamientos con TNF- α , sFlt-1 y VEGF. Dichos tratamientos se aplicaron en medio de cultivo estándar (2% SFB para CEs y 5% SFB para HTR-8/SVneo).

Finalizado el tiempo de los tratamientos, se recolectó el medio de cultivo y se almacenó en tubos de 2 mL a -80°C hasta el momento de las determinaciones. Se determinó también la concentración de proteínas para la normalización de los resultados por miligramo (mg) de proteínas. Para ello, las células fueron obtenidas mediante raspado empleando PBS frío. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 RPM por 5 min a 4°C para obtener el sedimento de células. Las células fueron lisadas en 100 μ L buffer RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer), conteniendo 50 mM de Tris-HCl, 0.1 mM de EDTA, 0.1 mM de EGTA, 0.1 % de SDS, 0.1 % de deoxicolato de sodio y 0.1 % de nonidet P-40. Para la lisis, los sedimentos de células con el buffer RIPA se mantuvieron en hielo y agitación durante 5 minutos. Posteriormente se clarificó el lisado mediante centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 13300 RPM. Por último, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Pierce BCA (Ver “sección Contenido total de proteínas. Ensayo de Pierce BCA”). **Figura 3.3.**

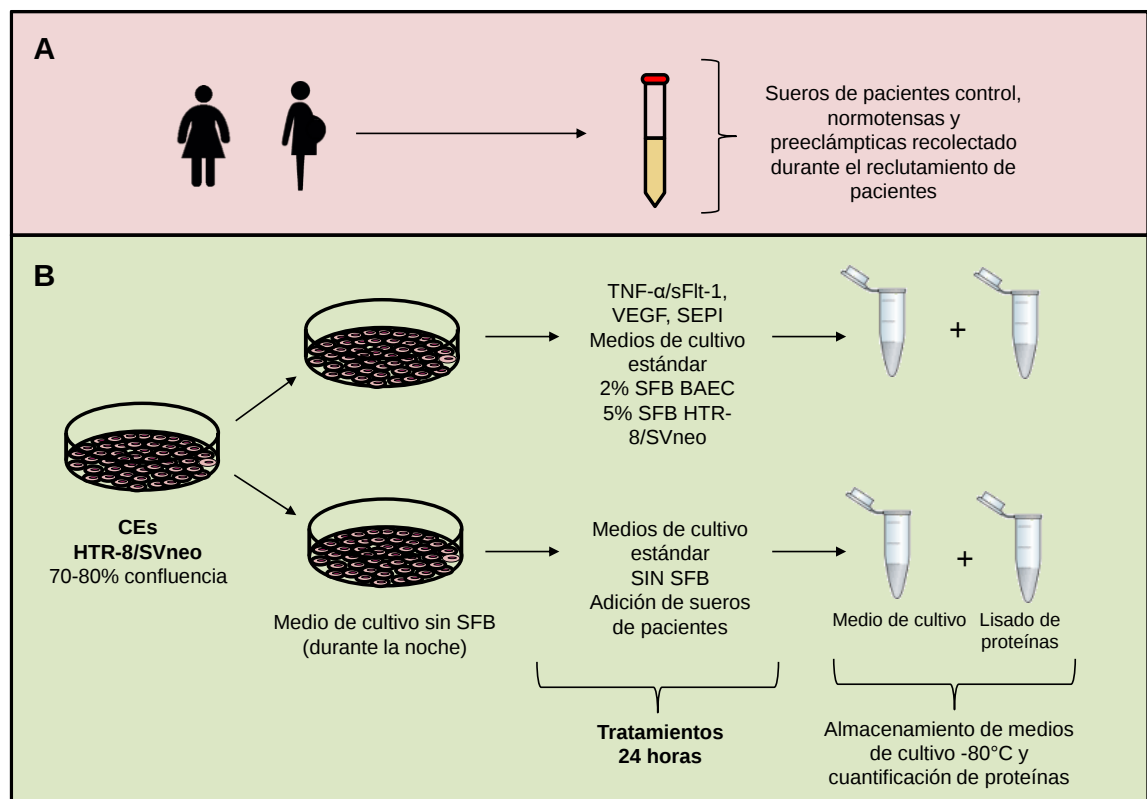


Figura 3.3 Representación esquemática de los procedimientos previos al ELISA. (A) Obtención de muestras de suero para la cuantificación de niveles circulantes de TNF- α y sFlt-1 y (B) procedimientos para la obtención y almacenamiento de medios de cultivo obtenidos tras la incubación de células CE y HTR-8/SVneo con tratamientos con TNF- α , sFlt-1 y VEGF.

Determinación de niveles de sFlt-1:

El kit Human VEGF R1/Flt-1 Quantikine ELISA permitió medir los niveles de sFlt-1 presentes en el suero de pacientes control, normotensas y preeclápticas. Además de evaluar la producción de esta proteína en células expuestas a diversas concentraciones de TNF- α , VEGF y SEPI. Este ensayo consta de una prueba de ELISA de fase sólida que emplea la técnica de inmuno-ensayo enzimático cuantitativo tipo sándwich. El kit provee una placa de 96 pozos donde previamente se ha recubierto la superficie de los pozos con anticuerpo monoclonal específico para sFlt-1 humano (VEGFR-1-humano), además provee los estándares para el establecimiento de la curva de calibración.

Para el ensayo se siguieron las instrucciones del fabricante, se prepararon las muestras, estándares y reactivos según la instrucción descrita en el manual inserto. Los sueros fueron evaluados sin diluir y con dilución 1:10 (en Assay Diluent RD1-68). Para la activación de la placa de ELISA se adicionó 100 μ L de Assay Diluent RD1-68 a cada pozo + 100 μ L de los estándares y muestras en pozos por duplicado.

Se incubó la placa durante 2 horas en agitación horizontal a 500 RPM a temperatura ambiente. Seguidamente se hicieron 3 lavados con el buffer de lavado siguiendo recomendaciones del fabricante. Se adicionaron 200 μ L del conjugado de VEGFR-1 a cada pozo y se incubó la placa durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación horizontal a 500 RPM. Se hicieron 3 lavados con buffer de lavado y posteriormente se adicionó 200 μ L con la solución de sustrato y se incubó la placa durante 30 minutos sin agitación, protegida de la luz. Por último, se agregaron 50 μ L de solución de parada y se leyó la absorbancia en los 15 minutos subsiguientes en lector de placas Thermo Scientific VarioSkan Flash Plate Reader a 450 nm. Los niveles circulantes de sFlt-1 se expresaron en ng/mL, mientras que los niveles de sFlt-1 en el sobrenadante de cultivo se expresaron en pg/mL/mg de proteínas.

Determinación de niveles de TNF- α :

Se empleó el kit Bovine TNF-alpha DuoSet ELISA, ya que este kit no provee placas previamente recubiertas con anticuerpo para TNF- α , para tal fin, se utilizó también el kit DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 3 que consta de los reactivos necesarios para el revestimiento de la superficie de la placa con el anticuerpo de captura. El ensayo de ELISA para la determinación de los niveles de TNF- α es un ensayo de fase sólida de tipo sándwich. Para el ensayo se siguieron las instrucciones provistas por el fabricante. En primer lugar, se determinó el número de muestras, incluyendo estándares, por duplicado. La preparación de la placa consistió en el revestimiento de la superficie de los pozos necesarios para la prueba con el anticuerpo de captura para TNF- α bovino provisto en el kit e incubación de la placa a temperatura ambiente durante la noche. Seguidamente, se lavaron los pozos con buffer de lavado 3 veces, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se adicionó 300 μ L del reactivo diluyente provisto en el kit y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, sin agitación. A continuación, se hicieron 3 lavados con el buffer de lavado, se adicionó 100 μ L de las muestras y estándares por duplicado en los respectivos pozos y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas, sin agitación. Culminada la incubación se hicieron 3 lavados, se adicionaron 100 μ L del anticuerpo de detección y se hizo otra incubación de 2 horas a temperatura ambiente.

Se hicieron 3 lavados y se adicionó 200 μ L de la solución de estreptavidina conjugada con HRP (peroxidasa de rábano) y se incubó la placa durante 20 minutos protegida de la luz. Se hicieron 3 lavados y se adicionó 100 μ L del sustrato y se incubó la placa durante 20 minutos protegida de la luz. Para finalizar, se agregaron 50 μ L de la solución de parada y se leyó la absorbancia en los 15 minutos subsiguientes empleando lector de placas Thermo Scientific VarioSkan Flash Plate Reader configurado a 450 nm. Los niveles circulantes de TNF- α se expresaron en pg/mL, mientras que los niveles determinados en el sobrenadante de cultivo se expresaron en pg/mL/mg de proteínas.

Curvas de calibración y resultados:

Se obtuvo el promedio de las lecturas de absorbancia de muestra y estándares por duplicado de cada prueba, tomando en cuenta la lectura del blanco en cada caso. Para las curvas de calibración, se graficaron las lecturas de absorbancia en el eje Y, y las concentraciones de los estándares en el eje X, se estableció una curva de 4 parámetros logísticos (4-PL). Las lecturas de las muestras se interpolaron en la curva de calibración, en el caso de las lecturas de los sobrenadantes, estos fueron normalizados por la concentración de proteínas determinada por el método de Pierce BCA. **Figuras 3.4 y 3.5.**

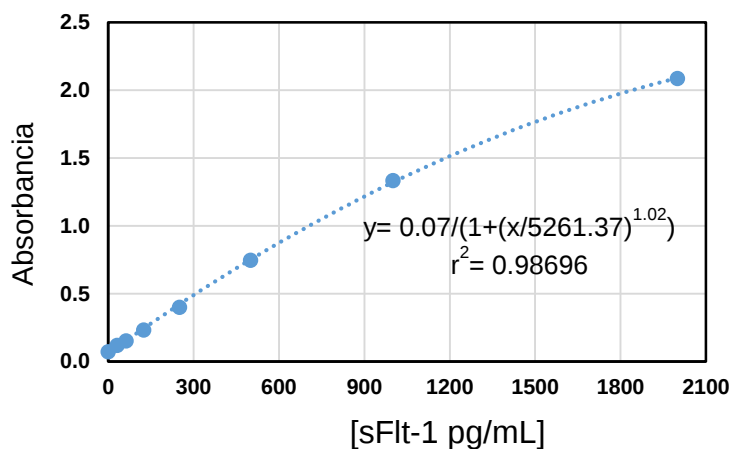


Figura 3.4 Curva de calibración de sFlt-1 (VEGF-R1). $r^2 = 0.98696$.

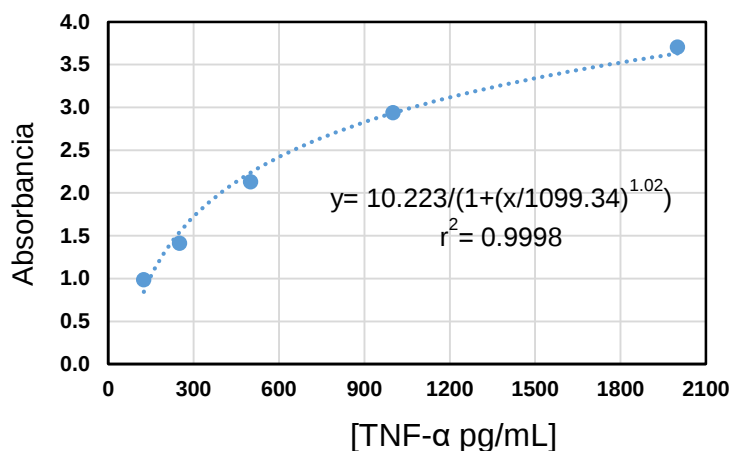


Figura 3.5 Curva de calibración de TNF-α bovino. $r^2 = 0.9998$.

3.12 Función bioenergética mitocondrial y metabolismo

Uno de los objetivos de este estudio fue evaluar el papel potencial de sFlt-1 como perturbador temprano del metabolismo celular en un modelo *in vitro* de PE. Para ello, se evaluó la actividad bioenergética mitocondrial y metabolismo glucolítico celular en tiempo real en células intactas utilizando un XFe24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse-Agilent, Billerica, MA, USA). Este equipo permite la medición de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y tasa de acidificación extracelular (ECAR) en tiempo real en el medio de cultivo de células intactas adheridas a una placa de cultivo V7, especial para esta técnica; en donde la obtención de sustratos y el metabolismo se evalúan de manera simultánea. La técnica evalúa el OCR, representativo del metabolismo mitocondrial y la ECAR como indicador de la extrusión celular de protones que ocurre durante la glucólisis. De esta manera, se identificó el perfil metabólico global y reprogramación bioenergética de las células luego del tratamiento con rh sFlt-1, TNF- α y sueros de pacientes.

Las placas V7 constan de un área de crecimiento celular similar al encontrado en placas de 96 pozos (0.32 cm² aproximadamente). Previo al inicio de los ensayos, fue determinante definir la densidad celular más adecuada para el crecimiento en estas placas y que permitieran observar una respuesta lineal entre la medición de OCR y ECAR con respecto a la densidad celular. En el caso de CEs, la literatura revisada sugirió la utilización de 4.0×10^4 células/pozo (232). En el caso de HTR-8/SVneo, la densidad óptima fue calculada entre $3.5\text{-}4.0 \times 10^4$ células/pozo.

El primer día del ensayo, las células CEs y HTR-8/SVneo, fueron sembradas en placas V7 en densidad de $3.5\text{-}4.0 \times 10^4$ células/pozo en 100 μ L de medio de ensayo respectivo para cada línea celular. Una vez sembradas, se verificó que la distribución celular fuera homogénea en cada pozo, utilizando el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-S. Al cabo de 2 horas aproximadamente, con las células adheridas a la placa de cultivo, se aplicaron los tratamientos indicados. En un primer escenario se evaluó el papel de sFlt-1 como perturbador metabólico, para ello se emplearon concentraciones de rh sFlt-1 previamente evaluadas que no indujeron respuesta anti-angiogénica (10, 25 y 50 ng/mL), también se evaluó el papel de TNF- α en el metabolismo, para lo cual se utilizaron concentraciones de 1, 10 y 100 ng/mL de la proteína recombinante. Para los estudios de correlación *in vitro*, se evaluó la reprogramación metabólica en respuesta a tratamiento con 2% de sueros de pacientes; control, normotensas y preeclámpticas. En estos escenarios y en diversas ocasiones también se suplementó con L-NAME, SEPI, MTX, GTN y VEGF; para observar la contribución de los metabolitos y/o rutas metabólicas en los cambios metabólicos. Los tratamientos se aplicaron por 24 horas, donde se mantuvieron las células incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. **Figura 3.6.**

Al cabo de las 24 horas de tratamiento, se removió el medio de cultivo y se hicieron dos lavados con 700 μ L de medio DMEM sin buffer, conteniendo 5.5 mM de glucosa (sólo para ensayos de metabolismo mitocondrial), 2mM glutamina y 1 mM de

piruvato de sodio, ajustado a pH 7.35 con NaOH a 37 °C. Seguidamente, las células fueron incubadas en el medio DMEM sin buffer durante 1 hora a 37 °C sin CO₂, para permitir el equilibrio de temperatura y pH previo al inicio de las mediciones en el equipo. Transcurrido este tiempo, ya dentro del equipo, se dio inicio a las mediciones basales de OCR y ECAR, para establecer la línea base de metabolismo mitocondrial y glucólisis, respectivamente. **Figura 3.6.**

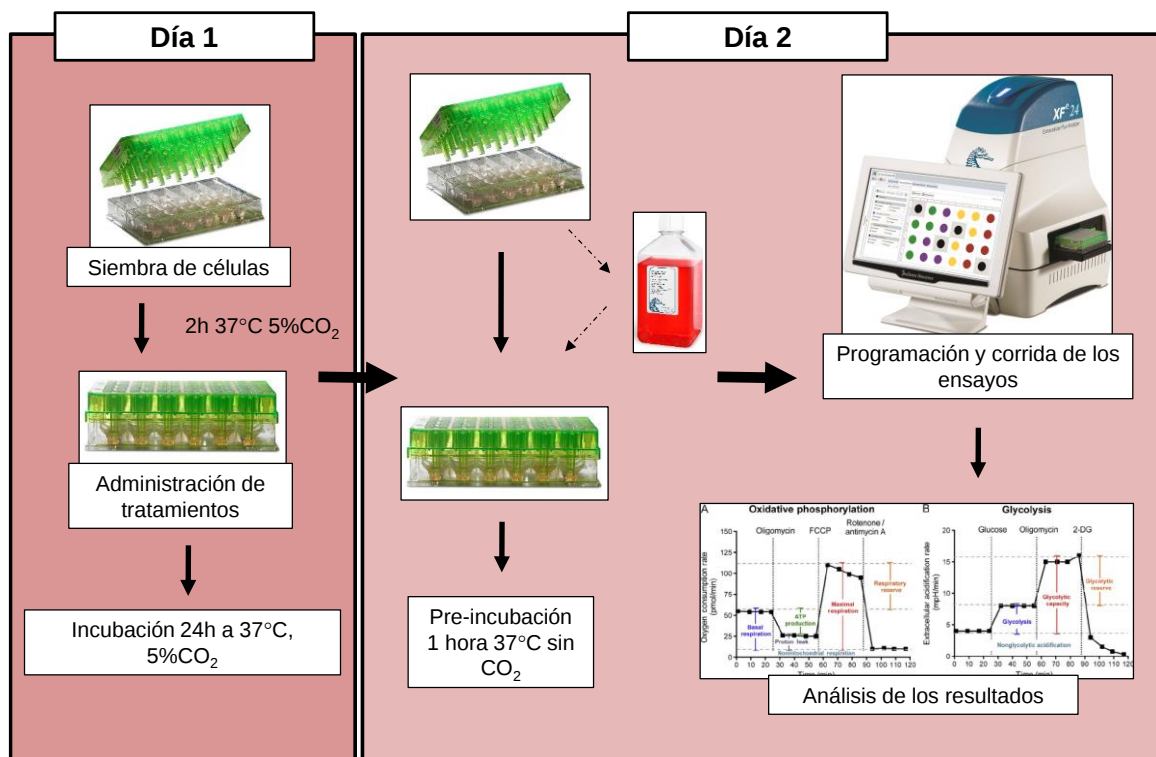


Figura 3.6 Flujo de trabajo para la evaluación de la función bioenergética mitocondrial y metabolismo.

Evaluación de la actividad bioenergética mitocondrial:

Una vez establecida la línea basal de las mediciones de ECAR y OCR, se realizaron inyecciones subsecuentes de los siguientes inhibidores de la función mitocondrial:

- Oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa) a 1mM.
- FCCP (Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone), agente desacoplante de la fosforilación oxidativa, a 0.5 mM.
- Mezcla de 1mM de rotenona (inhibidor del complejo I de CTE)/antimicina A (inhibidor del complejo III de la CTE) (Rot/AntA) en cada pozo.

Luego de cada inyección, se realizaron mediciones de ECAR y OCR en tiempo real con intervalos de 3 minutos entre cada inyección para estabilización del microambiente celular. La administración de los inhibidores de la función

mitocondrial permitió determinar la contribución relativa de diferentes parámetros de consumo de oxígeno en la mitocondria. Con este ensayo se evaluaron los parámetros: consumo de oxígeno basal (OCR-basal), consumo de oxígeno vinculado a la producción de ATP (OCR-producción de ATP), fuga de protones o “proton leak” (OCR-fuga de protones), máximo consumo de oxígeno al complejo IV de la CTE (OCR-máximo), reserva respiratoria (OCR-reserva) y respiración no mitocondrial (non-mitoOCR).

La primera inyección con oligomicina permite la inhibición del complejo V o ATP sintasa, esto ocasiona una disminución del OCR dada la inhibición de la síntesis de ATP y un aumento de la tasa glucolítica con incremento de ECAR. La diferencia entre la medición de OCR-basal y esta medida permite calcular el OCR vinculado a producción de ATP. Seguidamente, la inyección de FCCP provoca disipación del potencial de membrana mitocondrial y el flujo de electrones (e^-) a través de la CTE lo que conlleva a un dramático incremento del consumo de oxígeno y con ello la determinación del OCR-máximo al complejo IV. La diferencia entre el OCR-máximo y el OCR-basal permite calcular la OCR-reserva; ésta corresponde al total del consumo de oxígeno disponible para las células en situaciones de estrés, donde incrementa la demanda de ATP. Finalmente, la mezcla Rot/AntA inhibe el complejo III y I de la mitocondria, respectivamente; lo cual previene el consumo de oxígeno en el complejo IV, por lo cual se puede calcular el consumo de oxígeno de origen no mitocondrial (non-mitoOCR). **Figura 3.7.**

Evaluación del metabolismo glucolítico:

Para evaluar la contribución de glucólisis, se realizaron mediciones de ECAR como indicador de la glucólisis anaerobia. Tal como se indicó con anterioridad, previo al inicio de estos estudios, el lavado de las células se hizo con medio DMEM sin buffer y sin glucosa. Una vez iniciadas las mediciones en el equipo se realizaron inyecciones subsecuentes de:

- Glucosa (para estimular la glucólisis) a 5.5 mM.
- Oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa) a 1mM.
- 2-deoxi glucosa (2-DG) (inhibidor de la glucólisis) a 100 mM.

Se realizaron 3 mediciones luego de la inyección de cada una de las drogas indicadas. Esto permitió identificar parámetros del metabolismo glucolítico: glucólisis, capacidad glucolítica, reserva glucolítica y acidificación no glucolítica. La administración de glucosa estimula la glucólisis conllevando a un incremento del ECAR, la diferencia entre esta medición y la ECAR basal permite calcular la tasa de glucólisis. Seguidamente, la oligomicina inhibe la síntesis de ATP en la mitocondria, lo cual provoca otro aumento del ECAR que indica que la célula activa mecanismos compensatorios ante la falta de ATP de origen mitocondrial, lo cual se entiende como una aumentada actividad glucolítica para soportar la demanda energética

celular, la diferencia entre esta medición y la ECAR basal permiten calcular la capacidad glucolítica. Finalmente, la administración de 2-DG, análogo competitivo de la glucosa que no puede ser metabolizado por la enzima hexoquinasa a piruvato, detiene la glucólisis y permite calcular la tasa de acidificación no glucolítica. **Figura 3.7.** Al finalizar cada experimento, mediante el ensayo de Bradford se cuantificó el contenido de proteínas en cada pozo con la finalidad de normalizar por concentración de proteínas, los datos de OCR y ECAR de cada ensayo.

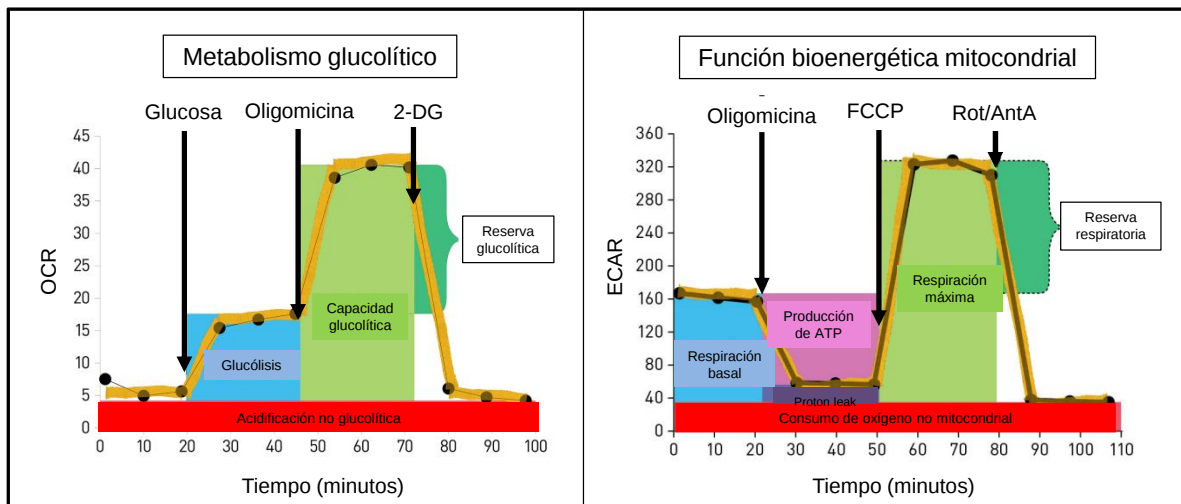


Figura 3.7 Parámetros evaluados en el metabolismo glucolítico y en la función bioenergética mitocondrial.

3.13 Fenotipo energético celular

Los datos obtenidos luego de la evaluación de la función bioenergética mitocondrial y glucólisis mediante los ensayos de bioenergética y metabolismo, permitieron evaluar el fenotipo energético celular. Para ello, se utilizaron paquetes estadísticos incluidos en archivos de MS Excel, propios de Seahorse-Agilent. En el macro de MS Excel “Cell Energy Phenotype Test Report Generator” se evalúa el potencial metabólico, fenotipo basal y fenotipo estresado de las células luego del tratamiento específico. **Figura 3.8.** Es importante definir cada uno de estos conceptos que la tecnología Seahorse-Agilent plantea al estudiar el fenotipo energético celular, a saber:

Fenotipo energético celular: Descripción acumulativa del potencial metabólico, fenotipo basal y fenotipo estresado.

Fenotipo basal: Corresponde a la medición de OCR y ECAR en condiciones basales (control), cuando no se ha administrado tratamiento exógeno proteínas recombinantes o sueros de pacientes.

Fenotipo estresado: Mediciones de OCR y ECAR en presencia de un compuesto o condiciones que generan un incremento en la demanda energética o perturbación metabólica, tales como las proteínas recombinantes y sueros de pacientes.

Potencial metabólico: Porcentaje de incremento de las mediciones de OCR estresado sobre OCR basal y porcentaje de incremento de las mediciones de ECAR estresado sobre ECAR basal. Mide la capacidad de las células de alcanzar los requerimientos energéticos por vía glucolítica o mitocondrial.

$$OCR \text{ estresado (\%)} = \frac{OCR \text{ estresado}}{OCR \text{ basal}} \times 100$$

$$ECAR \text{ estresado (\%)} = \frac{ECAR \text{ estresado}}{ECAR \text{ basal}} \times 100$$

Tal como fue descrito en la sección “Función bioenergética mitocondrial y metabolismo”, la administración de las drogas; oligomicina 1mM, FCCP 0.5 mM y mezcla de 1mM Rot/AntA, permitieron evaluar la función bioenergética mitocondrial y posteriormente, tras la normalización por concentración de proteínas (Ver sección contenido total de proteínas), los datos incluidos en el macro de MS Excel permitieron conocer los cambios en la función metabólica y fenotipo metabólico celular antes y después de los tratamientos con sFlt-1 y sueros de pacientes.

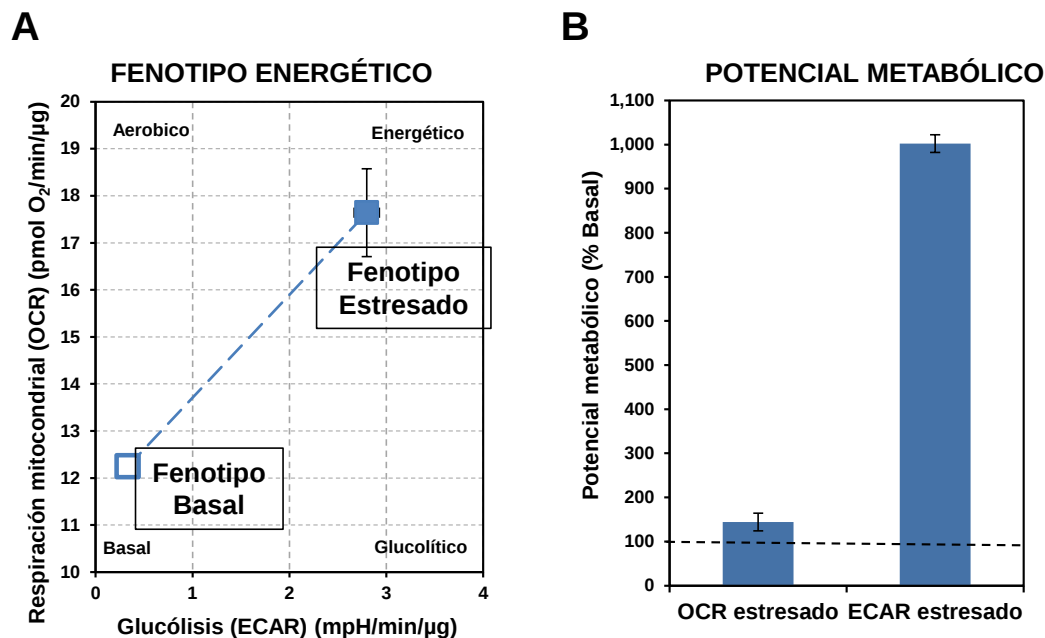


Figura 3.8 Representación gráfica de (A) Fenotipo energético celular y (B) Potencial metabólico.

3.14 Potencial de membrana mitocondrial

Para poder establecer el papel de sFlt-1 como perturbador metabólico temprano en PE, fue necesario conocer el impacto de sFlt-1 y de los sueros de pacientes en el establecimiento de disfunción mitocondrial. Para ello, se evaluaron los cambios en el potencial de membrana mitocondrial, inducidos por el modelo *in vitro* establecido. La medición de los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se realizaron utilizando la sonda fluorescente JC-1 (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). JC-1 se localiza dentro de la mitocondria y forma agregados que emiten fluorescencia roja-naranja (Ex: 550/Em: 600 nm). Cuando el Ψ_m se disipa, por cambios mitocondriales que alteran el potencial de membrana; las células emiten fluorescencia verde (Ex: 485/Em: 535 nm).

Para este ensayo, las células CEs y HTR-8/SVneo fueron sembradas en placas de 24 pozos, en densidades de 5.0×10^4 células/pozo. Las CEs en medio de ensayo (suplementado con 2% de SFB) y las HTR-8/SVneo en medio de cultivo estándar, respectivamente. Al cabo de 24 horas, se inició el ensayo, al adicionar los tratamientos con sFlt-1 (10, 25 y 50 ng/mL) y sueros de pacientes; control, normotensas y preeclámpticas. Los tratamientos se aplicaron por 24 horas, donde se mantuvieron las células incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Al finalizar el tratamiento, las células se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) estéril a 37 °C, dos veces. Seguidamente, se incubaron las células con 5µM de JC-1 en medio de cultivo por 30 minutos a 37°C en atmósfera de 5% CO₂ y en oscuridad. Luego, las células fueron lavadas nuevamente en dos ocasiones con PBS y la fluorescencia roja/verde fue medida.

En primer lugar, se tomaron imágenes fluorescentes utilizando el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-S y el software NiS Elements (USA), que permitió el procesamiento de las imágenes y el cálculo de la intensidad media fluorescente (IMF). Para confirmar los resultados obtenidos por microscopía, también se evaluó la disipación del Ψ_m por citometría de flujo. Para esta técnica, el procedimiento ya descrito incluyó que, tras la finalización con los diversos tratamientos, las células fueron tripsinizadas, lavadas e incubadas en suspensión durante 15 minutos a 37 °C, atmósfera de 5% de CO₂ y en oscuridad con el reactivo de JC-1. Luego, las células fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con paraformaldehído al 1%. Seguidamente, la fluorescencia fue medida en un BD FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) y los resultados analizados con el software Diva (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Los resultados fueron demostrados en imágenes de fluorescencia captadas y procesadas con el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-S y el software NiS Elements (USA). Además, la IMF se representó como % de cambio en función al control evaluando el ratio de fluorescencia roja/verde.

3.15 Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante HPLC

En diversos escenarios, la producción de ROS ha sido vinculada a la fisiopatología de numerosas enfermedades, tales como: aterosclerosis, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (233). Entre las diversas ROS implicadas en enfermedad, el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) reacciona directamente con el $\bullet NO$, disminuyendo su actividad biológica. Niveles elevados de $O_2^{\cdot-}$ han sido relacionados con la fisiopatología de enfermedades cardiovasculares, donde la disponibilidad del $\bullet NO$ es limitada (209). Para conocer el papel de los sFlt-1 en la producción de ROS, específicamente $O_2^{\cdot-}$, se empleó la sonda fluorescente hidroetidina (HE) y se detectó analíticamente a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La sonda fluorescente HE, oxidada en presencia de $O_2^{\cdot-}$, forma etidio (E^+) como producto de la oxidación de $2 e^-$ a partir de HE. La fluorescencia emitida por el producto E^+ se considera proporcional a la formación de $O_2^{\cdot-}$ intracelular. Tal como ha sido demostrado previamente, la oxidación de HE a E^+ no ocurre directamente por la oxidación HE mediada por $O_2^{\cdot-}$, en lugar, otro producto el 2-hidroxietidio (2-OH- E^+), con propiedades fluorescentes similares a E^+ se forma en la reacción de HE con $O_2^{\cdot-}$ (233, 234). Afortunadamente, la reacción de HE con otras especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, tales como ($ONOO^-$, $\cdot OH$, H_2O_2) no forma 2-OH- E^+ , mientras que si permite la formación de otros productos de oxidación de HE, tales como dímeros de E^+ (E^+-E^+). **Figura 3.9.** De tal manera que el monitoreo de la formación de 2-OH- E^+ , permite evaluar cualitativamente la formación de $O_2^{\cdot-}$, que puede ser identificado mediante técnicas analíticas como HPLC y detección por fluorescencia (233, 234).

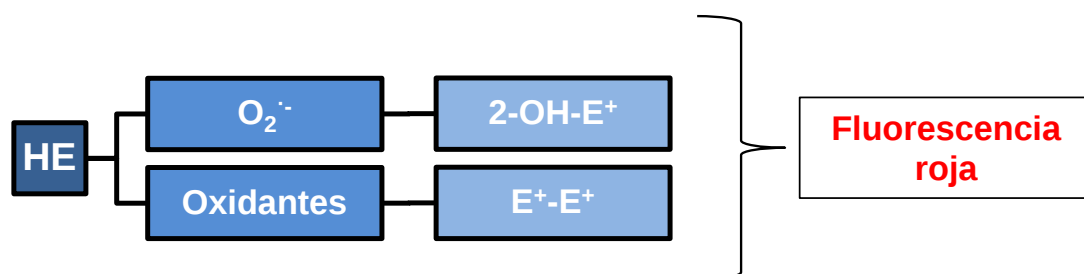


Figura 3.9 Oxidación de HE. La sonda fluorescente HE puede ser oxidada a dos productos; 2-OH- E^+ y E^+ debido a su oxidación con $O_2^{\cdot-}$ u otros agentes oxidantes, respectivamente. Obteniendo como resultado la emisión de fluorescencia roja. Imagen tomada y adaptada de: Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. Free radical biology & medicine. 2012;52(1):1-6. Epub 2011/10/27 (233).

Para la detección de $O_2^{\cdot-}$, las células CEs y HTR-8/SVneo fueron sembradas y cultivadas en placas de Petri de 100mm, se sembraron $1.0-1.5 \times 10^6$ células/placa hasta confluencia de 70-80%, se aplicaron diversos tratamientos con sFlt-1, TNF- α ,

VEGF y SEPI por 24 horas. Las CE fueron mantenidas en medio de ensayo (suplementado con 2% de SFB) y las HTR-8/SVneo en medio de cultivo estándar. Al cabo de las 24 horas de tratamiento, se removió el medio de las células, se lavaron tres veces con PBS estéril a 37°C y se administró la sonda HE en concentración de 1 μ M en Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) durante 30 minutos. La adición del agente quelante ácido dietileno triamino pentaacético (DTPA) en concentración de 100 μ M se administró a los buffers para prevenir la oxidación secundaria y formación de artefactos oxidados debido a la presencia de metales en la superficie de material de vidrio, plástico y en los buffers.

Transcurrida la incubación con HE, las células fueron cultivadas mediante raspado en PBS frío, se centrifugó la suspensión celular a 1500 RPM por 5 min a 4°C para obtener el sedimento de células. Las células fueron posteriormente lisadas en 150 μ L de 0.1% Tritón X-100 en PBS. Utilizando el lisado se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Ver sección contenido total de proteínas). Para el ensayo de detección de $O_2^{\cdot-}$, 100 μ L del lisado celular se mezclaron con 100 μ L de ácido perclórico ($HClO_4$) 0.2 M en metanol 98% (MeOH). Se incubó la mezcla en hielo durante 1 hora, seguidamente se centrifugó a 14000 RPM durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante colectado se mezcló en partes iguales (100 μ L) con buffer fosfato pH 2.6. Finalmente se centrifugó esta mezcla a 14000 RPM por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido (150 μ L) se empleó para las determinaciones analíticas a través de HPLC.

Análisis de HPLC:

Se utilizó el sistema Agilent 1100 equipado con detector de absorción UV-visible y fluorescencia. Se utilizó una columna C18 (Phenomenex, Kinetex C18, 100 $\times$ 4.6 mm, 2.6 μ m). Para el gradiente de elución se utilizó una fase móvil acuosa con un incremento del gradiente de acetonitrilo de 20% a 100% en 5 minutos, en presencia de 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). Se utilizaron estándares de: HE, 2-OH- E^+ , E^+ y E^+-E^+ para la cuantificación. Además, los resultados fueron normalizados por la concentración de proteínas, previamente determinada mediante el ensayo de Bradford. Para la detección de los diferentes productos, se utilizó el detector fluorescente con Ex: 358nm/Em: 440nm para HE. Para 2-OH- E^+ se empleó también el detector fluorescente a Ex: 490nm/Em: 567nm. Para E^+ Ex: 490/Em: 596. Finalmente, la detección de E^+-E^+ se hizo a 290 nm en absorción UV-visible.

3.16 Detección de especies reactivas de oxígeno de origen mitocondrial (mROS)

La evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de origen mitocondrial, específicamente $O_2^{\cdot-}$, permitió observar el impacto de sFlt-1, TNF- α y de los sueros de pacientes en la función mitocondrial. La producción de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial (mROS) fue evaluada con la sonda fluorescente MitoSOX Red

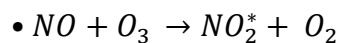
(Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). MitoSOX Red es un reactivo fluorescente específicamente dirigido a la mitocondria, (HE conjugado con catión de trifenilfosfina) (235). La oxidación de la sonda en presencia de $O_2^{\cdot-}$ produce la emisión de fluorescencia roja detectada a 580 nm (Ex: 510/ Em: 580 nm) en células intactas.

La detección de mROS en CEs y HTR-8/SVneo se hizo por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Las células CEs y HTR-8/SVneo fueron sembradas en placas de 24 pozos, en densidades de 5×10^4 células/pozo. Las CEs en medio de ensayo (suplementado con 2% de SFB) y las HTR-8/SVneo en medio de cultivo estándar, respectivamente. Transcurridas 24 horas, se inició el ensayo con la adición de rh sFlt-1 (10, 25 y 50 ng/mL), TNF- α (50 ng/mL) y sueros de pacientes; control, normotensas y preeclámpticas. En ocasiones, se adicionó SEPI, MTX y VEGF, esto permitió observar la contribución de los metabolitos y/o rutas metabólicas en la producción de mROS. Los tratamientos se aplicaron por 24 horas, donde se mantuvieron las células incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO_2 . Al finalizar el tratamiento, Las células se lavaron con PBS estéril a 37 °C, dos veces. Seguidamente, se incubaron las células con 5 μ M de MitoSOX en HBSS por 15 minutos a 37°C en atmósfera de 5% CO_2 y protegidas de la luz. Luego, las células fueron lavadas nuevamente en dos ocasiones con HBSS y la fluorescencia roja fue medida a 580 nm. Utilizando el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-S y el software NiS Elements (USA), se capturaron y procesaron las imágenes fluorescentes.

Para confirmar los resultados obtenidos por microscopía, también se evaluó la formación de mROS por citometría de flujo. Para citometría de flujo, el procedimiento ya descrito incluyó que, tras la finalización con los diversos tratamientos, las células fueron tripsinizadas, lavadas e incubadas en suspensión con MitoSOX Red durante 15 minutos a 37 °C, atmósfera de 5% de CO_2 y protegidas de la luz. Luego, las células fueron lavadas dos veces con HBSS. Posteriormente, la fluorescencia fue medida en un BD FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) y los resultados analizados con el software Diva (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Además, se calculó la IMF. Los resultados fueron demostrados en imágenes de fluorescencia captadas y procesadas con el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-S y el software NiS Elements (USA). Finalmente, la IMF se representó como % de cambio en función al control.

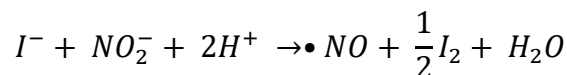
3.17 Medición de •NO

La producción de •NO se determinó cuantificando los niveles de nitritos (NO_2^-), usando un Sievers 280i Nitric Oxide Analyzer (NOA). El modelo 280i es un detector de alta sensibilidad para la medición de •NO basado en la reacción quimioluminiscente en fase gaseosa del óxido nítrico y ozono.



La emisión del dióxido de nitrógeno excitado electrónicamente, ocurre en el espectro rojo e infrarrojo cercano y es detectado por un fotomultiplicador rojo sensitivo termoelectricamente enfriado. En sistemas biológicos, el $\bullet NO$ es producido por la oxidación enzimática de la arginina. En solución, el $\bullet NO$ reacciona con el oxígeno molecular (O_2) para formar nitrito (NO_2^-); con oxihemoglobina y O_2^- para formar nitrato; con S-nitroso compuestos y aminos para formar nitrosaminas y con metales para formar complejos metal-nitrosilados. En la ausencia de oxihemoglobina y O_2^- , el NO_2^- formado de la reacción de $\bullet NO$ con O_2 corresponde al mayor producto de oxidación del $\bullet NO$.

Para la medición de $\bullet NO$, se utilizó una solución al 1% (p/v) de yoduro de sodio (NaI) en ácido acético glacial como agente reductor, para convertir los nitratos nuevamente a óxido nítrico.



Brevemente; el funcionamiento del equipo involucra el empleo de un gas inerte (helio), que hace burbujear el agente reductor, para facilitar la conversión de nitratos a $\bullet NO$. Las muestras son inyectadas al recipiente de reacción y el gas inerte acarrea el $\bullet NO$ hacia el detector del NOA. Para cuantificar $\bullet NO$, a través de la medición indirecta de NO_2^- se utilizó una curva de calibración de NO_2^- en HBSS en concentraciones de (250, 500, 750 y 1000) nM de nitrito de sodio **Figura 3.10**.

Tratamientos:

CEs y HTR-8/SVneo fueron cultivadas en placas de Petri de 60 mm hasta confluencia del 70-80%. Se aplicaron tratamientos con rh sFlt-1, TNF- α y sueros de pacientes. En diversos escenarios se adicionó SEPI y VEGF. Los tratamientos fueron aplicados por 24 horas. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas con HBSS e incubadas con 0.5 mM de L-arginina, por 1 hora a 37 °C en 5% de atmósfera de CO_2 , en HBSS conteniendo calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}). Seguidamente se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -80 °C hasta las determinaciones. El contenido de proteínas se determinó con el ensayo de Bradford (ver sección "Contenido total de proteínas"), esto permitió normalizar los resultados.

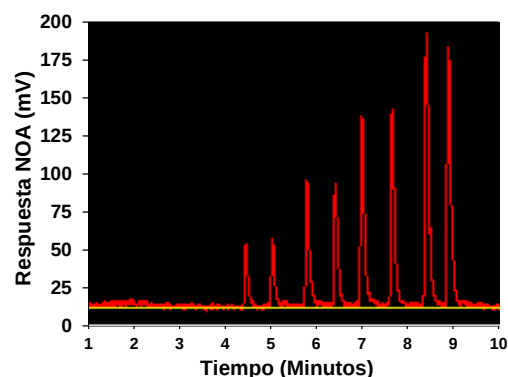
Lecturas:

Se realizaron dos lecturas para cada muestra desconocida y según su medición de respuesta NOA (mV), se interpoló el resultado en la curva de calibración. Las

lecturas fueron medidas y analizadas con el software Liquid (NOA Analysis software) (Sievers versión 3.22). Posteriormente las concentraciones de nitritos fueron normalizadas por proteínas (Ver sección contenido total de proteínas) para obtener la razón de concentración de nitritos sobre concentración de proteínas ($[\text{NO}_2^-]/[\text{mg proteínas}]$).

A

[Nitritos] (nM)	mV
250	51
500	99
750	132
1000	184



B

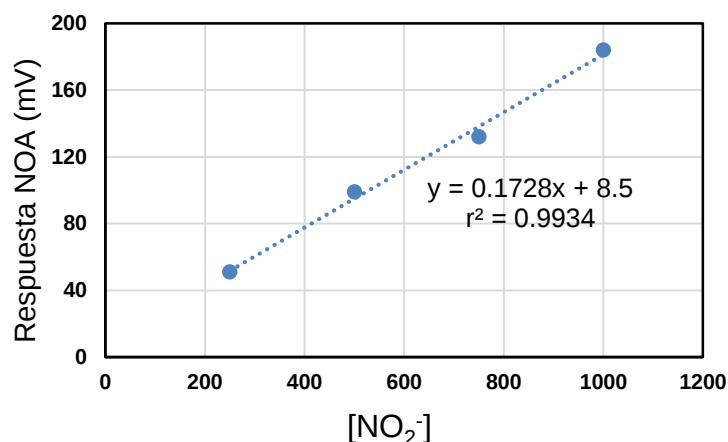


Figura 3.10 Calibración de nitritos. A: Concentraciones de nitrito de sodio empleadas para la curva de calibración de nitritos. Se realizaron dos lecturas por cada concentración con el calibrador respectivo. B: Regresión lineal y ecuación de la curva de calibración para la medición de nitritos.

3.18 Niveles de peroxinitrito (ONOO^-)

Para la determinación de la formación de ONOO^- , especie reactiva formada por la reacción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}$, se utilizó la sonda fluorescente boronato de cumarina (CBA) (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). La sonda CBA es fluorescente y se utiliza para detectar la formación de ONOO^- , ácido hipocloroso y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Sin embargo, la reacción con ONOO^- ocurre más rápidamente ($k=1.1 \mu\text{M/s}$) con respecto a la reacción con ácido hipocloroso y con H_2O_2 (234). El producto fluorescente de la reacción de CBA con ONOO^- se detectó utilizando un lector de placas Thermo Scientific VarioSkan Flash Plate Reader a Ex: 330nm/Em: 450nm.

CEs y HTR-8/SVneo fueron cultivadas en placas de 96 pozos. Se sembraron 2.0×10^4 células/pozo en medio de ensayo respectivo para cada línea celular. Al cabo de 24 horas se aplicaron los tratamientos con sFlt-1, TNF- α , VEGF y SEPI. La distribución de los tratamientos se hizo horizontalmente, para garantizar 12 pozos consecutivos por cada uno de ellos. Una hora antes de la finalización del tratamiento, las placas de 96 pozos fueron virtualmente divididas en tres grandes columnas de 4 líneas verticales cada una. La columna del extremo derecho fue tratada con el inhibidor L-NAME 0.1 mM en DPBS conteniendo cloruro de magnesio ($MgCl_2$), cloruro de calcio ($CaCl_2$) y piruvato 1 mM, durante una hora a 37°C. **Figura 3.11.**

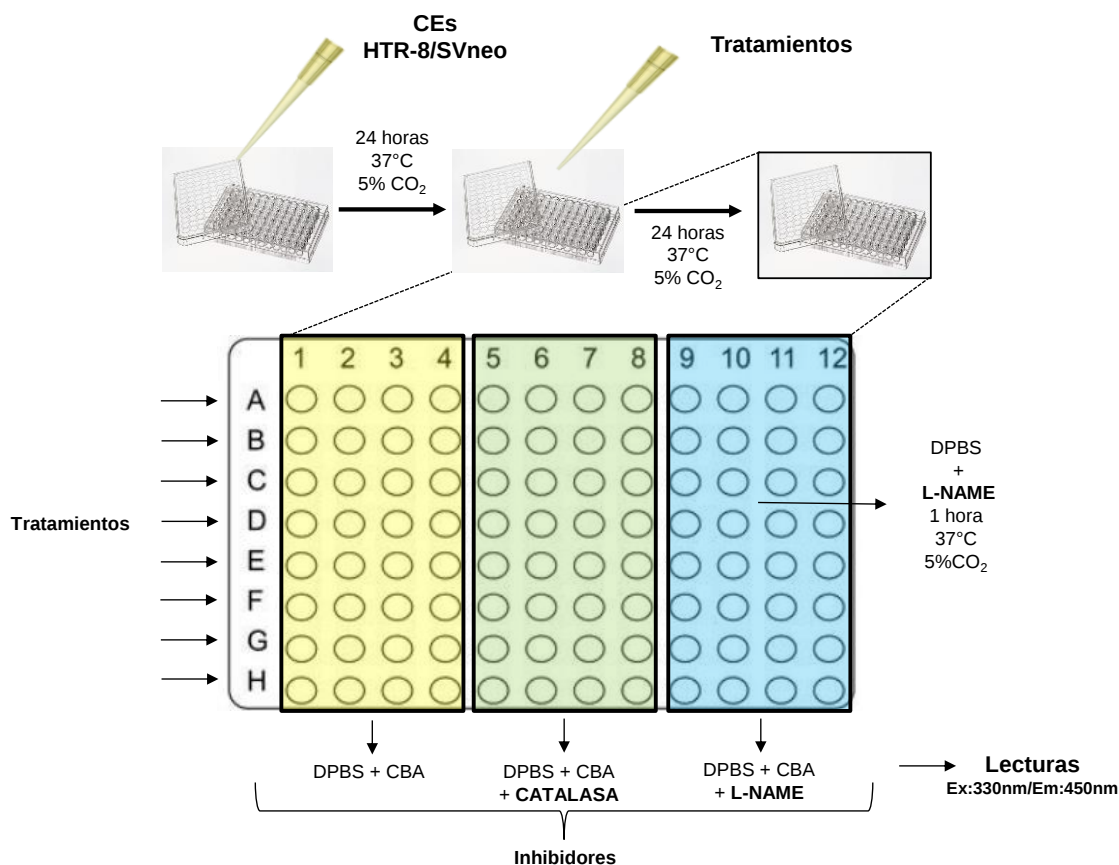


Figura 3.11 Representación esquemática del montaje del ensayo para la detección de niveles de $ONOO^-$.

Transcurrido el acondicionamiento con L-NAME por una hora, se removió el medio y DPBS de toda la placa y se administró en la columna 1, DPBS ($MgCl_2$, $CaCl_2$ y piruvato 1mM) + CBA 100 μM . Columna 2, DPBS + catalasa (CAT-4 de Fluka (Sigma-Aldrich), proveniente de *Corinebacterium glutamicin* 660 KU/mL) 10U/mL + CBA 100 μM y finalmente en la columna 3 se añadió DPBS + L-NAME 0.1 mM + CBA 100 μM . **Figura 3.11.** La fluorescencia fue medida en un lector de placas Varioskan mantenido a 37°C durante 2 horas. El equipo se programó a Ex: 330

nm/Em: 450 nm para realizar mediciones cinéticas del fondo y centro de cada pozo de la placa de 96 cada 30 segundos. En total se hicieron 240 lecturas por pozo. Una vez finalizadas las lecturas, se determinó la concentración de proteínas por el ensayo de Bradford para la posterior normalización de los resultados. Ya que la oxidación de la sonda CBA no es específica para ONOO^- , la administración de los inhibidores:

- a) catalasa previno la formación de H_2O_2 y con ello su reacción con CBA
- b) y b) L-NAME inhibió competitivamente la enzima eNOS y con ello la formación de $\bullet\text{NO}$.

Análisis de resultados:

Para el análisis de los resultados las lecturas de cada pozo fueron graficadas en función al tiempo (cada lectura se hizo cada 30 segundos). Se obtuvieron las pendientes de cada determinación por cuadruplicado con cada tratamiento e inhibidor. Los resultados fueron normalizados por la concentración de proteínas de cada pozo y el promedio de las pendientes fue expresado en función al control (solo CBA), para obtener el porcentaje de producción de H_2O_2 (L-NAME) y de ONOO^- (catalasa) por tratamiento. Además, la producción neta de ONOO^- y H_2O_2 fue comparada con respecto al control de células basal sin tratamiento.

3.19 Determinación de niveles de biopterinas (BH4/BH2)

La determinación de los niveles de BH4 permitió valorar el uso de SEPI como potencial tratamiento en PE. La determinación de biopterinas por HPLC se fundamenta en la propiedad química de las biopterinas oxidadas de emitir fluorescencia, a diferencia de las biopterinas reducidas. La determinación por HPLC esta acoplada a un detector de fluorescencia (236).

CEs fueron cultivadas en placas de Petri de 100 mm, sembradas en densidad de $1.0\text{-}1.5 \times 10^6$ células/placa, hasta confluencia de 70-80%. Se aplicaron los tratamientos con sFlt-1, TNF- α , VEGF y SEPI por 24 horas. Las CEs fueron mantenidas en medio de ensayo (suplementado con 2% de SFB). Al cabo de las 24 horas de tratamiento, se removió el medio de las células, se lavó tres veces con PBS estéril a 37°C. La obtención de células se hizo a través de raspado empleando PBS frío. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 RPM por 5 min a 4°C para obtener el sedimento de células. Las células fueron posteriormente lisadas en 200 μL de la fase móvil (50mM buffer fosfato pH 2.6), conteniendo 1 mM de ditioneol (DTT). Se clarificó el lisado mediante centrifugación a 15700 g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se empleó para los análisis de biopterinas y una alícuota se utilizó para la determinación de proteínas por el método de Pierce BCA.

Análisis de HPLC:

Previo al análisis, los sobrenadantes obtenidos fueron desproteinizados utilizando filtros Amicon de 10K (Millipore, Bedford, MA). Dichos filtros fueron pre-tratados antes del proceso de desproteinización. Para ello se hicieron centrifugaciones consecutivas de los filtros con:

- 1) NaOH 0.1 M (500 μ L) a 14000 RPM por 20 minutos.
- 2) Fase móvil (50 mM buffer fosfato pH 2.6) (500 μ L) a 14000 RPM por 20 minutos, dos veces.

Una vez finalizada la última centrifugación, los filtros se mantuvieron cerrados en baño de hielo a 4°C hasta el momento de la desproteinización de los sobrenadantes, para ello se centrifugaron los sobrenadantes en los filtros Amicon pre-tratados a 14000 RPM por 20 minutos.

Los ensayos de HPLC se llevaron a cabo en el sistema de HPLC de ESA Biosciences modelo 582-542 (ESA Biosciences CoulArray® System Modelos 582-542), con detector electroquímico acoplado. Se usó una columna Synergi Polar-RP (Phenomenex, 4 μ m, 250x4.6 mm). Para la elución se utilizó argón y fase móvil. Para la detección se empleó detector electroquímico configurado para medición coulométrica multicanal de 0-600 mV. Un canal se mantuvo configurado a -250 mV para monitorear el pico de la reversibilidad de la oxidación de BH4. Se establecieron curvas de calibración al sumar las áreas calculadas en los picos de detección a 0 y 150 mV para BH4 y a 280 y 365 mV para BH2. Los estándares fueron obtenidos de Schircks Laboratories, Switzerland. Para el cálculo de los niveles intracelulares de BH4, los resultados fueron normalizados por concentración de proteínas.

3.20 Expresión de proteínas determinada por western blot

Para la detección de la expresión de eNOS, p-eNOS, GTPCH y β -actina se llevó a cabo el ensayo de western blot. Para llevar a cabo este ensayo, las células CE y HTR-8/SVneo fueron cultivadas en placas de Petri de 100 mm, se sembraron $1.0-1.5 \times 10^6$ en medio de ensayo para cada línea celular hasta confluencia de 70%. Las placas fueron lavadas con PBS estéril a 37°C dos veces y se le agregó medio sin SFB correspondiente a cada línea celular y se incubaron las placas en este medio durante toda la noche. Seguidamente, se agregó el tratamiento con sFlt-1, TNF- α , VEGF y SEPI en medio de ensayo (CEs con 2% SFB y HTR-8/SVneo con 5% SFB) durante 24 horas de incubación a 37°C y atmósfera de 5% CO₂. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se removió el medio de cultivo y se obtuvieron las células mediante raspado, empleando 1000 μ L de PBS frío, se centrifugaron las células para obtener el sedimento durante 5 minutos a 1500 RPM a 4°C.

Una vez obtenido el sedimento, se realizó la lisis celular en buffer lisis RIPA (composición descrita en la sección ELISA) con la adición de los siguientes inhibidores de proteasas y fosfatasas:

Inhibidor	Volumen (por mL de RIPA)
Inhibidor de proteasas coctel 1X (Roche)	10 μ L
PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)	20 μ L
NaF (Fluoruro de sodio)	5 μ L
Na ₃ VO ₄ (ortovanadato de sodio)	5 μ L

Finalmente se clarificó el lisado celular mediante centrifugación a 13300 RPM por 10 minutos a 4°C. Se almacenó el sobrenadante a -80°C en alícuotas hasta el momento de los ensayos de western blot. Una alícuota se usó inmediatamente para determinar la concentración de proteínas del lisado mediante el ensayo de Pierce BCA.

Ensayo de western blot:

Las proteínas obtenidas de las células CE y HTR-8/SVneo, tratadas con sFlt-1, TNF- α , VEGF y SEPI; fueron sembradas en geles de acrilamida/bisacrilamida. Para las CE se estableció la siembra de 30 μ g de proteínas, mientras que para HTR-8/SVneo se estableció 60 μ g de proteínas. Previo a la siembra de muestras en el gel, se mezclaron en proporción 1:1 con buffer de muestras, el cual contenía glicerol 20% (v/v), SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0.1% (p/v), Tris-HCl 125 mM (pH 6.8) y β -mercapto-etanol 5% (v/v) y se les incubó a 95°C durante minutos. Finalizada esta incubación, las muestras fueron sembradas y separadas en geles de 12-16% de concentración de acrilamida/bisacrilamida, mediante electroforesis, utilizando el equipo de electroforesis Miniprotean de Biorad. La electroforesis se llevó a cabo durante 80-90 minutos, que varió según la concentración de los geles, a 120 V constantes en buffer de corrida pH 8.3, el cual contenía 25 mM de Tris-Base, 193 mM glicina y 0.1% SDS.

Para la transferencia de proteínas ya separadas en los geles, se emplearon membranas de PVDF (Fluoruro de polivinilideno) que fueron transferidas en el equipo Mini Transblot Electrophoresis Transfer Cell de Biorad en buffer de transferencia pH 8.3, que contenía 20 mM Tris-Base y 150 mM glicina, durante 1 hora a 4°C y 120 V constantes. Seguidamente se bloquearon las membranas en solución TBS-Tween20 pH 7.5, conteniendo 100 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.1 % Tween20 y 5% de albúmina bovina (BSA), con la finalidad impedir la unión inespecífica con los anticuerpos primarios en estudio, este proceso se realizó durante 1 hora a 4°C en agitación constante a 500 RPM. Posteriormente las membranas fueron incubadas en solución TBS-Tween20 y 1% BSA conteniendo los

anticuerpos primarios policlonales (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) tal como se describe a continuación.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
eNOS (NOS3) anti-rabbit (sc-654).	1:200	Goat anti-rabbit (sc-2004).	1:5000
p-eNOS (serina 1177) anti-rabbit (sc-21871-R).	1:100		
GCH-1 (GTPCH-1) anti-goat (sc-48510).	1:200	Donkey anti-goat (sc-2020).	1:5000
β -actina anti-goat (sc-1616).	1:200		

Con la finalidad de normalizar la expresión de proteínas se evaluó también la expresión de β -actina. La incubación con los respectivos anticuerpos primarios se hizo durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Seguidamente, las membranas fueron lavadas en solución TBS-Tween20 por 5 minutos, 3 veces. Para finalmente incubar las membranas en solución TBS-Tween20 y 1% BSA conteniendo el anticuerpo secundario conjugado con HRP (tal como ha sido descrito en la tabla anterior), durante 1 hora a 4°C en agitación constante. Las membranas se lavaron 3 veces en TBS-Tween20. En todos los experimentos se utilizó el revelador Pierce ECL western blotting substrate durante 10 minutos en protección de la luz. La toma y procesamiento de fotografías con el análisis densitométrico se hizo empleando el equipo Versadoc de Biorad y el software Quantity One, también de Biorad.

3.21 Contenido total de proteínas

Ensayo de Bradford:

Tras la finalización de los ensayos de bioenergética mitocondrial y metabolismo, así como los ensayos de determinación de •NO, se cuantificó el contenido total de proteínas, con la finalidad de normalizar los datos obtenidos en cada ensayo. La normalización por proteínas es un método efectivo para controlar la variabilidad de los resultados con respecto al número de células. Para ello se empleó el reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Para la cuantificación de proteínas en los ensayos de bioenergética mitocondrial y metabolismo se siguió el protocolo de Dranka et al., 2011 (237) con modificaciones. Como lo plantea el autor en su protocolo, se emplean 480 μ L del reactivo de Bradford por cada 20 μ L del lisado de proteínas. En esta investigación se optimizó dicha cantidad del reactivo de Bradford, debido a que siguiendo las instrucciones del protocolo no se consiguió mantener la linealidad en la regresión lineal de la curva de calibración para el margen de concentraciones de proteínas obtenidas en los ensayos. Tal como ha sido reportado previamente (238), el ensayo de cuantificación

de proteínas con el reactivo de Bradford (Azul de Coomassie brillante), presenta el inconveniente que en un amplio margen de concentraciones de proteínas existe una curvatura normal que no permite obtener una correspondencia con la concentración de proteínas y la absorbancia medida, lo cual afecta la sensibilidad de la prueba. Por ello, se estableció la curva de calibración empleando concentraciones de BSA de (0.125, 0.25, 0.75 y 1) mg/mL y se utilizó 1200 μ L de reactivo de Bradford por cada 20 μ L del lisado de proteínas, para mantener una proporción de 1:60 con respecto al reactivo de Bradford.

Para la cuantificación de proteínas en los ensayos de determinación de $\bullet$ NO, basado en el protocolo de Dranka et al., 2011 (237) se optimizó la curva de calibración empleando concentraciones de BSA de (0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2) mg/mL y se utilizó 300 μ L del reactivo de Bradford por cada 5 μ L del lisado de proteínas, para mantener una proporción de 1:60 con respecto al reactivo de Bradford.

En ambos casos, la determinación de la absorbancia se hizo a 590 nm, empleando un lector de placas Thermo Scientific VarioSkan Flash Plate Reader. **Figura 3.12.**

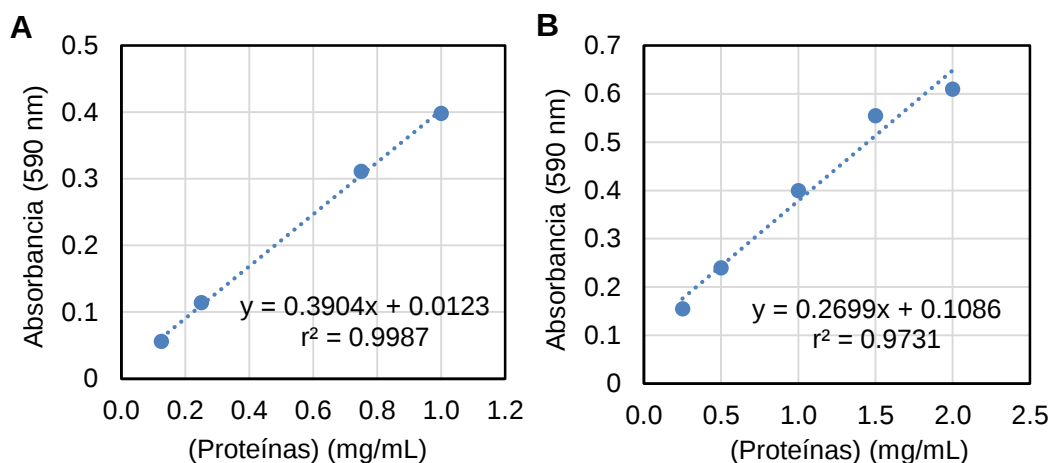


Figura 3.12 Curvas de calibración de la determinación de proteínas por el método de Bradford. (A) Curva de calibración de proteínas para el ensayo de bioenergética mitocondrial y metabolismo. (B) Calibración de proteínas para el ensayo de determinación de $\bullet$ NO.

Ensayo de Pierce BCA:

Para la determinación de expresión de proteínas por western blot y cuantificación de proteínas para la normalización de los niveles de sFlt-1 y TNF- α medidos por ELISA, se utilizó buffer RIPA como buffer de lisis. Cuando se cuantifican proteínas en este buffer es necesario hacerlo por técnicas diferentes al ensayo de Bradford, debido a que la reacción del buffer RIPA con el reactivo de Bradford genera una coloración azul, que impide la correcta cuantificación de las proteínas presentes en

el lisado. Por ello se midieron las proteínas lisadas en buffer RIPA mediante el ensayo de Pierce BCA.

Este ensayo permite la determinación del contenido proteico de forma colorimétrica, el método se basa en la reacción de Biuret, donde las proteínas en medio alcalino reducen el Cu^{2+} a Cu^{1+} , el reactivo compuesto por ácido bicinonínico (BCA) cambia de azul a violeta en presencia de proteínas. Esta característica permite cuantificar el contenido proteico por espectroscopía UV-visible al medir la absorbancia a 540 nm. Para la curva de calibración se usaron estándares de BSA en concentración de 0 – 2 mg/mL. Para el ensayo se utilizaron 10 μL del lisado o estándar y 200 μL del reactivo de BCA. Se incubó la reacción a 37°C durante 30 minutos en oscuridad y se leyó la absorbancia a 540 nm usando un lector de placas Thermo Scientific VarioSkan Flash Plate Reader. **Figura 3.13.**

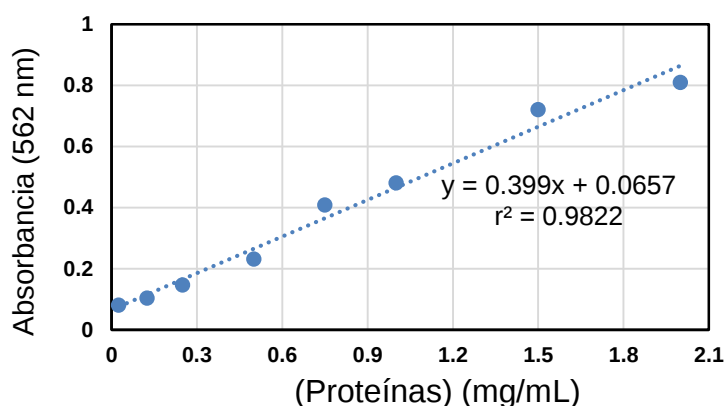


Figura 3.13 Curva de calibración de la determinación de proteínas por el método de Pierce BCA.

3.22 Aspectos éticos

Para la inclusión y participación en el estudio; todas las pacientes firmaron consentimiento informado, previamente avalado por los Comités de Ética en Investigaciones de la FCV y CMISL (*Anexos 1 y 2*). El desarrollo de este estudio no generó ningún riesgo para la vida de las personas involucradas en la investigación. El estudio cumplió con las disposiciones de la Declaración de Helsinki, las normas científicas técnicas y administrativas para la investigación en salud contempladas en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y aval de los Comités de Ética. Todos los datos recopilados para la realización de este estudio son confidenciales y utilizados sólo para fines de investigación, bajo los parámetros de la Ley 1581 de 2012 de Protección de Datos Personales en Colombia.

3.23 Procesamiento de los datos

Los datos recolectados durante el reclutamiento de pacientes fueron debidamente diligenciados en los documentos de consentimiento informado y reporte de caso (CRF). Se constató que los datos estuvieran completos, fueran legibles y consistentes. Las correcciones necesarias fueron anotadas con las fechas y las iniciales de la persona que hizo la edición. Inmediatamente después de corregir el formato, la información fue registrada y almacenada en una base de datos en MS Excel.

3.24 Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico de Stata 8.0 (Stata Corporation). El análisis descriptivo de las variables se expresó en medias y proporciones (%). La distribución de las variables continuas se analizó con la prueba de Shapiro-Wilk. La determinación de diferencias entre dos grupos se realizó mediante las pruebas de chi cuadrado, T de Student o U de Mann- Withney de acuerdo a la distribución de los datos y la homocedasticidad de las variables. En casos de comparación de múltiples grupos se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y se empleó la prueba *posthoc* de Bonferroni cuando fue apropiado. Valores de $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. Resultados

Capítulo I. El factor anti-angiogénico: soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) causa disfunción endotelial, favorece el desacoplamiento de eNOS e induce cambios en el fenotipo metabólico en preeclampsia, al interferir en la señalización dependiente de VEGF.

4.1 Introducción.

La angiogénesis es un proceso de generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de estructuras pre-existentes (48), que permite la formación y crecimiento de un nuevo organismo durante el embarazo (49, 50). En el complejo proceso de angiogénesis durante la gestación, el factor de crecimiento VEGF, juega un papel protagónico (49, 50). Como evidencia de este hecho, en estudios *in vivo* e *in vitro*, se ha demostrado que VEGF es un factor de supervivencia de CEs, a través de mecanismos relacionados a la expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (B-cell lymphoma 2 proteins) (53). Además, VEGF juega un papel fundamental en la activación de rutas de señal intracelular vía Raf, Mek y Erk que promueven la proliferación y migración celular (66) y en la formación de •NO (68), a través de la activación de PI-3K/Akt (146) y el incremento en la expresión de eNOS (67).

El •NO es un importante mediador de la angiogénesis a través de mecanismos que aún no son bien conocidos (239). Por una parte, el •NO es un factor de sobrevivencia de CEs, que inhibe la apoptosis (240). Asimismo, el •NO ejerce efectos hemodinámicos como vasodilatador, lo cual es determinante en la proliferación del endotelio y la angiogénesis (239). En relación a esto, se demostró que la activación independiente del receptor 1 y 2 de VEGF (VEGFR-1 y VEGFR-2), estimulan la formación de tubos (*in vitro*) a través de la activación de eNOS vía PI-3K/Akt (241). Estas evidencias, abren una ventana hacia nuevas teorías que relacionan a la biodisponibilidad de VEGF con la activación de eNOS y la producción de •NO en PE. El papel del •NO en PE, aún no está bien esclarecido, hasta el momento se han identificado controversias en los niveles determinados en mujeres normotensas y preeclámpicas. Una de las razones de estas inconsistencias, se debe a que no existe consenso sobre el método más idóneo para determinar los niveles de •NO, el tipo de muestra y tiempo gestacional más adecuado en el cuál se deben deberían realizar las determinaciones (11). Sin embargo, desde el punto de vista fisiopatológico, se espera que los niveles de •NO en PE, estén disminuidos.

En esta investigación se ha propuesto, que una baja activación de eNOS, como resultado del incremento de los niveles de sFlt-1; que disminuyen la biodisponibilidad e interfieren en la señalización de VEGF, podría explicar la baja producción de •NO asociados a PE. Por otra parte, tal como ha sido descrito previamente en otros modelos patológicos *in vitro*, la disponibilidad reducida de •NO, puede deberse a un desacoplamiento de la enzima eNOS, en donde su

cofactor BH4 juega un papel clave. Por tal motivo, en esta sección se propuso identificar el papel de sFlt-1 en la producción de •NO y los mecanismos moleculares que conllevan a cambios en la biodisponibilidad de este importante vasodilatador.

Por otra parte, la dinámica gestacional que permite el desarrollo de un nuevo ser vivo, es un proceso complejo que implica una serie de adaptaciones metabólicas, con un incremento en la demanda energética, aumento en la actividad y biogénesis mitocondrial. La mitocondria, es la principal maquinaria energética celular, cuya función es determinante durante el embarazo (136). En el embarazo normal, el aumento de la demanda energética conlleva a un aumento de la actividad mitocondrial para compensar los requerimientos metabólicos necesarios para sustentar el crecimiento y la proliferación celular de los tejidos placentarios y endotelial (242). La homeostasis de VEGF tiene un papel central en el mantenimiento de la biogénesis y metabolismo mitocondrial, al soportar la señalización de PI-3K/Akt (242).

En el embarazo normal, los niveles circulantes de sFlt-1 aumentan progresivamente mientras avanza la edad gestacional (64) y junto a VEGF, regulan el proceso de angiogénesis (80). En general, el incremento de los niveles de FAAs en el embarazo tiene el efecto de aumentar el tono vascular materno y mantener la perfusión uterina normal (15), actuando también como un regulador angiogénico (80). En PE, los niveles circulantes de sFlt-1, se encuentran significativamente elevados, comparado con mujeres normotensas (45, 81-83) debido a mecanismos que aún desconocidos (84). sFlt-1, antagoniza la señalización de VEGF e incrementa la sensibilidad de CEs a moléculas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (65). Hasta el momento, no se conocen los mecanismos fisiopatológicos que conllevan a ese incremento desproporcionado de los niveles circulantes de FAAs en PE. Tampoco se conocen los mecanismos moleculares que estos FAAs pueden desencadenar, a medida que los niveles circulantes van en aumento con la edad gestacional, es decir, antes de instaurarse el proceso patológico.

Investigaciones previas con el factor anti-angiogénico sFlt-1, han demostrado *in vivo* en ratones, que la infusión exógena de sFlt-1 conduce a cambios histológicos en la mitocondria y a la expresión de proteínas pro-apoptóticas con un incremento significativo en la apoptosis y estrés oxidativo (125). Esto sugiere que sFlt-1 tiene un papel clave en la aparición de la enfermedad, probablemente al disminuir la biodisponibilidad de VEGF. Para conocer los mecanismos moleculares a través de los cuales sFlt-1 conduce a enfermedad, en este estudio se planteó conocer las perturbaciones o cambios metabólicos que sFlt-1 conlleva *in vitro*, a concentraciones en las cuales aún no se evidencia respuesta anti-angiogénica, procurando emular los eventos que ocurren *in vivo*, previo a la semana 20 de gestación, cuando los niveles de sFlt-1 van aumentando progresivamente, pero antes de que sus niveles circulantes sean desproporcionadamente elevados.

4.2 Establecimiento de las concentraciones de trabajo de sFlt-1 para el modelo *in vitro* de PE.

Previamente, se ha descrito que los FAAs, entre ellos sFlt-1, están aumentados en PE (45, 81-83). Sin embargo, el impacto de estos niveles elevados en la circulación materna, para desencadenar eventos moleculares que conllevan a enfermedad, aun no son bien conocidos. Dado que, en PE, por factores aún desconocidos, los niveles de sFlt-1 superan drásticamente a los niveles encontrados en mujeres sanas; el primer enfoque de este estudio fue conocer el impacto que tiene sFlt-1 en etapas tempranas del embarazo. Al referirse a etapas tempranas del embarazo, se hace referencia a cuando los niveles circulantes de sFlt-1 comienzan a elevarse, pero antes de que se produzca una respuesta anti-angiogénica. Para ello se estableció un modelo *in vitro* de PE, empleando proteína rh sFlt-1. El ensayo escogido para encontrar las concentraciones de trabajo en las cuales no se estableciera respuesta anti-angiogénica fue el ensayo de migración, “Wound Healing Assay” (WHA). El WHA es un ensayo muy bien descrito en donde se puede observar la migración celular, tal como ocurriría en un proceso de cicatrización de heridas (230). Los resultados de este análisis fueron expresados en porcentaje en función al control, considerando a éste con un 100% de cierre de la herida.

En el modelo *in vitro* de endotelio con CEs, se trataron concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ng/mL de rh sFlt-1. Hasta 50 ng/mL, no se observó respuesta anti-angiogénica, manteniéndose un porcentaje de cierre de la herida de (103, 105 y 104) % respectivamente, para las concentraciones de 10, 25 y 50 ng/mL de rh sFlt-1. Mientras que, en concentraciones de 100 ng/mL, a pesar que estadísticamente no indicó una diferencia significativa con respecto al control ($P=0.07$), se observó una ligera tendencia a disminuir la capacidad migratoria celular (**Figura 4.1 A y C**). De la misma manera, en el modelo de trofoblastos provenientes de las extra vellosidades de placentas de primer trimestre, HTR-8/SVneo, en concentraciones de: 10-100 ng/mL no se observaron cambios estadísticamente significativos en la migración celular ($P=0.25$). Los porcentajes de cierre de la herida determinados fueron (99, 104, 99 y 106) % respectivamente, para los tratamientos de 10, 25, 50 y 100 ng/mL de rh sFlt-1 (**Figura 4.1 B y D**).

Una vez identificadas las concentraciones de trabajo que no conllevan a respuesta anti-angiogénica, se evaluó que dichas concentraciones no afectaran la viabilidad y proliferación celular. Para este fin se realizaron ensayos de viabilidad y proliferación celular, empleando los ensayos de MTT y conteo celular con colorante de exclusión azul de tripán. Los resultados de los ensayos de MTT se expresaron en función al control y los ensayos de proliferación celular con coloración de exclusión con azul de tripán en número de células viables. En CEs, la viabilidad celular fue de (97, 96, 95 y 80) % respectivamente, luego de la administración de rh sFlt-1 en concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ng/mL. Mientras que, para el ensayo de proliferación, se determinó el número de células viables tras 24, 48 y 72 horas de incubación por conteo con coloración de exclusión con azul de tripán. Vale destacar

que no se observó diferencia estadísticamente significativa con respecto a concentraciones de rh de sFlt-1 de 10-50 ng/mL en la viabilidad ni la proliferación celular ($P=0.30$ y $P=0.13$, respectivamente), (**Figuras 4.2 A y 4.3 A**, respectivamente). Sin embargo, a 100 ng/mL se observó una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular ($P=0.002$) y de la proliferación ($P=0.02$) (**Figuras 4.2 A y 4.3 A**, respectivamente).

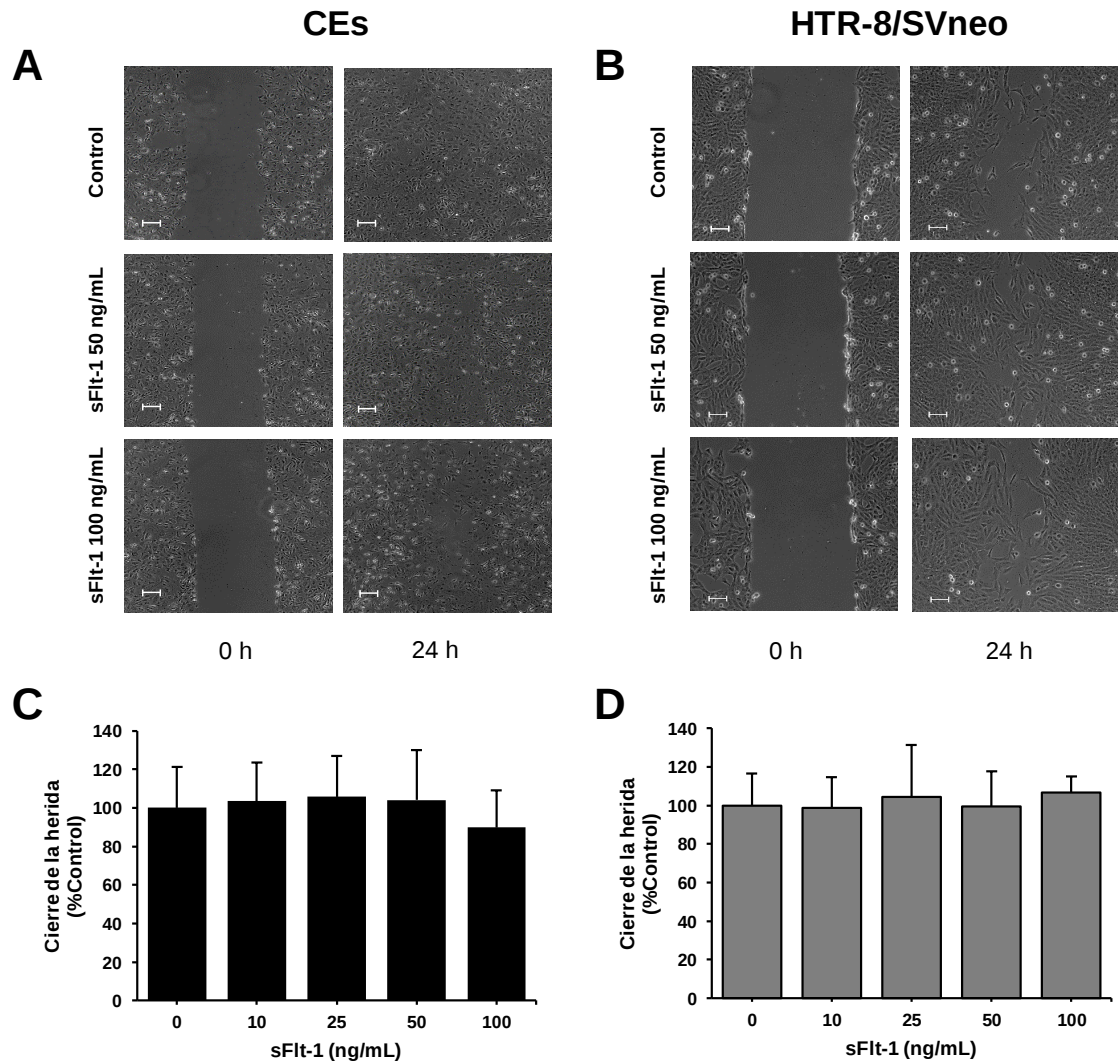


Figura 4.1 Efectos de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en la migración celular de CEs y trofoblastos. sFlt-1 se administró en concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ng/mL, el tratamiento se aplicó durante 24 horas, tras las cuales se tomaron microfotografías empleando microscopio de contraste de fases Nikon Eclipse Ti-S, en CEs y trofoblastos. (A) Microfotografías de CEs y (B) HTR-8/SVneo representando el efecto de sFlt-1 exógena en la migración celular (40X). (C) Capacidad migratoria de CEs y (D) HTR-8/SVneo representada como el cierre de la herida del ensayo WHA con respecto al control (100%). Barra: 50 μ m. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. (n=3). NS: No se observaron diferencias estadísticamente significativas ya que $P>0.05$, ANOVA).

Por otra parte, en células HTR-8/SVneo, el empleo de sFlt-1 exógena no arrojó resultados con diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad ($P=0.61$). Los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad mediante ensayo de MTT fueron de: (102, 99, 101 y 100) % respectivamente, tras los tratamientos con 10, 25, 50 y 100 ng/mL de rh sFlt-1. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la proliferación celular, determinada mediante el conteo de células viables con coloración de exclusión con azul de tripán ($P=0.19$), ver figuras 4.2 B y 4.3 B, respectivamente).

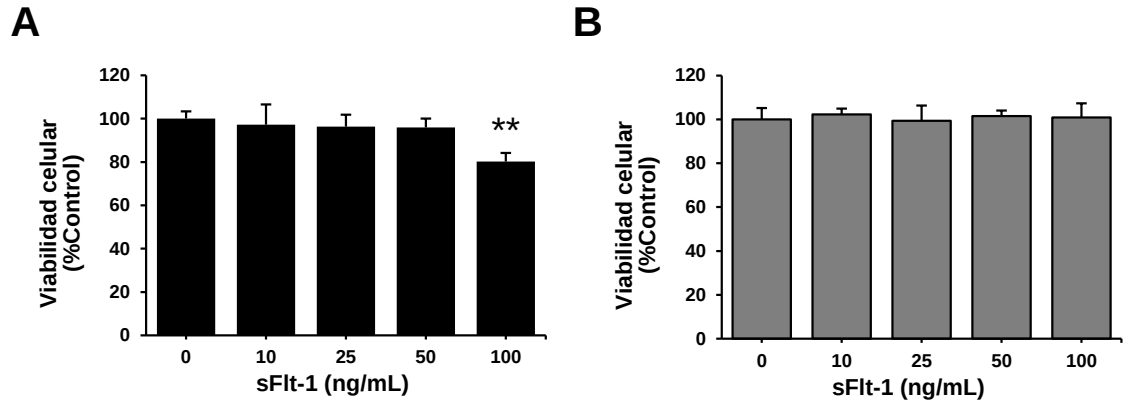


Figura 4.2 Efectos de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en la viabilidad celular de CEs y trofoblastos. sFlt-1 se administró en concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ng/mL. La viabilidad se determinó a las 24 horas del tratamiento empleando la prueba de MTT en CEs y trofoblastos. Viabilidad con respecto al control en: (A) CEs y (B) HTR-8/SVneo. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. ($n=3$), * $P<0.05$, ** $P<0.01$ con respecto al control, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

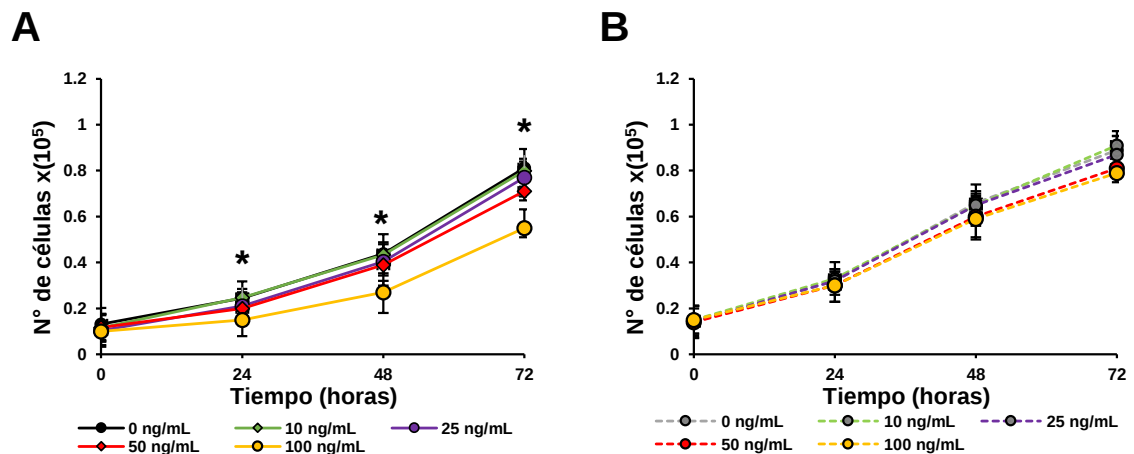


Figura 4.3 Efectos de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en la proliferación celular de CEs y trofoblastos. sFlt-1 se administró en concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ng/mL. La proliferación celular se determinó a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento, para ello se realizaron conteos empleando hematocitómetro y azul de tripán como colorante de exclusión, en CEs y trofoblastos. Proliferación celular en: (A) CEs y (B) HTR-8/SVneo. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. ($n=3$), * $P<0.05$, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Basado en los resultados obtenidos (**Figuras 4.1, 4.2 y 4.3**), se estableció que las concentraciones de trabajo para la proteína rh de sFlt-1 tanto en CEs, como en HTR-8/SVneo serían concentraciones de 10, 25 y 50 ng/mL, ya que no demostraron respuesta anti-angiogénica *in vitro*, ni cambios en la viabilidad ni proliferación celular. Por este motivo, se consideró que son las condiciones más adecuadas para conocer el impacto que sFlt-1 tiene en la bioenergética mitocondrial y metabolismo en condiciones *in vitro* que no evidencian cambios en la viabilidad celular.

4.3 sFlt-1 disminuye los niveles de •NO in vitro al reducir la biodisponibilidad de VEGF en CEs y trofoblastos.

Previamente se ha asociado una baja producción de •NO al establecimiento de PE (172, 173, 175, 182). Estudios en modelos animales, por ejemplo: en ratones RUPP (Reduced uterine perfusión pressure, por sus siglas en inglés), el cual es un modelo de estudio *in vivo* de hipertensión con ratones con reducción en la presión y perfusión uterina, han demostrado una asociación entre el balance positivo de sFlt-1 con un incremento en la vasoconstricción y en la presión arterial, debido a niveles bajos de •NO (243). Sin embargo, ya que la PE es enfermedad cardiovascular asociada al embarazo, donde no sólo los FAAs juegan un papel determinante en su fisiopatología, no se ha esclarecido si FAAs como sFlt-1 pueden alterar los niveles de •NO.

Para dilucidar estos eventos, se evaluó la producción de •NO, al cuantificar los niveles de NO_2^- , como sustituto del •NO, por quimioluminiscencia. En CEs, los niveles de NO_2^- obtenidos fueron de (140.8 y 93.9) nmol $\text{NO}_2^-/\mu\text{g}$ de proteína, para el control y el tratamiento con 50 ng/mL de rh sFlt-1, respectivamente ($P=0.003$). Mientras que, los niveles de NO_2^- obtenidos en HTR-8/SVneo fueron de (132.5 y 104.3) nmol $\text{NO}_2^-/\mu\text{g}$ de proteína (control y tratamiento con 50 ng/mL de rh sFlt-1), respectivamente ($P=0.04$). Estos resultados muestran una disminución en la producción de •NO en presencia de sFlt-1, en CEs y en HTR-8/SVneo (**Figura 4.4 A y B**). Seguidamente, fue importante conocer la relación existente entre la baja producción de •NO encontrada y la señalización de VEGF. Esto permitiría a continuación, constatar el papel de sFlt-1 en la reducción de la producción del •NO. Para ello, se administró 20 ng/mL de proteína rh VEGF y se observó la restauración de los niveles de •NO a nivel del control, en presencia de este factor de crecimiento; tanto en CEs (122.4 nmol $\text{NO}_2^-/\mu\text{g}$ de proteína) ($P=0.03$ con respecto al grupo tratado con sFlt-1) como en HTR-8/SVneo (125.9 nmol $\text{NO}_2^-/\mu\text{g}$ de proteína) ($P=0.02$ con respecto al grupo tratado con sFlt-1) ($P=0.16$ y $P=0.26$, respectivamente con respecto al control) (**Figura 4.4 A y B**).

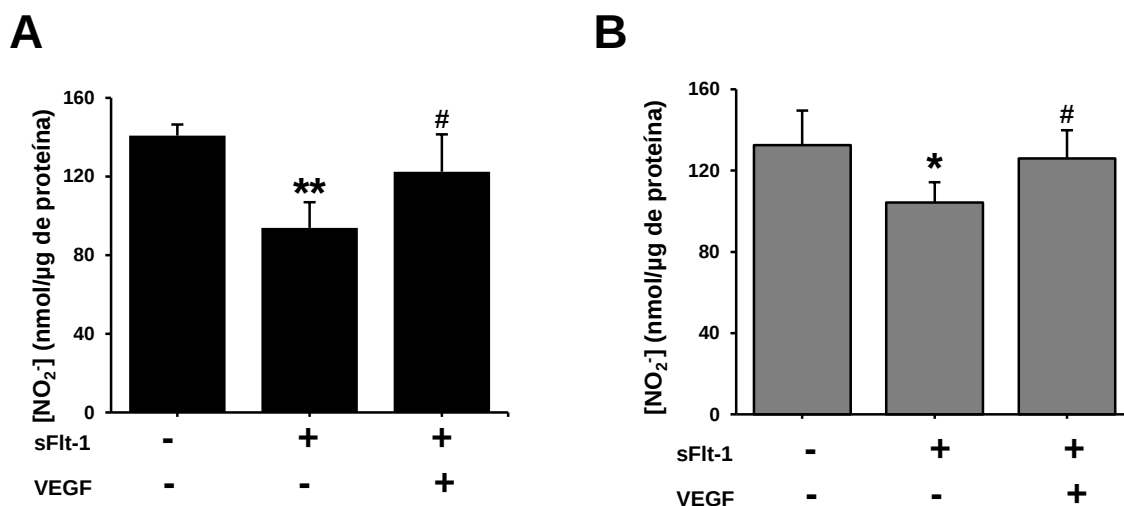


Figura 4.4 Efectos de sFlt-1 en la producción de •NO en CEs y HTR-8/SVneo. Se administró sFlt-1 (50 ng/mL) y VEGF (20 ng/mL) durante 24 horas a CEs y trofoblastos, el •NO se determinó mediante su sustituto, el NO₂⁻ a través de quimioluminiscencia. (A) Producción de •NO en CEs y (B) HTR-8/SVneo medidas como la concentración de NO₂⁻ (nmol NO₂⁻/μg de proteína). Los datos están presentados con la media ± SEM con respecto al control. (n=3), **P*<0.05, con respecto al control, #*P*<0.05, con respecto al grupo tratado con sFlt-1 (prueba T de Student).

4.4 sFlt-1 afecta la activación de eNOS en CEs y HTR-8/SVneo.

Una vez conocido el efecto de sFlt-1 en la producción de •NO, fue significativo conocer el mecanismo molecular que conlleva a estos cambios en la disponibilidad de este importante vasodilatador. Por ello, se evaluó la expresión de eNOS y la su activación, mediante la fosforilación en el residuo de serina 1177, en CEs y HTR-8/SVneo. El tratamiento de las células con las proteínas rh sFlt-1 y VEGF se realizó durante 15 minutos, se empleó este tiempo ya que se ha demostrado previamente que es suficiente para inducir la fosforilación de eNOS en células endoteliales aorticas bovinas (244).

Se encontró que sFlt-1 no provoca cambios en la expresión de eNOS, pero si influye en la activación de esta enzima al observar una reducción la fosforilación de eNOS (p-eNOS), identificado por western blot en función al control (**Figura 4.5**). En la **figura 4.5 A y B** se observan las bandas de expresión de eNOS para CE y HTR-8/SVneo luego del tratamiento con 50 ng/mL de sFlt-1. La administración de proteína rh sFlt-1 no conlleva a cambios en la expresión de eNOS en ningún caso (*P*=0.4 y *P*=0.72, respectivamente para CEs y HTR-8/SVneo) (**Figura 4.5 C y D**). Tal como ha sido demostrado en otros modelos cardiovasculares, la baja activación de eNOS también puede tener un papel fundamental en la baja producción de •NO (245), por ello se evaluó por western blot la activación de eNOS al medir la fosforilación de eNOS en la serina 1177. Se encontró que la fosforilación de eNOS disminuye en CEs y HTR-8/SVneo expuestas a sFlt-1 (50 ng/mL) (*P*=0.02 y *P*=0.02,

respectivamente) (**Figura 4.5 E y F**). Estos efectos fueron reestablecidos al nivel del control, al administrar 20 ng/mL de proteína rh VEGF ($P=0.37$ y $P=0.28$, respectivamente) (**Figura 4.5 A y B**). Bajo las bandas, se muestran las unidades densitométricas normalizadas con la expresión de β -actina ($P=0.35$) (**Figura 4.5 C-F**). La razón p-eNOS/eNOS, tal como se observa en la **figura 4.6** demuestra como en presencia de sFlt-1 disminuye la fosforilación de eNOS tanto en CEs como en HTR-8/SVneo (**Figura 4.6 A y B**).

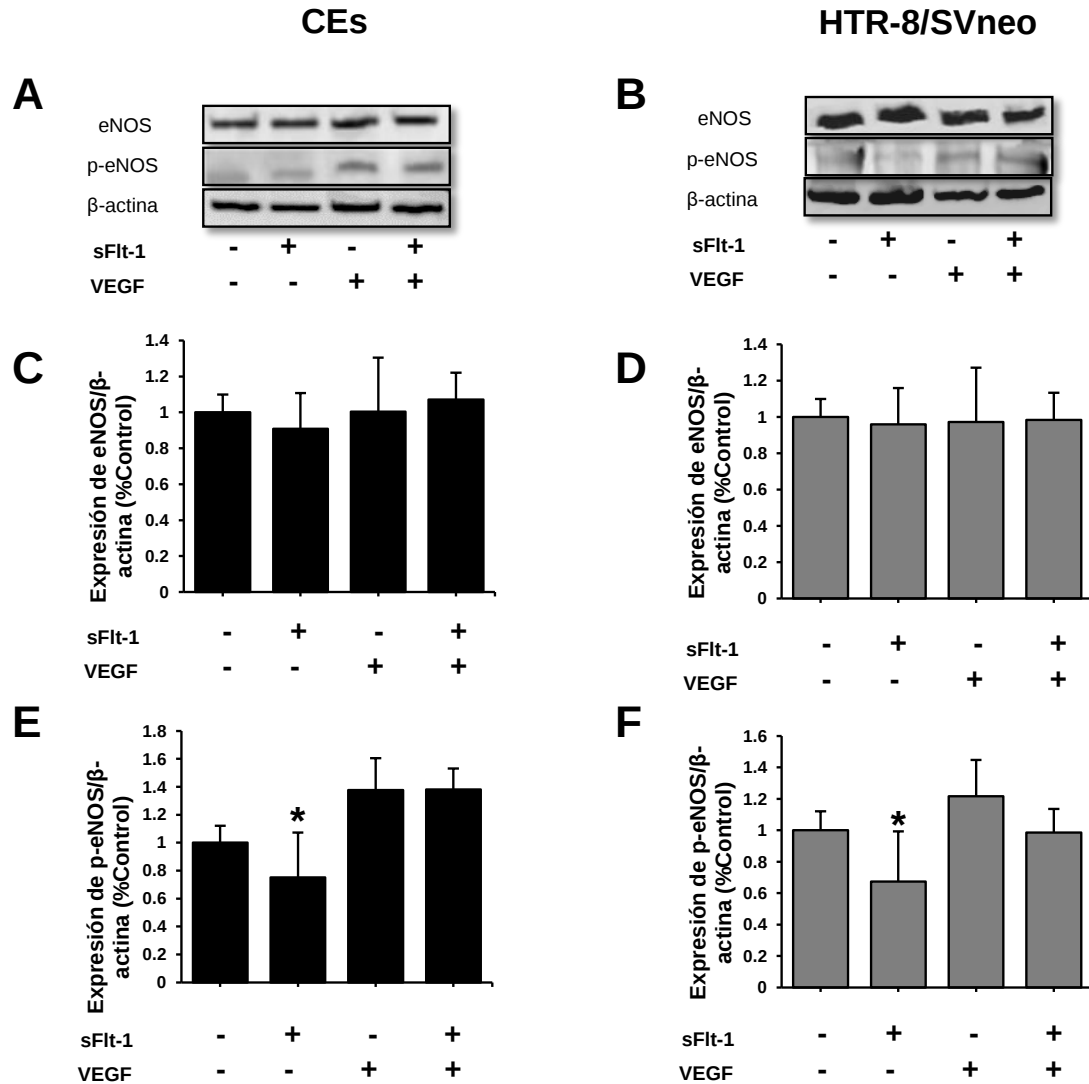


Figura 4.5 Efectos de sFlt-1 en la expresión de eNOS y p-eNOS en CEs y HTR-8/SVneo. La recuperación y lisado de proteínas se realizó tras 15 minutos de incubación con las proteínas rh sFlt-1 (50 ng/mL) y VEGF (20 ng/mL) y se determinó por western blot en CEs y trofoblastos. La exposición de: (A) CEs y (B) HTR-8/SVneo con sFlt-1 no afecta la expresión de eNOS, pero si afecta significativamente la activación de eNOS. La administración de 20 ng/mL de proteína rh VEGF, restablece la activación de eNOS. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. (n=3), * $P<0.05$, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

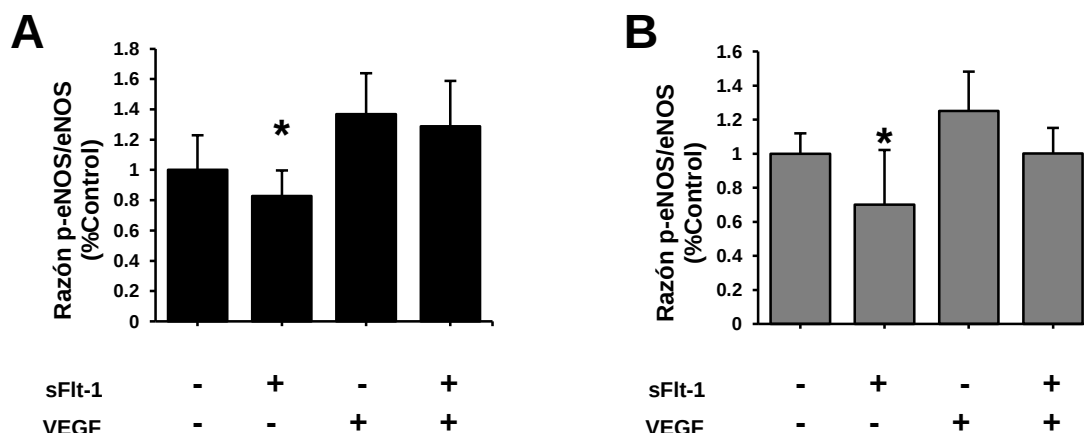


Figura 4.6 Efectos de sFlt-1 en la activación de eNOS en CE y HTR-8/SVneo. La recuperación y lisado de proteínas se realizó tras 15 minutos de incubación con las proteínas rh sFlt-1 (50 ng/mL) y VEGF (20 ng/mL) y se determinó por western blot en CE y trofoblastos. La exposición de: (A) CE y (B) HTR-8/SVneo con sFlt-1 afecta significativamente la activación de eNOS. La administración de 20 ng/mL de proteína rh VEGF restableció la activación de eNOS a nivel del control. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. (n=3), $P<0.05$, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

4.5 sFlt-1 desacopla la enzima eNOS en CE y trofoblastos.

Tal como fue descrito por Vásquez-Vivar et al., 1998; la actividad de la enzima eNOS requiere el acoplamiento de los dominios oxidasa y reductasa, mediados por la presencia de cofactores enzimáticos, entre los cuales fue identificado que BH4 es determinante (164). Ya que en el presente estudio se identificó que sFlt-1 media un proceso de DE a través de mecanismos que involucran una producción reducida de $\bullet\text{NO}$, con disminución en la activación de eNOS; se evaluó la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en presencia de sFlt-1 empleando la sonda HE y los niveles de BH4 por HPLC. Estas mediciones se realizaron con la finalidad de observar el papel de sFlt-1 en el acoplamiento de la enzima eNOS.

La sonda fluorescente HE, oxidada en presencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$, forma etidio (E^+) como producto de la oxidación de 2e^- a partir de HE. La fluorescencia emitida por el producto E^+ se considera proporcional a la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ intracelular. Tal como ha sido demostrado previamente, la oxidación de HE a E^+ no ocurre directamente por la oxidación HE mediada por $\text{O}_2^{\cdot-}$, en lugar, otro producto 2-OH- E^+ , con propiedades fluorescentes similares a E^+ se forma en la reacción de HE con $\text{O}_2^{\cdot-}$ (233, 234). Afortunadamente, la reacción de HE con otras especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, tales como (ONOO^- , $^{\cdot}\text{OH}$, H_2O_2) no forma 2-OH- E^+ , mientras que sí permite la formación de otros productos de oxidación de HE, tales como dímeros de E^+ (E^+-E^+). Por tal motivo, se detectó por HPLC empleando detector de fluorescencia la formación de 2-OH- E^+ .

Tras la administración de rh sFlt-1 (10 y 50) ng/mL, los niveles de $O_2^{\cdot-}$ detectados por HPLC en CEs fueron de: (7.532 ± 2.4) y (11.76 ± 1.1) nmoles/mg de proteína, respectivamente. En comparación con los niveles detectados en el control de 5.676 ± 1.14 nmoles/mg de proteína. Se encontró diferencia estadísticamente significativa con respecto al tratamiento de 50 ng/mL de rh sFlt-1 ($P=0.02$) (**figura 4.7**). La administración de rh VEGF en concentración de 20 ng/mL restableció los niveles de $O_2^{\cdot-}$ (2.209 ± 0.5) nmoles/mg de proteína a niveles que no fueron estadísticamente diferentes al control. Estos hallazgos muestran una diferencia significativa con respecto al control ($P=0.01$) y con respecto al tratamiento con rh sFlt-1 50 ng/mL ($P=0.01$).

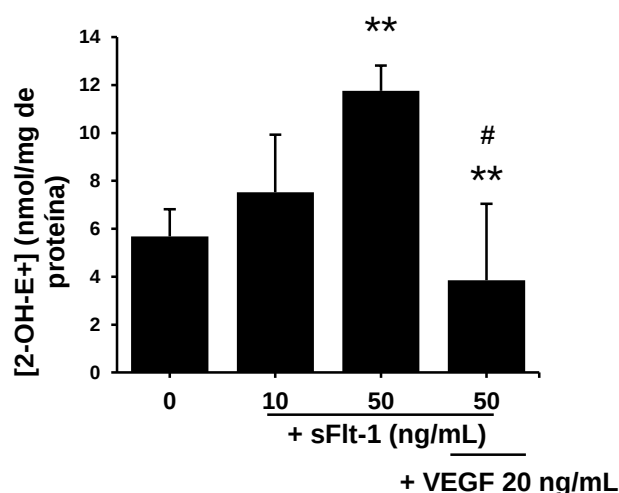


Figura 4.7 Detección de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en respuesta a sFlt-1 en CEs. La administración de sFlt-1 conlleva al incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en CEs detectado por HPLC, empleando la sonda HE, luego de 24 horas de tratamiento con la proteína rh sFlt-1 (50 ng/mL). La administración de VEGF (20 ng/mL) reestableció la producción de $O_2^{\cdot-}$ a nivel del control. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3), * $P<0.05$, ** $P<0.01$ con respecto al control, # $P<0.01$ con respecto al tratamiento con sFlt-1 50 ng/mL, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Por otra parte, se consideró el papel del cofactor BH4 en el acoplamiento de eNOS. Ya que el mantenimiento de los niveles de BH4 es fundamental para el acoplamiento de eNOS, se midieron los niveles de BH4 en presencia de sFlt-1 y VEGF por HPLC. Luego de la administración de rh sFlt-1 en concentración de 10 ng/mL se detectaron niveles de BH4 de (14.65 ± 0.43) pmol/mg de proteína, la administración de 50 ng/mL conllevó a niveles de (10.97 ± 1.36) pmol/mg de proteína. Mientras que los niveles detectados en el control fueron de (48.65 ± 13.6) pmol/mg de proteína ($P=0.03$). En la **figura 4.8** se observa el efecto de sFlt-1 en los niveles de BH4, los cuales disminuyen significativamente en presencia de sFlt-1 en CEs. Vale destacar que la administración de VEGF no logró restablecer los niveles de BH4 a nivel del control (**Figura 4.8**).

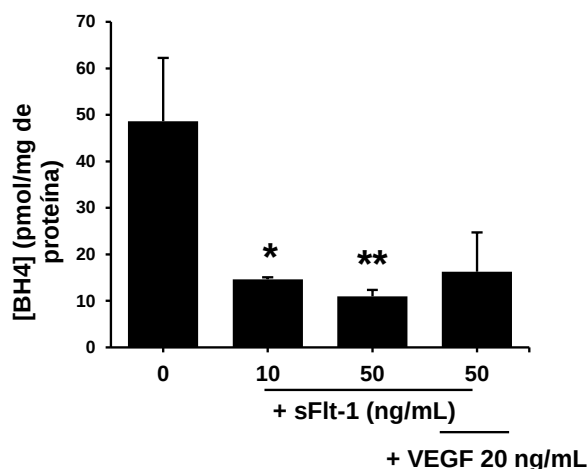


Figura 4.8 Efectos de sFlt-1 en los niveles de tetrahidrobiopterina (BH4) en CE. La administración de sFlt-1 conlleva a la disminución en la producción de BH4 en CE detectado por HPLC, luego de 24 horas de tratamiento con la proteína rh sFlt-1 (50 ng/mL). La administración de VEGF (20 ng/mL) no restablece los niveles de BH4 a nivel del control. La determinación se realizó tras 24 horas de tratamiento con la proteína rh sFlt-1 (50 ng/mL) y VEGF (20 ng/mL). Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. (n=3), * P <0.05, ** P <0.01, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Estos resultados, sugieren que sFlt-1 conlleva al desacoplamiento de eNOS, establecido debido a una baja disponibilidad del cofactor BH4. La biodisponibilidad de BH4 refleja el balance entre la síntesis de novo, (donde GTPCH-1 es la enzima limitante) y la reducción de BH2 a BH4 por la vía salvaje (vía DHFR). La razón BH4/BH2 puede verse afectada cuando el reciclaje de las formas oxidadas del cofactor BH4 es reducida, proceso mediado por la enzima DHFR (246). Por una parte, el incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ observada en presencia de sFlt-1, sugiere que la baja disponibilidad de BH4 en presencia de sFlt-1, ocurre debido a que el reciclaje de BH2 a BH4 podría verse afectado, dados los niveles de $O_2^{\cdot-}$ determinados. En concordancia, tal como ha sido previamente reportado, el acoplamiento de eNOS no solamente obedece a bajos niveles de BH4, sino también a la disminución en la razón BH4/BH2 (246).

Sin embargo, no se puede descartar que la obtención de BH4 también involucre a su biosíntesis, mediada por la enzima GTPCH-1. Por tales motivos, y para evaluar el papel que juega la enzima GTPCH-1 en la generación de BH4, se evaluó su expresión por western blot. Para este fin, CE y trofoblastos fueron cultivados en presencia de sFlt-1 50 ng/mL durante 24 horas, tras este tiempo, se obtuvo el lisado de proteínas. En la **figura 4.9** se observan las bandas de expresión de GTPCH, demostrando que sFlt-1 (50 ng/mL) no afecta la expresión de esta enzima en CE ni en HTR-8/SVneo. Bajo las bandas, se evidencia un gráfico de barras que muestra las unidades densitométricas normalizadas con la expresión de β -actina. La expresión de GTPCH-1 no varió en presencia de sFlt-1 (P =0.21 y P =0.38, respectivamente) (**Figura 4.9 A y B**).

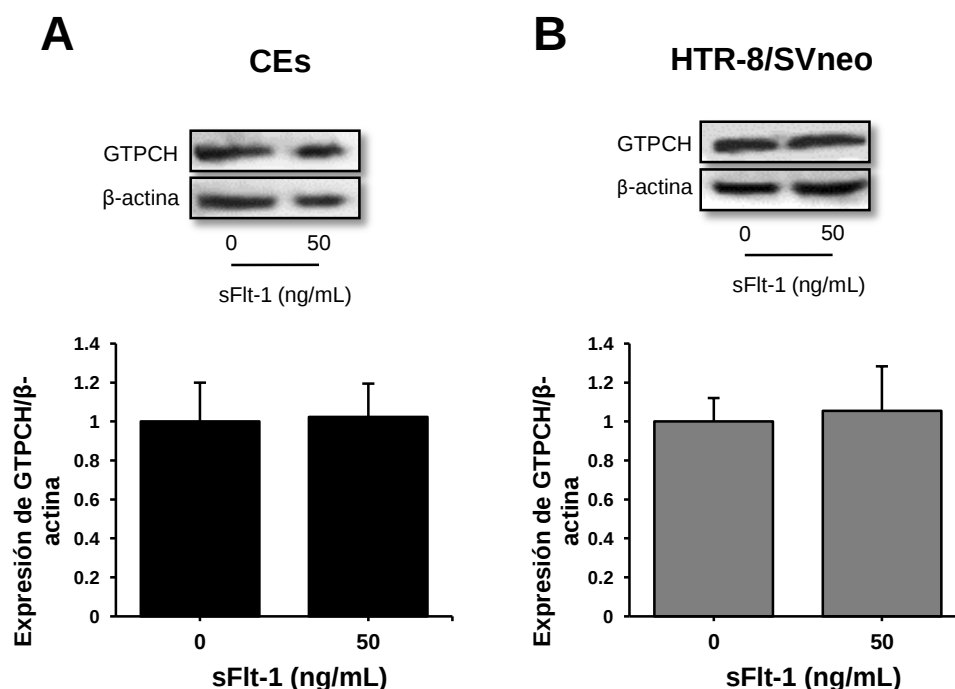


Figura 4.9. Efectos de sFlt-1 en la expresión de GTPCH-1 en CEs y HTR-8/SVneo. La recuperación y lisado de proteínas se realizó tras 24 horas de tratamiento con la proteína rh sFlt-1 (50 ng/mL). Expresión de GTPCH-1 en: (A) CEs y (B) HTR-8/SVneo, tratadas con sFlt-1 se determinó por western blot, en CEs y trofoblastos. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. (n=3), (prueba T de Student).

Estos resultados sugieren, que los mecanismos moleculares involucrados en la baja disponibilidad de BH4 encontrada y mostrada en la **figura 4.8**, probablemente se asocian a la actividad y reciclaje de BH2 vía DHFR y no a mecanismos relacionados a su biosíntesis.

4.6 El factor anti-angiogénico sFlt-1 afecta la función bioenergética mitocondrial en CEs.

Antes de iniciar los ensayos de bioenergética mitocondrial y metabolismo, se consideraron las variables del ensayo que debían ser previamente estandarizadas antes de iniciar experimentos. Tal como fue descrito en la sección de “Materiales y métodos, sección: Función bioenergética mitocondrial y metabolismo”, la densidad celular escogida para CEs se basó en experiencias previas de Dranka et al., 2010 (232). En el caso de HTR-8/SVneo, al momento no existen reportes que sugieran una densidad celular óptima para esta línea celular en esta técnica. Por tal motivo, se evaluaron densidades de 1.0 a 4.0×10^4 células/pozo y se encontró que entre 3.5 - 4.0×10^4 células/pozo existe una respuesta lineal entre la medición de OCR y ECAR con respecto a la densidad celular (**Figura 4.10**). El análisis de regresión lineal, demostró valores de r^2 de 0.9924 para OCR y de r^2 de 0.9494 para ECAR, lo

cual indicó una fuerte correlación con respecto a la densidad celular escogida. Como ha sido previamente demostrado (232), la correspondencia de OCR y ECAR con respecto a la densidad celular sólo es lineal entre ciertos rangos de densidad celular. Asimismo, la tecnología Seahorse-Agilent sugiere que para el equipo XFe24, las mediciones de OCR se encuentren entre 20-300 pmol O₂/min y que de ECAR sean superiores a 2.0 mpH/min para validar la sensibilidad de las mediciones.

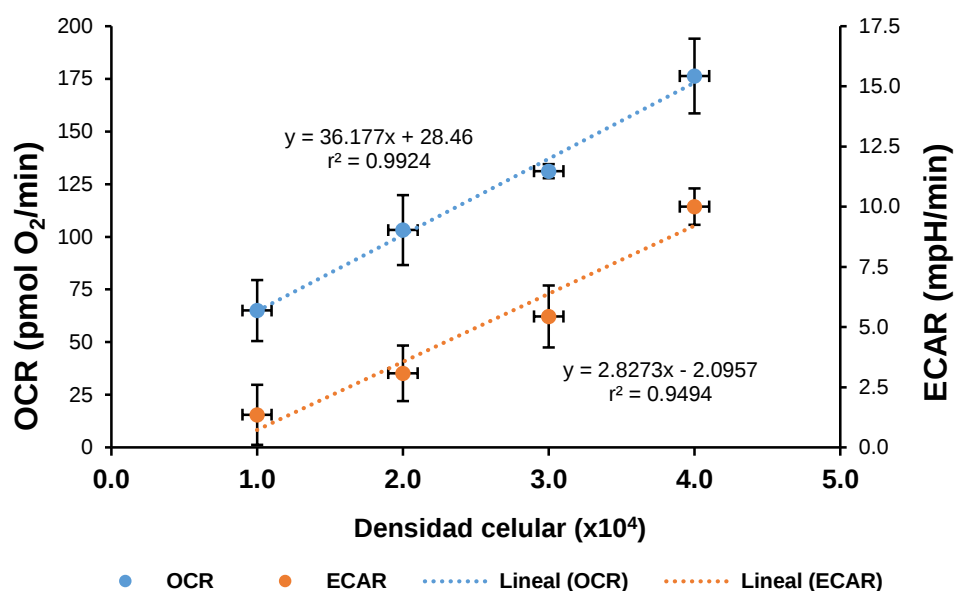


Figura 4.10 Parámetros de OCR y ECAR para la estandarización de la densidad celular de HTR-8/SVneo. Células HTR-8/SVneo fueron sembradas en placas V7 (Seahorse) en densidades de: 10, 20, 30 y 40 x 10⁴ células/pozo. Tras 24 horas, se determinó el OCR y ECAR utilizando el kit de glucólisis y la tecnología Seahorse-Agilent. El coeficiente de correlación (r^2) para OCR fue 0.9924 y para ECAR $r^2=0.9494$. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5).

Por tales motivos, en ambas líneas celulares, la densidad celular establecida y estandarizada para todos los análisis de bioenergética mitocondrial y metabolismo fue de 3.5-4.0 x 10⁴ células/pozo (Estandarización de densidad celular en HTR-8/SVneo en **figura 4.10**).

Otra variable a considerar para estudiar la bioenergética mitocondrial fue el establecimiento de las concentraciones de las drogas: oligomicina, FCCP y mezcla de Rot/AntA a emplear. Para CEs, basado en experiencias previas de Dranka et al., 2010 (232), se determinó la utilización de oligomicina 1 μ M, FCCP 0.5 μ M y 1 μ M de Rot/AntA. Mientras que para HTR-8/SVneo, dado que no existen experiencias previas de medición del metabolismo mitocondrial en células intactas con la tecnología de Seahorse-Agilent, se estandarizó las concentraciones más adecuadas para las drogas; se evaluaron concentraciones de 0.5 y 1 μ M de oligomicina y 0.5 y 1 μ M de Rot/AntA obteniendo resultados similares con ambas concentraciones (**Figura 4.11 A y C**, respectivamente). Por lo tanto y para mantener

igual tratamiento con respecto a las CEs en estudio, se estableció utilizar 1 μM de oligomicina y 1 μM de Rot/AntA. Mientras que al evaluar FCCP, se encontró que a concentraciones de 0.5 y 1 μM de FCCP la respuesta de OCR no aumentó con respecto a los niveles de OCR basales. Esto indicó que a pesar de la aceleración en el consumo de oxígeno que induce FCCP al aumentar la demanda energética, en HTR-8/Svneo, la reserva respiratoria es prácticamente nula. La ausencia de reserva respiratoria indica que HTR-8/Svneo es una línea celular que incluso en condiciones basales funciona a su máxima capacidad respiratoria. Ya que un exceso de FCCP podría conllevar a una sobre estimulación energética, se estableció el empleo de 0.5 μM de FCCP como concentración óptima para los ensayos con la línea celular HTR-8/Svneo (**Figura 4.11 B**).

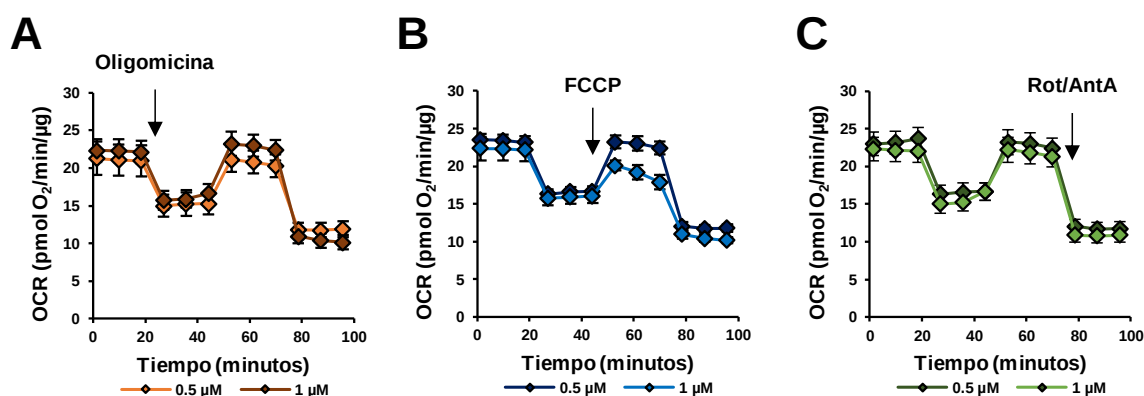


Figura 4.11 Estandarización de las concentraciones de las drogas a emplear en los ensayos de bioenergética mitocondrial de Seahorse en HTR-8/SVneo. Se realizaron determinaciones de metabolismo bioenergético mitocondrial empleando diversas concentraciones de las drogas: oligomicina, FCCP y mezcla Rot/AA (rotenona/antimicina A). (A) Oligomicina, (B) FCCP (Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone) y (C) Rot/AntA. Para cada droga, se evaluó la respuesta de OCR obtenida luego de administrar concentraciones de 0.5 y 1 μM de cada una. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5).

Una vez establecidas las variables de densidad celular y concentración de drogas, se iniciaron los estudios de bioenergética mitocondrial y metabolismo con la tecnología de XFe24 Extracellular Flux Analyzer de Seahorse-Agilent. En la **figura 4.12** se muestra el efecto de sFlt-1 en la actividad bioenergética mitocondrial en CEs. Las CEs fueron cultivadas en placas V7, especiales de Seahorse-Agilent durante dos horas, seguidamente se administraron diversas concentraciones de sFlt-1 (10, 25 y 50 ng/mL) durante 24 horas, tiempo tras el cual se realizaron las determinaciones de bioenergética mitocondrial.

La **figura 4.12 A** muestra la representación de los datos obtenidos con la administración exógena de 10, 25 y 50 ng/mL de proteína rh sFlt-1. Es interesante observar que tras la administración de FCCP, sFlt-1 de forma dosis dependiente, afectó la respiración máxima de CEs, control: 14.25 ± 0.8 pmol $\text{O}_2/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína, 10 ng/mL: 9.25 ± 0.9 pmol $\text{O}_2/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína, 25 ng/mL: 6.15 ± 0.4

pmol O₂/min/μg de proteína ($P=0.04$) y 50 ng/mL: 5.73 ± 0.7 pmol O₂/min/μg de proteína ($P=0.003$) (**Figura 4.12 B**). Por consecuencia, existió un dramático efecto en la capacidad de reserva respiratoria mitocondrial, control: 5.04 ± 0.8 pmol O₂/min/μg de proteína, 10 ng/mL: 0.38 ± 0.8 pmol O₂/min/μg de proteína, 25 ng/mL: 0.05 ± 0.1 pmol O₂/min/μg de proteína ($P=0.03$) y 50 ng/mL: 0.01 ± 0.04 pmol O₂/min/μg de proteína ($P=0.002$) (**Figura 4.12 C**). La disminución de la reserva respiratoria observada tras la administración de FCCP, indica que las células a medida que aumenta su exposición con el factor anti-angiogénico, van perdiendo su reserva respiratoria y, por lo tanto; incluso en condiciones basales, funcionan en su máxima capacidad. Esto sugiere que las CEs en PE, expuestas a elevados niveles circulantes de sFlt-1, no son capaces de alcanzar las demandas energéticas propias del proceso de gestación a través del metabolismo mitocondrial que se ve afectado por sFlt-1, inclusive ante concentraciones que no necesariamente desencadenan una respuesta anti-angiogénica (demostrado en la **figura 4.1**).

Tal como se observa en la **figura 4.12 D**, la respiración basal no se ve afectada por la exposición a sFlt-1, (control: 8.85 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína, 10 ng/mL: 8.87 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína, 25 ng/mL: 7.82 ± 0.7 pmol O₂/min/μg de proteína y 50 ng/mL: 7.98 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína ($P=0.1$). Consistentemente, en condiciones basales, sFlt-1 no induce cambios significativos estadísticamente en la OCR y tal como fue demostrado anteriormente; incluso concentraciones de 50 ng/mL no desencadenan cambios en la viabilidad y/o proliferación celular que sugieran una alteración en el OCR basal (ver **figuras 4.2 y 4.3**). De igual manera, el consumo de O₂ vinculado a la producción de ATP no fue alterado ante la administración de proteína rh sFlt-1, (control: 7.79 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína, 10 ng/mL: 7.65 ± 0.01 pmol O₂/min/μg de proteína, 25 ng/mL: 6.45 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína y 50 ng/mL: 5.87 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína ($P=0.16$) (**Figura 4.12 E**). Esto sugiere que sFlt-1 sólo altera la función bioenergética mitocondrial en condiciones de estrés, mientras que, en condiciones basales, las CEs son capaces de mantener su metabolismo y cumplir funciones vitales, probablemente a través de otras rutas metabólicas diferentes a la respiración celular que le permiten mantener la producción de ATP.

Finalmente, otro aspecto evaluado fue el “proton leak” o fuga de protones; se observó el fuga de protones aumenta a medida que se incrementa la dosis de sFlt-1 exógena, control: 1.07 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína, 10 ng/mL: 1.22 ± 0.1 pmol O₂/min/μg de proteína, 25 ng/mL: 1.37 ± 0.5 pmol O₂/min/μg de proteína y 50 ng/mL: 2.11 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína (**Figura 4.12 F**), siendo estadísticamente significativa sólo en dosis de 50 ng/mL ($P=0.04$). Esta observación sugiere que a pesar que la bioenergética mitocondrial se ve alterada incluso a bajas dosis de sFlt-1 (que no conllevan a respuesta anti-angiogénica), sólo ante concentraciones más altas, comienza a ser evidente que existen alteraciones en la función mitocondrial que afectan; no sólo la capacidad energética de la mitocondria, sino que también sugiere posibles alteraciones en la función mitocondrial.

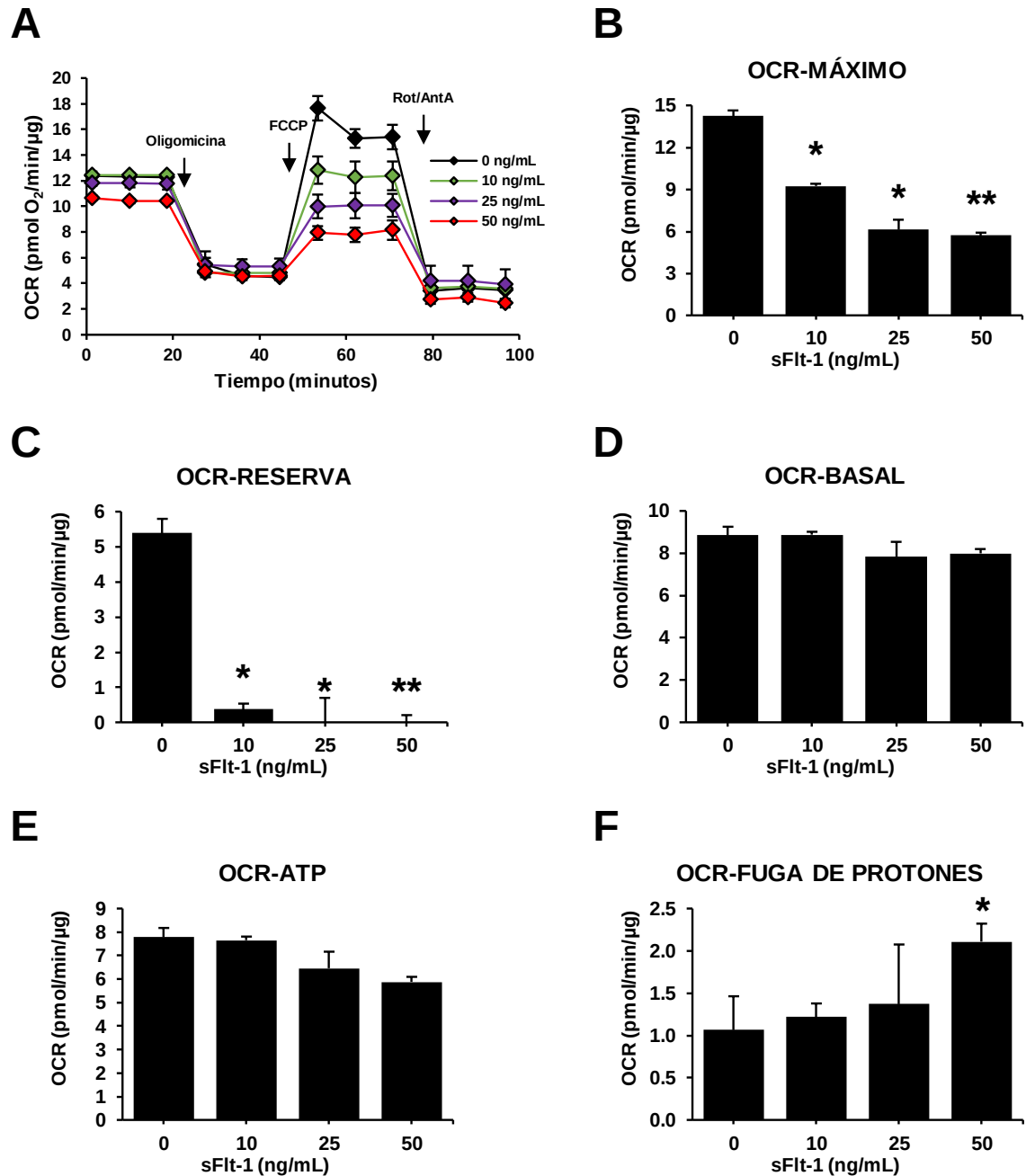


Figura 4.12 Efecto de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en la función bioenergética mitocondrial de CEs. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh sFlt-1 en concentraciones de: 10, 25 y 50 ng/mL, durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR-máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-fuga de protones. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * P <0.05, ** P <0.01, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

4.7 El factor anti-angiogénico sFlt-1 no afecta la función bioenergética mitocondrial en células HTR-8/SVneo.

En contraste con las observaciones en CEs, se observó que las HTR-8/SVneo tienen un elevado consumo de oxígeno basal y una reducida reserva respiratoria al comparar con el perfil respiratorio de CEs (**Figura 4.12 A y 4.13 A**, respectivamente). Estas diferencias sugieren que las células trofoblásticas en condiciones basales, poseen mitocondrias altamente funcionales y que, en condiciones de estrés metabólico, (por ejemplo, tras la administración de FCCP), no dependen de la actividad metabólica mitocondrial para soportar sus requerimientos metabólicos.

En base a estas observaciones se demostró que la administración de proteína rh sFlt-1 en concentraciones de 10 y 25 ng/mL, no desencadena cambios estadísticamente significativos en la respiración máxima, control: 23.47 ± 0.9 pmol O₂/min/μg de proteína, 10 ng/mL: 25.37 ± 1.9 pmol O₂/min/μg de proteína, 25 ng/mL: 22.95 ± 2.2 pmol O₂/min/μg de proteína y 50 ng/mL: 15.88 ± 1.5 pmol O₂/min/μg de proteína (**Figura 4.13 B**). Tampoco en la reserva respiratoria, control: 3.16 ± 0.6 pmol O₂/min/μg de proteína, 10 ng/mL: 3.67 ± 0.3 pmol O₂/min/μg de proteína, 25 ng/mL: 1.28 ± 1.1 pmol O₂/min/μg de proteína y 50 ng/mL: -0.82 ± 0.0 pmol O₂/min/μg de proteína (**Figura 4.13 C**). Únicamente ante concentraciones más elevadas de sFlt-1 (50 ng/mL), se observó una disminución significativa tanto en la respiración máxima como en la capacidad de reserva respiratoria mitocondrial ($P=0.01$ y $P=0.002$, respectivamente).

Consistentemente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las mediciones de OCR basal, control: 20.30 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína, 10 ng/mL: 21.70 ± 1.9 pmol O₂/min/μg de proteína, 25 ng/mL: 21.67 ± 1.5 pmol O₂/min/μg de proteína y 50 ng/mL: 18.71 ± 1.4 pmol O₂/min/μg de proteína ($P=0.1$) (**Figura 4.13 D**); en el consumo de oxígeno acoplado a la producción de ATP, control: 16.31 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína, 10 ng/mL: 17.07 ± 1.4 pmol O₂/min/μg de proteína, 25 ng/mL: 17.04 ± 1.1 pmol O₂/min/μg de proteína y 50 ng/mL: 13.31 ± 1.2 pmol O₂/min/μg de proteína ($P=0.23$) (**Figura 4.13 E**);. Tampoco en el consumo de oxígeno dependiente de la fuga de protones, control: 4.00 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína, 10 ng/mL: 4.63 ± 0.6 pmol O₂/min/μg de proteína, 25 ng/mL: 4.63 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína y 50 ng/mL: 3.40 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína ($P=0.34$) luego de la administración de proteína rh sFlt-1 de 10, 25 y 50 ng/mL (**Figura 4.13 F**). Los resultados obtenidos demuestran que los trofoblastos de las extra vellosidades de placenta aislados de primer trimestre poseen un perfil metabólico diferente a las CEs.

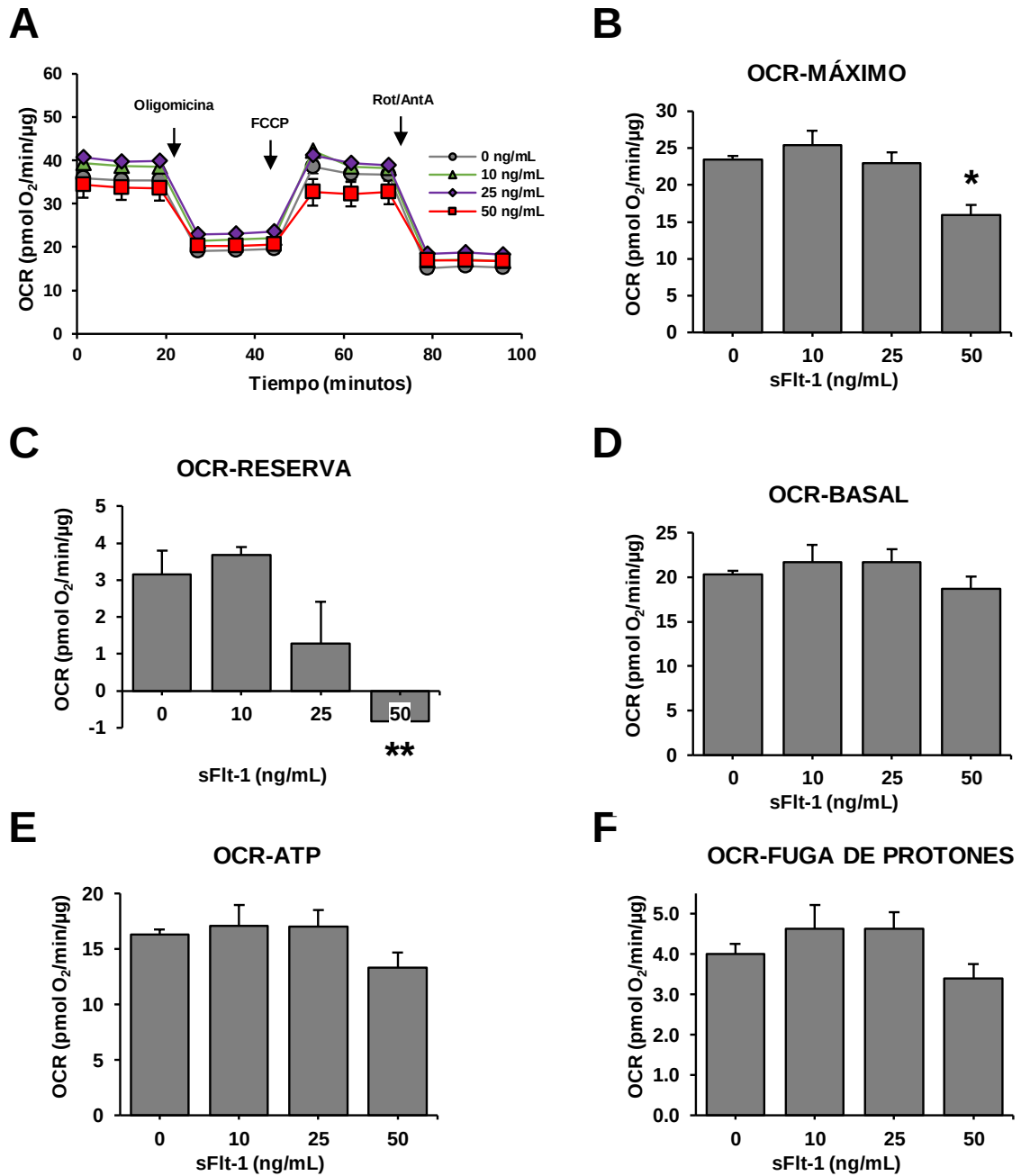


Figura 4.13 Efecto de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en la función bioenergética mitocondrial de HTR-8/SVneo. Células HTR-8/SVneo fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh sFlt-1 en concentraciones de: 10, 25 y 50 ng/mL, durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR-máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-fuga de protones. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

4.8 sFlt-1 induce cambios en el fenotipo metabólico en células endoteliales, pero no en trofoblastos.

El fenotipo metabólico celular, se define por la contribución de las diversas rutas metabólicas primarias en las células. Hasta lo presentado hasta este momento, en esta investigación se ha observado que el metabolismo de las CE es afectado por concentraciones de sFlt-1 que no inducen respuesta anti-angiogénica ni cambios en la viabilidad y/o proliferación celular. Es interesante, que a pesar del impacto de sFlt-1 en el metabolismo mitocondrial, no existiera un efecto observable en la producción de ATP y viabilidad. Esto sugirió que las CE ante situación de estrés, podrían reprogramarse metabólicamente para cumplir con los requerimientos energéticos celulares. Para comprobar este supuesto, se estudió el fenotipo energético y potencial metabólico de CE tratadas con sFlt-1. Esto permitió observar la contribución de la respiración mitocondrial y glicólisis como principales rutas metabólicas, luego del tratamiento de sFlt-1.

Se observó un aumento de la ECAR en CE, dosis dependiente a la exposición a sFlt-1 (10-50 ng/mL). Con ello, la tasa glucolítica, control: 0.5 ± 0.1 mpH/min/ μ g de proteína, 10 ng/mL: 0.6 ± 0.1 mpH/min/ μ g de proteína, 25 ng/mL: 1.5 ± 0.1 mpH/min/ μ g de proteína ($P=0.02$) y 50 ng/mL: 4.2 ± 0.2 mpH/min/ μ g de proteína ($P=0.003$). Así como la reserva glucolítica, control: 2.1 ± 0.2 mpH/min/ μ g de proteína, 10 ng/mL: 2.6 ± 0.5 mpH/min/ μ g de proteína, 25 ng/mL: 3.2 ± 0.5 mpH/min/ μ g de proteína ($P=0.02$) y 50 ng/mL: 4.5 ± 0.5 mpH/min/ μ g de proteína ($P=0.03$) aumentan dramáticamente a medida que se incrementan los niveles de sFlt-1 (Figura 4.14 A y B).

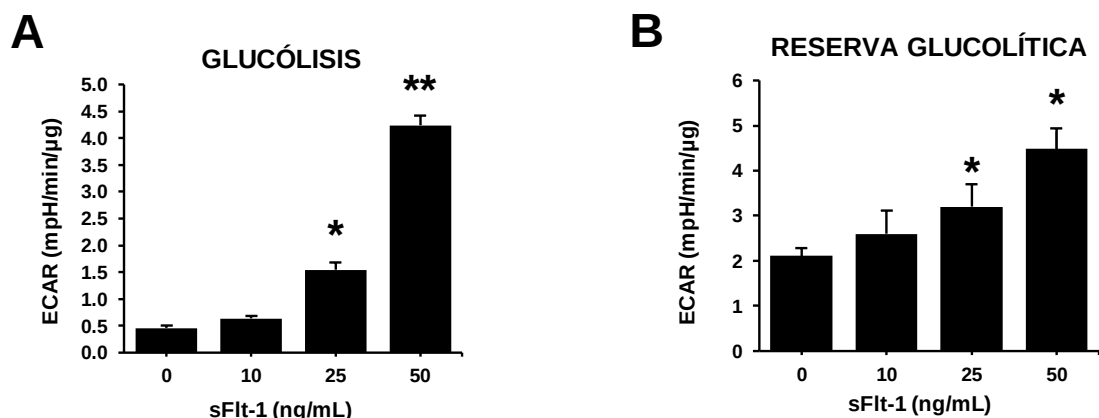


Figura 4.14 Efectos en la actividad glucolítica de CE expuestas a tratamiento con proteína rh sFlt-1. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh sFlt-1 en concentraciones de: 10, 25 y 50 ng/mL, durante 24 horas. Se determinó la actividad glucolítica empleando la tecnología Seahorse-Agilent. Incremento de la (A) glucólisis y de la (B) reserva glucolítica en CE expuestas a rh sFlt-1. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P<0.05$, ** $P<0.01$, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Estas observaciones sugieren que las CEs optimizan su metabolismo, favoreciendo la obtención de energía mediante glucólisis para que la célula sea capaz de hacer frente a sus demandas energéticas. En base a estas observaciones, la evaluación del fenotipo metabólico permitió demostrar que efectivamente las CEs expuestas a sFlt-1 muestran niveles de OCR basal de 10.40 ± 0.18 pmol O₂/min/μg de proteína en comparación con el control 12.24 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína, que no manifiestan diferencias estadísticamente significativas entre sí (*Prueba T de Student*). Mientras que, los niveles de OCR estresados (luego de la administración de FCCP), del control fueron de 17.64 ± 0.94 pmol O₂/min/μg de proteína y las células expuestas a sFlt-1 50 ng/mL de 8.15 ± 0.76 pmol O₂/min/μg de proteína. Estos resultados son diferentes estadísticamente ($P=0.001$). Mientras, las mediciones de ECAR basal fueron de 0.33 ± 0.08 mpH/min/μg de proteína para el control y 1.36 ± 0.13 mpH/min/μg de proteína para las células tratadas con 50 ng/mL de rh sFlt-1 ($P=0.32$). Por su parte, los niveles de ECAR estresado en el control fueron de 2.80 ± 0.13 mpH/min/μg de proteína y para las células tratadas con sFlt-1 de 4.29 ± 0.15 mpH/min/μg de proteína ($P=0.001$) (*Prueba T de Student*) (**Figura 4.15**).

El potencial metabólico de CEs expuestas a sFlt-1 representa la habilidad de las células de obtener sus demandas energéticas vía respiración mitocondrial y/o glucólisis, tal como se muestra en la **figura 4.15**, en condiciones de estrés, las células expuestas a sFlt-1 son menos capaces de obtener sus requerimientos metabólicos vía mitocondria. Asimismo, el potencial metabólico vía glucólisis es mayor en células expuestas a sFlt-1 (**Figura 4.15 B-D**). Estos resultados sugieren que las CEs poseen la capacidad de reprogramar metabólicamente y compensar la demanda energética vía glucólisis ante perturbadores metabólicos como ha demostrado ser sFlt-1.

De forma opuesta, HTR-8/SVneo no demostró cambios en el fenotipo metabólico inducidos por sFlt-1 (**Figura 4.16**). Consistente con estos resultados, el potencial metabólico de HTR-8/SVneo demostró que tras la administración exógena de sFlt-1, no ocurren cambios significativos en la habilidad de las células para obtener sus requerimientos metabólicos vía respiración mitocondrial. El OCR basal del control determinado fue: 35.33 ± 1.09 pmol O₂/min/μg de proteína, mientras que tras la administración de 50 ng/mL de sFlt-1 se encontraron niveles de 33.47 ± 22.72 pmol O₂/min/μg de proteína. En situación de estrés metabólico (luego de administrar FCCP), los niveles de OCR (estresado) del control fueron de 38.49 ± 1.5 pmol O₂/min/μg de proteína y de las células tratadas con sFlt-1 de 32.65 ± 2.74 pmol O₂/min/μg de proteína. Incluso ante situaciones de estrés metabólico, las células HTR-8/SVneo no aumentan su potencial metabólico a través de la respiración mitocondrial ($P=0.15$).

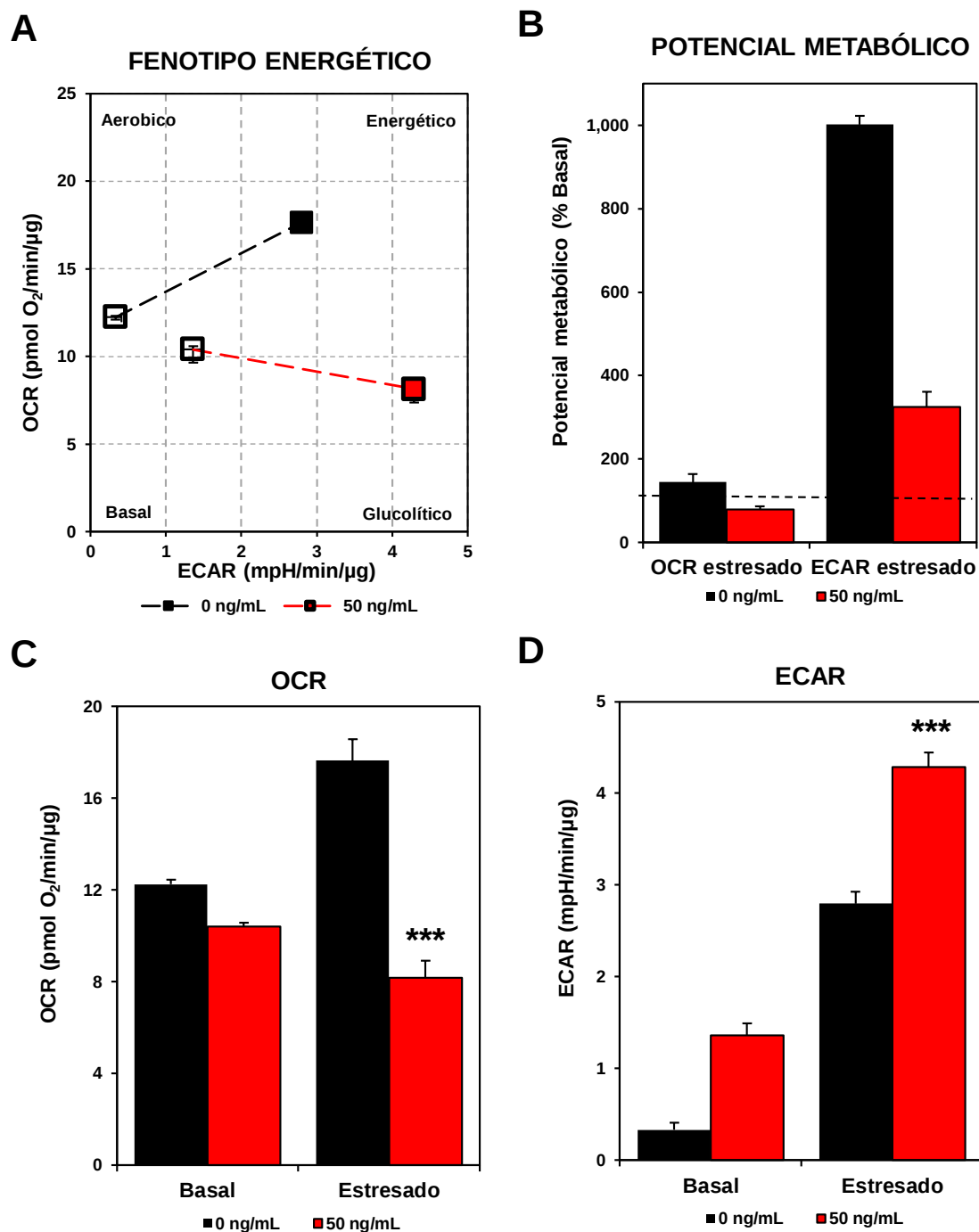


Figura 4.15 Efectos de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en el fenotipo metabólico de CEs. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh sFlt-1 (50 ng/mL), durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial y fenotipo metabólico empleando la tecnología Seahorse-Agilent en CEs. (A) Fenotipo energético, (B) potencial metabólico, (C) OCR y (D) ECAR. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto al control, (Prueba T de Student).

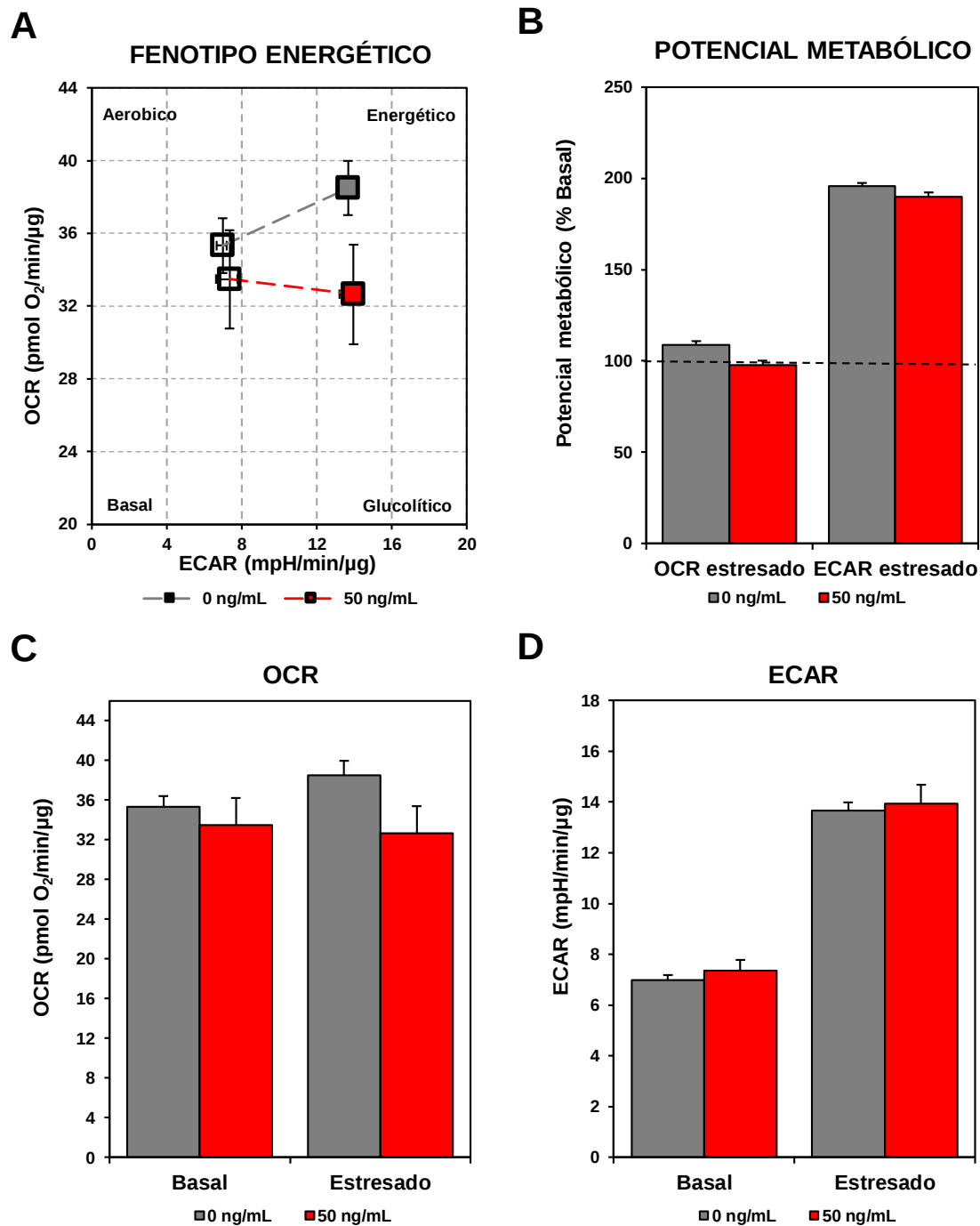


Figura 4.16 Efectos de la administración exógena de proteína rh sFlt-1 en el fenotipo metabólico de trofoblastos. Células HTR-8/SVneo fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh sFlt-1 (50 ng/mL), durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial y fenotipo metabólico empleando la tecnología Seahorse-Agilent en trofoblastos. (A) Fenotipo energético, (B) potencial metabólico, (C) OCR y (D) ECAR. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), (Prueba T de Student).

Con respecto a la contribución de la glucólisis como ruta metabólica en las células trofoblásticas, se observó en el control niveles de ECAR basal de 6.99 ± 0.2 mpH/min/ μ g de proteína y en las células tratadas con sFlt-1 de 7.35 ± 0.41 mpH/min/ μ g de proteína. Luego de la administración de FCCP los niveles de ECAR determinados para el control fueron de 13.67 ± 0.33 mpH/min/ μ g de proteína y de las células tratadas con sFlt-1 de 13.95 ± 0.74 mpH/min/ μ g de proteína ($P=0.44$). Vale resaltar que el potencial metabólico de OCR tiene una tendencia a disminuir luego del tratamiento con altas dosis de sFlt-1 (50 ng/mL). Estos hallazgos, a pesar de no ser estadísticamente significativos, se corresponden con las observaciones previas de este estudio, (**Figura 4.13**), en donde se observaron alteraciones en la bioenergética mitocondrial sólo a 50 ng/mL de sFlt-1. Estos resultados sugieren que las células HTR-8/SVneo probablemente dependen de glucólisis con fines energéticos más que de la respiración mitocondrial y con esto, el impacto de sFlt-1 como perturbador mitocondrial en estas células, es mucho menor que el observado en CEs.

Para confirmar este supuesto, se evaluó la dependencia metabólica de las células CEs y HTR-8/SVneo, cuando son forzadas a sobrevivir exclusivamente de la respiración mitocondrial. Ya que la oxidación de galactosa a piruvato por vía glucolítica no genera la producción neta de ATP, las células dependen de la fosforilación oxidativa para generar suficiente ATP para la sobrevivencia celular (229). Por tal motivo, las CEs y HTR-8/SVneo fueron cultivadas en medio de cultivo estándar de crecimiento, suplementado con D-galactosa en lugar de D-glucosa, con la finalidad de observar la dependencia de estas células de la fosforilación oxidativa con propósitos metabólicos.

Una primera observación fue que tanto CEs como HTR-8/SVneo mostraron una morfología más alargada, en comparación con la morfología que presentan cuando son cultivadas en medio de cultivo estándar con glucosa (**Figura 4.17 A y B**, respectivamente). Además, su patrón de crecimiento fue más lento que el observado en condiciones de cultivo estándar con glucosa; demorando de 10-12 (CEs) y de 17-22 días (HTR-8/SVneo) en alcanzar confluencia de 70-80%. Para entender el impacto de sFlt-1 en el metabolismo de células que dependen exclusivamente de la respiración celular con fines energéticos, se cultivaron CEs y HTR-8/SVneo en presencia de galactosa y de rh sFlt-1 (50 ng/mL). Se realizaron contajes de células viables con coloración de exclusión de azul de tripán, a las 24, 48 y 72 horas (**tabla 4.1 y 4.2**).

En ambas líneas celulares se encontró un efecto de sFlt-1 en la proliferación celular en presencia de galactosa. En CEs, el cultivo de las células en glucosa y sFlt-1 no conllevó a cambios estadísticamente significativos con respecto al control con glucosa, glucosa y sFlt-1 y control con galactosa. Mientras que, si se observaron diferencias con respecto al grupo expuesto a galactosa y sFlt-1. El análisis estadístico mediante ANOVA y test posthoc de Bonferroni, indicó valores de P de: 0.02 a las 24 horas, 0.02 a las 48 horas y 0.01 a las 72 horas, las diferencias

estadísticas encontradas se obtuvieron al comparar el grupo expuesto a galactosa y sFlt-1 con respecto a los otros tres tratamientos en estudio (control con glucosa, control con galactosa y células expuestas a galactosa y sFlt-1) (**Figura 4.17 C**).

Tratamiento	Tiempo (horas)				
	0	24	48	72	
Glucosa	0.132	0.245	0.438	0.812	
Glucosa + sFlt-1	0.115	0.247	0.434	0.799	x 10 ⁵
Galactosa	0.103	0.210	0.403	0.770	células
Galactosa + sFlt-1	0.117	0.162	0.317	0.600	

Tabla 4.1 Contaje de CEs viables tratadas con sFlt-1 y expuestas a glucosa y galactosa. Contajes con coloración con exclusión con azul de tripán, de células expuestas a glucosa o galactosa (5 mM) y sFlt-1 (50 ng/mL) durante 24, 48 y 72 horas. (n=3), * $P < 0.05$ con respecto a los grupos glucosa, glucosa + sFlt-1 y galactosa, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Con respecto a HTR-8/SVneo, el conteo de células viables expuestas a galactosa, en comparación a aquellas expuestas a glucosa, demostró que estas células no son capaces de sobrevivir exclusivamente de galactosa vía fosforilación oxidativa. Lo cual, junto a las observaciones previas en esta sección, sugieren que los trofoblastos son células altamente glucolíticas. La glucosa es el sustrato primario para la generación de energía en el tejido placentario, además de ser la principal fuente de carbonos en la placenta (247). Tal como se observa en la **figura 4.17 D**, los trofoblastos expuestos a galactosa con respecto a aquellos expuestos a glucosa, presentan una menor tasa de proliferación celular (**tabla 4.2**). Por otra parte, la adición de sFlt-1 a las células expuestas a galactosa ocasionó un gran impacto en la proliferación de esta línea celular. El análisis estadístico mediante ANOVA y Bonferroni's post-hoc test, demostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de células expuestas a glucosa (control con glucosa y expuestas a glucosa y sFlt-1) con aquellas expuestas a galactosa ($P = 0.02$ a las 48 horas y $P = 0.01$ a las 72 horas) y diferencias estadísticas entre las células tratadas con galactosa con respecto a células expuestas a galactosa y sFlt-1, $P = 0.01$ a las 24 horas, $P = 0.001$ a las 48 horas y $P = 0.002$ a las 72 horas).

Tratamiento	Tiempo (horas)				
	0	24	48	72	
Glucosa	0.116	0.302	0.640	1.150	
Glucosa + sFlt-1	0.135	0.295	0.623	1.220	x 10 ⁵
Galactosa	0.125	0.201	0.300	0.445	células
Galactosa + sFlt-1	0.135	0.155	0.129	0.079	

Tabla 4.2 Contaje de HTR-8/SVneo viables tratadas con sFlt-1 y expuestas a glucosa y galactosa. Contajes con coloración con exclusión con azul de tripán, de células expuestas a glucosa o galactosa (5 mM) y sFlt-1 (50 ng/mL) durante 24, 48 y 72 horas. (n=3), * $P < 0.05$ con respecto a los grupos

glucosa, glucosa + sFlt-1 y galactosa. # $P < 0.01$ con respecto al grupo control expuesto a galactosa, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

La viabilidad evaluada por el ensayo de MTT se correspondió con a las observaciones en el conteo de células viables (**Figura 4.17 C y D**). La viabilidad evaluada por MTT, se representó en función al control (**Figura 4.17 E y F**). En el caso de CEs, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control con glucosa y las células expuestas a glucosa + sFlt-1 (100 y 101) %, respectivamente ($P=0.98$). Mientras que, si se observaron diferencias significativas desde el punto de vista estadístico entre las células expuestas a galactosa y aquellas también expuestas a sFlt-1 (99 y 86) %, respectivamente ($P=0.03$) (**Figura 4.17 E**). Por otra parte, en los trofoblastos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad evaluada mediante el ensayo de MTT en células expuestas a glucosa y glucosa + sFlt-1 (100 y 98) %, respectivamente ($P=0.49$). Mientras que, si se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de células expuestas a galactosa y galactosa + sFlt-1 (52 y 30) %, respectivamente ($P=0.001$). Ya que las diferencias en HTR-8/SVneo fueron tan marcadas con respecto a los tratamientos con glucosa y galactosa, se evaluó a través de ANOVA con post-test de Bonferroni las diferencias entre las medias analizadas y se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos expuestos a galactosa, con respecto a aquellos expuestos a glucosa con valor $P=0.00055$ (**Figura 4.17 F**).

Vale destacar que, en el proceso experimental, el cambio del medio de cultivo suplementado con glucosa a galactosa se hizo gradualmente, aumentando el porcentaje de medio conteniendo galactosa tras cada cambio de medios. Esto fue necesario ya que las HTR-8/SVneo mostraron poca tolerancia a la galactosa, observándose una marcada disminución de la viabilidad celular cuando el cambio de medio se hizo inmediatamente. A pesar que las CEs no mostraron este comportamiento, y para mantener igual tratamiento a las dos líneas celulares, las CEs fueron también cambiadas de medio de cultivo gradualmente. Las CEs sobrevivieron en medio de cultivo con galactosa, mostrando una viabilidad y proliferación celular disminuida, sólo cuando además de galactosa, las células eran expuestas a sFlt-1 (**Figura 4.17 C y E**). Por otra parte, el impacto tan marcado en la viabilidad celular visto en HTR-8/SVneo, junto a las observaciones previas de su dependencia metabólica en glucólisis (**Figuras 4.13 y 4.15**), sugirió que debido a reducidos niveles de glucosa en el medio de cultivo de HTR-8/SVneo, las células tanto en condiciones basales, como las tratadas con sFlt-1 no serían capaces de mantener sus requerimientos metabólicos vía glucólisis, dependiendo totalmente de la maquinaria mitocondrial.

En condiciones basales, las HTR-8/SVneo, a pesar de no depender metabólicamente de mitocondria con fines energéticos, son capaces de establecer una reprogramación metabólica a respiración mitocondrial; que, aunque escasa, permitió mantener la viabilidad celular y la proliferación celular. Mientras que en

presencia de sFlt-1, se demostró que, al depender de la maquinaria mitocondrial con fines energéticos, las HTR-8/SVneo son incapaces de reprogramar metabólicamente su fuente energética primaria, resultado en disminuida viabilidad y disminuida proliferación celular (Figura 4.17 D y F).

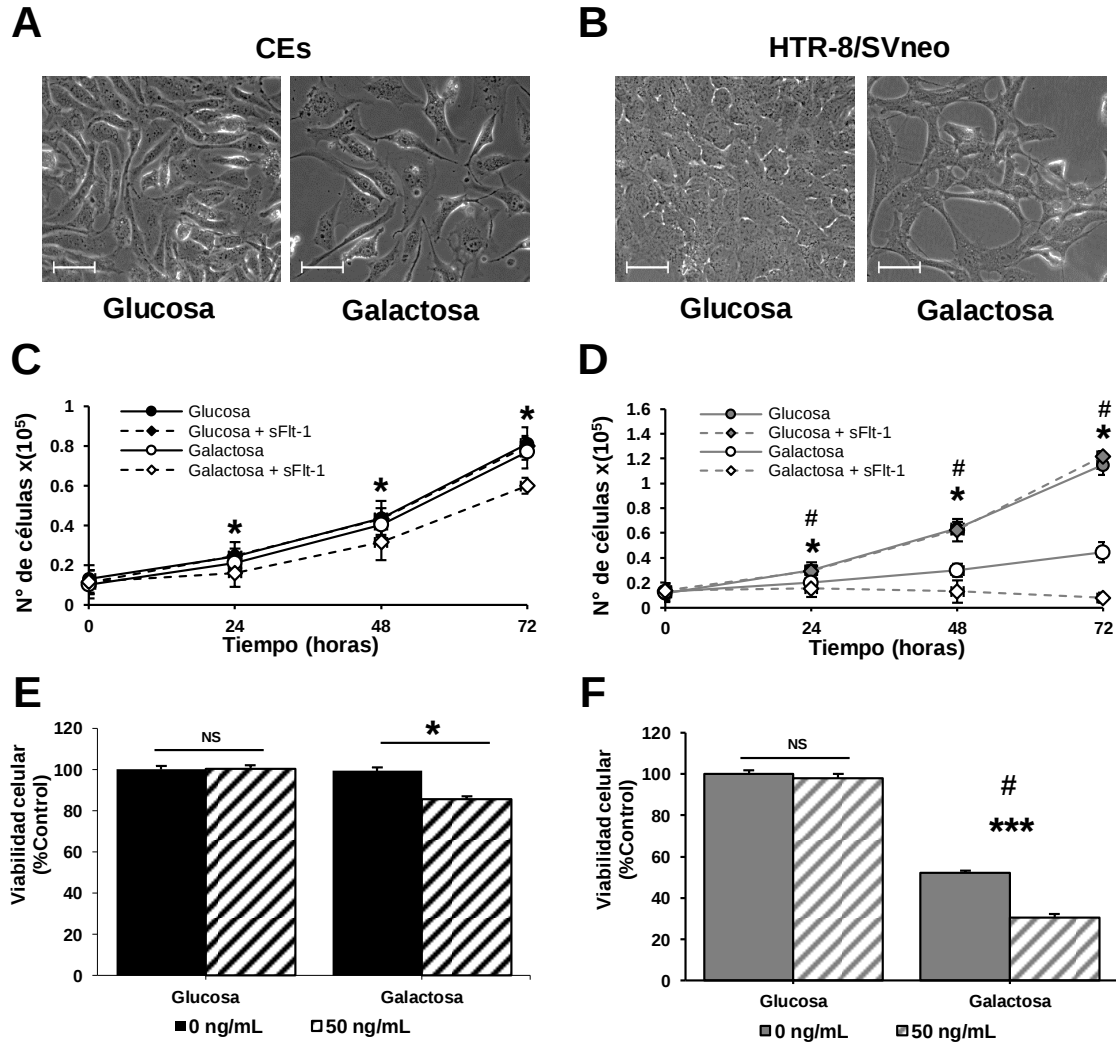


Figura 4.17 sFlt-1 ejerce cambios metabólicos que afectan la viabilidad y proliferación celular en CEs y HTR-8/SVneo. (A) Morfología *in vitro* de CEs y (B) HTR-8/SVneo cultivadas en medios suplementados con glucosa y galactosa, respectivamente (40X). (C) Contaje de células a las 24, 48 y 72 post-tratamiento con 50 ng/mL de sFlt-1 en CEs y (D) HTR-8/SVneo cultivadas en medios con glucosa y galactosa. (E) Viabilidad de CEs y (F) HTR-8/SVneo cultivadas en medios suplementados con glucosa y galactosa, 24 horas después de la administración exógena de proteína rh sFlt-1. Barra: 50 μ m. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3, * P <0.05 en C, corresponde al comparar el grupo de células tratado con galactosa y sFlt-1 con los otros grupos en estudio, en D corresponde al comparar las células tratadas con glucosa con aquellas tratadas con galactosa, en E corresponde a la comparación entre las medias de los dos grupos tratados con galactosa, *** P <0.001 en F con respecto al control tratado con galactosa y aquellas células tratadas con galactosa y sFlt-1, # P <0.001 en F, con respecto a los grupos tratados con glucosa y galactosa, NS=No significativo estadísticamente con respecto al control (glucosa y galactosa), respectivamente).

En conjunto, estos resultados sugieren que sFlt-1, probablemente actúa como un perturbador metabólico que afecta de manera más dramática a células que dependen metabólicamente de la respiración mitocondrial con fines energéticos. En condiciones de cultivo normales, con glucosa, las CEs incluso cambiando su fenotipo metabólico mitocondrial a metabolismo principalmente glucolítico, son mucho más susceptibles a la perturbación metabólica de sFlt-1. En comparación, las HTR-8/SVneo, que basalmente tienen una programación metabólica dependiente de glucólisis para hacer frente a sus requerimientos metabólicos, se observó que sólo al forzar su metabolismo mitocondrial, sFlt-1 logra impactar en el metabolismo de estas células, cuya respiración mitocondrial no es su fuente energética primaria.

4.9 sFlt-1 en altas concentraciones conlleva a disfunción mitocondrial en células endoteliales, pero no en HTR-8/SVneo.

Posteriormente, para constatar el impacto de sFlt-1, no sólo a nivel metabólico como un perturbador temprano, sino evaluar su capacidad de inducir disfunción mitocondrial (DM); se estudió la producción de especies reactivas de oxígeno de origen mitocondrial (mROS) y cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), inducidos por la proteína rh sFlt-1 en el modelo *in vitro* de endotelio (CEs) y trofoblastos (HTR-8/SVneo).

Primero, se evaluó el efecto de la administración de 50 ng/mL de sFlt-1 en la formación de mROS de CEs expuestas a este FAAs durante 24 horas. La determinación de mROS se hizo empleando la sonda fluorescente MitoSOX Red, por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (**Figura 4.18**); a esta concentración, se observó un incremento estadísticamente significativo en la formación de mROS ($P=0.03$) (*Prueba T de Student*) (**Figura 4.18**).

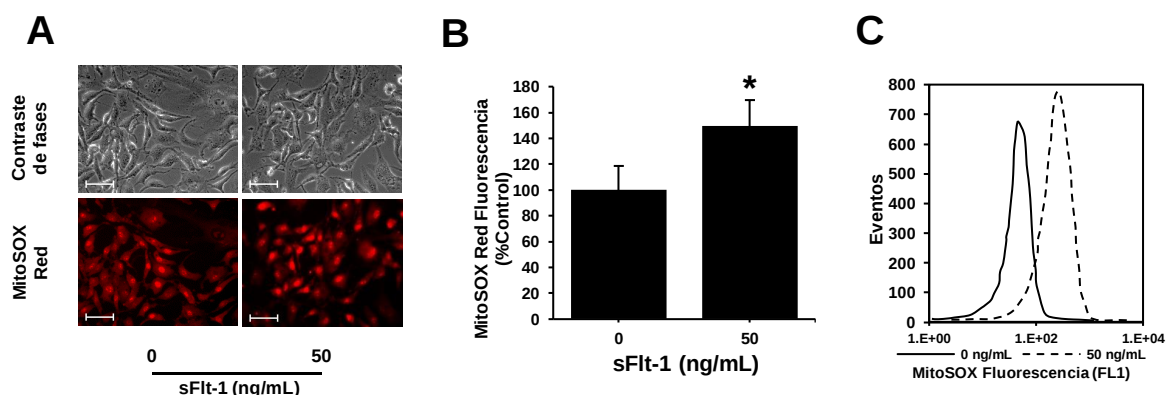


Figura 4.18 Efectos de sFlt-1 en la formación de mROS en CEs. (A) Microscopía de contraste de fases y fluorescencia con MitoSOX Red (40X), (B) Incremento en la formación de mROS con respecto al control y (C) Histogramas de fluorescencia de MitoSOX Red por citometría de flujo, 24 horas post-tratamiento con 50 ng/mL de rh sFlt-1. Barra: 50 μ m. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3, * P <0.05 con respecto al control, (prueba T de Student).

Seguidamente, y soportando estos hallazgos en relación a mROS, al evaluar los cambios en el Ψm inducidos por la administración exógena de sFlt-1, se observó que en elevadas dosis (50 ng/mL) el potencial de membrana mitocondrial disminuyó significativamente ($P=0.02$) (*Prueba T de Student*) (**Figura 4.19**). Para este ensayo las CEs fueron sembradas en densidad de 5.0×10^4 células/pozo y tratadas durante 24 horas con sFlt-1, tiempo tras el cual se llevó a cabo el ensayo de JC-1, sonda fluorescente que permitió observar la disipación del Ψm (disminución del Ψm) tras la administración de este FAAs, por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (**Figura 4.19**).

Los cambios en el metabolismo mitocondrial, están generalmente asociados a cambios en el potencial de membrana mitocondrial y a la producción de mROS (248, 249). A pesar de esto, los resultados previos relacionados a la bioenergética mitocondrial y metabolismo de CEs y sFlt-1 de este estudio, (**Figuras 4.12, 4.14, 4.15 y 4.17**), sugieren que sFlt-1 es capaz de inducir perturbaciones metabólicas tempranas que no necesariamente conllevan a disfunción mitocondrial de manera inmediata, es decir, cuando los niveles de sFlt-1 son relativamente bajos, entre 10 y 25 ng/mL. Esto sugiere que, durante el embarazo, cuando los niveles de sFlt-1 comienzan a aumentar, ya inicia un proceso metabólico con perturbaciones tempranas, que más adelante, en PE, cuando los niveles de sFlt-1 rebasan los niveles normales y alteran drásticamente, conllevan a que el proceso de DM se instaure por completo.

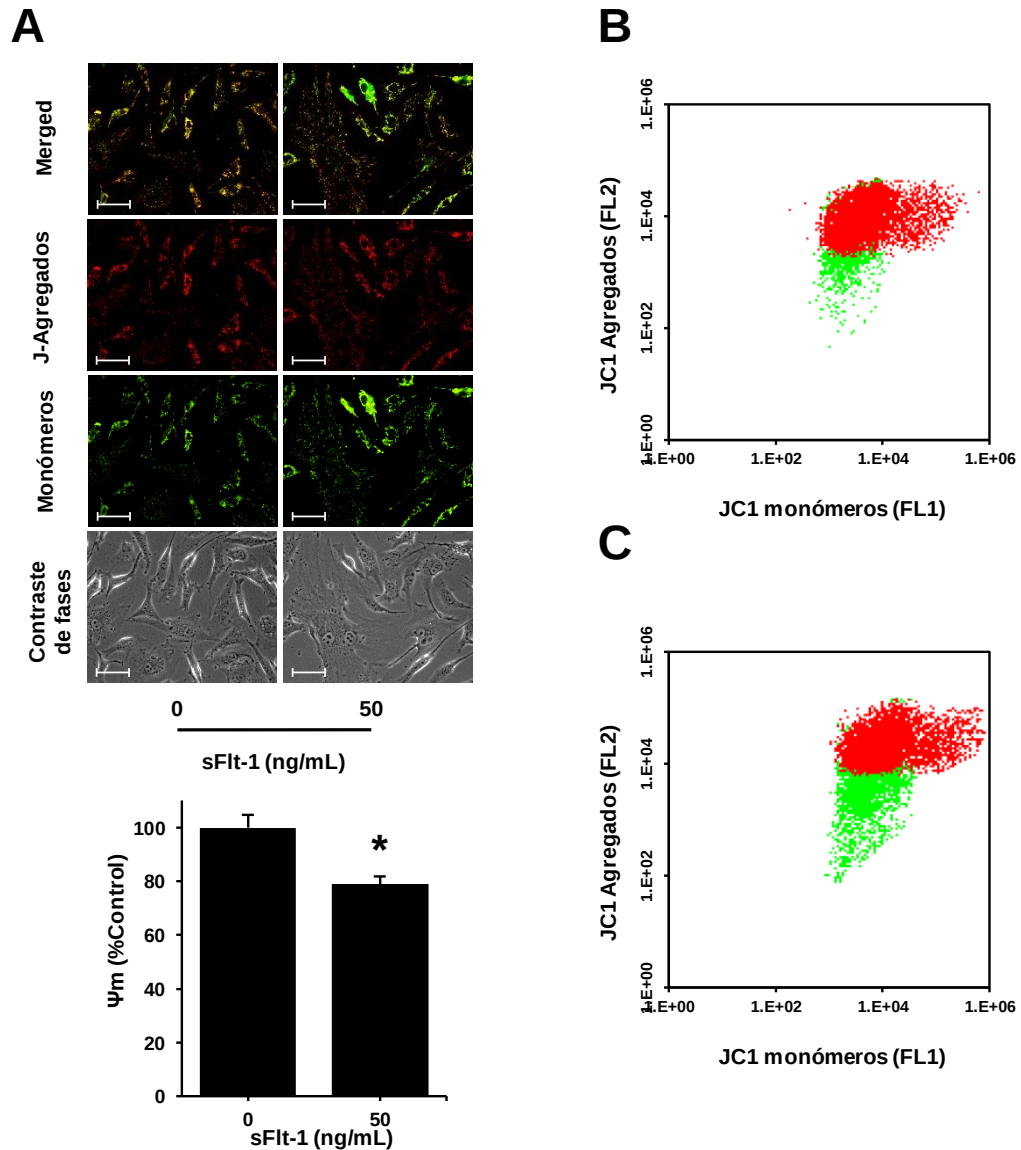


Figura 4.19 Cambios en el Ψ_m inducidos por la administración exógena de sFlt-1 en CEs. (A) Microscopía de contraste de fases y fluorescencia con JC1 (40X) demuestra una disminución del Ψ_m con respecto al control (B) Control y (C) 50 ng/mL de sFlt-1 inducen cambios en el Ψ_m tras por la administración exógena de sFlt-1 en CEs, demostrados por citometría de flujo, 24 horas post-tratamiento con 50 ng/mL de rh sFlt-1. Barra: 50 μ m. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3, * P <0.05 con respecto al control, (prueba T de Student).

Por otra parte, contrastando con las evidencias obtenidas en CEs, los experimentos en HTR-8/SVneo demostraron que sFlt-1, incluso a elevadas dosis de 50 ng/mL de rh sFlt-1, no conllevan a incrementos significativos en la producción de mROS (**Figura 4.20**). Inclusive, no se observaron cambios significativos en el Ψ_m (**Figura 4.21**), estos resultados sugieren que la función mitocondrial de las HTR-8/SVneo no se afecta por sFlt-1 con la misma magnitud que lo observado con respecto a CEs.

Las células trofoblásticas en estudio, al igual que las CEs, fueron sembradas en densidad de 5.0×10^4 células/pozo y tratadas con sFlt-1 por 24 horas. Tiempo tras el cual se determinó por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, la formación de mROS y la disipación del Ψ_m (disminución del Ψ_m). Tal como se demostró en el perfil bioenergético mitocondrial y metabolismo de los trofoblastos HTR-8/SVneo (**Figuras 4.13, 4.16 y 4.17**), sólo en concentraciones de 50 ng/mL de sFlt-1 comienzan a observarse perturbaciones metabólicas que potencialmente conllevarían a alteraciones en la función mitocondrial.

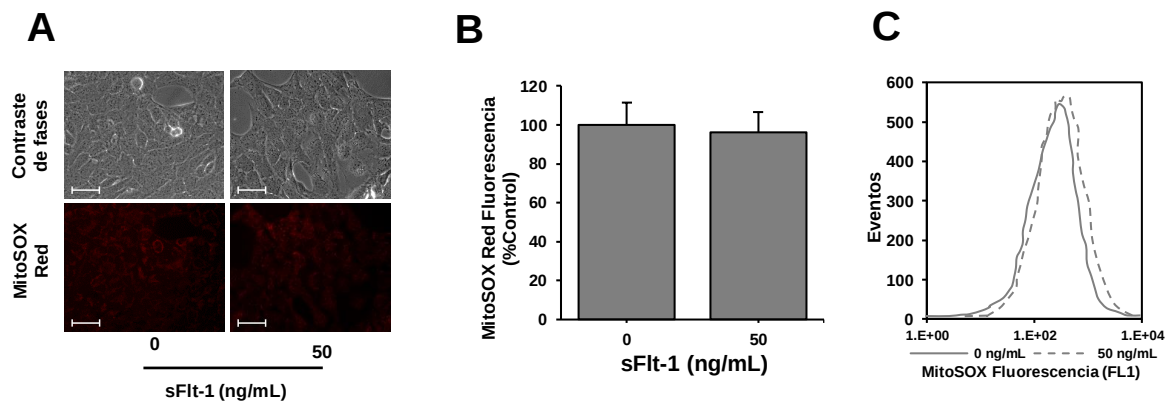


Figura 4.20 Efectos de sFlt-1 en la formación de mROS en HTR-8/SVneo. (A) Microscopía de contraste de fases y fluorescencia con MitoSOX Red (40X), (B) Formación de mROS con respecto al control y (C) Histogramas de fluorescencia de MitoSOX Red por citometría de flujo, 24 horas post-tratamiento con 50 ng/mL de rh sFlt-1. Barra: 50 μ m. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3, (prueba T de Student).

Es probable, que debido al metabolismo glucolítico basal que demuestran las HTR-8/SVneo, donde la mitocondria parece no tener el papel protagónico para sustentar las demandas energéticas celulares, el efecto perturbador de sFlt-1 no es tan dramático y con ello que no se observen cambios asociados a un proceso de DM con estas dosis (hasta 50 ng/mL).

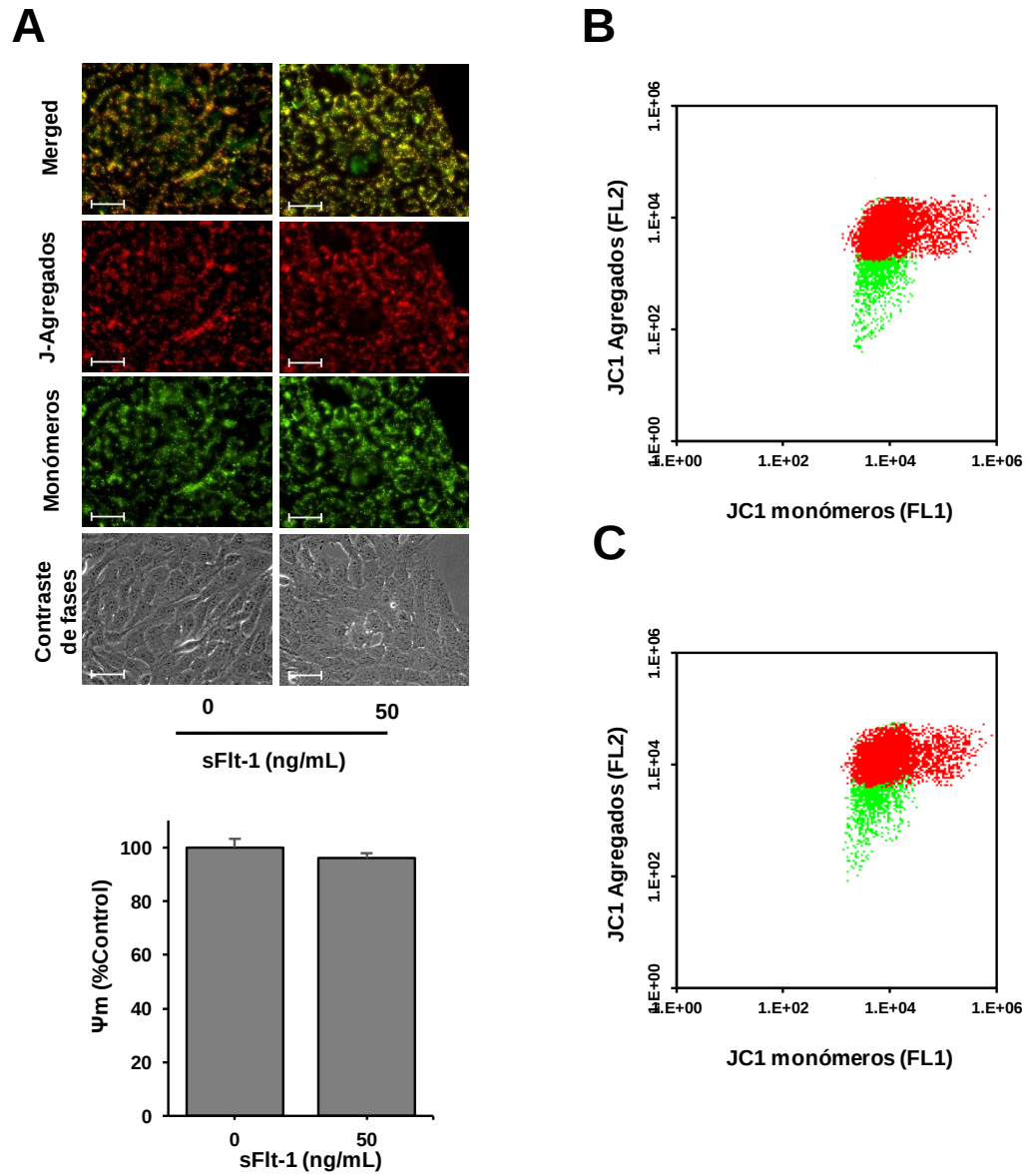


Figura 4.21 Cambios en el Ψ_m inducidos por la administración exógena de sFlt-1 en trofoblastos. (A) Microscopía de contraste de fases y fluorescencia con JC1 (40X) no conlleva a cambios en el Ψ_m con respecto al control. (B) Control y (C) 50 ng/mL de sFlt-1 no inducen cambios en el Ψ_m tras la administración exógena de sFlt-1 en HTR-8/SVneo, evaluados por citometría de flujo, 24 horas post-tratamiento con 50 ng/mL de rh sFlt-1. Barra: 50 μm . Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3, (prueba T de Student).

5. Resultados

Capítulo II. Modelo de correlación *in vitro* de PE. sFlt-1 y TNF- α como moduladores del metabolismo, función endotelial y función bioenergética mitocondrial en PE.

5.1 Introducción.

La PE es una enfermedad cardiovascular asociada al embarazo, que afecta hasta el 8% de todos los embarazos a nivel mundial (8). Su elevada prevalencia, junto a las graves repercusiones en la morbi-mortalidad materna y perinatal, convierte a esta enfermedad en un problema de alta prioridad en salud pública (9). Su fisiopatología sigue siendo un enigma. Sin embargo, se ha identificado que, desde el punto de vista molecular, la enfermedad cursa con un proceso de DE, mediado por elevados y desproporcionados niveles de FAAs y FPIs.

El embarazo es un proceso complejo, dirigido por un balance angiogénico y por el reconocimiento, comunicación y reparación celular mediada por el sistema inmune (SI) (250). Además del papel que juegan los FAAs en PE, esta enfermedad también se ha considerado que tiene una base inmunológica (92, 251, 252). Una de las citoquinas pro-inflamatorias mejor estudiadas en PE corresponde al factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Existen estudios que soportan la hipótesis de que en PE, TNF- α contribuye con la DE característica de esta enfermedad (252). TNF- α , activa la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (253), mientras que niveles bajos de esta citoquina desestabilizan la expresión de la enzima eNOS (254), constitutivamente expresada (150) y que ha sido ya ampliamente asociada a DE y a PE (175, 176).

Murphy et al. 2003, propusieron en su estudio un enfoque que asocia a TNF- α y sFlt-1 (107). En estudios *ex vivo* con explantes de placenta, se ha demostrado que el incremento en los niveles de TNF- α se acompaña de incrementos en los niveles de sFlt-1 (106-109). Además, se ha postulado que el antagonismo de VEGF mediado por sFlt-1 en CEs, genera mayor sensibilidad de estas células a FPIs (65). Por otra parte, se demostró en un modelo animal de PE (modelo isquémico RUPP) que la infusión crónica de TNF- α aumenta la presión arterial y los niveles circulantes de sFlt-1 (107). Estas evidencias sugieren un papel regulatorio de sFlt-1, mediado por TNF- α . Sin embargo, aún no se ha descrito los posibles mecanismos moleculares que conllevan a esta asociación.

Desde hace más de dos décadas, algunos autores han manifestado argumentos en contra de la asociación de TNF- α con la fisiopatología de PE (252, 255, 256). Entre estos argumentos se encuentra falta de asociación de niveles circulantes elevados de TNF- α con la enfermedad (257). Sin embargo, ya que la vida media de esta citoquina es menor a 30 minutos (258), los niveles plasmáticos de TNF- α podrían

variar considerablemente, lo cual podría explicar algunas inconsistencias en la asociación TNF- α /PE descritas en la literatura (257). Otro argumento apunta a que TNF- α , en escenarios completamente diferentes a PE, contribuye al establecimiento de hipotensión (en casos de sepsis) (259). Dada la variabilidad de argumentos en torno a TNF- α como molécula involucrada en la fisiopatología de PE; en este estudio se consideró la posibilidad de un proceso regulatorio de TNF- α mediado por sFlt-1 y no únicamente dependiente de TNF- α . Todo esto basado en la presunción de que la manifestación de PE podría estar mediada por otros eventos de señalización que involucren el incremento en los niveles de TNF- α como una consecuencia al proceso patológico mismo de la enfermedad.

Con base en los resultados obtenidos en relación a sFlt-1 en el capítulo anterior (**capítulo I** de “Resultados”), se evaluó en un modelo de correlación *in vitro*, empleando sueros provenientes de mujeres no embarazadas, normotensas y preeclámpticas, la contribución de sFlt-1 como mecanismo fisiopatológico al regular la biodisponibilidad y señalización de VEGF. Además, dado el impacto del SI en PE, se evaluó el papel de TNF- α en el establecimiento de cambios o perturbaciones metabólicas en el modelo *in vitro* de endotelio y trofoblastos. Por último, se evaluó la posible asociación de sFlt-1 en la estabilización y regulación de los niveles de TNF- α en cultivo, como posible mecanismo fisiopatológico en la aparición de PE.

5.2 Establecimiento del modelo de correlación in vitro de PE. Reclutamiento de pacientes para el estudio.

El presente estudio constó de un modelo de correlación *in vitro*, en donde se evaluaron los cambios y perturbaciones metabólicas tempranas en el endotelio (CEs) y en células trofoblásticas, que pueden ser inducidos por las moléculas presentes en el suero de mujeres preeclámpticas. Además, se buscó evaluar si sFlt-1, previamente identificados aumentados en sangre materna de mujeres preeclámpticas (45, 81-83), es responsable de esos cambios metabólicos.

Para ello, además del modelo *in vitro* con administración exógena de proteína rh sFlt-1 de la sección anterior (**capítulo I**, de “Resultados”), se trataron CEs y HTR-8/SVneo, con sueros de las pacientes control (no embarazadas), normotensas y preeclámpticas vinculadas al estudio. Para este fin, se realizó el reclutamiento de las pacientes y la toma de muestra de sangre antes de la cesárea. El reclutamiento de las pacientes consistió en la identificación, por parte del personal médico de las áreas de Ginecología y Obstetricia de las clínicas FCV y CMISL, de las pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión (Descritos en la sección criterios de inclusión de “Materiales y métodos”). Ya que este no fue un estudio de cohorte, no se realizó seguimiento del embarazo de las maternas que participaron en el estudio. El reclutamiento se hizo previa identificación clínica; el mismo día del parto, en el caso de las maternas y el día de consulta por ginecología en el caso de las pacientes no embarazadas.

Al momento de la toma de muestras de sangre de las pacientes, se tomó nota de datos clínicos suministrados por el médico tratante, además de datos demográficos suministrados directamente por la paciente. En la **tabla 5.1** se muestran las características clínicas de las pacientes vinculadas al estudio. Como se observa en la tabla, los grupos de pacientes no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a su edad ($P=0.33$). Con respecto a la edad gestacional, el grupo de pacientes preeclámpticas se caracterizó por el hecho de que los partos fueron inducidos hacia la semana gestacional 33 (pre-término), lo cual suele ser característico en este grupo de pacientes que, dada su situación patológica, son rápidamente indicadas a tener una terminación prematura del parto por cesárea. Por tal motivo se identificó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de pacientes normotensas ($P=0.00025$).

Otra característica resaltante fue el índice de masa corporal (IMC), en donde el grupo de pacientes preeclámpticas mostró un mayor IMC con respecto al grupo control ($P=0.03$). Sin embargo, es importante recalcar que no existieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo normotensas ($P=0.12$). Tal como ha sido previamente descrito, las pacientes preeclámpticas presentaron una presión arterial sistólica y diastólica significativamente mayor con respecto a pacientes controles y normotensas. Además, la proteinuria fue observada únicamente en el grupo de paciente preeclámpticas. Tal como lo sugiere la ACOG (7), el criterio diagnóstico para PE se basó en la presión arterial y proteinuria.

Variable	Grupos			P
	Control n=10	Normotensas n=20	Preeclámpticas n=20	
Edad (años)	24±1.5	29.64±1.4	26.84±2.2	0.33
Edad gestacional (semanas)	N.A.	38.3±0.3	33.3±1.3***	0.00025
Índice de masa corporal (IMC) (kg/m ²)	22.3±1.1	27.9±0.9	30.9±1.4*	0.03 – 0.12
Primíparas (%)	N.A.	12%	65%#	0.00092
Presión arterial sistólica (mmHg)	112±1.3	115±1.9	150±6.8***	0.00053
Presión arterial diastólica (mmHg)	68±1.5	74±1.9	98±4.0**	0.0073
Proteinuria (mg proteína/orina de 24 horas)	<300	<300	458±32***	0.00064

Tabla 5.1 Datos clínicos de las pacientes vinculadas al estudio. Los datos están presentados como la media $\pm$ SEM con respecto al control. La variable “primíparas” se presenta en porcentaje. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ con respecto al grupo control, # $P<0.01$ con respecto al grupo normotensas (prueba T de Student). N.A.= No aplica.

Ya que la finalidad de esta sección fue establecer un modelo de correlación *in vitro* empleando sueros de pacientes y así conocer el papel de sFlt-1 y TNF- α en la fisiopatología de PE; se determinaron los niveles circulantes de sFlt-1 en el grupo de pacientes en estudio. Para este fin se empleó el Kit de ELISA: Human VEGF

R1/Flt-1 Quantikine. Con este ensayo, se encontró que las pacientes control no embarazadas (CTL) presentaron niveles de sFlt-1 de 102.4 ± 0.75 pg/mL, mientras que las pacientes del grupo normotensas (NOR) mostraron niveles de 4737.9 ± 0.98 pg/mL, además los niveles de sFlt-1 en pacientes del grupo preeclámpticas (PE) fueron 31056.1 ± 12.19 pg/mL. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos CTL y NOR ($P=0.001$) y entre los grupos CTL y PE ($P=0.03$), respectivamente, tal como se observa en la **figura 5.1**. Además, la diferencia entre los niveles de sFlt-1 de pacientes NOR y PE fue significativa estadísticamente ($P=0.04$).

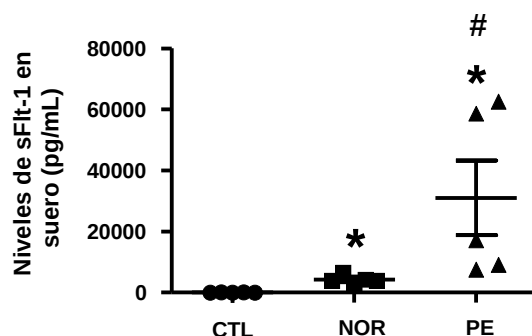


Figura 5.1 Niveles circulantes de sFlt-1 en sueros de pacientes en estudio. Muestras de sangre fueron colectadas antes del parto (embarazadas) o al momento de consulta por ginecología (controles no embarazadas). El suero fue empleado para la determinación de los niveles de sFlt-1 a través de ELISA. CTL: Pacientes de grupo control no embarazadas. NOR: pacientes de grupo normotensas. PE: pacientes del grupo preeclámpticas. (n=6), * $P<0.05$ en comparación al control, # $P<0.05$ en comparación al grupo NOR, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

5.3 Papel de la señalización de VEGF en el establecimiento de DE en PE.

Una vez establecidos los niveles de sFlt-1 presentes en sueros de pacientes normotensas y preeclámpticas, se evaluó el papel de sFlt-1 en el establecimiento de DE. Para ello, se cultivaron CEs en presencia de sueros provenientes de pacientes en estudio (2% de suero) y se administró proteína rh VEGF (20 ng/mL). Previamente, otros investigadores han establecido modelos de correlación *in vitro* de PE al cultivar células en presencia de sueros de pacientes (160). En base a esta investigación, se estableció la administración de 2% de suero para el cultivo de CEs y trofoblastos en estudio. Al igual que en la sección **capítulo I** de "Resultados", la determinación de los niveles de $\bullet\text{NO}$ fueron medidos mediante la cuantificación de su sustituto, NO_2^- , por quimioluminiscencia.

Los niveles de NO_2^- en células expuestas a suero proveniente del grupo NOR fueron de 95 ± 2 nmol $\text{NO}_2^-/\mu\text{g}$ de proteína, 78 ± 5 nmol $\text{NO}_2^-/\mu\text{g}$ de proteína en células expuestas a sueros del grupo PE y de 98 ± 5 nmol $\text{NO}_2^-/\mu\text{g}$ de proteína en el grupo expuesto a sueros CTL. Se encontró que las CEs tratadas con sueros de pacientes preeclámpticas producen una cantidad significativamente menor de nitritos ($P=0.01$), con respecto a los grupos CTL y NOR. Mientras que, la administración

exógena de VEGF (20 ng/mL), logró aumentar significativamente la producción de •NO (detectado como NO₂⁻) a 86 ± 3 nmol NO₂⁻/μg de proteína con respecto al grupo PE (*P*=0.03); sin embargo, los niveles no lograron ser reestablecidos al nivel del control (**Figura 5.2**).

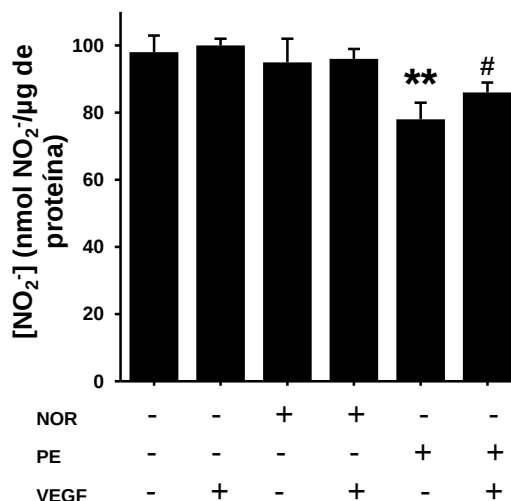


Figura 5.2 Efectos de la administración exógena de VEGF en la producción de •NO en CEs tratadas con sueros provenientes de pacientes normotensas y preeclámpticas. Los niveles de •NO fueron medidos como la concentración de NO₂⁻ (nmol de NO₂⁻/μg de proteína) por quimioluminiscencia en CEs tratadas durante 24 horas con sueros de pacientes (2%), suplementadas con 20 ng/mL de proteína rh VEGF. NOR: Suero proveniente de pacientes normotensas. PE: Suero proveniente de pacientes preeclámpticas. Los datos están presentados con la media ± SEM. (n=3), ***P*<0.01, con respecto al control. #*P*<0.05, con respecto al grupo PE, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

5.4 Modelo de correlación *in vitro* de PE. Efectos en la función bioenergética mitocondrial en CEs y trofoblastos.

Para establecer el modelo de correlación *in vitro* en CEs y HTR-8/SVneo, se cultivaron las células en estudio, en medio de cultivo conteniendo suero de los diversos grupos de pacientes en estudio. Tal como ha sido empleado anteriormente (160), se empleó 2% de suero de cada grupo, para el cultivo de cada línea y para los experimentos de bioenergética mitocondrial. Con respecto a las CEs, en la **figura 5.3 A** se observan las mediciones de OCR con respecto al tiempo, en CEs expuestas a suero de pacientes CTL, NOR y PE. Luego de la administración de FCCP, se cuantificaron los niveles de consumo de oxígeno correspondientes a la respiración máxima; en el grupo CTL: 23.3 ± 1.7 pmol O₂/min/μg de proteína, grupo NOR: 22.1 ± 0.7 pmol O₂/min/μg de proteína y grupo PE: 12.1 ± 1.5 pmol O₂/min/μg de proteína (*P*=0.02, con respecto al control) (**Figura 5.3 B**). Asimismo, la cuantificación de la capacidad respiratoria máxima en el grupo CTL fue 5.8 ± 1.5 pmol O₂/min/μg de proteína, del grupo NOR: 4.1 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína y del grupo PE: -1.2 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo CTL y PE (*P*=0.03) (**Figura 5.3 C**). Tal como se observa en las **figuras 5.3 A-C**, la administración de suero proveniente del

grupo NOR no conllevó a cambios estadísticamente significativos en la respiración máxima ($P=0.42$) ni en la capacidad respiratoria máxima ($P=0.06$) con respecto al control.

Entre otros parámetros evaluados, se observó que la administración de sueros del grupo NOR y PE, no conllevó a cambios en la respiración basal (**Figura 5.3 D**) ($P=0.2$ y $P=0.5$, respectivamente), con determinaciones para el grupo CTL de 17.4 ± 0.2 pmol O_2 /min/ μ g de proteína, grupo NOR: 18.0 ± 0.8 pmol O_2 /min/ μ g de proteína y en el grupo PE: 18.7 ± 1.2 pmol O_2 /min/ μ g de proteína. Mientras que, tampoco se observaron cambios en el OCR acoplado a la producción de ATP (**Figura 5.3 E**) ($P=0.80$ y $P=0.12$, respectivamente); grupo CTL: 14.9 ± 0.4 pmol O_2 /min/ μ g de proteína, grupo NOR: 15.7 ± 0.7 pmol O_2 /min/ μ g de proteína y grupo PE: 16.6 ± 0.9 pmol O_2 /min/ μ g de proteína. Finalmente, el OCR acoplado a la fuga de protones en el grupo CTL fue de: 2.5 ± 0.3 pmol O_2 /min/ μ g de proteína, grupo NOR: 2.3 ± 0.2 pmol O_2 /min/ μ g de proteína y grupo PE: 3.1 ± 0.4 pmol O_2 /min/ μ g de proteína. La administración de sueros del grupo NOR no conllevó a cambios significativos en el OCR-fuga de protones, mientras que el suero PE indujo un aumento significativo de esta medición (**Figura 5.3 F**) ($P=0.07$ y $P=0.04$, respectivamente).

Por otra parte, se evaluó el impacto de la administración de sueros de los grupos en estudios en la función bioenergética y mitocondrial de HTR-8/SVneo. En la **figura 5.4 A** se evidencia la representación del consumo de oxígeno con respecto al tiempo en trofoblastos expuestos a sueros de pacientes. La respiración máxima determinada en el grupo CTL fue: 6.76 ± 0.7 pmol O_2 /min/ μ g de proteína, grupo NOR: 6.16 ± 0.2 pmol O_2 /min/ μ g de proteína y grupo PE: 4.73 ± 0.5 pmol O_2 /min/ μ g de proteína. Se observó que el tratamiento con sueros de PE disminuyó significativamente la respiración máxima ($P=0.03$) (**Figura 5.4 B**). La capacidad de reserva respiratoria mitocondrial en el grupo CTL fue: 0.67 ± 0.4 pmol O_2 /min/ μ g de proteína, en el grupo NOR: 0.64 ± 0.4 pmol O_2 /min/ μ g de proteína y en el grupo PE: -1.08 ± 0.1 pmol O_2 /min/ μ g de proteína. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa con respecto al grupo CTL ($P=0.002$) (**Figura 5.4 C**).

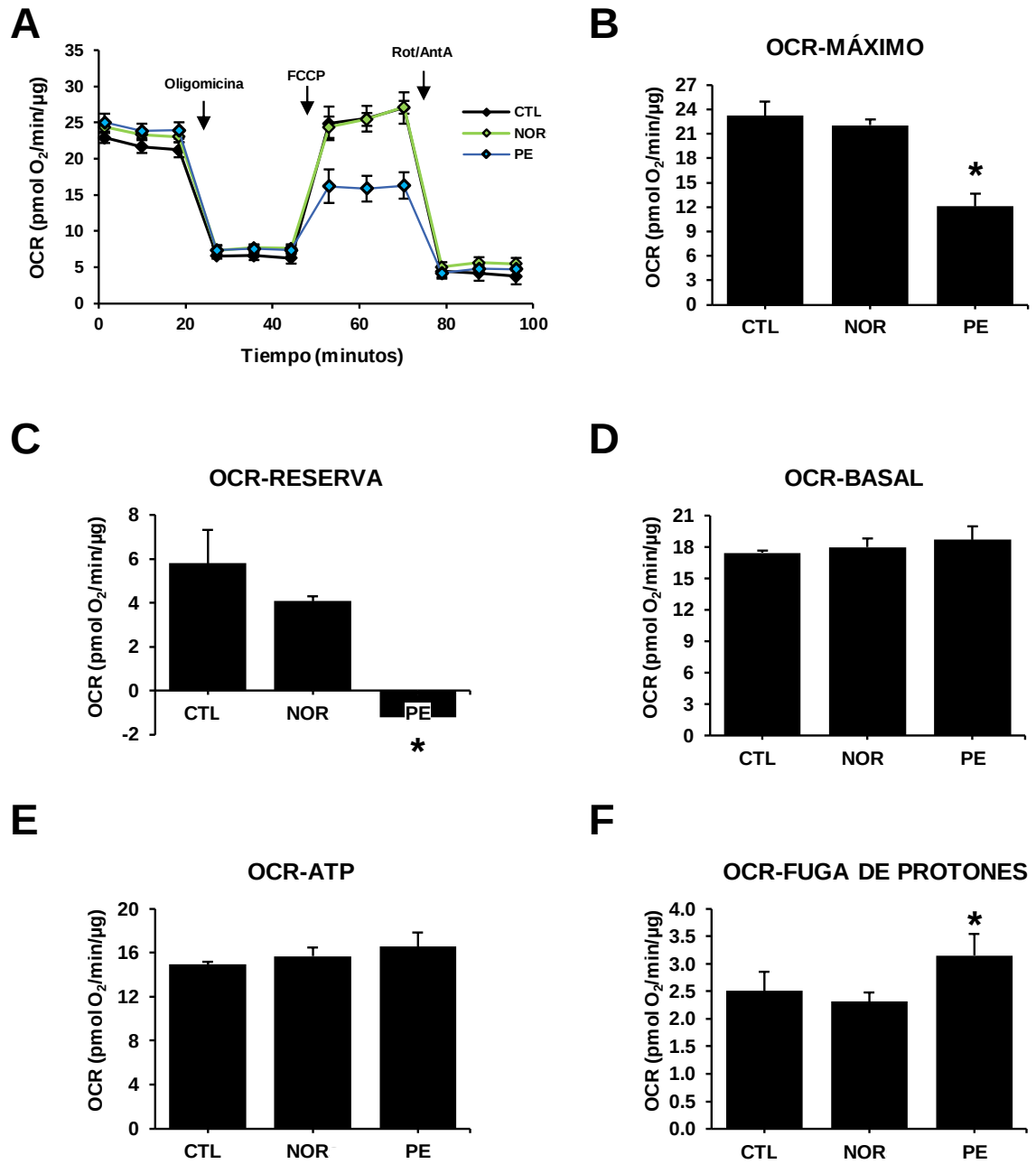


Figura 5.3 Efectos de la administración de sueros provenientes de pacientes en estudio, en la actividad bioenergética mitocondrial de CE. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con suero de pacientes en estudio (2%) durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-fuga de protones. Pacientes no embarazadas (CTL), normotensas (NOR) y preeclámpsicas (PE). Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Entre otros parámetros evaluados, el OCR-basal para el grupo CTL fue: 6.1 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína, en el grupo NOR: 5.5 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína y en el grupo PE: 5.5 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína. Estadísticamente, no se observaron diferencias en el OCR-basal entre las tres condiciones evaluadas ($P=0.31$) (**Figura 5.4 D**). Con respecto al consumo de oxígeno acoplado a la producción de ATP, los niveles detectados en el grupo CTL fueron: 5.4 ± 0.3 pmol O₂/min/μg de proteína, en el grupo NOR: 4.5 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína y en el grupo PE: 4.5 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína. El análisis estadístico no indicó diferencias estadísticas entre las medias evaluadas ($P=0.29$) (**Figura 5.4 E**). Finalmente, el OCR asociado a la fuga de protones en el grupo CTL fue: 0.7 ± 0.1 pmol O₂/min/μg de proteína, en el grupo NOR: 1.0 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína y en el grupo PE 1.0 ± 0.3 pmol O₂/min/μg de proteína. En esta oportunidad, tampoco se observaron diferencias estadísticas entre los tres grupos evaluados ($P=0.45$) (**Figura 5.4 F**).

5.5 La administración exógena de VEGF no reestablece la actividad bioenergética mitocondrial de CEs y HTR-8/SVneo.

Un punto central en esta investigación fue conocer el papel de sFlt-1 en el establecimiento de cambios o perturbaciones metabólicas tempranas que pudieran conllevar a la aparición de procesos patológicos, como PE. Una vez conocido el impacto de los sueros provenientes de pacientes PE en el establecimiento de cambios bioenergéticos, no sólo en CEs sino en trofoblastos, fue imperativo conocer si sFlt-1 es el responsable de dichas alteraciones observadas. Para ello, sueros de pacientes PE fueron suplementados con proteína rh VEGF a una concentración de 20 ng/mL. Como ha sido previamente propuesto, sFlt-1 actúa como un modulador de la actividad pro-angiogénica de VEGF, limitando su biodisponibilidad (63), para regular el delicado balance angiogénico durante la gestación. Con este conocimiento y responsabilizando a sFlt-1 de los cambios observados en la correlación *in vitro* (**figura 5.3 y 5.4**), se esperaba que la administración de VEGF rescatara la actividad bioenergética mitocondrial tanto en CEs como en HTR-8/SVneo. Sin embargo, se observó que a pesar que VEGF logra una tendencia a mejorar el OCR, los datos no se normalizan a nivel del control (**Figura 5.5**).

En la **figura 5.5 A** se muestra la respiración máxima de CEs expuestas a sueros y a sueros suplementados con rh VEGF. La **tabla 5.2** resume las mediciones de OCR-Máximo. La adición de VEGF a los sueros CTL y NOR conllevó a diferencias significativas con respecto a las células tratadas con sueros únicamente, mientras que se observó un aumento significativo del OCR-Máximo en presencia de VEGF con respecto al grupo PE ($P=0.03$). Sin embargo, el aumento de OCR observado no logra restablecer el OCR a nivel del control ($P=0.07$). Asimismo, tal como se evidencia en la **figura 5.5 B**, y se resume en la **tabla 5.3**, no se logró restablecer la capacidad respiratoria máxima a nivel del control, tras la administración de rh VEGF ($P=0.06$).

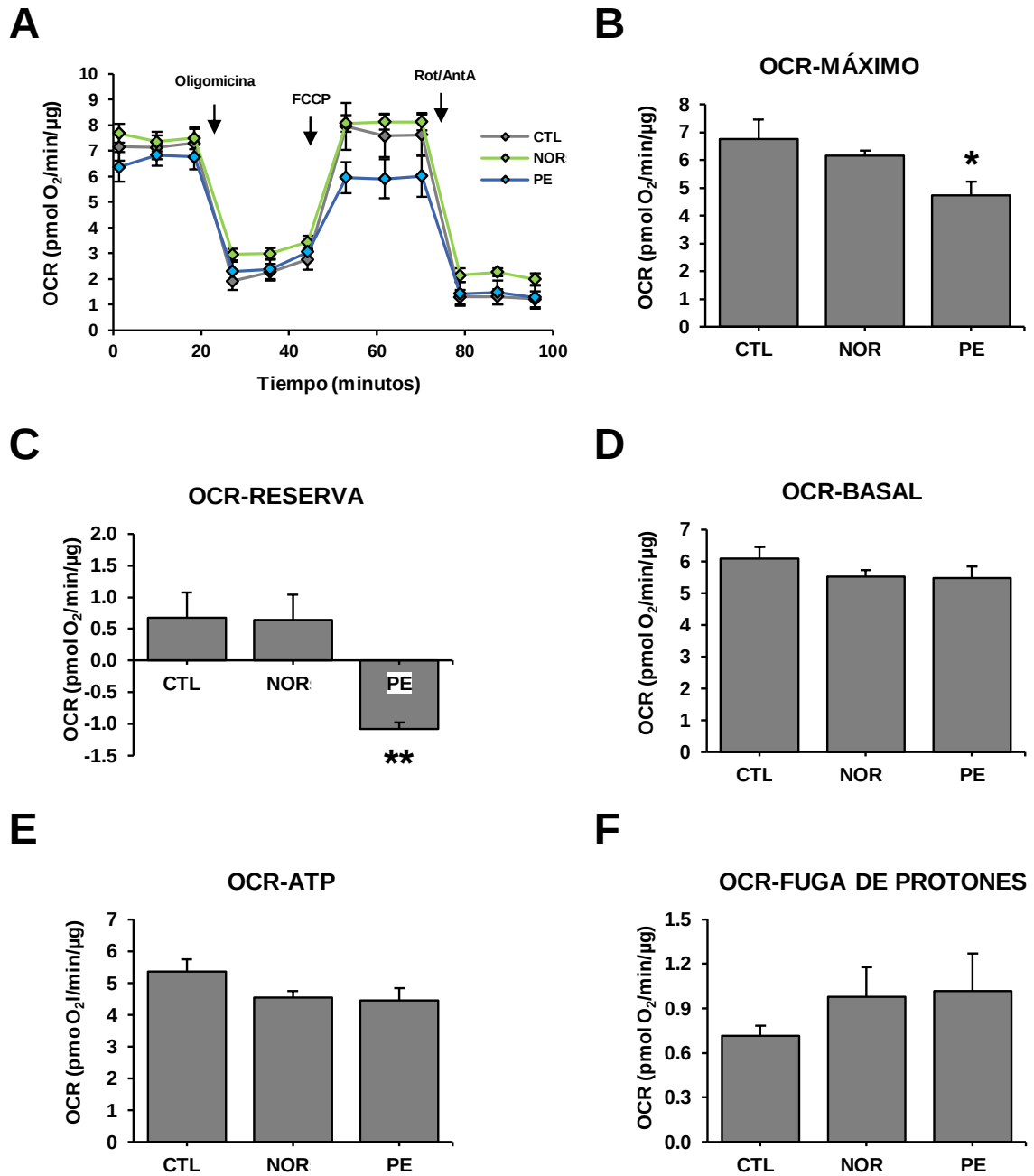


Figura 5.4 Efectos de la administración de sueros provenientes de pacientes en estudio, en la actividad bioenergética mitocondrial de HTR-8/SVneo. Células HTR-8/SVneo fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con suero de pacientes en estudio (2%) durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-fuga de protones. Control (CTL), normotensas (NOR) y preeclámpticas (PE). Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Tratamiento	OCR-Máximo ($\mu\text{mol O}_2/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína)		
	Grupos experimentales		
	CTL	NOR	PE
Suero	25.4 ± 1.7	22.1 ± 0.7	$12.1 \pm 1.5^*$
Suero + VEGF	23.3 ± 1.3	20.2 ± 1.4	$16 \pm 1.3^\#$

Tabla 5.2 Niveles de OCR-Máximo en células CEs tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE, suplementados con VEGF. VEGF: 20 ng/mL. (n=5), * $P < 0.05$, con respecto al control, # $P < 0.05$ con respecto al grupo PE, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Tratamiento	OCR-Reserva ($\mu\text{mol O}_2/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína)		
	Grupos experimentales		
	CTL	NOR	PE
Suero	5.8 ± 1.5	4.10 ± 0.2	$1 \pm 0.2^*$
Suero + VEGF	7 ± 1.5	3.4 ± 1.4	1.3 ± 1.0

Tabla 5.3 Niveles de OCR-Reserva en células CEs tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE, suplementados con VEGF. VEGF: 20 ng/mL. (n=5), * $P < 0.05$, con respecto al control, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Por otra parte, en las células trofoblásticas, tal como se observó previamente (**figura 5.4**), la administración de suero PE indujo cambios significativos en la respiración máxima. De igual manera, la suplementación con VEGF no desencadenó variación en esta misma medición ($P=0.09$) con respecto al grupo control y ($P=0.28$) con respecto al grupo PE (**Figura 5.5 C**) (**tabla 5.4**). Mientras que, en la capacidad respiratoria máxima, tal como se evidencia en la **figura 5.5 D**, logró un aumento estadísticamente significativo con respecto al grupo PE ($P=0.04$). Sin embargo, esta tendencia a mejorar la OCR-Reserva no fue suficiente para restablecer la bioenergética mitocondrial con respecto al grupo control ($P=0.06$) (**Tabla 5.5**).

Tratamiento	OCR-Máximo (pmol O ₂ /min/μg de proteína)		
	Grupos experimentales		
	CTL	NOR	PE
Suero	6.76 ± 0.7	6.16 ± 0.2	4.73 ± 0.5*
Suero + VEGF	6.45 ± 0.3	6.33 ± 0.4	5.1 ± 0.6

Tabla 5.4 Niveles de OCR-Máximo en células HTR-8/SVneo tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE, suplementados con VEGF. VEGF: 20 ng/mL. (n=5), *P<0.05, con respecto al control, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Tratamiento	OCR-Reserva (pmol O ₂ /min/μg de proteína)		
	Grupos experimentales		
	CTL	NOR	PE
Suero	0.67 ± 0.4	0.64 ± 0.4	-1.08 ± 0.1*
Suero + VEGF	0.85 ± 0.5	0.83 ± 0.3	-0.22 ± 0.1 [#]

Tabla 5.5 Niveles de OCR-Reserva en células HTR-8/SVneo tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE, suplementados con VEGF. VEGF: 20 ng/mL. (n=5), *P<0.05, con respecto al control, [#]P<0.05, con respecto al grupo PE, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Estas observaciones sugieren que sFlt-1 podría ser responsable de antagonizar con la actividad homeostática de VEGF, teniendo un impacto a nivel mitocondrial. Sin embargo, es probable que otras moléculas presentes en el suero materno de mujeres PE, (y a menor escala en sueros de pacientes NOR), podrían ser responsables de desencadenar los efectos observados a nivel metabólico. Al contrastar estos resultados con las observaciones previas en relación a sFlt-1 exógena, es posible que sFlt-1 promueva la liberación de otras moléculas que potencialmente impacten a nivel metabólico y establezcan perturbaciones metabólicas tempranas a nivel mitocondrial. En esta investigación se sugiere que una de estas moléculas involucradas podría ser TNF-α.

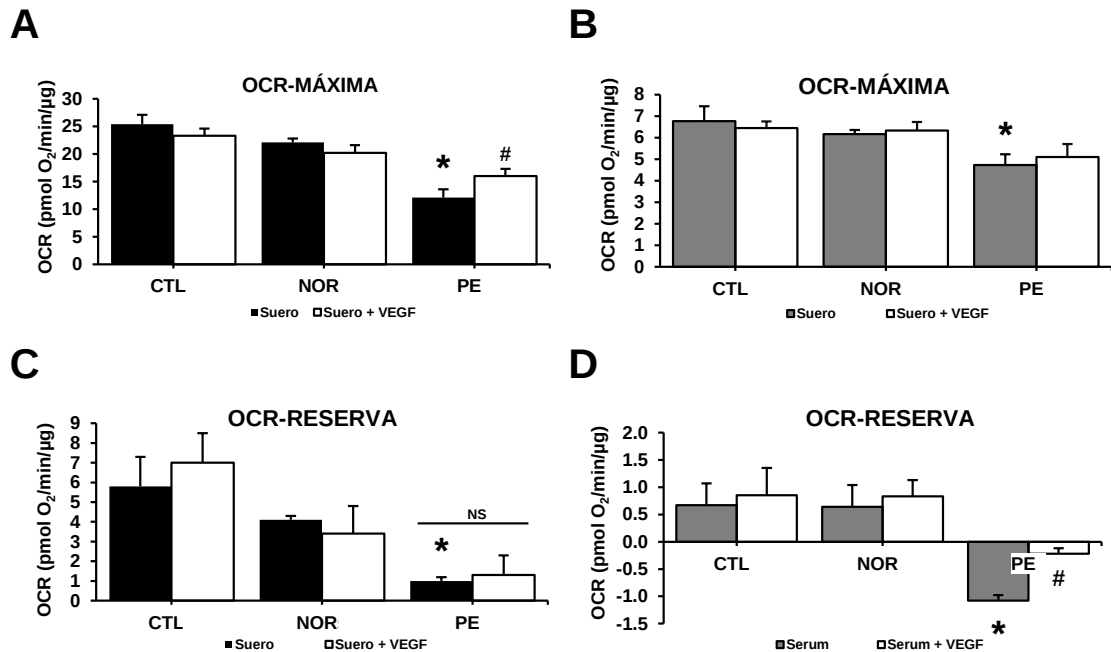


Figura 5.5 Cambios en la función bioenergética mitocondrial luego de la administración exógena de proteína rh VEGF al tratamiento con sueros de pacientes en CEs y trofoblastos. OCR-Máxima de (A) CEs y (B) HTR-8/SVneo. (C) OCR-Reserva de CEs y (D) HTR-8/SVneo, 24 horas post-tratamiento con 2% de sueros de pacientes control (CTL), normotensas (NOR) y preeclápticas (PE). Además, se administró 20 ng/mL de rh VEGF para observar su efecto en cada grupo en estudio. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5, * P <0.05, con respecto al control, # P <0.05 con respecto al grupo PE, NS=No significativo estadísticamente con respecto a PE, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

5.6 VEGF no disminuye la producción de mROS ni restablece los cambios en el Ψ_m inducidos por la administración de sueros de pacientes preeclápticas en CEs y trofoblastos.

A continuación, se evaluó si los sueros provenientes de pacientes, podría conllevar a una producción aumentada de mROS y cambios en Ψ_m . Para ellos, las CEs fueron sembradas en placas de 24 pozos en densidad de 5.0×10^4 células/pozo, tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE al 2% por 24 horas; tiempo tras el cual se midió por microscopía de fluorescencia, empleando la sonda mitoSOX Red, la formación de mROS. En CEs, se observó una producción incrementada de mROS en presencia de suero proveniente del grupo PE ($P=0.0009$). De igual manera, se observó que el suero de pacientes del grupo NOR no conllevó a cambios estadísticamente significativos en la formación de mROS con respecto al control ($P=0.12$) (Figura 5.6 A-B).

Seguidamente, se observó que el suero de pacientes del grupo PE conlleva a una disminución del Ψ_m en CEs ($P=0.002$). Para este fin, las CEs, sembradas en

densidad celular de 5.0×10^4 células/pozo, en placa de 24 pozos; fueron tratadas con sueros de pacientes CTL, NOR y PE (2%), durante 24 horas. Tras este tiempo, se evaluó por microscopía de fluorescencia, usando la sonda fluorescente JC-1, la disminución (disipación) del Ψ_m . Estos cambios no fueron observados cuando se administró suero de pacientes NOR ($P=0.35$), al comparar con el control (**Figura 5.6 C**).

Además, se buscó evaluar el papel de sFlt-1 en los cambios observados a nivel de la función mitocondrial. Para ello se administró 20 ng/mL de proteína rh VEGF. En CEs, la administración exógena de VEGF atenuó la formación de mROS con respecto al grupo PE ($P=0.03$). Sin embargo, esto no logró restablecer la formación de mROS a los niveles del control, manteniendo aún, una diferencia estadísticamente significativa con el grupo CTL (**Figura 5.6 A-B**). Además, VEGF no logró restablecer los cambios en el Ψ_m inducidos por el suero de pacientes PE ($P=0.052$), manteniendo una marcada disminución en el Ψ_m con respecto al grupo CTL (**Figura 5.6 C**).

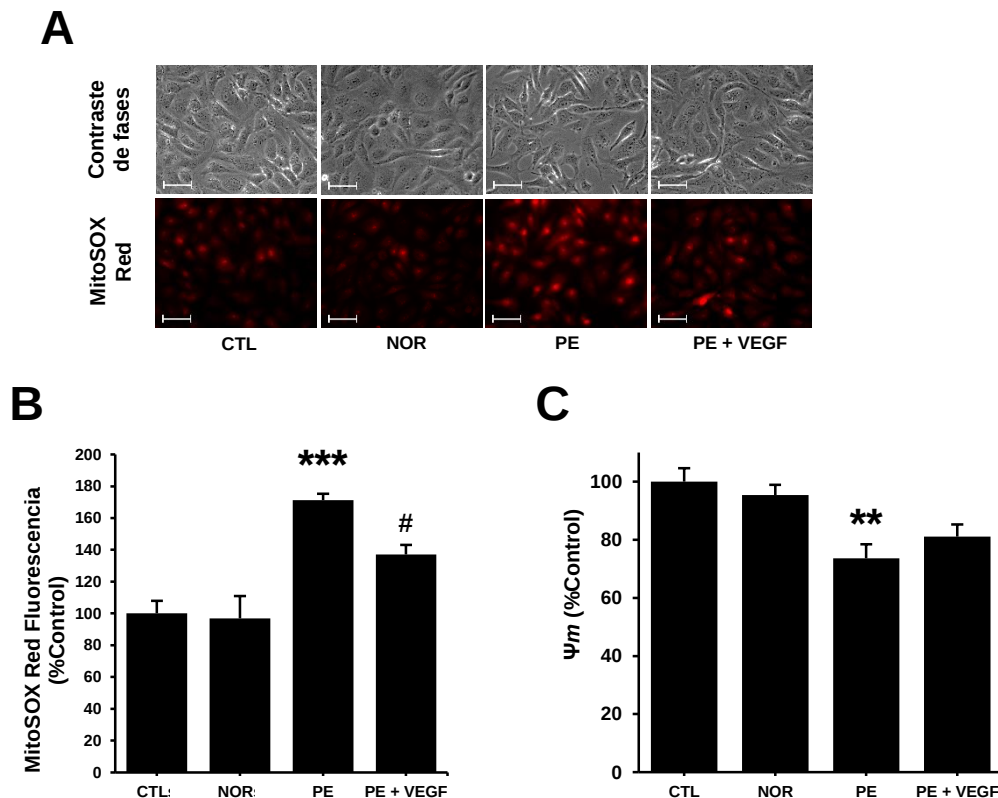


Figura 5.6 Efecto de la administración exógena de proteína rh VEGF en la formación de mROS y en la disminución del Ψ_m , inducido por el tratamiento con sueros de pacientes en estudio en CEs. (A) Microscopía de contraste de fases y fluorescencia con MitoSOX Red (40X), (B) Incremento en la formación de mROS con respecto al control y (C) Disminución del Ψ_m con respecto al control, 24 horas post-tratamiento con 2% de sueros de pacientes control (CTL), normotensas (NOR) y preeclámpticas (PE). Además, se administró 20 ng/mL de proteína rh VEGF para observar su efecto

durante la administración de suero del grupo PE. La formación de mROS se detectó por fluorescencia empleando la sonda MitoSOX Red y el potencial de membrana empleando la sonda JC-1, ambos por fluorescencia. Barra: 50 μ m. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3), * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 con respecto al control, # P <0.05 con respecto al grupo PE, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Con respecto a las observaciones en HTR-8/SVneo, células trofoblásticas fueron sembradas en placas de 24 pozos en densidad de 5.0×10^4 células/pozo, tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE al 2% por 24 horas; tiempo tras el cual se midió por microscopía de fluorescencia, empleando la sonda mitoSOX Red, la formación de mROS. En la **figura 5.7** se observó que la administración de sueros provenientes de pacientes del grupo NOR, así como del grupo PE son capaces de inducir un incremento estadísticamente significativo en la formación de mROS ($P=0.04$ y $P=0.009$, respectivamente) (**Figura 5.7 A-B**). Mientras que, sólo la administración de suero PE logró establecer una disminución significativa del Ψ_m ($P=0.003$) al comparar con el control. La administración de proteína rh VEGF 20 ng/mL, logró restablecer los niveles de mROS a nivel del grupo NOR, con una disminución estadísticamente significativa con respecto al grupo PE ($P=0.02$), sin lograr restablecer la formación de mROS a nivel del control.

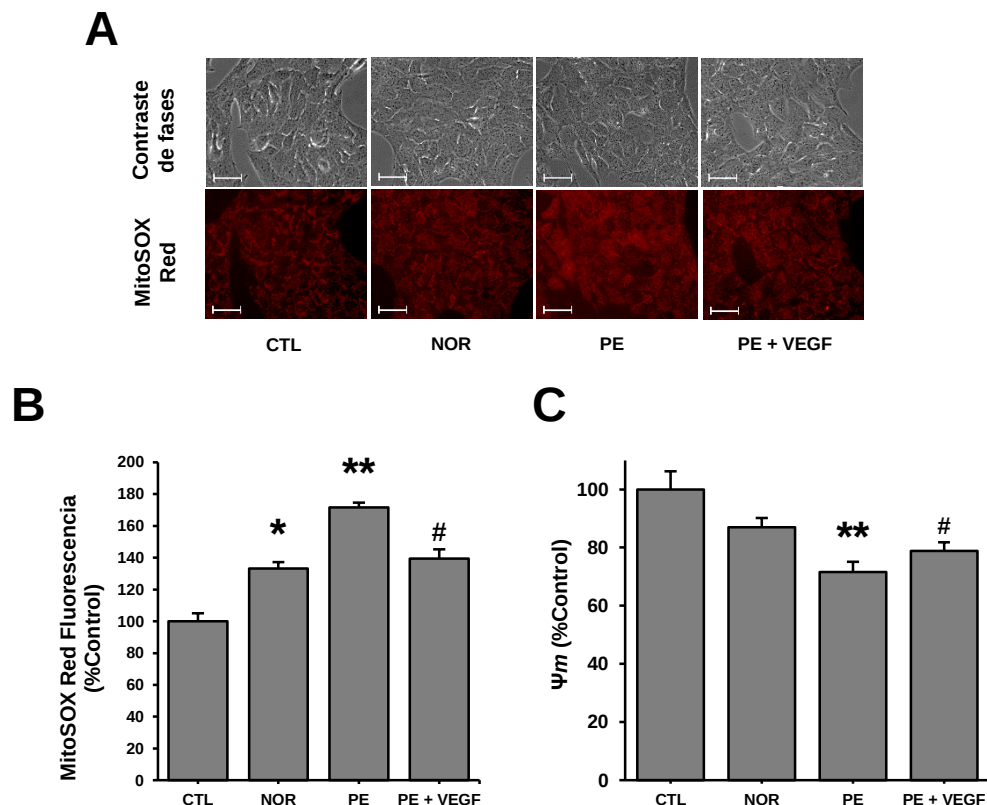


Figura 5.7 Efecto de la administración exógena de proteína rh VEGF en la formación de mROS y en la disminución del Ψ_m , inducido por el tratamiento con sueros de pacientes en estudio en HTR-8/SVneo. (A) Microscopía de contraste de fases y fluorescencia con MitoSOX Red (40X), (B)

Incremento en la formación de mROS con respecto al control y (C) Disminución del Ψm con respecto al control, 24 horas post-tratamiento con 2% de sueros de pacientes control (CTL), normotensas (NOR) y preeclámpticas (PE). Además, se administró 20 ng/mL de proteína rh VEGF para observar su efecto durante la administración de suero PE. La formación de mROS se detectó por fluorescencia empleando la sonda MitoSOX Red y el potencial de membrana empleando la sonda; JC-1, ambos por fluorescencia. Barra: 50 μm . Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3), * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ con respecto al control, # $P < 0.05$ con respecto al grupo PE, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Una observación interesante a nivel de las células trofoblásticas, fue que el suero de pacientes PE tuvo un impacto en la formación de mROS, que VEGF logró igualar en las células tratadas con suero de pacientes NOR. Esto sugiere que, tanto en embarazos normales como en PE, existe una formación aumentada de mROS. Lo cual implica que a nivel trofoblástico, esta formación incrementada de mROS, podría jugar un papel crucial durante la gestación. Además, estas observaciones sugieren que la biodisponibilidad de VEGF puede regular la producción exacerbada de mROS.

Por otra parte, la administración de VEGF no logró restablecer el Ψm en ninguna de las dos líneas celulares; esto sugiere que los cambios observables en el Ψm no dependen únicamente de sFlt-1, otras moléculas presentes en el suero materno de mujeres preeclámpticas, (y en menor escala en sueros de pacientes normotensas), podrían estar involucradas en este efecto observado en la función mitocondrial. Tal como se manifestó anteriormente, en esta investigación se propone que TNF- α podría ser una de estas moléculas involucradas.

5.7 Efectos de TNF- α en la función endotelial y función bioenergética mitocondrial de CE y trofoblastos.

Dado que las observaciones con sueros de pacientes y VEGF no demostró que la función endotelial y bioenergética mitocondrial pueda ser restablecida al incrementar la biodisponibilidad de VEGF; se evaluó el papel de TNF- α , como mediador de DE y como mediador de perturbaciones metabólicas en PE. Hace algunos años, se asoció a TNF- α , con la sobreproducción de sFlt-1 en PE (107). También, la regulación de TNF- α a través de sFlt-1 ha sido sugerida con anterioridad (260). Con ello, el siguiente enfoque en este estudio fue evaluar los mecanismos a través de los cuales TNF- α podría inducir a DE, impactando en el metabolismo celular, para luego poder estudiar el papel que juega sFlt-1 en los efectos de TNF- α sobre la bioenergética mitocondrial y metabolismo.

En primer lugar, se evaluó a través de ELISA los niveles de TNF- α en sueros de pacientes normotensas y preeclámpticas en estudio. La media de TNF- α en suero de pacientes normotensas fue: 4.691 ± 0.47 pg/mL y en pacientes preeclámpticas; 9.272 ± 0.74 pg/mL. Se constató que los niveles de TNF- α están significativamente aumentados en pacientes preeclámpticas en comparación a los niveles encontrados en pacientes normotensas ($P=0.01$), tal como se muestra en la **figura 5.8**.

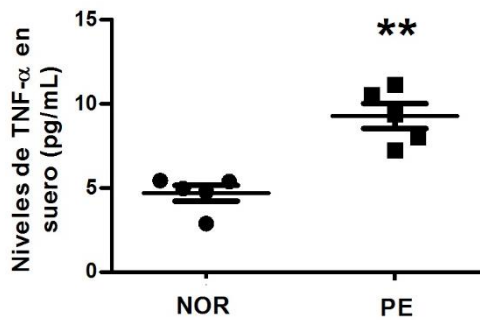


Figura 5.8 Niveles circulantes de TNF- α en sueros de pacientes gestantes. Las muestras de sangre fueron colectadas antes del parto. El suero fue empleado para la determinación de los niveles de TNF- α a través de ELISA. NOR: pacientes del grupo normotensas. PE: pacientes del grupo preeclámpticas. (n=6), * P < 0.05, ** P < 0.01 en comparación al control (prueba T de Student).

Una vez establecidos los niveles de TNF- α en suero de las maternas, normotensas y preeclámpticas, se buscó conocer el papel de esta citoquina en la función endotelial. Tal como ha sido previamente descrito en la literatura, TNF- α conlleva a DE mediante la disminución de la expresión de eNOS (261). Por tal motivo, células CE y HTR-8/SVneo expuestas a 50 ng/mL de proteína rh TNF- α fueron evaluadas mediante western blot y se determinó la expresión de eNOS y la fosforilación de esta enzima en el residuo de serina 1177. Para este ensayo, células trofoblásticas y CE, fueron tratadas durante 15 minutos con proteína rh TNF- α (50 ng/mL), tiempo tras el cual, las células fueron lisadas y ensayado en el western blot.

Tal como se evidencia en la **figura 5.9**, el tratamiento con TNF- α no conlleva a cambios en la expresión de eNOS, pero sí en la activación de esta enzima, evaluado mediante fosforilación de eNOS (en el residuo de serina 1177), que disminuye significativamente en presencia de TNF- α . En consistencia con estos hallazgos, la razón p-eNOS/eNOS indica que en presencia de TNF- α , existe una regulación en la activación de eNOS (**Figura 5.10**). Seguidamente, se evaluó el papel de TNF- α a nivel metabólico. Para ello, se identificaron las concentraciones de TNF- α más adecuadas para emplear en los ensayos, que fueran capaces de inducir cambios metabólicos que no afectaran la viabilidad y/o proliferación celular. Es por ello que se realizaron ensayos de proliferación y viabilidad con MTT. Tal como se muestra en la **figura 5.11**, TNF- α incluso a bajas concentraciones, impacta en la viabilidad y proliferación celular de CE, pero no en HTR-8/SVneo.

TNF- α en concentraciones de 1 ng/mL a 100 ng/mL afectó significativamente la viabilidad celular de CE (P =0.0003) (**Figura 5.11 A**). La administración de TNF- α en concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 ng/mL conllevó a cambios en la viabilidad de CE determinadas en porcentaje, en función al control, de: (99.4, 83.5, 64.9 y 36) %, respectivamente, en función al control. En cuanto a la proliferación celular, el conteo con coloración de exclusión con azul de tripán, demostró una diferencia

estadística con respecto a los grupos control y al tratamiento con 0.1 ng/mL de rh TNF- α ($P=0.0002$) (**Figura 5.11 C**).

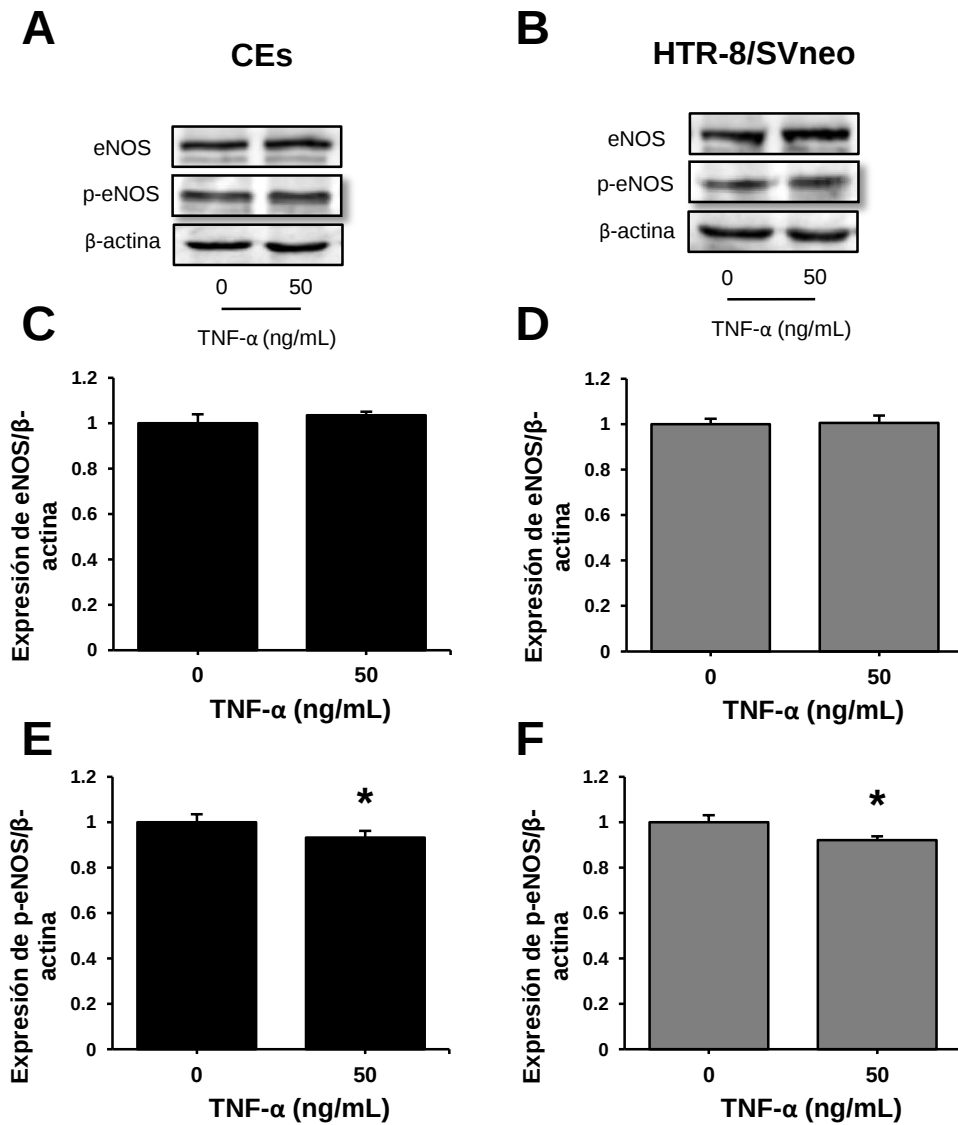


Figura 5.9 Efectos de TNF- α en la expresión y activación de eNOS en CEs y HTR-8/SVneo. La recuperación y lisado de proteínas se realizó tras 15 minutos de incubación con la proteína rh TNF- α (50 ng/mL), determinado por western blot en CEs y trofoblastos. (A) CEs y (B) HTR-8/SVneo, Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. (n=3), * $P<0.05$, (prueba T de Student).

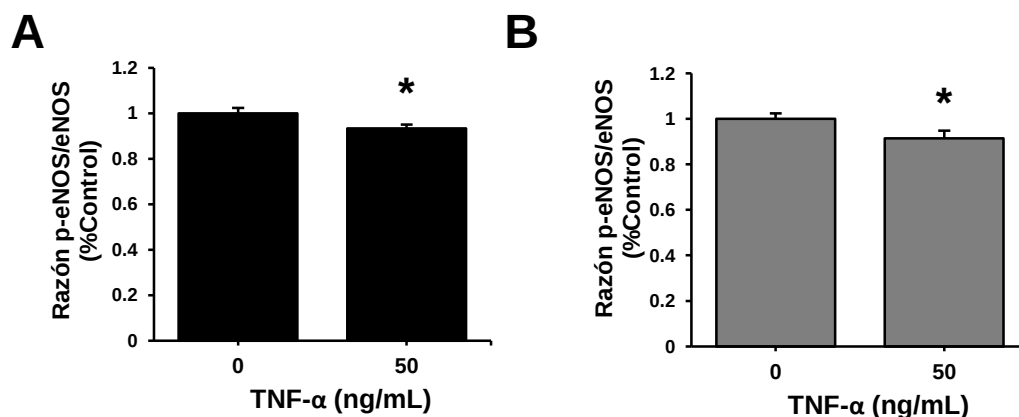


Figura 5.10 Efectos de TNF- α en la activación de eNOS en CEs y HTR-8/SVneo. La recuperación y lisado de proteínas se realizó tras 15 minutos de incubación con la proteína rh TNF- α (50 ng/mL), determinado por western blot en CEs y trofoblastos. (A) CEs y (B) HTR-8/SVneo. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. (n=3), * P <0.05 (prueba T de Student).

Mientras que, las células trofoblásticas tratadas con iguales concentraciones de TNF- α , sorpresivamente no presentaron cambios en su viabilidad con respecto al control, cuando fueron expuestas a concentraciones de proteína rh TNF- α de 0.1, 1, 10 y 100 ng/mL, obteniendo resultados de la viabilidad, medidos por MTT de: (100, 101, 103 y 102) %, respectivamente (P =0.15) (**Figura 5.11 B**). En cuanto a la proliferación celular, el conteo con coloración de exclusión con azul de tripán, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio (P =0.26) (**Figura 5.11 D**).

A continuación, se evaluó el impacto de TNF- α en el metabolismo celular de CEs. Se observó que TNF- α es capaz de afectar la función bioenergética mitocondrial en CEs (**Figura 5.12**). En la **figura 5.12 A**, se evidencia el impacto de la administración exógena de TNF- α en el OCR de CEs, en concentraciones de rh TNF- α de 1 a 100 ng/mL. Como se observó en la **figura 5.11**, concentraciones de TNF- α de 0.1 a 10 ng/mL afectan la viabilidad celular en menos del 50%. Con estas concentraciones, se mantuvo la densidad celular necesaria para que no se viera comprometida la sensibilidad de los ensayos de bioenergética mitocondrial por la tecnología Seahorse-Agilent. Mientras que, en concentraciones de 100 ng/mL, el efecto de TNF- α logró impactar en más de 60% la viabilidad celular. Esto comprometió la densidad celular al evaluar el metabolismo mitocondrial y por ello la interpretación de los resultados mostrados debió ser rigurosamente considerada.

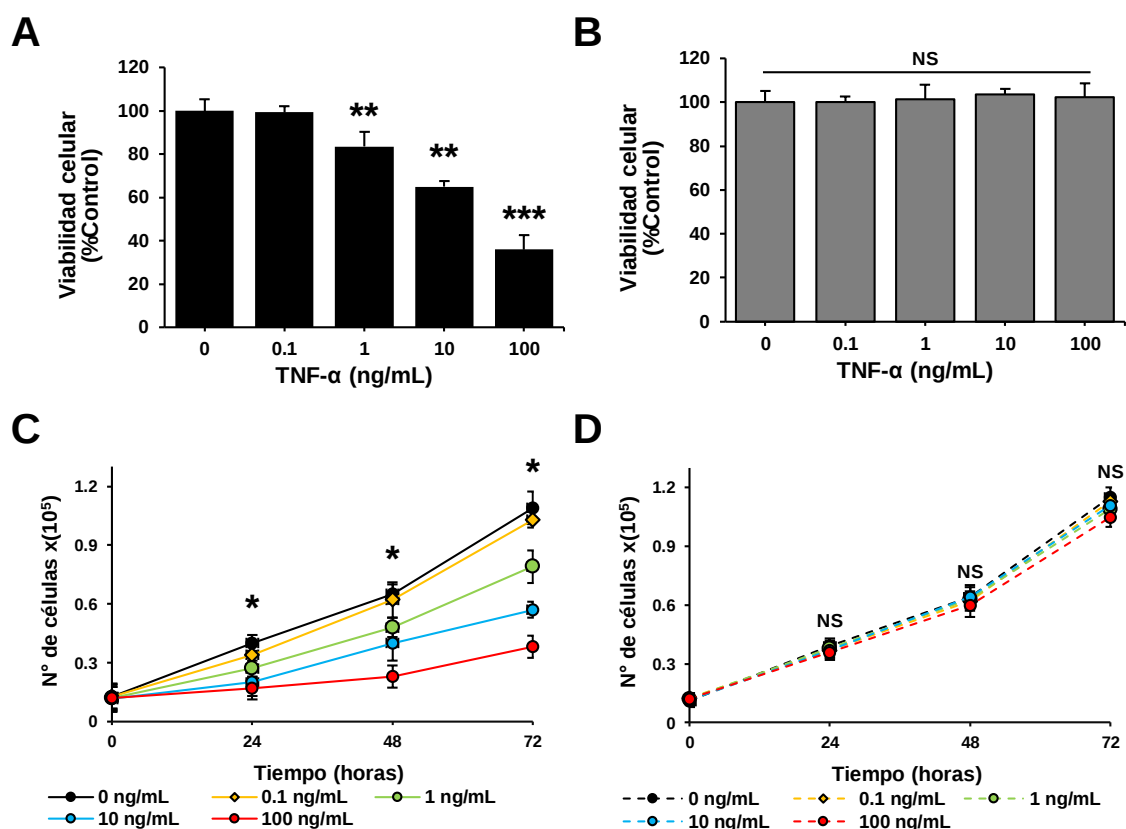


Figura 5.11 Efectos de la administración exógena de proteína rh TNF- α en la viabilidad y proliferación celular de CEs y HTR-8/SVneo. TNF- α se administró en concentraciones de: 0.1, 1, 10 y 100 ng/mL. La viabilidad se determinó a las 24 horas de tratamiento mediante el ensayo de MTT. La proliferación celular fue evaluada mediante conteo con hematocitómetro y coloración de exclusión con azul de tripán, a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento, con las mismas concentraciones de TNF- α ya descritas. Viabilidad con respecto al control de (A) CEs y (B) HTR-8/SVneo. Proliferación celular de (C) CEs y (D) HTR-8/SVneo. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. (n=3), * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, NS: No significativo estadísticamente con respecto al control, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

En la figura 5.12 B se evidencia el impacto de TNF- α en la respiración máxima de CEs. El OCR-Máximo determinado para el control fue: 23.66 ± 1.4 pmol O₂/min/ μ g de proteína, mientras que para los tratamientos con TNF- α 1, 10 y 100 ng/mL, el OCR medido fue: 23.03 ± 0.3 pmol O₂/min/ μ g de proteína, 17.13 ± 1.4 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 11.61 ± 0.6 pmol O₂/min/ μ g de proteína, respectivamente. En concentraciones de 10 y 100 ng/mL de TNF- α , se observó una disminución significativa del OCR-Máximo ($P=0.03$, $P=0.0003$, respectivamente). Asimismo, la capacidad de reserva respiratoria de CEs se observó significativamente disminuida con la administración de 1, 10 y 100 ng/mL de TNF- α ($P=0.04$, $P=0.002$ y $P=0.0001$, respectivamente), las mediciones de OCR-Reserva para el control fue: 9.6 ± 1.1 pmol O₂/min/ μ g de proteína, mientras que para los tratamientos con TNF- α 1, 10 y 100 ng/mL, el OCR medido fue: 8.29 ± 0.3 pmol O₂/min/ μ g de proteína, 2.66 ± 0.6

pmol O₂/min/μg de proteína y 0.89 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína, respectivamente (**Figura 5.12 C**).

Entre otros parámetros, la OCR-basal determinada en el control fue: 14.60 ± 0.5 pmol O₂/min/μg de proteína, para los tratamientos con TNF-α se obtuvo mediciones de OCR-basal de: 14.74 ± 0.6 pmol O₂/min/μg de proteína, 14.47 ± 1.1 pmol O₂/min/μg de proteína y 10.72 ± 0.6 pmol O₂/min/μg de proteína, respectivamente para los tratamientos con 1, 10 y 100 ng/mL de TNF-α. Se observó que TNF-α puede impactar la respiración basal en elevadas concentraciones (100 ng/mL) ($P=0.04$), mientras que concentraciones de TNF-α iguales o inferiores a 10 ng/mL, no conllevan a cambios significativos del OCR-basal ($P=0.18$) (**Figura 5.12 D**).

Seguidamente, el OCR vinculado a la producción de ATP del control fue: 12.98 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína, luego de los tratamientos con TNF-α se obtuvieron mediciones de OCR-ATP de: 12.99 ± 0.9 pmol O₂/min/μg de proteína, 12.13 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína y 8.57 ± 0.5 pmol O₂/min/μg de proteína, con respecto a los tratamientos en estudio (1, 10 y 100) ng/mL. La administración exógena de 1 y 10 ng/mL de TNF-α no conllevó a cambios estadísticamente significativos ($P=0.27$), mientras que a 100 ng/mL, este efecto fue significativamente estadístico, evidenciándose una disminución del OCR-ATP ($P=0.003$) (**Figura 5.12 E**). Finalmente, se evaluó el OCR-asociado a fuga de protones; a medida que se incrementó la administración de TNF-α, se observó un aumento de la fuga de protones, siendo significativo a partir de 10 ng/mL ($P=0.04$). Las mediciones de OCR-fuga de protones fueron de: 1.62 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína, 1.75 ± 0.3 pmol O₂/min/μg de proteína, 2.33 ± 0.5 pmol O₂/min/μg de proteína y 2.77 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína, respectivamente para los grupos control, 1, 10 y 100 ng/mL de proteína rh TNF-α (**Figura 5.12 F**).

Estas observaciones sugieren que concentraciones de 10 ng/mL de TNF-α podrían ser suficientes para desencadenar perturbaciones metabólicas en CEs, capaces de alterar la viabilidad y proliferación celular de forma significativa. Mientras que elevadas concentraciones, como 100 ng/mL, son perjudiciales para la célula, desencadenando perturbaciones metabólicas que sobrepasan las capacidades celulares para mantener la viabilidad y proliferación.

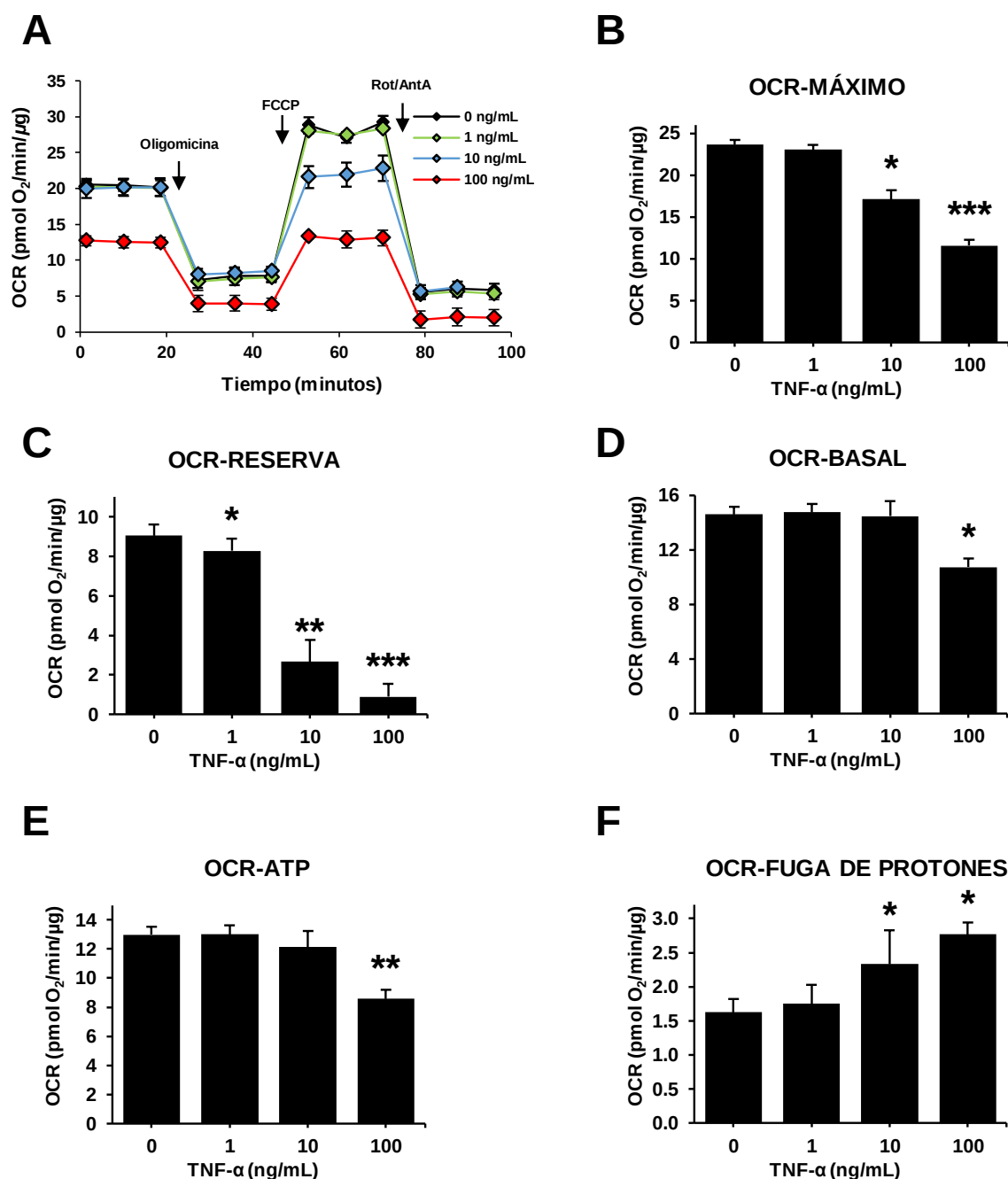


Figura 5.12 Efecto de la administración exógena de proteína rh TNF- α en la función bioenergética mitocondrial de CE. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh TNF- α en concentraciones de: 1, 10 y 100 ng/mL, durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-fuga de. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Contrastando con las observaciones en CEs, las células trofoblásticas HTR-8/SVneo no manifestaron cambios estadísticamente significativos en la viabilidad y proliferación celular (**figura 5.11**). Sin embargo, a nivel metabólico, TNF- α condujo a perturbaciones metabólicas que afectaron el OCR a medida que se aumentó la concentración de TNF- α (**Figura 5.13 A**). La respiración máxima determinada en el control fue: 24.31 ± 1.1 pmol O₂/min/ μ g de proteína, mientras que tras la administración de TNF- α de 1, 10 y 100 ng/mL, la medición de OCR-Máxima fue: 19.05 ± 0.6 pmol O₂/min/ μ g de proteína, 16.89 ± 0.6 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 15.69 ± 1.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína, respectivamente.

A partir de la administración de 1 ng/mL de TNF- α , se evidenció una disminución significativa con respecto al control ($P=0.004$) (**Figura 5.13 B**). Por otra parte, la capacidad de reserva respiratoria también se afectó con la elevación de las concentraciones de TNF- α administradas a HTR-8/SVneo. Para el control, la determinación de OCR- Reserva fue: 11.03 ± 0.8 pmol O₂/min/ μ g de proteína y con los tratamientos de TNF- α la medición de OCR fue: 7.76 ± 0.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína, 6.09 ± 0.6 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 5.13 ± 0.4 pmol O₂/min/ μ g de proteína, respectivamente. El valor $P=0.002$ indicó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio (**Figura 5.13 C**).

Mientras que, entre otros parámetros evaluados, el OCR-basal determinado fue: 13.28 ± 0.4 pmol O₂/min/ μ g de proteína, 11.29 ± 0.4 pmol O₂/min/ μ g de proteína, 10.79 ± 0.1 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 10.56 ± 0.8 pmol O₂/min/ μ g de proteína, respectivamente para el control y los tratamientos con 1, 10 y 100 ng/mL de TNF- α . Con respecto a las mediciones de OCR-basal, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.015$) (**Figura 5.13 D**). Por otra parte, la determinación del consumo del OCR acoplado a la producción de ATP, para el control fue de: 14.58 ± 0.7 pmol O₂/min/ μ g de proteína y para los tratamientos con TNF- α , 14.04 ± 0.3 pmol O₂/min/ μ g de proteína, 13.37 ± 0.5 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 12.66 ± 0.6 pmol O₂/min/ μ g de proteína, respectivamente. En esta medición no se observaron cambios significativos ($P=0.21$) (**Figura 5.13 E**).

Finalmente, la determinación del OCR-fuga de protones en el control fue: 2.89 ± 0.3 pmol O₂/min/ μ g de proteína y para los tratamientos con TNF- α fue: 2.90 ± 0.2 7 pmol O₂/min/ μ g de proteína, 2.75 ± 0.4 7 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 2.99 ± 0.5 7 pmol O₂/min/ μ g de proteína. En esta determinación tampoco se evidenció una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.34$) (**Figura 5.13 F**).

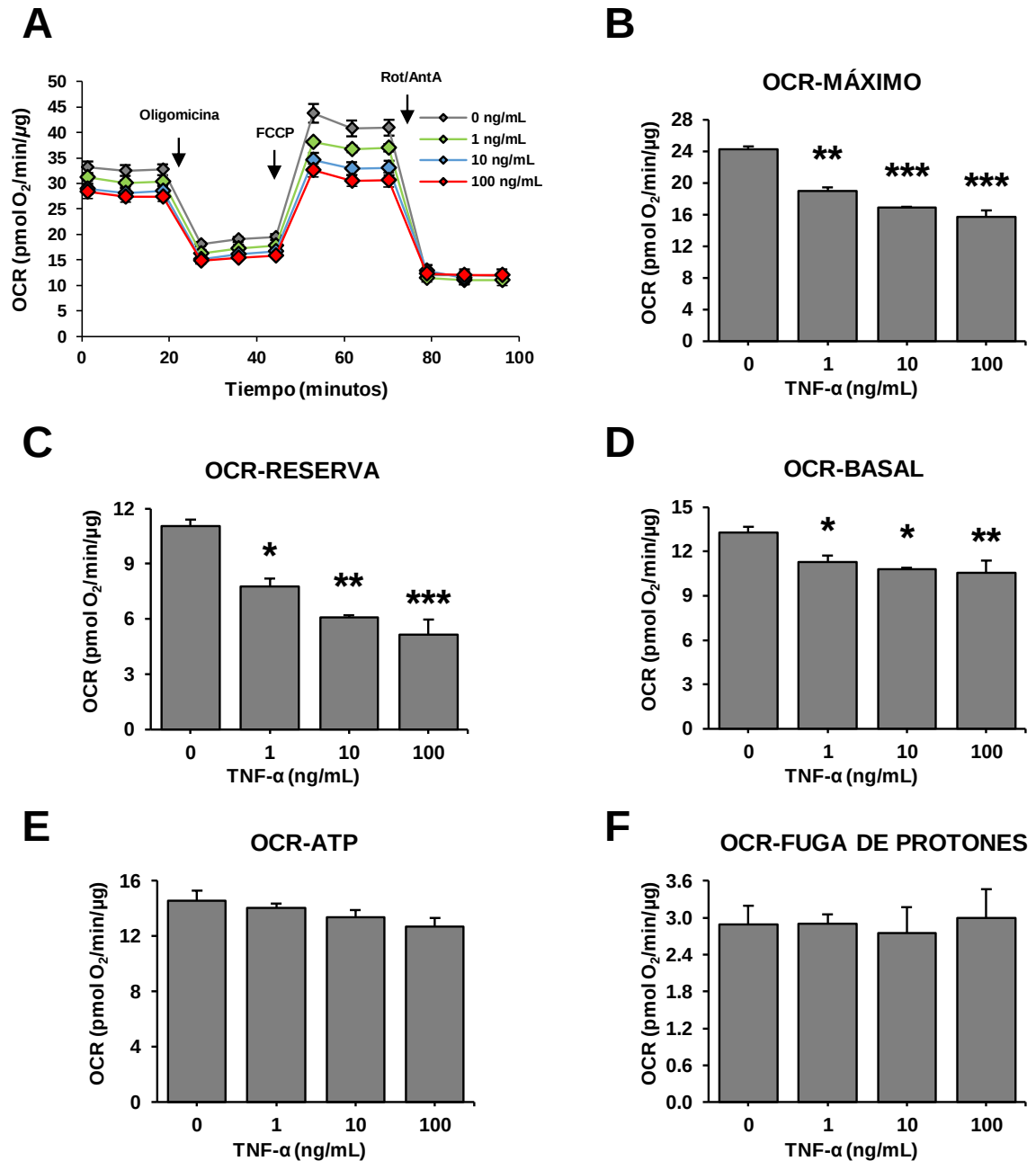


Figura 5.13 Efecto de la administración exógena de rh TNF- α en la función bioenergética mitocondrial de HTR-8/SVneo. Células HTR-8/SVneo fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh TNF- α en concentraciones de: 1, 10 y 100 ng/mL, durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-fuga de protones. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Tal como fue descrito en la sección “**capítulo I**, de Resultados”, las células HTR-8/SVneo son células que presentan un elevado metabolismo glucolítico basal. Ya que el impacto de TNF- α en la mitocondria es elevado en HTR-8/SVneo, los hallazgos aquí presentados sugieren que TNF- α podría conllevar a efectos perjudiciales en la obtención de ATP para estas células trofoblásticas. Sin embargo, dado que su metabolismo depende principalmente de la glucólisis aerobia en condiciones basales, esto podría explicar por qué las HTR-8/SVneo mantienen su viabilidad a pesar del impacto observado en la respiración mediado por TNF- α .

5.8 El mantenimiento de la viabilidad y proliferación celular en presencia de TNF- α no dependen de la reprogramación metabólica celular.

La contribución de diversas rutas metabólicas, como la glucólisis y respiración mitocondrial definen el fenotipo metabólico de las células, el cual puede modificarse drásticamente bajo ciertas condiciones de estrés. Tal como ha sido observado en esta sección (**figura 5.11**), TNF- α impacta en la viabilidad de CEs, lo cual sugiere que las células endoteliales en presencia de esta citoquina, no logran copar sus requerimientos metabólicos. También, como se observó en la **figura 5.12**, TNF- α , afecta dramáticamente el metabolismo mitocondrial en CEs. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado si las CEs, en presencia de TNF- α , son capaces de alterar su metabolismo a un fenotipo principalmente glucolítico para compensar requerimientos metabólicos.

Para comprobar este supuesto, se estudió el fenotipo energético y potencial metabólico de CEs tratadas con TNF- α . Esto permitió observar la contribución de la respiración mitocondrial y glicólisis como principales rutas metabólicas, luego del tratamiento de con proteína rh TNF- α (100 ng/mL). La evaluación del fenotipo metabólico permitió demostrar que efectivamente las CEs expuestas a TNF- α muestran un disminuido OCR basal, con determinaciones de: 20.19 ± 0.82 7 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 12.49 ± 0.75 pmol O₂/min/ μ g de proteína, respectivamente para los grupos control y TNF- α 100 ng/mL. Mientras que el OCR estresado fue: 29.25 ± 0.84 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 13.35 ± 0.29 pmol O₂/min/ μ g de proteína, respectivamente para el control y células expuestas a TNF- α (100 ng/mL).

En ambas determinaciones, la *prueba T de Student* demostró diferencias significativas entre las medias del OCR basal y OCR estresado ($P=0.001$) (**Figura 5.14 A y C**). Con respecto a la habilidad metabólica de las células para depender de glucólisis, la determinación de ECAR basal para el control fue: 2.70 ± 0.08 mpH/min/ μ g de proteína y para el tratamiento con TNF- α 2.92 ± 0.07 mpH/min/ μ g de proteína. Mientras que el ECAR estresado medido fue: 9.11 ± 0.09 mpH/min/ μ g de proteína y 6.59 ± 0.09 mpH/min/ μ g de proteína, respectivamente para el control y tratamiento con TNF- α (100 ng/mL). No se observaron diferencias estadísticas en el ECAR basal, pero si en el ECAR estresado ($P=0.001$, $n=5$) (**Figura 5.14 A y D**).

Por otra parte, el potencial metabólico de CEs expuestas a TNF- α representa la habilidad de las células de obtener sus demandas energéticas vía respiración mitocondrial y/o glucólisis, tal como se muestra en la **figura 5.14 B**, en condiciones de estrés, las células expuestas a TNF- α son menos capaces de obtener sus requerimientos metabólicos tanto por respiración mitocondrial como a través de glucólisis (**Figura 5.14 B-D**). Estos resultados sugieren que las CEs en presencia de TNF- α no son capaces de reprogramarse metabólicamente para compensar la demanda energética que no pueden adquirir vía mitocondria a través de glucólisis, lo cual se corresponde con la disminuida viabilidad observada en estas condiciones.

Consistentemente, HTR-8/SVneo no demostró cambios en el fenotipo metabólico inducidos por TNF- α (**Figura 5.15 A**). El potencial metabólico de HTR-8/SVneo demostró que tras la administración exógena de TNF- α , ocurre una disminución significativa en la habilidad de las células para obtener sus requerimientos metabólicos vía respiración mitocondrial. El OCR basal para el control fue: 32.70 ± 1.02 pmol O₂/min/ μ g de proteína y para TNF- α 100 ng/mL: 27.45 ± 0.94 pmol O₂/min/ μ g de proteína. Mientras que el OCR estresado determinado fue: 43.74 ± 1.77 pmol O₂/min/ μ g de proteína para el control y 32.58 ± 1.27 pmol O₂/min/ μ g de proteína para las células tratadas con 100 ng/mL de TNF- α . La diferencia en las medias de OCR estresado fue estadísticamente significativa ($P=0.0009$) (**Figura 5.15 C**). Con respecto a la contribución de la glucólisis al perfil metabólico, el ECAR basal determinado fue: 8.65 ± 0.26 mpH/min/ μ g de proteína y 8.17 ± 0.24 mpH/min/ μ g de proteína, respectivamente para el control y el tratamiento con TNF- α . Las mediciones de ECAR estresado; 13.89 ± 0.45 mpH/min/ μ g de proteína (control) y 13.19 ± 0.31 mpH/min/ μ g de proteína (TNF- α) no evidencian diferencias estadísticamente significativas entre sí (**Figura 5.15 D**).

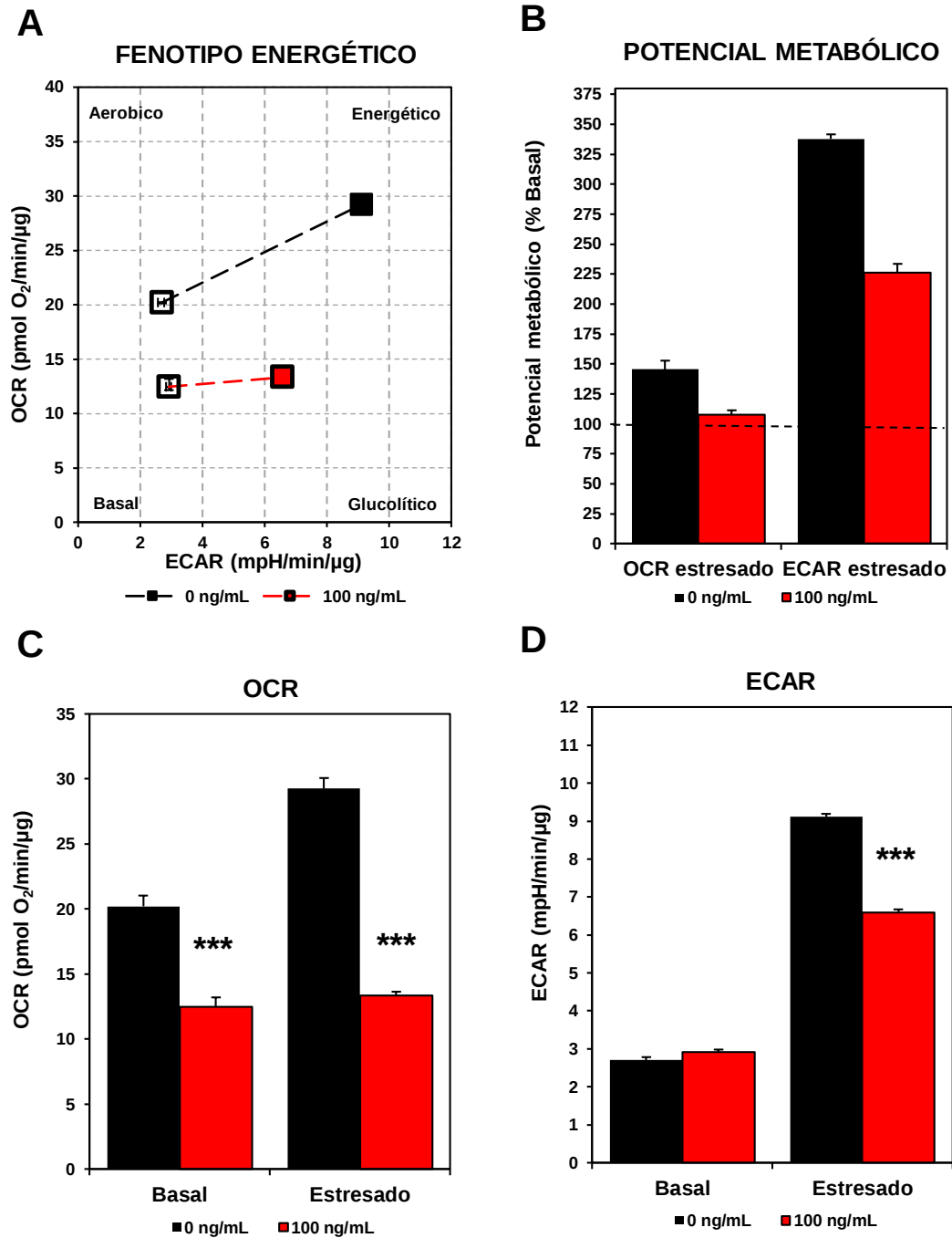


Figura 5.14 Efectos de la administración exógena de proteína rh TNF- α en el fenotipo metabólico de CEs. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh VEGF (100 ng/mL), durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial y fenotipo metabólico empleando la tecnología Seahorse-Agilent en CEs. (A) Fenotipo energético, (B) potencial metabólico, (C) OCR y (D) ECAR. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 con respecto al control, (prueba T de Student).

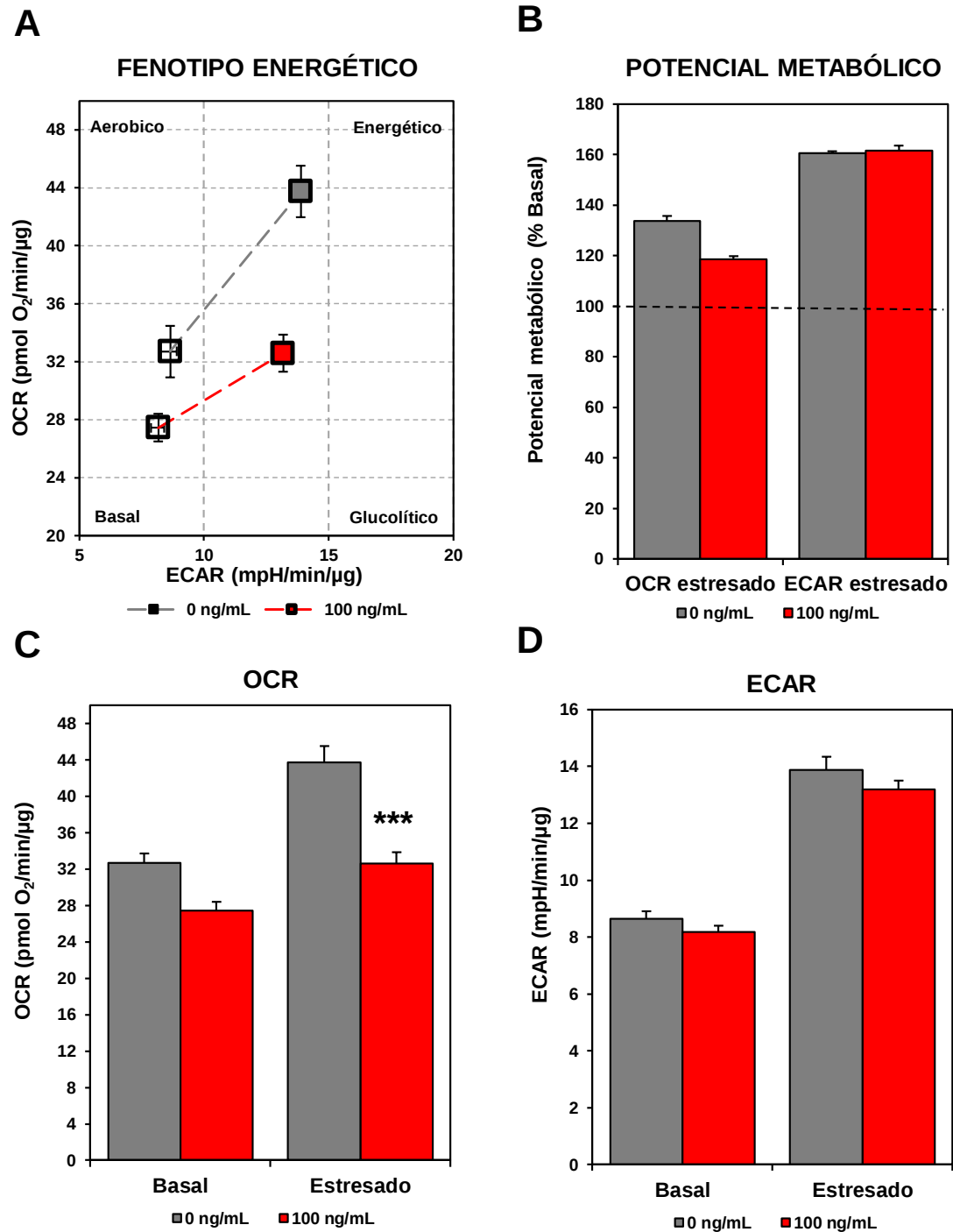


Figura 5.15 Efectos de la administración exógena de proteína rh TNF- α en el fenotipo metabólico de HTR-8/SVneo. Células HTR-8/SVneo fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh VEGF (100 ng/mL), durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial y fenotipo metabólico empleando la tecnología Seahorse-Agilent en trofoblastos. (A) Fenotipo energético, (B) potencial metabólico, (C) OCR y (D) ECAR. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 con respecto al control, (prueba T de Student).

5.9 TNF- α aumenta la producción de mROS y la disipa el Ψm en CEs, pero no en HTR-8/SVneo.

Seguidamente, para evaluar el impacto de TNF- α en la función mitocondrial, se estudió la producción de especies reactivas de oxígeno de origen mitocondrial (mROS) y cambios en el potencial de membrana mitocondrial (Ψm), inducidos por proteína rh TNF- α en el modelo *in vitro* de endotelio (CEs) y trofoblastos (HTR-8/SVneo), empleando las sondas fluorescentes mitoSOX Red y JC-1, respectivamente.

En CEs, la administración de 50 ng/mL de proteína rh TNF- α conllevó a un aumento significativo de la producción de mROS ($P=0.02$). La administración de concentraciones de 100 ng/mL, tal como fue descrita en la sección anterior (sección 5.8), fue perjudicial para el mantenimiento de la viabilidad celular. Por esta razón, se emplearon concentraciones hasta 50 ng/mL, con la finalidad de poder observar cambios inducidos por TNF- α que no estén enmascarados por la disminución en la viabilidad que conduce el empleo de elevadas concentraciones de esta citoquina. (**Figura 5.16 A**). En el modelo de trofoblastos con HTR-8/SVneo, se continuó empleando las concentraciones de trabajo de TNF- α definidas para CEs. Observándose que concentraciones de 50 ng/mL de proteína rh TNF- α , este incremento fue estadísticamente significativo ($P=0.04$) (**Figura 5.16 B**).

Soportando los hallazgos concernientes a mROS, se observó que TNF- α impactó en el potencial de membrana mitocondrial al inducir una disipación (disminución) del Ψm en CEs (**Figura 5.17 A**). En concentraciones 50 ng/mL de proteína rh TNF- α se observó una disminución del Ψm con respecto al control ($P=0.04$). Mientras que en HTR-8/SVneo, se observó una disminución significativa del Ψm a partir de concentraciones de 50 ng/mL de rh TNF- α ($P=0.002$) (**Figura 5.17 B**).

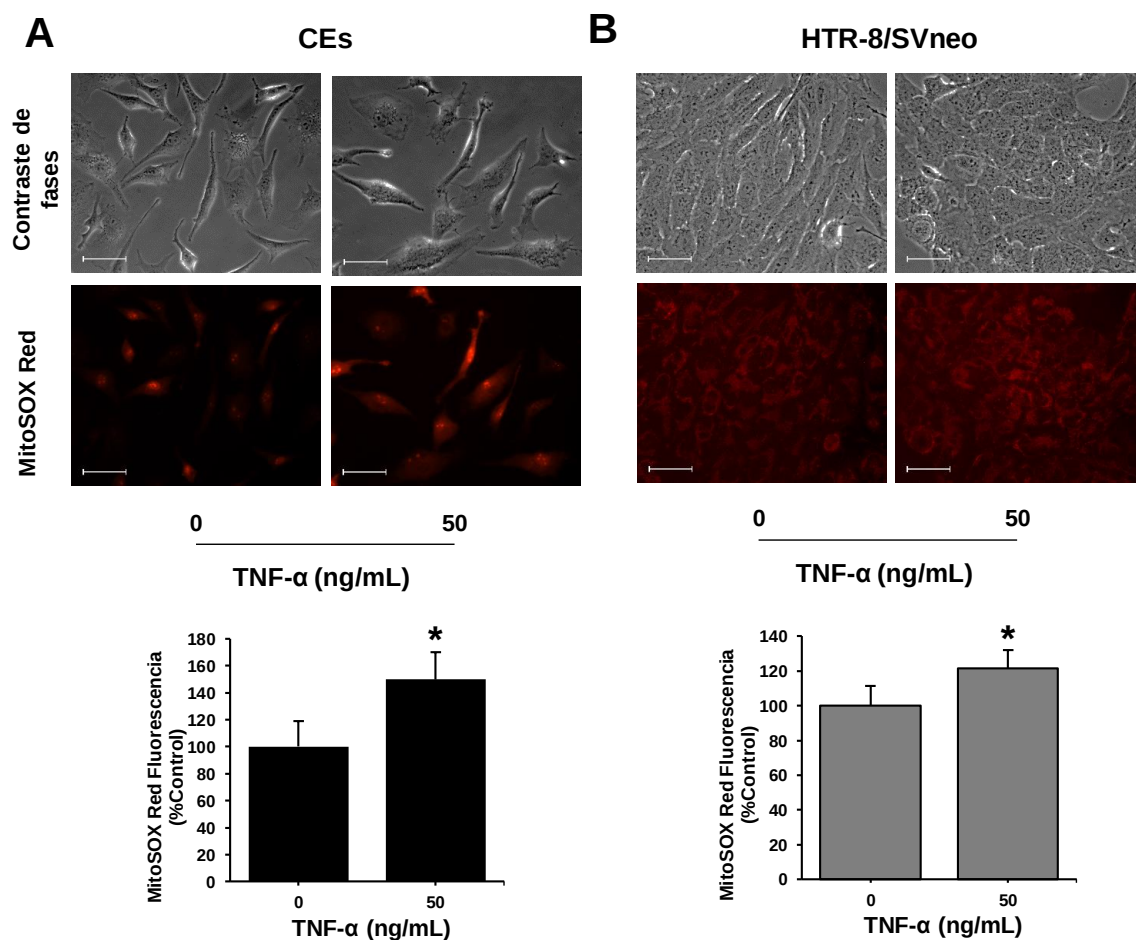


Figura 5.16 Efectos de TNF- α en la formación de mROS en CEs y trofoblastos. (A) Microscopía de contraste de fases y fluorescencia con MitoSOX Red (40X), representación gráfica del incremento de la formación de mROS con respecto al control en CEs y (B) HTR-8/SVneo. La formación de mROS se detectó por fluorescencia empleando la sonda MitoSOX Red. El tratamiento con TNF- α se empleó por 24 horas. Barra: 50 μ m. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3), * P <0.05 con respecto al control (prueba T de Student).

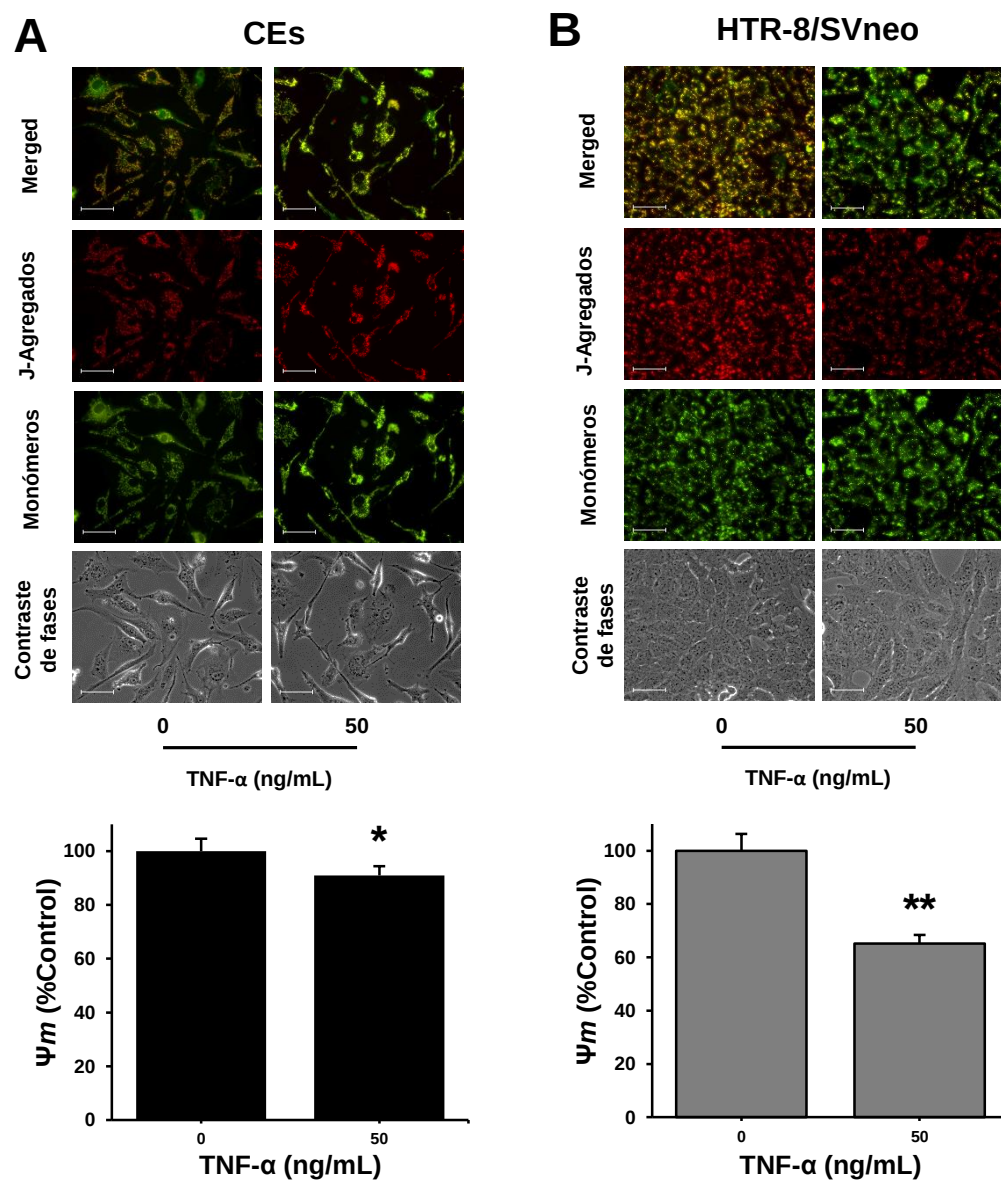


Figura 5.17 Cambios en el Ψ_m inducidos por la administración exógena de TNF- α en CEs y HTR-8/SVneo. (A) Microscopía de contraste de fases y fluorescencia con JC-1 (40X) y gráfico que demuestra una disminución del Ψ_m con respecto al control de CEs y (B) HTR-8/SVneo, tras la administración exógena de TNF- α 50 ng/mL. Barra: 50 μ m. Los cambios en el potencial de membrana se detectaron por fluorescencia empleando la sonda JC-1. El tratamiento con TNF- α se empleó por 24 horas. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3), * P <0.05 con respecto al control, (prueba T de Student).

5.10 VEGF, regulador maestro de la producción de sFlt-1 y TNF- α .

Hasta el momento, los hallazgos en esta investigación apuntan a que no sólo sFlt-1, como FAAs involucrado en PE, es responsable de desencadenar la enfermedad. Es probable que otras moléculas, tal como TNF- α , tengan un papel protagónico en la fisiopatología de la enfermedad. Hasta el momento, no se ha respondido el mecanismo a través del cual, sFlt-1 y TNF- α están aumentados en PE. Por esta razón y con la finalidad de encontrar un mecanismo regulatorio capaz de modular la señalización de sFlt-1 y TNF- α , esta siguiente sección se enfocó en VEGF como molécula que potencialmente podría regular tanto a sFlt-1 como TNF- α .

Previamente, se ha demostrado que VEGF en la placenta, regula la producción de sFlt-1 (25); mientras que en escenarios diferentes a PE, se ha demostrado que VEGF también es capaz de regular la expresión y producción de TNF- α , evidenciado en un modelo de endotoxemia, donde la producción de TNF- α y la respuesta inflamatoria, estuvo modulada por la administración de LPS (262). Tampoco se puede descartar el hecho que otras investigaciones han manifestado que sFlt-1 es capaz de regular a TNF- α (98) y éste a su vez a sFlt-1 (260), cuando las condiciones hipóxicas son exacerbadas (107). Pero, ¿quién regula a quién?; hasta la fecha sigue siendo una incógnita qué mecanismo molecular precede y cuál inicia o desencadena la PE (263).

En esta investigación se ha propuesto que este agente desencadenante de los eventos moleculares que llevan a PE, podría ser VEGF; como evidencia de esto, se cuenta con observaciones de otros autores, donde el exceso de la producción de sFlt-1 en PE, sería secundario a un proceso de isquemia/hipoxia (81). Sin embargo, es desconocido si la hipoxia *per se* puede afectar el balance angiogénico neto, ya que la misma hipoxia también regula a VEGF (264). Para soportar la afirmación que VEGF sería el regulador maestro en la producción de sFlt-1 y TNF- α , se evaluó el papel de VEGF como regulador de la señalización de VEGF/sFlt-1 y VEGF/TNF- α .

Para demostrar la correspondencia en la regulación de la producción de sFlt-1 y TNF- α dependiente de VEGF, se cultivaron células CEs y HTR-8/SVneo en presencia de proteína rh VEGF en concentraciones de: 10 y 20 (ng/mL). Se cuantificó por ELISA los niveles de sFlt-1 y TNF- α en el medio de cultivo sobrenadante de cada línea celular, luego del tratamiento durante 24 horas con proteína rh VEGF. Los resultados demuestran que VEGF es capaz de regular la producción tanto de sFlt-1 como de TNF- α .

Es peculiar que este efecto de VEGF para aumentar los niveles de sFlt-1 se observó únicamente en células CEs, más no en trofoblastos. En CEs se obtuvo un valor promedio de sFlt-1 de 226.98 ± 29.31 (pg/mL/mg de proteínas) en el grupo control, 1313.6 ± 86.8 (pg/mL/mg de proteínas) en presencia de VEGF 10 ng/mL ($P=0.07$) y 1515.38 ± 74.32 (pg/mL/mg de proteínas) en presencia de VEGF 20 ng/mL ($P=0.03$) (**Figura 5.18 A**). Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas

en comparación al control. Mientras, en HTR-8/SVneo, los niveles de sFlt-1 en el control fueron de 384.49 ± 64.03 (pg/mL/mg de proteínas), en células expuestas a VEGF 10 ng/mL 343.01 ± 15 (pg/mL/mg de proteínas) ($P=0.6$) y con exposición a VEGF 20 ng/mL 368.70 ± 20.93 (pg/mL/mg de proteínas) ($P=0.8$), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 5.18 B**).

Con respecto a la determinación de los niveles de TNF- α , ésta se hizo en medio de cultivo sobrenadante obtenido de células CEs tratadas con proteína rh VEGF en concentraciones de: 10 y 20 (ng/mL). Se obtuvo una concentración de 11.93 ± 2.3 (pg/mL/mg de proteínas) en el control, 22.26 ± 3.4 (pg/mL/mg de proteínas) en presencia de VEGF 10 ng/mL ($P=0.03$) y 35.57 ± 8.7 (pg/mL/mg de proteínas) cuando las células fueron tratadas con 20 ng/mL de VEGF ($P=0.01$). Estos resultados arrojan diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tratamientos con VEGF (**Figura 5.19**).

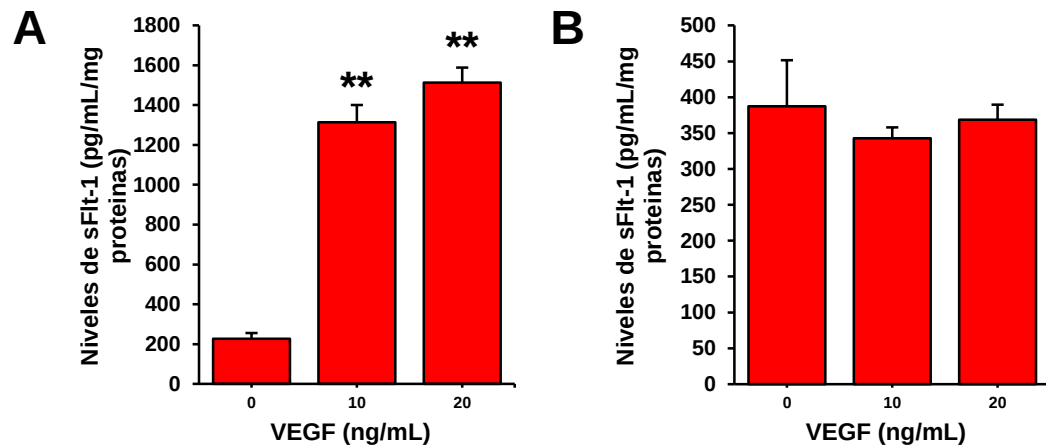


Figura 5.18 Regulación de la producción de sFlt-1 mediada por VEGF en CEs y HTR-8/SVneo. Niveles de sFlt-1 (pg/mL/mg de proteínas) en medio de cultivo sobrenadante de (A) CEs y (B) HTR-8/SVneo fueron detectados por ELISA, luego de la exposición durante 24 horas con proteína rh VEGF. (n=3), * $P<0.05$, ** $P<0.01$, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

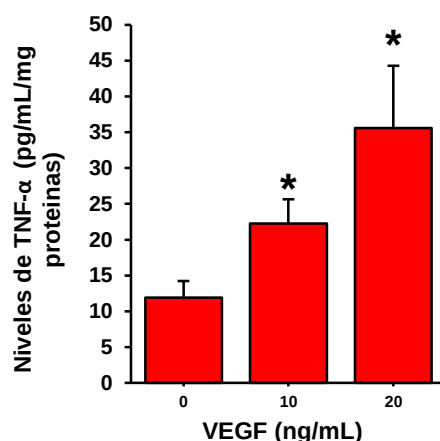


Figura 5.19 Regulación de la producción de TNF- α mediada por VEGF en CE. Niveles de TNF- α (pg/mL/mg de proteínas) evaluados en medio de cultivo sobrenadante de células CE fueron detectados por ELISA, luego de la exposición durante 24 horas con proteína rh VEGF. (n=3), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

En complemento a los resultados obtenidos hasta este momento, estas observaciones vinculan a VEGF con el incremento de los niveles de sFlt-1 y TNF- α . Además, fue pertinente evaluar el impacto de los factores sFlt-1 y TNF- α podrían tener para regular sus niveles entre sí. Al momento, existen muy pocos reportes que asocian la producción de sFlt-1 mediada por TNF- α y viceversa. Tal como se describió anteriormente, no sólo sFlt-1 al impactar en la biodisponibilidad de VEGF es capaz de conllevar a DE y a perturbar el metabolismo mitocondrial *in vitro*.

Las observaciones aquí descritas muestran que TNF- α también es un modulador de la función endotelial y del metabolismo. Ya que se ha reportado que PE es una enfermedad que cursa con un proceso de DE y también se ha reportado que tiene un componente inmunológico de base, el siguiente aspecto que fue considerado en esta investigación se centró en conocer la interrelación de estos factores (sFlt-1 y TNF- α) para regular sus niveles entre sí. Para ello se midieron los niveles de TNF- α en el medio de cultivo de CE expuestas a sFlt-1 exógeno y también se midieron los niveles de sFlt-1 en el medio de cultivo de CE y HTR-8/SVneo expuestas a TNF- α exógeno.

En el primer enfoque que relacionó a TNF- α en el incremento de los niveles de sFlt-1; se evaluó en el medio de cultivo sobrenadante de células CE y HTR-8/SVneo expuestas a concentraciones de proteína rh TNF- α de 10, 25 y 50 ng/mL por ELISA. Los resultados demostraron que TNF- α es capaz de conllevar a un incremento en los niveles de sFlt-1 en ambas líneas celulares. En CE, tras la administración de TNF- α 10 ng/mL se detectó una concentración de sFlt-1 de 475.9 ± 2.9 pg/mL/mg de proteínas. Mientras que tras la administración de (25 y 50) ng/mL de TNF- α se detectaron niveles de sFlt-1 de $(555.8 \pm 6$ y $559.4 \pm 14.2)$ pg/mL/mg de proteínas, respectivamente. Las diferencias con respecto al control 226.9 ± 29.3 pg/mL/mg de

proteínas, muestran diferencias estadísticamente significativas, con valores de *P* de 0.01, 0.008 y 0.009 para las células tratadas con TNF- α de 10, 25 y 50 (ng/mL), respectivamente (**Figura 5.20 A**).

Con respecto a HTR-8/SVneo, luego de la administración de TNF- α 10 y 25 ng/mL se detectaron niveles de sFlt-1 de $(542.7 \pm 21.5$ y $580.32 \pm 35.5)$ pg/mL/mg de proteína, que con respecto al control 387.5 ± 64 pg/mL/mg de proteína, mostraron una tendencia al incremento de los niveles de sFlt-1 en función a la concentración de TNF- α . Sin embargo, las diferencias detectadas no fueron estadísticamente significativas (*P*=0.14 y 0.11, respectivamente). Finalmente, tras la administración de 50 ng/mL de TNF- α los niveles de sFlt-1 detectados 790.7 ± 2.7 pg/mL/mg de proteína mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (*P*=0.02) (**Figura 5.20 B**).

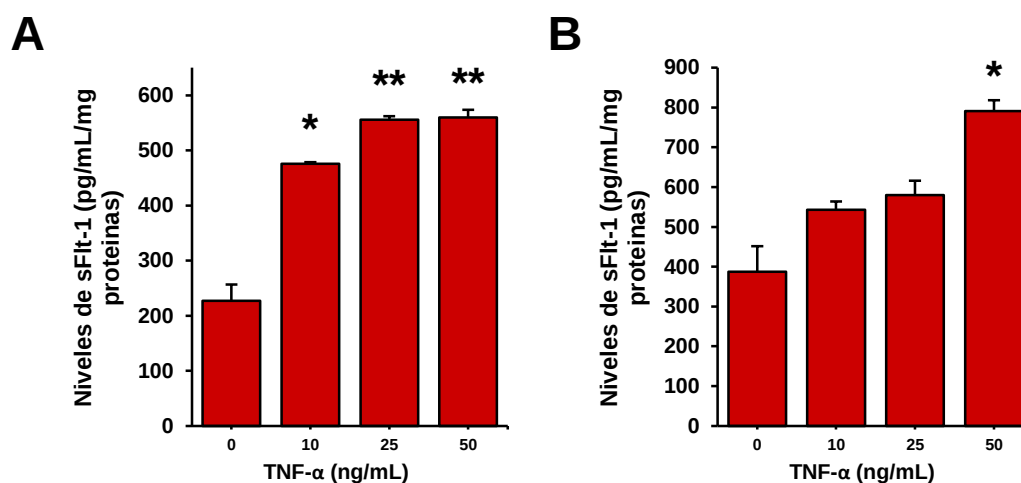


Figura 5.20 Regulación de la producción de sFlt-1 mediada por TNF- α en CE y HTR-8/SVneo. Los niveles de sFlt-1 en sobrenadante de cultivo celular fueron detectados mediante ELISA, luego de la exposición durante 24 horas con proteína rh TNF- α . (A) CE y (B) HTR-8/SVneo. (n=3), **P*<0.05, ***P*<0.01, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

A continuación, se evaluó la correspondencia que sFlt-1 tendría en el incremento de los niveles de TNF- α , se evaluó en el medio de cultivo sobrenadante de células CE expuestas a concentraciones de proteína rh sFlt-1 de 10, 25 y 50 ng/mL, por ELISA. Los resultados demostraron que sFlt-1 es capaz de conllevar a un incremento en los niveles de TNF- α en células CE. Tras la administración de sFlt-1 10 ng/mL se detectaron niveles de TNF- α de 32.6 ± 2.9 pg/mL/mg de proteína, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control 11.92 ± 2.3 pg/mL/mg de proteína (*P*=0.22). Mientras que luego de la administración de sFlt-1 25 y 50 ng/mL, los niveles de TNF- α detectados en el sobrenadante fueron de $(37.6 \pm 6$ y $75.9 \pm 14.1)$ pg/mL/mg de proteína, respectivamente; en estos casos las diferencias con respecto al control fueron estadísticamente significativas, (*P*=0.01 y 0.02, respectivamente) (**Figura 5.21**).

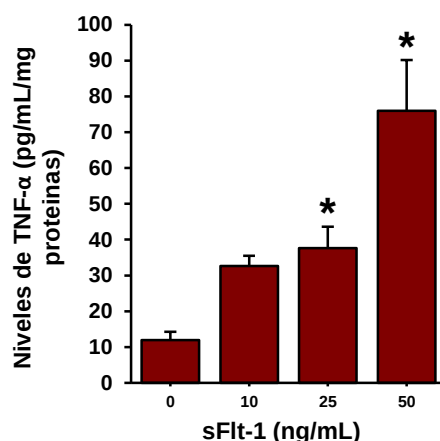


Figura 5.21 Regulación de la producción de TNF- α mediada por sFlt-1 en CEs. Los niveles de TNF- α en sobrenadante de cultivo celular fueron detectados mediante ELISA, luego de la exposición durante 24 horas con proteína rh sFlt-1. (n=3), * P <0.05, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Estos resultados sugieren, un mecanismo regulatorio de VEGF sobre la producción de sFlt-1 y TNF- α a través de la señalización de VEGF/sFlt-1 y VEGF/TNF- α . Además, los resultados sugieren la existencia de mecanismos alternos, mediado por el incremento en los niveles de sFlt-1 y TNF- α , como regulación entrecruzada entre estos dos factores que han demostrado ser protagónicos en la fisiopatología de PE.

6. Resultados

Capítulo III. Sepiapterina, análogo precursor de tetrahidrobiopterina, restablece la función endotelial, acoplamiento de eNOS y el fenotipo metabólico en CEs.

6.1 Introducción.

En PE, las manifestaciones clínicas de la enfermedad, reflejan una pérdida de la función endotelial materna (64, 81). En el proceso de DE, el acoplamiento de eNOS y la producción de $\bullet\text{NO}$, tienen un papel protagónico. La formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por el desacoplamiento de eNOS, ha sido implicada en DE, asociada a enfermedades cardiovasculares como hipertensión y diabetes. En este ámbito, la PE no es la excepción. Estudios de resonancia paramagnética del electrón (EPR), han demostrado que el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4), es crucial en el acoplamiento y funcionamiento de eNOS, ya que estabiliza los dominios oxidasa y reductasa de la enzima y permite la oxidación de L-arginina a L-citrulina y la producción de $\bullet\text{NO}$ (265).

Experimentalmente, la administración oral de L-sepiapterina, precursor de BH4, ha demostrado restablecer la DE y reducir el estrés oxidativo en un modelo *in vivo*, empleando arterias mesentéricas aisladas de ratones diabéticos (db/db) (212). La sepiapterina (SEPI), funciona como precursor de BH4 por la vía salvaje (195). Su administración oral a las 6 horas, demostró restablecer los niveles de BH4 en conejos previamente alimentados con una dieta rica en colesterol (modelo de DE *in vivo*), basado en sus hallazgos, los autores proponen que el empleo de SEPI, podría mejorar el tono vasomotor durante la aterosclerosis (213). SEPI, como precursor de BH4, funciona como agente acoplante de eNOS *in vitro* en CEs, donde ha demostrado restablecer la producción de $\bullet\text{NO}$ (203).

Inclusive, se le ha atribuido propiedades antioxidantes al actuar como un estabilizador o neutralizador de ROS (203). Más recientemente, Sethumadhavan et al., 2016 encontraron en un modelo *in vivo* en ratones, con sobreexpresión específica de GTPCH-1 en tejido cardíaco, que niveles elevados de BH4 disminuyen significativamente el estatus redox celular de cardiomiocitos (209), sin afectar los niveles celulares de $\bullet\text{NO}$. Estos resultados sugieren que BH4, en situaciones independientes de la actividad de eNOS, podría actuar como un potente agente antioxidante.

Vale acotar que en el año 2007, la “Food and Drug Administration” (FDA) aprobó el uso de la primera formulación de BH4 (dicloruro de sapropterina, Kuvan), para su uso en pacientes con fenilcetonuria (210). El dicloruro de sapropterina, es el primer fármaco aprobado con funciones análogas a BH4, que es seguro de emplear en mujeres en estado de gestación.

Las propiedades estabilizadoras de la función endotelial y antioxidantes de SEPI, sugieren su uso potencial como agente terapéutico en el tratamiento de la DE ocasionada por niveles elevados de FAAs en PE. En este estudio, se evaluó el papel de SEPI en el acoplamiento de eNOS y producción de •NO en PE. Dado que la formulación “Kuvan” ha sido empleada y es segura de administrar en mujeres en embarazo (210), en esta investigación, los resultados obtenidos en lo concerniente al restablecimiento de la función endotelial, la sugieren como posible tratamiento a emplear en PE. SEPI, demostró tener un papel como un agente antioxidante en el modelo *in vitro* de PE y de correlación *in vitro* con sueros de pacientes, donde restableció el fenotipo metabólico en CEs y HTR-8/SVneo expuestas a sFlt-1 y a sueros de pacientes preeclámpticas.

6.2 SEPI restablece la producción de •NO, al favorecer el acoplamiento de eNOS en CEs y HTR-8/SVneo.

Como ha sido previamente descrito, SEPI, al actuar como un análogo precursor de BH4, permite restablecer el acoplamiento de eNOS, en casos de baja disponibilidad de este importante cofactor (265). Para constatar el efecto de SEPI en el restablecimiento de los niveles de •NO, disminuidos por la administración exógena de sFlt-1 y TNF- α ; se evaluó la producción de •NO a través de la cuantificación de los niveles de NO₂⁻ por quimioluminiscencia. En CEs, los niveles de NO₂⁻, medidos en sobrenadante celular, se muestran en la **tabla 6.1**. La administración de SEPI logró restablecer la producción de •NO a nivel del grupo control, en células tratadas con sFlt-1 y TNF- α ($P=0.32$) (**Figura 6.1 A**). Mientras, en HTR-8/SVneo, también se logró restablecer los niveles de •NO en presencia de sFlt-1 + SEPI y TNF- α + SEPI ($P=0.31$). Los niveles de NO₂⁻, se muestran en la **tabla 6.2 (Figura 6.1 B)**.

Tratamiento	[NO ₂ ⁻] (nmol/ μ g de proteínas)
Control	152 $\pm$ 11
sFlt-1	99 $\pm$ 12**
SEPI	160 $\pm$ 14
sFlt-1 + SEPI	137 $\pm$ 10#
TNF- α	78 $\pm$ 12***
TNF- α + SEPI	132 $\pm$ 22#

Tabla 6.1 Niveles de NO₂⁻ determinados en sobrenadante de células CEs tratadas con sFlt-1, TNF- α y SEPI. Los tratamientos se aplicaron durante 24 horas. sFlt-1: 50 ng/mL, TNF- α : 50 ng/mL y SEPI: 100 μ M. (n=3), * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 con respecto al grupo control. # P <0.05 con respecto al grupo SEPI. ANOVA, (Bonferroni's post-hoc test).

Tratamiento	[NO ₂ ⁻] (nmol/μg de proteínas)
Control	140 ± 7.5
sFlt-1	112 ± 11*
SEPI	138 ± 12
sFlt-1 + SEPI	125 ± 9#
TNF-α	101 ± 8*
TNF-α + SEPI	119 ± 8#

Tabla 6.2 Niveles NO₂⁻ de determinados en sobrenadante de células HTR-8/SVneo tratadas con sFlt-1, TNF-α y SEPI. Los tratamientos se aplicaron durante 24 horas. sFlt-1: 50 ng/mL, TNF-α: 50 ng/mL y SEPI: 100 μM. (n=3), *P<0.05 con respecto al grupo control. #P<0.05 con respecto al grupo SEPI. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

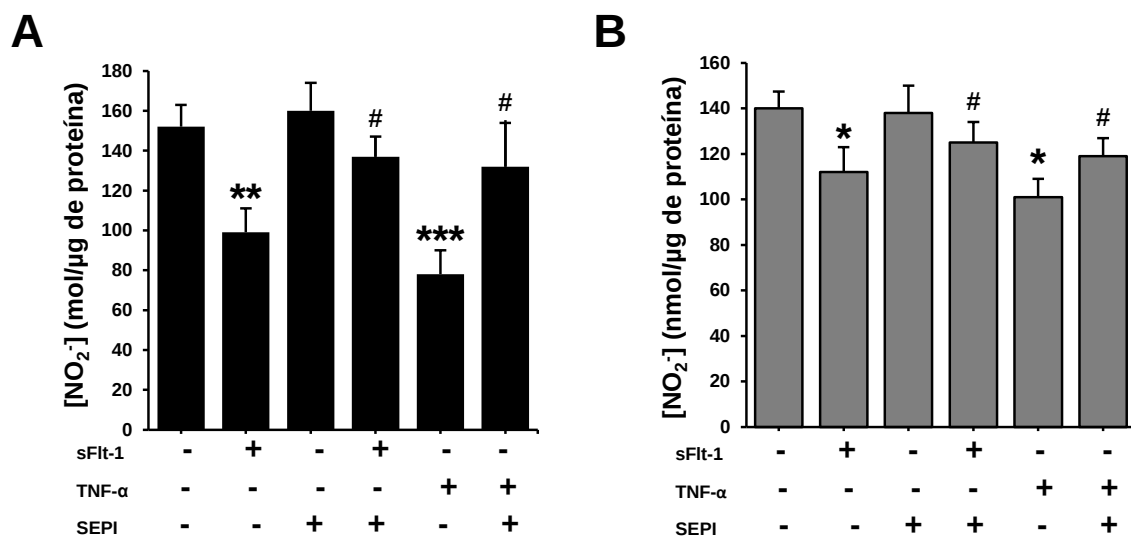


Figura 6.1 Efectos de la administración de SEPI en el restablecimiento de la producción de •NO en CEs y HTR-8/SVneo expuestas a tratamiento con sFlt-1 y TNF-α. Los tratamientos se aplicaron durante 24 horas. sFlt-1: 50 ng/mL, TNF-α: 50 ng/mL y SEPI: 100 μM. Los niveles de •NO, medidos a través de su sustituto, NO₂⁻, se determinaron por quimioluminiscencia. (A) Producción de •NO en CEs y (B) HTR-8/SVneo, medidas como la concentración NO₂⁻ (nmol NO₂⁻/μg de proteína). Los datos están presentados con la media ± SEM con respecto al control. (n=3), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 con respecto al control, #P<0.05 con respecto a grupo SEPI. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

La enzima eNOS, requiere de un adecuado acoplamiento de sus dominios oxidasa y reductasa, para la formación de •NO. Este adecuado acoplamiento de la enzima, ocurre por la presencia de sus cofactores enzimáticos; entre los cuales, BH₄ ha sido descrito previamente, como un mediador esencial en el acoplamiento de eNOS (265). En esta sección de la investigación, se evaluó el papel de SEPI, en el restablecimiento de la activación de eNOS, evaluada por la fosforilación del residuo de serina 1177 de la enzima, en CEs expuestas a sFlt-1.

Para estos ensayos, las CEs fueron sembradas y cultivadas en placas de Petri de 100 mm, al llegar a confluencia del 70-80 %, las células fueron tratadas durante 24

horas con la proteína rh sFlt-1 (50 ng/mL), también se suplementaron con SEPI (100 μ M). La administración de SEPI a CEs no afectó la expresión de la enzima eNOS (**figura 6.2 A y B**). La administración de 100 μ M de SEPI restableció la activación de la enzima eNOS (**figura 6.2 A, C y D**) en presencia de proteína rh sFlt-1 (50 ng/mL), que se evidencia mediante el restablecimiento, a nivel del control, de la razón p-eNOS/eNOS (**Figura 6.2 D**).

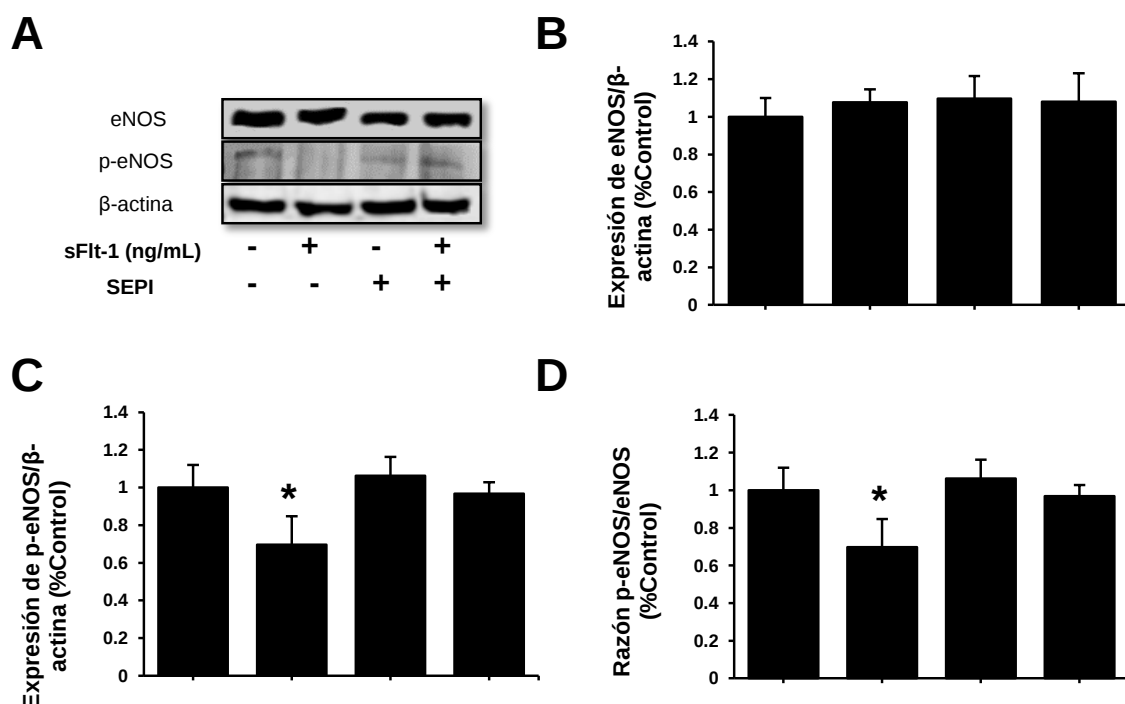


Figura 6.2 Efectos de la administración de SEPI en la expresión de eNOS y activación de eNOS (p-eNOS) expuestas a sFlt-1 en CEs. La recuperación y lisado de proteínas se realizó luego de 24 horas de tratamiento con sFlt-1 (50 ng/mL) y SEPI (100 μ M); se determinó la expresión de las mismas, mediante western blot. (A) Expresión de eNOS, p-eNOS y β -actina en CEs tratadas con sFlt-1 y SEPI. (B) Normalización de la expresión de eNOS y (C) p-eNOS en función a la expresión de β -actina. (D) Razón de activación de eNOS en presencia de sFlt-1 y SEPI. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. (n=3), * P <0.05, con respecto al control. ANOVA, (Bonferroni's post-hoc test).

Ya que en secciones anteriores de esta investigación se demostró que tanto sFlt-1, como TNF- α , juegan un papel crucial en el desacoplamiento de eNOS (**capítulos I y II** de "Resultados"); además de las evidencias que ubican a SEPI como un agente acoplante de eNOS, se evaluaron los niveles de BH4, por HPLC en presencia de sFlt-1 y TNF- α (50 ng/mL), suplementados con 100 μ M de SEPI.

Tras la administración de SEPI (100 μ M) a CEs previamente tratadas con proteína rh sFlt-1 y TNF- α , se detectaron niveles de BH4 por HPLC de: 426.34 ± 89.35 pmol/mg de proteína en CEs tratadas con sFlt-1 + SEPI y 447.27 ± 108.34 pmol/mg

de proteína, en CEs tratadas con TNF- α + SEPI. Mientras que las CEs tratadas con SEPI mostraron niveles de BH4 de: 412.65 ± 94.76 pmol/mg de proteína. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de células tratadas con SEPI. Mientras que, si se observó diferencia significativa entre todos los grupos tratados con SEPI, en comparación al control (CEs sin tratamiento) (**Figura 6.3**).

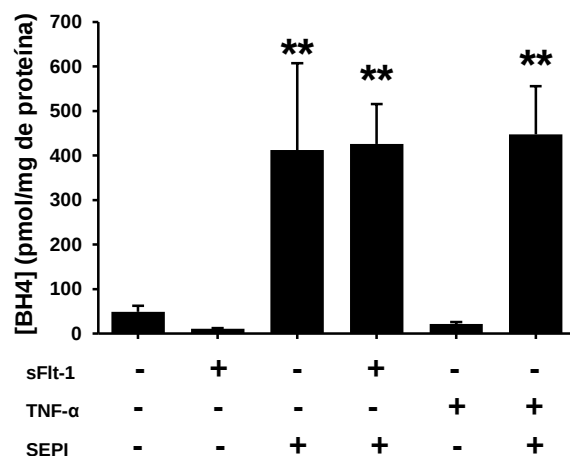


Figura 6.3 Efectos de la administración de SEPI en el restablecimiento de los niveles de tetrahidrobiopterina (BH4) en CEs expuestas a tratamiento con sFlt-1 y TNF- α . Los niveles de BH4 fueron determinados por HPLC luego de tratamiento durante 24 horas con sFlt-1 (50 ng/mL), TNF- α (50 ng/mL) y SEPI (100 μ M). Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. (n=3), * P <0.05, ** P <0.01. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Mientras que, los niveles de $O_2^{\cdot-}$ medidos por HPLC, empleando la sonda HE para evaluar la formación de $O_2^{\cdot-}$, mostraron que en células tratadas con sFlt-1 (50 ng/mL) y suplementadas con SEPI (100 μ M), los niveles de $O_2^{\cdot-}$ lograron restablecerse a nivel del grupo control ($P=0.56$). Es resaltante, que la administración de SEPI, logró disminuir la producción de $O_2^{\cdot-}$ incluso a niveles inferiores a los detectados en el grupo control ($P=0.006$). Los niveles de $O_2^{\cdot-}$ detectados fueron: 2.21 ± 0.50 nmoles/mg de proteína en CEs tratadas con SEPI y 6.87 ± 0.29 nmoles/mg de proteína en células control y 11.76 ± 1.1 nmoles/mg de proteína en células tratadas con 50 ng/mL de sFlt-1. El restablecimiento de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ detectados en células tratadas con sFlt-1 con respecto a aquellas que además fueron suplementadas con SEPI fue significativo estadísticamente ($P=0.004$) (**Figura 6.4**).

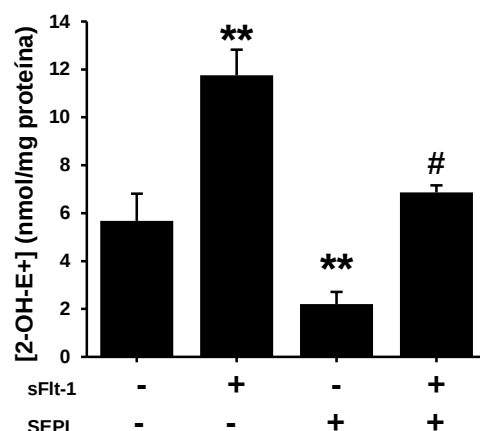


Figura 6.4 Efectos de la administración de SEPI en el restablecimiento de los niveles de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en CEs tratadas con sFlt-1. Los niveles de $O_2^{\cdot-}$ fueron determinados mediante HPLC usando la sonda HE, tras 24 horas de tratamiento con sFlt-1 (50 ng/mL) y SEPI (100 μ M). Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. (n=3), * P <0.05, ** P <0.01, # P <0.01 con respecto al grupo de células tratadas con sFlt-1. ANOVA, (Bonferroni's post-hoc test).

6.3 El aumento en la producción de $\bullet$ NO mediado por SEPI no conlleva a la producción de especies reactivas de nitrógeno.

Cuando se restablece la producción de $\bullet$ NO en escenarios de estrés oxidativo, una consecuencia resulta ser la formación de especies reactivas de nitrógeno (RNS), tal como peroxinitrito ($ONOO^-$) (266). $ONOO^-$ se produce debido a la reacción rápida entre $\bullet$ NO y $O_2^{\cdot-}$ (267). En esta investigación, el aumento de los niveles de $\bullet$ NO mediado por SEPI, además de la observación de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en presencia de sFlt-1 y TNF- α , indicó que probablemente los niveles de $ONOO^-$ podrían encontrarse elevados. Por ello, se evaluó la producción de $ONOO^-$ medido a través de la reacción de este RNS con la sonda boronato de cumarina (CBA), siguiendo las indicaciones del Dr. Zielonka del Departamento de Biofísica del "Medical College of Wisconsin" (267). Se observó que los niveles de $ONOO^-$ no cambian en presencia de sFlt-1 y TNF- α (**Figura 6.5**). Además, la administración de SEPI no altera la producción de $ONOO^-$ en CEs y en trofoblastos (**tablas 6.3 y 6.4**).

Para este ensayo, CEs y HTR-8/SVneo fueron sembradas en placas de 96 pozos en densidad de 1.0×10^4 células/pozo y tratadas durante 24 horas con las proteínas rh sFlt-1 (50 ng/mL), TNF- α (50 ng/mL) y suplementadas con SEPI (100 μ M). Para la detección de $ONOO^-$ se empleó la sonda CBA, que permitió detectar en tiempo real, la formación de $ONOO^-$. Tal como se describió en la sección "Materiales y métodos; Niveles de $ONOO^-$ "; la detección de $ONOO^-$ se hizo bajo tres condiciones o tratamientos que permitieron discriminar entre la formación de $ONOO^-$ y H_2O_2 . En una primera condición, se administró la sonda CBA; que reacciona con $ONOO^-$ y H_2O_2 . Ya que la sonda también reacciona con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se administró catalasa, con la finalidad de descomponer el H_2O_2 en O_2 y agua; por lo

que el producto detectado bajo esta condición correspondió a ONOO⁻. Además, se administró L-NAME, inhibidor competitivo de la enzima eNOS que inhibe la formación de •NO y con ello la tasa de producción de ONOO⁻ disminuye, de tal manera que el metabolito que bajo estas condiciones reaccionó con la sonda correspondió a H₂O₂.

Tratamiento	Niveles de ONOO ⁻ (Unidades arbitrarias/mg) x 10 ⁶		
	ONOO ⁻ + H ₂ O ₂ (CBA)	ONOO ⁻ (Cat) (CBA + Cat)	H ₂ O ₂ (L-NAME) (CBA + L-NAME)
Control	6.25 ± 0.48	3.00 ± 0.01	4.75 ± 0.48
sFlt-1	8.25 ± 0.01*	2.75 ± 0.25	6.50 ± 0.01#
TNF-α	9.50 ± 0.50*	3.25 ± 0.25	6.75 ± 0.01#
SEPI	8.75 ± 0.75*	2.50 ± 0.30	5.25 ± 0.63
sFlt-1 + SEPI	8.75 ± 0.48*	3.00 ± 0.01	5.25 ± 0.25
TNF-α + SEPI	8.25 ± 0.10*	2.75 ± 0.25	4.50 ± 0.29

Tabla 6.3 Niveles de ONOO⁻ determinados en CEs. CEs fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratadas durante 24 horas con sFlt-1 (50 ng/mL), TNF-α (50 ng/mL) y SEPI (100μM), respectivamente. La detección de peroxinitrito (ONOO⁻) se hizo mediante fluorescencia empleando la sonda boronato de cumarina (CBA) y lector de placas. El uso de catalasa (Cat) y L-NG-Nitroarginine methyl ester (L-NAME) permitió discriminar entre la formación de ONOO⁻, ONOO⁻ + H₂O₂ y H₂O₂. (n=3), *P<0.05 en comparación con el control con la sonda CBA, #P<0.05 en comparación con el control con L-NAME. ANOVA, (Bonferroni's post-hoc test).

Tal como se observa en la **figura 6.5 A** y se resume en la **tabla 6.3**; la administración de sFlt-1 conllevó a un aumento en los niveles totales de ONOO⁻ + H₂O₂. Este aumento también fue evidente en CEs tratadas con TNF-α, en comparación al grupo control. La administración de SEPI a CEs, así como la co-administración de sFlt-1 y SEPI o TNF-α y SEPI también resultó en un aumento en los niveles totales de ONOO⁻ + H₂O₂ (P=0.013 en comparación al control). Ya que en todos los tratamientos el aumento de ONOO⁻ + H₂O₂ no discrimina entre los niveles reales de ONOO⁻ o H₂O₂; los niveles detectados en presencia de L-NAME (H₂O₂), demostraron que bajo los tratamientos con sFlt-1 y TNF-α el aumento de los niveles totales de ONOO⁻ + H₂O₂ es dependiente de la formación de ROS. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa entre el control y las células tratadas con sFlt-1 y TNF-α (P=0.018). Esto es consistente con resultados previos de esta investigación que indican que en presencia de estos factores existe estrés oxidativo. Mientras que, no se encontraron diferencias estadísticas entre los niveles de ONOO⁻ (medidos con la administración de catalasa) (P=0.072).

Con la finalidad de evaluar la formación de ONOO⁻ en trofoblastos tratados con sFlt-1 y TNF-α y de conocer el efecto de SEPI en la formación de ONOO⁻; se detectaron los niveles de ONOO⁻ en HTR-8/SVneo empleando la sonda CBA. En la **tabla 6.5** y

figura 6.6 B se muestran los niveles de ONOO⁻ detectados como niveles totales (ONOO⁻ + H₂O₂), H₂O₂ (L-NAME) y ONOO⁻ (catalasa). La administración de sFlt-1 no conllevó a cambios estadísticamente significativos en los niveles totales de ONOO⁻ ($P=0.13$). Por su parte, TNF- α tampoco logró disminuir significativamente esta misma medición (con respecto al grupo control) ($P=0.43$). La administración de SEPI, así como bajo los tratamientos de sFlt-1 + SEPI y TNF- α + SEPI, no mostraron ser significativamente diferentes al valor medio obtenido en el grupo control. Con respecto a los niveles de ONOO⁻ (catalasa) y H₂O₂, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio ($P=0.37$) (**Figura 6.5 B** y **tabla 6.4**).

Tratamiento	Niveles de ONOO ⁻ (Unidades arbitrarias/mg) x 10 ⁶		
	ONOO ⁻ + H ₂ O ₂ (CBA)	ONOO ⁻ (Cat) (CBA + Cat)	H ₂ O ₂ (L-NAME) (CBA + L-NAME)
Control	6.00 ± 0.01	1.50 ± 0.29	5.25 ± 0.25
sFlt-1	6.00 ± 0.25	2.00 ± 0.25	5.75 ± 0.25
TNF- α	5.50 ± 0.50	2.00 ± 0.01	5.25 ± 0.25
SEPI	6.00 ± 0.01	2.00 ± 0.01	5.00 ± 0.01
sFlt-1 + SEPI	6.00 ± 0.01	2.00 ± 0.01	5.25 ± 0.25
TNF- α + SEPI	5.50 ± 0.29	2.00 ± 0.02	4.75 ± 0.25

Tabla 6.4 Niveles de ONOO⁻ determinados en HTR-8/SVneo. Células trofoblásticas, HTR-8/SVneo, fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratadas durante 24 horas con sFlt-1 (50 ng/mL), TNF- α (50 ng/mL) y SEPI (100 μ M), respectivamente. La detección de peroxinitrito (ONOO⁻) se hizo mediante fluorescencia empleando la sonda boronato de cumarina (CBA) y lector de placas. El uso de catalasa (Cat) y L-NG-Nitroarginine methyl ester (L-NAME) permitió discriminar entre la formación de ONOO⁻, ONOO⁻ + H₂O₂ y H₂O₂. (n=3). ANOVA, (Bonferroni's post-hoc test).

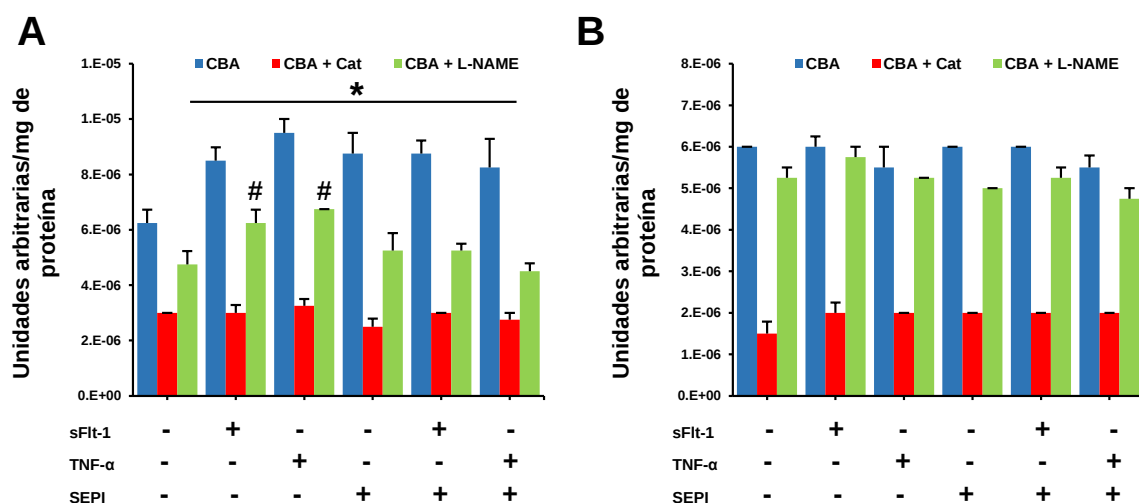


Figura 6.5 Detección de ONOO^- en CE y trofoblastos tratados con sFlt-1, $\text{TNF-}\alpha$ y SEPI. Células trofoblásticas y CE, fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratadas durante 24 horas con sFlt-1 (50 ng/mL), $\text{TNF-}\alpha$ (50 ng/mL) y SEPI (100 μM), respectivamente. La detección de peroxinitrito (ONOO^-) se hizo mediante fluorescencia empleando la sonda boronato de cumarina (CBA) y lector de placas. El uso de catalasa (Cat) y L-NG-Nitroarginine methyl ester (L-NAME) permitió discriminar entre la formación de ONOO^- , $\text{ONOO}^- + \text{H}_2\text{O}_2$ y H_2O_2 . (A) Producción de ONOO^- en CE y (B) HTR-8/SVneo, respectivamente. (n=3), * $P < 0.05$ en comparación con el control, # $P < 0.05$ en comparación con el control en tratamiento con L-NAME. ANOVA, (Bonferroni's post-hoc test).

6.4 SEPI disminuye la producción de mROS en modelo *in vitro* de PE.

Hasta el momento, los resultados obtenidos en esta investigación han evidenciado que SEPI favorece el acoplamiento de la enzima eNOS y a su vez, el restablecimiento de la producción de $\bullet\text{NO}$. Un hallazgo importante, fue la disminución de la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en presencia de SEPI. Además, durante la determinación de los niveles de ONOO^- , la suplementación con SEPI conllevó a determinar niveles de H_2O_2 menores que los determinados en el grupo control. Estas observaciones sugieren que SEPI podría, además de favorecer el acoplamiento de eNOS, actuar como un potencial agente antioxidante.

En la sección 6.2 de este capítulo, se encontró que SEPI es capaz de restablecer los niveles de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en células CE tratadas con sFlt-1 y $\text{TNF-}\alpha$ a nivel del grupo control. Por otra parte, en secciones anteriores de esta investigación se determinó que en el modelo *in vitro* de PE, con administración de sFlt-1 y $\text{TNF-}\alpha$, la función bioenergética mitocondrial y formación de mROS está incrementada (**capítulos I y II** de "Resultados"). Por ello, a continuación, se evaluó el papel de SEPI en el restablecimiento de la formación de mROS en células endoteliales tratadas con proteína rh sFlt-1 (50 ng/mL) y $\text{TNF-}\alpha$ (50 ng/mL).

En CEs, la administración exógena de sFlt-1 (50 ng/mL) conlleva al aumento significativo en la producción de mROS, medido por microscopía de fluorescencia, empleando la sonda MitoSOX Red ($P=0.03$) (**Figura 6.6**). Mientras que, la administración de SEPI, también conlleva a una diferencia significativa con respecto al control, sin embargo; SEPI (100 μ M) es capaz de disminuir la producción de mROS en más del 40% ($P=0.002$). Cuando se co-administró sFlt-1 y SEPI se mantuvo la misma disminución en la producción de mROS, restableciendo su producción a niveles del grupo control. La disminución en la producción de mROS con respecto al grupo de células tratadas con sFlt-1 fue estadísticamente significativa ($P=0.02$) (**Figura 6.6**).

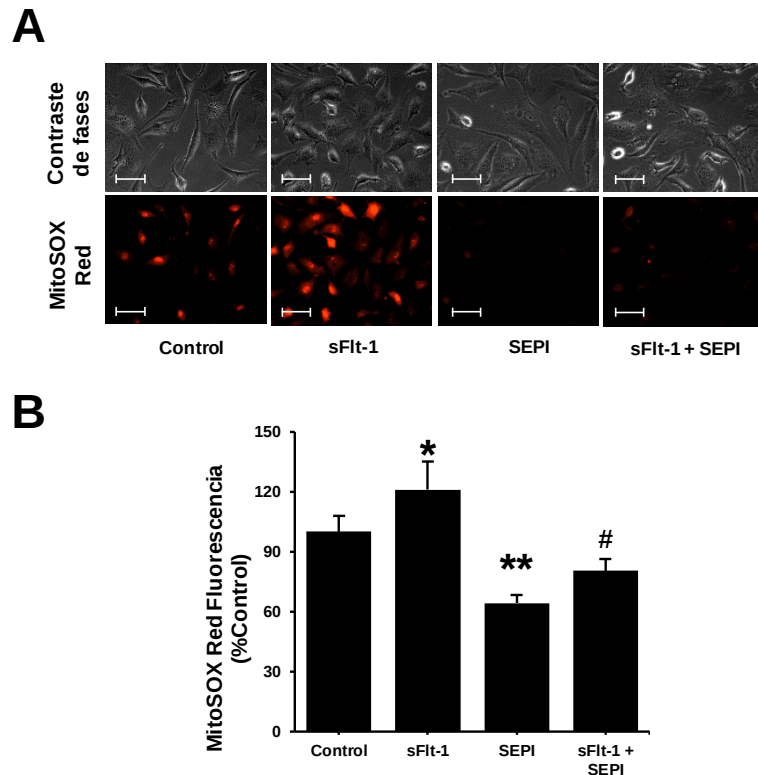


Figura 6.6 Efecto de la administración exógena de SEPI en la formación de mROS en modelo *in vitro* de PE, inducido por el tratamiento con sFlt-1 en CEs. (A) Microscopía de contraste de fases y fluorescencia con MitoSOX Red (40X), (B) Incremento en la formación de mROS con respecto al control, 24 horas post-tratamiento con 50 ng/mL de rh sFlt-1 y 100 μ M de SEPI. Barra: 50 μ m. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3), * $P<0.05$, ** $P<0.01$, con respecto al control, # $P<0.05$ con respecto al grupo de células expuestas a sFlt-1, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Cuando se evaluó el papel de SEPI en el restablecimiento de la formación de mROS en CEs tratadas con TNF- α , se observaron resultados similares a los observados con sFlt-1. TNF- α (50 ng/mL) conlleva al aumento significativo en la producción de mROS ($P=0.04$) en más de un 20% en comparación al grupo control. Tal como se observó anteriormente, la administración de SEPI (100 μ M) disminuyó estadísticamente la formación de mROS ($P=0.01$). Finalmente, la administración de

TNF- α y SEPI permitió restablecer la formación de mROS, detectado por fluorescencia, empleando la sonda MitoSOX Red, a nivel del control. Asimismo, la disminución en la formación de mROS es estadísticamente significativa al comparar con el grupo de células expuestas a TNF- α (50 ng/mL) ($P=0.02$) (**Figura 6.7**).

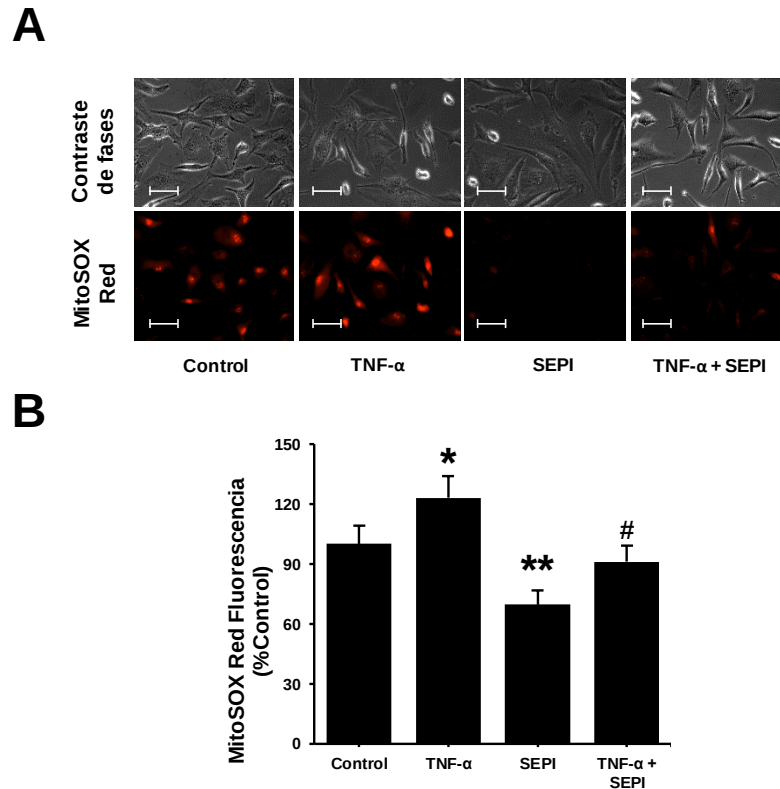


Figura 6.7 Efecto de la administración exógena de SEPI en la formación de mROS en modelo *in vitro* de PE, inducido por el tratamiento con TNF- α en CEs. (A) Microscopía de contraste de fases y fluorescencia con MitoSOX Red (40X), (B) Incremento en la formación de mROS con respecto al control, 24 horas post-tratamiento con 50 ng/mL de rh sFlt-1 y 100 μ M de SEPI. Barra: 50 μ m. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. ($n=3$), * $P<0.05$, ** $P<0.01$, con respecto al control, # $P<0.05$ con respecto al grupo de células expuestas a TNF- α , ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

6.5 SEPI reestablece la función bioenergética mitocondrial y el fenotipo metabólico en modelo *in vitro* de PE.

Los resultados obtenidos con respecto al papel de SEPI en el restablecimiento de la función endotelial y en la disminución de la formación de mROS, indican que SEPI podría tener también un papel clave en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial de células que han sido expuestas a factores disruptores mitocondriales; tal como sFlt-1.

Para probar este supuesto, se evaluó la función bioenergética mitocondrial de CEs y trofoblastos, expuestos a sFlt-1 y SEPI. En un primer enfoque, se emplearon

concentraciones de SEPI de 50 μ M. Sin embargo, los resultados obtenidos al emplear esta concentración no indicaron que SEPI tuviera un efecto en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial (**Figuras 6.8 y 6.9**).

En la **figura 6.8 A**, se representan de los datos de OCR con respecto al tiempo, obtenidos en CEs luego de la administración exógena de SEPI (50 μ M) y la co-administración de sFlt-1 25 ng/mL + SEPI (50 μ M) y sFlt-1 50 ng/mL + SEPI (50 μ M). Luego de la administración de FCCP en el ensayo, se calculó el OCR-Máximo; los resultados obtenidos fueron los siguientes: en el control; 35.16 ± 1.1 pmol O₂/min/ μ g de proteína, SEPI: 33.83 ± 1.3 pmol O₂/min/ μ g de proteína, sFlt-1 25 ng/mL + SEPI: 27.25 ± 0.9 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 19.25 ± 0.6 pmol O₂/min/ μ g de proteína en células tratadas con sFlt-1 50 ng/mL + SEPI. Tal como se observa en la **figura 6.8 B**, el OCR-Máximo determinado en este ensayo disminuye de forma dependiente a la dosis de sFlt-1 administrada ($P=0.0004$) y SEPI no conlleva a cambios en esta determinación. Consistentemente, al calcular los resultados de OCR-Reserva se obtuvieron resultados para el control de: 24.51 ± 1.0 pmol O₂/min/ μ g de proteína, SEPI: 23.25 ± 1.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína, 14.87 ± 0.7 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 7.72 ± 0.4 pmol O₂/min/ μ g de proteína en CEs tratadas con sFlt-1 25 ng/mL + SEPI y sFlt-1 50 ng/mL + SEPI, respectivamente. En esta determinación, tal como se evidenció en el **capítulo I** de “Resultados” de esta investigación; sFlt-1 de forma dependiente a la dosis administrada, disminuye significativamente la capacidad de reserva respiratoria en CEs ($P=0.0003$) (**Figura 6.8 C**).

Entre otras determinaciones, el OCR-basal no cambió en presencia de sFlt-1 o durante su co-administración con SEPI, los resultados obtenidos en el control corresponden a: 10.65 ± 0.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína, SEPI: 10.58 ± 0.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína, para células tratadas con sFlt-1 25 ng/mL + SEPI: 11.38 ± 0.4 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 11.54 ± 0.4 pmol O₂/min/ μ g de proteína, para aquellas tratadas con sFlt-1 50 ng/mL + SEPI ($P=0.12$) (**Figura 6.8 D**). Por otra parte, el OCR acoplado a la producción de ATP no cambió significativamente en células tratadas con sFlt-1 y SEPI. Los resultados detectados en el control fueron: 9.12 ± 0.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína, en células tratadas con SEPI: 9.24 ± 0.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína, 9.71 ± 0.3 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 8.13 ± 0.3 pmol O₂/min/ μ g de proteína en células tratadas con sFlt-1 25 ng/mL + SEPI y sFlt-1 50 ng/mL + SEPI, respectivamente. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el OCR-ATP de células co-tratadas con sFlt-1 50 ng/mL + SEPI con respecto al control ($P=0.03$) (**Figura 6.8 E**). De igual manera, se determinaron los niveles de OCR vinculados a la fuga de protones y se obtuvieron resultados de: 1.53 ± 0.1 pmol O₂/min/ μ g de proteína en el control, 1.34 ± 0.01 pmol O₂/min/ μ g de proteína en células tratadas con SEPI, 2.17 ± 0.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 3.41 ± 0.1 pmol O₂/min/ μ g de proteína, en células que respectivamente fueron tratadas con sFlt-1 25 y 50 ng/mL + SEPI. Se encontró una diferencia significativa entre estos dos últimos grupos con respecto al control ($P=0.0004$) (**Figura 6.8 F**).

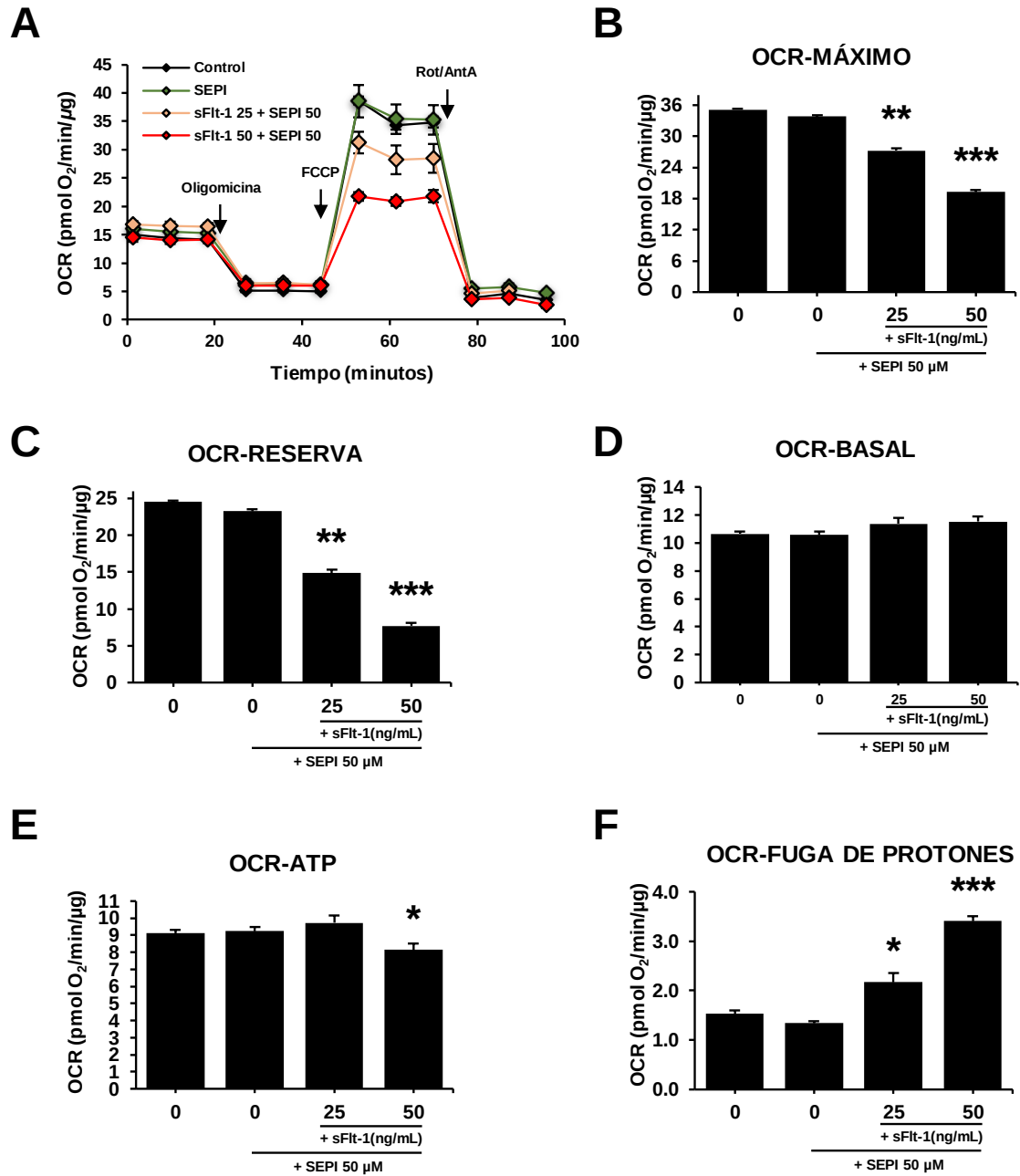


Figura 6.8 Efecto de la administración de SEPI (50µM) en la función bioenergética mitocondrial de CE en modelo *in vitro* de PE inducido por la administración de sFlt-1. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh sFlt-1 en concentraciones de: 25 y 50 ng/mL, y suplementadas con SEPI 50 µM, durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-fuga de protones. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto al control. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

En complemento a estos análisis, se determinó el potencial metabólico y fenotipo metabólico de CEs co-tratadas con sFlt-1 y SEPI (50 μ M). El OCR basal encontrado en células CEs control fue: 14.14 ± 0.24 pmol O_2 /min/ μ g de proteína, mientras que las células tratadas con SEPI evidenciaron un resultado de: 15.33 ± 0.46 pmol O_2 /min/ μ g de proteína, las CEs tratadas con sFlt-1 25 ng/mL + SEPI: 15.10 ± 0.63 pmol O_2 /min/ μ g de proteína y aquellas tratadas con sFlt-1 50 ng/mL + SEPI: 14.09 ± 0.74 pmol O_2 /min/ μ g de proteína. El análisis estadístico empleado en esta oportunidad (ANOVA; Bonferroni post-hoc test), no indicó diferencias estadísticamente significativas entre los resultados del OCR basal ($P=0.35$). Sin embargo, con respecto al OCR estresado, el control se determinó: 38.65 ± 1.20 pmol O_2 /min/ μ g de proteína, con SEPI: 38.59 ± 1.58 pmol O_2 /min/ μ g de proteína, en CEs tratadas con sFlt-1 25 ng/mL + SEPI: 31.27 ± 0.86 pmol O_2 /min/ μ g de proteína y en las tratadas con sFlt-1 50 ng/mL + SEPI: 21.81 ± 0.88 pmol O_2 /min/ μ g de proteína. Se encontraron diferencias significativas entre las medias del OCR estresado de los cuatro grupos evaluados ($P=0.003$) (**Figura 6.9 C**). Con este análisis se demuestra que SEPI en concentraciones de 50 μ M, no restablece el fenotipo metabólico de CEs expuestas al disruptor metabólico, sFlt-1, en dosis crecientes de 25 a 50 ng/mL.

Las mediciones de ECAR basal correspondieron a: 0.45 ± 0.08 mpH/min/ μ g de proteína para el control, 0.48 ± 0.05 mpH/min/ μ g de proteína para células tratadas con SEPI; 1.02 ± 0.07 mpH/min/ μ g de proteína y 1.02 ± 0.05 mpH/min/ μ g de proteína para CEs tratadas con 25 ng/mL de sFlt-1 + SEPI y 50 ng/mL de sFlt-1 + SEPI, respectivamente. En esta determinación se observó una diferencia estadísticamente significativa de los valores de ECAR basales de las células tratadas con sFlt-1 + SEPI, con respecto al control ($P=0.03$) (**Figura 6.9 D**). Por su parte, las mediciones de ECAR estresado para el control fueron de: 2.40 ± 0.19 mpH/min/ μ g de proteína, 2.28 ± 0.08 mpH/min/ μ g de proteína en CEs tratadas con SEPI, 3.08 ± 0.14 mpH/min/ μ g de proteína en células tratadas con sFlt-1 25 ng/mL + SEPI y 3.43 ± 0.19 mpH/min/ μ g de proteína en aquellas tratadas con sFlt-1 50 ng/mL + SEPI. Es resaltante que, tal como se observó en la sección “**capítulo I** de Resultados”, a medida que se incrementa la dosis de sFlt-1, aumenta ECAR. En esta ocasión el ECAR estresado también fue estadísticamente diferente entre los grupos evaluados ($P=0.002$) (**Figura 6.9 D**). Finalmente, la administración de SEPI 50 μ M no permitió restablecer el fenotipo metabólico de CEs tratadas con sFlt-1.

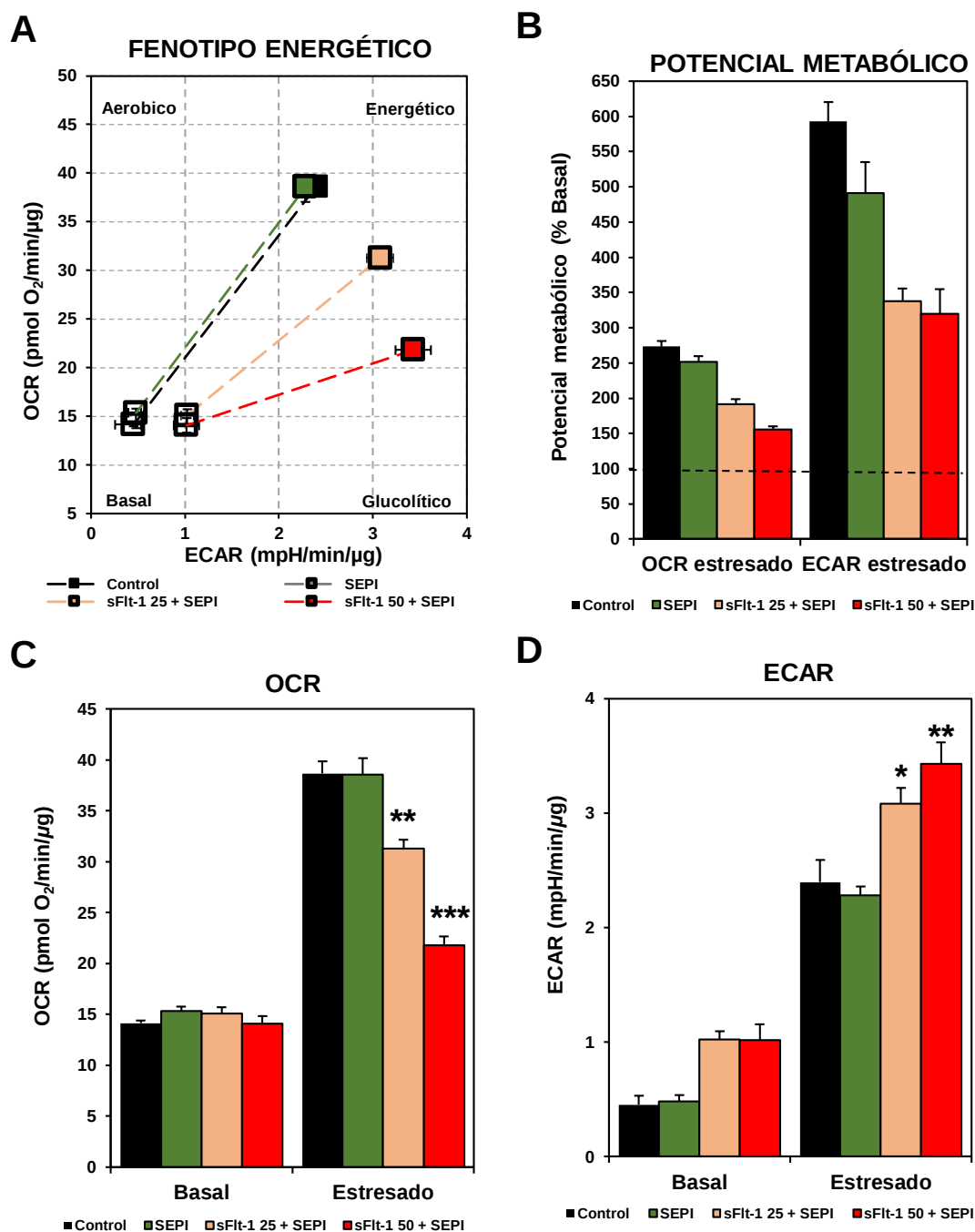


Figura 6.9 Efectos de la administración exógena de SEPI (50μM) en el restablecimiento del fenotipo metabólico de CE's expuestas a sFlt-1. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh sFlt-1 (25 y 50 ng/mL) y SEPI (100μM), durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial y fenotipo metabólico empleando la tecnología Seahorse-Agilent en CE's. (A) Fenotipo energético, (B) potencial metabólico, (C) OCR y (D) ECAR en CE's expuestas a sFlt-1 y SEPI 50 μM. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto al control, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Al revisar la literatura publicada con respecto a la administración de BH4 para el restablecimiento de la función endotelial, en modelos animales y en humanos; se encontró que la dosis de BH4 administrada corresponde a 10 mg/Kg/día (207, 268, 269). Hattori et al. 2007, emplearon en ratones C57BL/6J, una dosis de 10 mg/Kg/día (269), correspondiente a la administración de 500 μ M de BH4/día (tomando en cuenta que el peso promedio del ratón C57BL/6J es 30 gramos y el volumen de sangre 5.5 mL/100 gramos de peso, referencia de: The Jackson Laboratories Bar Harbor, ME, USA). Heitzer et al. 2000 y Taylor et al. 2016 emplearon en humanos, la misma dosis de 10 mg/Kg/día de BH4 (207, 268), correspondiente a la administración de 450 μ M/día de BH4; considerando el peso promedio de un adulto: 70 Kg y volumen de sangre total de 5 litros. Con este conocimiento, se tomó la decisión de incrementar la concentración de SEPI, ya que una concentración de 50 μ M/día en CEs podría no concluir en resultados notorios dada su baja disponibilidad en el período de tiempo evaluados para los ensayos de bioenergética que corresponden a 24 horas.

Por tal motivo, se evaluó nuevamente la respuesta metabólica de CEs tratadas con sFlt-1 (25 y 50 ng/mL) y SEPI en concentraciones de 100 μ M. La evaluación de la bioenergética mitocondrial por la tecnología Seahorse-Agilent, permitió observar que el OCR en CEs tratadas con SEPI (100 μ M) si permitió el restablecimiento del consumo de oxígeno afectado por la administración de sFlt-1. Tal como se observa en la **figura 6.10 A**, el OCR con respecto al tiempo en CEs tratada con sFlt-1 (25 y 50 ng/mL) no cambia luego de la administración de FCCP, cuando las células son igualmente tratadas con SEPI (100 μ M). Los resultados de OCR-Máximo (**tabla 6.5**) demuestran, tal como fue indicado en la sección “**capítulo I** de Resultados”, que la administración de sFlt-1 afecta el consumo de oxígeno máximo, mientras que, la co-administración de sFlt-1 con SEPI permite restablecer esta medición (**figura 6.10 B**). Consistentemente, el OCR-Reserva también afectado por sFlt-1, fue restablecido en presencia de SEPI (100 μ M) (**Tabla 6.5**) (**Figura 6.10 C**).

Los resultados de OCR-Basal, representados en la **tabla 6.5** muestran que tanto la administración de sFlt-1, como SEPI (100 μ M) y sFLT-1 + SEPI (100 μ M) no afectan el consumo de oxígeno basal de CEs (**Figura 6.10 D**). Con respecto al OCR-ATP y OCR-Fuga de protones, representados en la **tabla 6.5**; se observa que la administración de SEPI (100 μ M) permite restablecer los efectos de sFlt-1 en las mediciones correspondientes (**Figura 6.10 E y F**). Con respecto al fenotipo metabólico, en la **tabla 6.6** se resumen los resultados obtenidos con respecto al OCR basal y estresado de las CEs tratadas con sFlt-1 (25 y 50 ng/mL) y SEPI 100 μ M. La administración de SEPI permitió el restablecimiento del fenotipo metabólico afectado por la administración del disruptor mitocondrial sFlt-1 (**Figura 6.11**).

Tratamiento	Consumo de oxígeno (OCR) (pmol O ₂ /min/μg de proteína)				
	OCR-Máximo	OCR-Reserva	OCR-Basal	OCR-ATP	OCR-Fuga de protones
Control	32.38 ± 2.6	20.81 ± 2.4	11.58 ± 0.2	10.85 ± 0.2	0.73 ± 0.1
sFlt-1 (50 ng/mL)	13.35 ± 0.3	0.26 ± 0.06	12.09 ± 0.6	11.98 ± 0.6	1.12 ± 0.1
SEPI 100 μM	33.48 ± 3.1	23.74 ± 2.5	11.76 ± 0.8	9.56 ± 0.8	0.2 ± 0.01
sFlt-1 (25 ng/mL) + SEPI 100 μM	34.26 ± 2.6	22.64 ± 2.4	11.63 ± 0.3	11.07 ± 0.2	0.56 ± 0.2
sFlt-1 (50 ng/mL) + SEPI 100 μM	34.26 ± 3.0	19.87 ± 2.7	11.79 ± 0.6	11.11 ± 0.3	0.68 ± 0.1

Tabla 6.5 Consumo de oxígeno (OCR) de células CEs tratadas con sFlt-1 y SEPI (100μM). OCR-Máximo: Consumo de oxígeno máximo, OCR-Reserva: Capacidad de reserva respiratoria, OCR-Basal: Consumo de oxígeno basal, OCR-ATP: Consumo de oxígeno acoplado a la producción de ATP, OCR-Fuga de protones: Consumo de oxígeno acoplado a la fuga de protones.

Fenotipo metabólico				
Tratamiento	Consumo de oxígeno (OCR) pmol O ₂ /min/μg de proteína		Acidificación extracelular (ECAR) mpH/min/μg de proteína	
	OCR-Basal	OCR-Estresado	ECAR-Basal	ECAR-Estresado
Control	16.36 ± 0.35	37.17 ± 3.09	0.68 ± 0.05	3.10 ± 0.08
sFlt-1 (50 ng/mL)	15.47 ± 1.02	15.74 ± 0.49	1.26 ± 0.20	5.65 ± 0.50
SEPI 100 μM	15.73 ± 1.55	39.45 ± 4.20	0.76 ± 0.07	3.08 ± 0.25
sFlt-1 (25 ng/mL) + SEPI 100 μM	17.20 ± 0.56	39.85 ± 3.44	0.73 ± 0.03	3.22 ± 0.25
sFlt-1 (50 ng/mL) + SEPI 100 μM	17.07 ± 0.60	36.94 ± 3.84	0.90 ± 0.08	3.82 ± 0.15

Tabla 6.6 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de células CEs tratadas con sFlt-1 y SEPI (100μM). OCR-Basal: consumo de oxígeno basal, OCR-Estresado: consumo de oxígeno luego de la administración de FCCP, ECAR-Basal: acidificación extracelular basal, ECAR-Estresado: acidificación extracelular luego de la administración de FCCP.

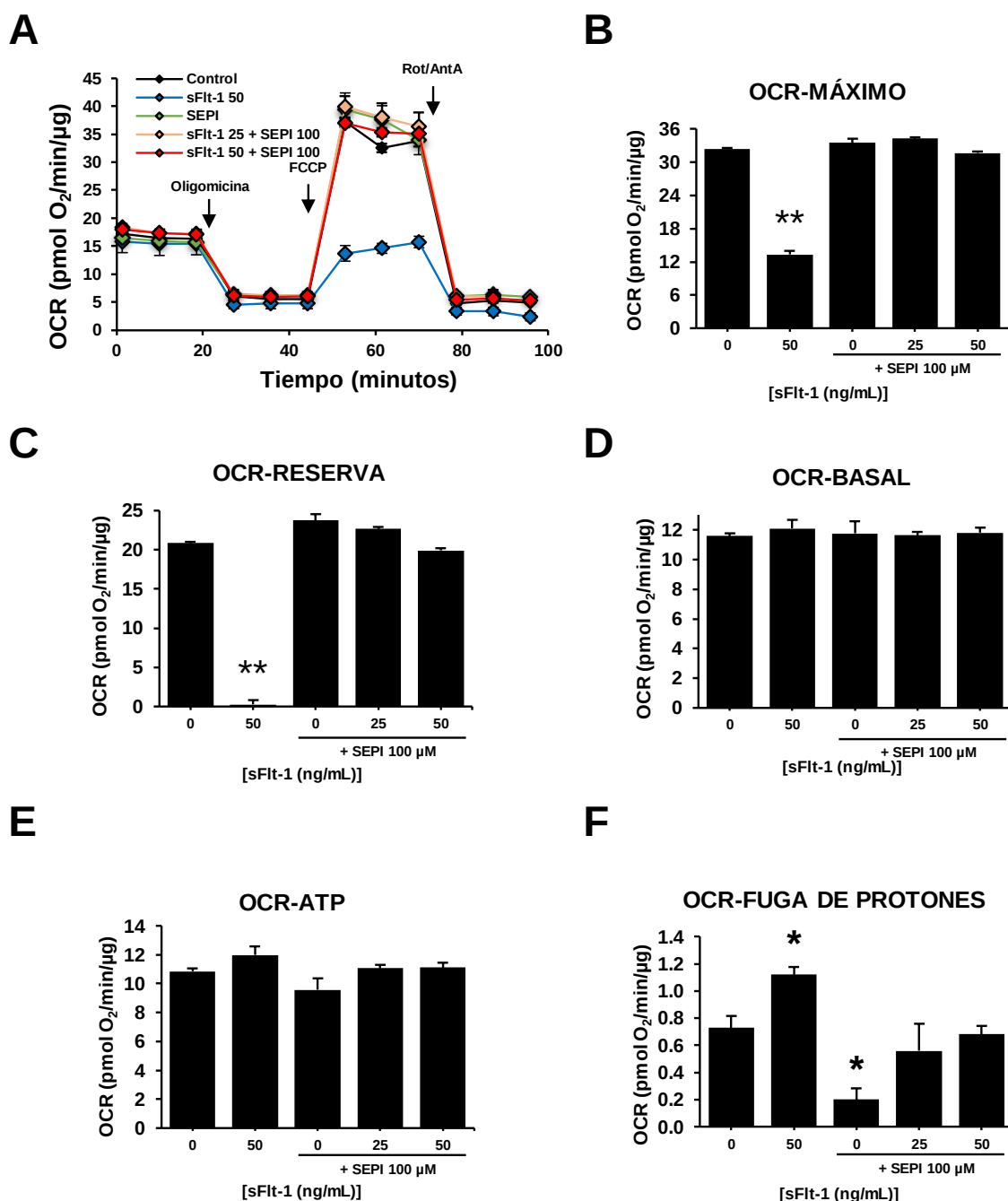


Figura 6.10 Efecto de la administración de SEPI (100μM) en la función bioenergética mitocondrial de CEs en modelo *in vitro* de PE inducido por la administración de sFlt-1. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh sFlt-1 en concentraciones de: 25 y 50 ng/mL, y suplementadas con SEPI 100 μM, durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-Fuga de protones. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5, * P <0.05, ** P <0.01 con respecto al control, ANOVA, Bonferroni's post-hoc test).

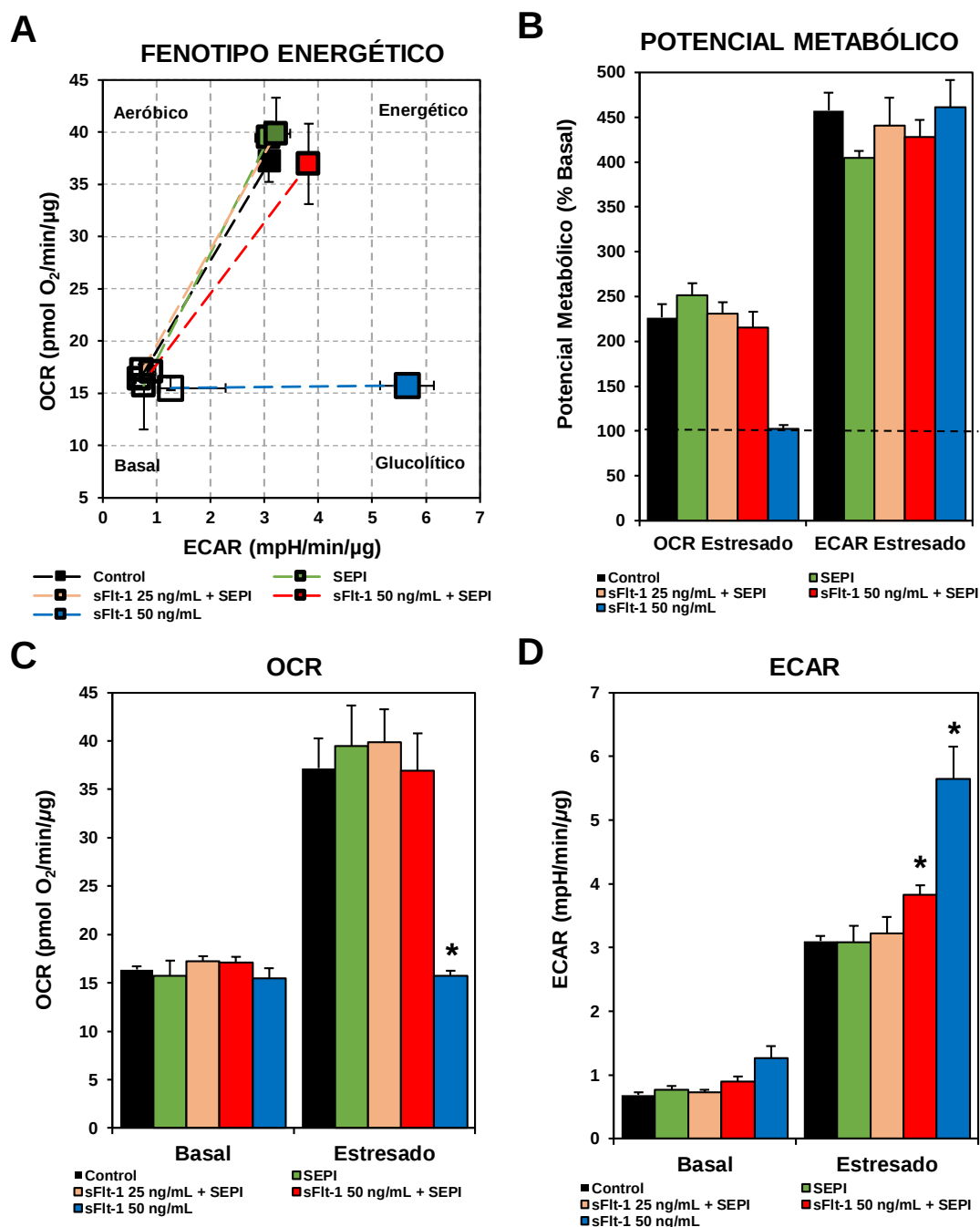


Figura 6.11 Efectos de la administración exógena de SEPI (100 μ M) en el restablecimiento del fenotipo metabólico de CEs expuestas a sFlt-1. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh sFlt-1 (25 y 50 ng/mL) y SEPI (100 μ M), durante 24 horas. Se determinó el fenotipo metabólico empleando la tecnología Seahorse-Agilent en CEs. (A) Fenotipo energético, (B) potencial metabólico, (C) OCR y (D) ECAR en CEs expuestas a sFlt-1 (25 y 50 ng/mL) y SEPI 100 μ M. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 con respecto al control, ANOVA, Bonferroni's post-hoc test).

Una vez conocido el efecto de SEPI en concentración de 100 μ M en el restablecimiento de la función endotelial y fenotipo metabólico en CEs, se evaluó el papel de SEPI en el metabolismo mitocondrial de trofoblastos. En la **tabla 6.7** se resumen los resultados obtenidos con respecto al OCR de células HTR-8/SVneo expuestas a tratamiento con sFlt-1 y al co-tratamiento de sFlt-1 + SEPI. En la figura **6.12 A**, se observa el consumo de oxígeno en función al tiempo de trofoblastos tratados con sFlt-1 50 ng/mL, SEPI 100 μ M y tratadas con sFlt-1 50 ng/mL + SEPI 100 μ M. Con respecto al OCR-Máximo; las células tratadas con sFlt-1 mostraron una disminución en esta medición, que fue estadísticamente significativa ($P=0.02$) con respecto al control. El OCR-Reserva también mostró una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control de las células que fueron tratadas con sFlt-1 50 ng/mL y sFlt-1 50 ng/mL + SEPI 100 μ M ($P=0.03$) (**Figuras 6.12 B y C**). Hasta el momento las mediciones realizadas se corresponden con los resultados obtenidos en la sección “**capítulo I** de Resultados”. En relación a las células trofoblásticas, la administración de SEPI 100 μ M no demostró tener un efecto en el restablecimiento de la bioenergética mitocondrial de células expuestas a sFlt-1.

Entre otras mediciones realizadas, el OCR-basal determinado en células HTR-8/SVneo no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($P=0.64$) (**Figura 6.12 D**). De la misma manera, las determinaciones de OCR-ATP y OCR-Fuga de protones, representadas en la **tabla 6.7**, tampoco muestran diferencias estadísticamente significativas ($P=0.23$ y $P=0.44$, respectivamente) (**Figura 6.12 E y F**).

Tratamiento	Consumo de oxígeno (OCR) pmol O ₂ /min/ μ g de proteína				
	OCR-Máximo	OCR-Reserva	OCR-Basal	OCR-ATP	OCR-Fuga de protones
Control	20.66 $\pm$ 0.1	5.56 $\pm$ 0.3	16.10 $\pm$ 0.2	14.13 $\pm$ 0.2	1.69 $\pm$ 0.1
sFlt-1 (50 ng/mL)	14.57 $\pm$ 0.8	2.59 $\pm$ 0.01	14.83 $\pm$ 0.3	13.74 $\pm$ 0.4	1.98 $\pm$ 0.1
SEPI 100 μ M	19.75 $\pm$ 1.4	4.37 $\pm$ 0.1	14.79 $\pm$ 1.0	13.99 $\pm$ 0.9	0.81 $\pm$ 0.1
sFlt-1 (50 ng/mL) + SEPI 100 μ M	17.69 $\pm$ 1.1	2.79 $\pm$ 0.7	15.38 $\pm$ 0.7	13.69 $\pm$ 0.7	1.10 $\pm$ 0.1

Tabla 6.7 Consumo de oxígeno (OCR) de células HTR-8/SVneo tratadas con sFlt-1 y SEPI (100 μ M). OCR-Máximo: Consumo de oxígeno máximo, OCR-Reserva: Capacidad de reserva respiratoria, OCR-Basal: Consumo de oxígeno basal, OCR-ATP: Consumo de oxígeno acoplado a la producción de ATP, OCR-Fuga de protones: Consumo de oxígeno acoplado a la fuga de protones.

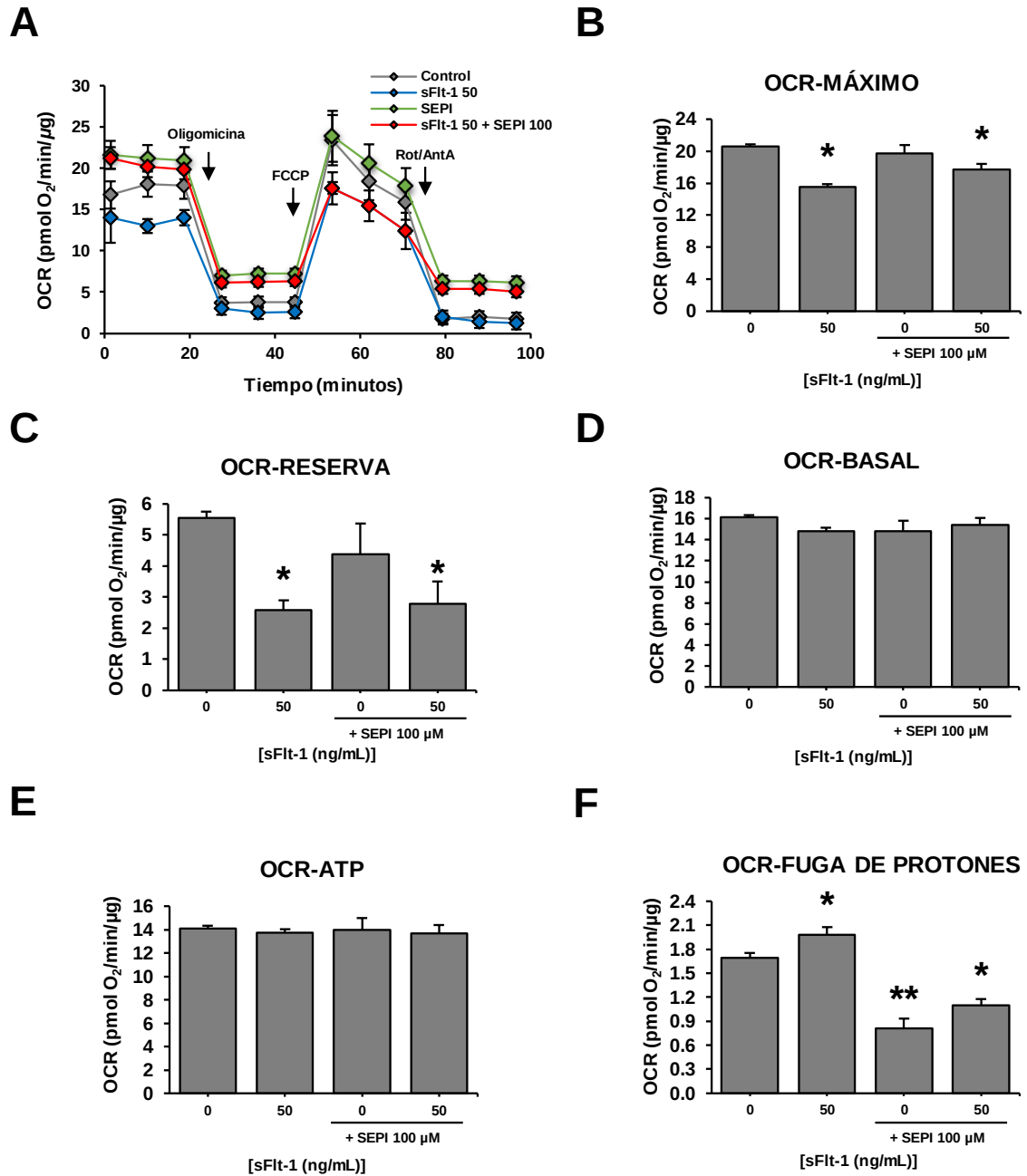


Figura 6.12 Efecto de la administración de SEPI (100µM) en la función bioenergética mitocondrial de HTR-8/SVneo en modelo *in vitro* de PE inducido por la administración de sFlt-1. Células HTR-8/SVneo fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh sFlt-1 (50 ng/mL) y suplementadas con SEPI 100 µM, durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-Fuga de protones. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto al control. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Con respecto al fenotipo metabólico de células HTR-8/Svneo expuestas a sFlt-1 y SEPI (100 μ M); en la **tabla 6.8** se representan los valores obtenidos con respecto al OCR-Basal y OCR-Estresado. Tal como se evidencia en la **figura 6.13**, la administración de sFlt-1 50 ng/mL conlleva a una tendencia a disminuir el OCR en situaciones de estrés (no es estadísticamente significativo) ($P=0.10$). La administración de SEPI 100 μ M, no restablece el fenotipo metabólico en trofoblastos. Se observó una tendencia a mejorar el OCR-Estresado, que no fue significativo estadísticamente con respecto al grupo de células tratadas con sFlt-1 50 ng/mL o con respecto al control (ANOVA, Bonferroni's post hoc test) ($P=0.07$) (**Figura 6.13**).

Fenotipo metabólico				
Tratamiento	Consumo de oxígeno (OCR) pmol O ₂ /min/ μ g de proteína		Acidificación extracelular (ECAR) mpH/min/ μ g de proteína	
	OCR-Basal	OCR-Estresado	ECAR-Basal	ECAR-Estresado
Control	17.86 $\pm$ 0.96	23.41 $\pm$ 0.74	6.83 $\pm$ 0.20	10.60 $\pm$ 0.44
sFlt-1 50 (ng/mL)	18.16 $\pm$ 2.32	20.98 $\pm$ 2.55	6.89 $\pm$ 0.66	10.82 $\pm$ 1.16
SEPI 100 μ M	20.97 $\pm$ 1.79	23.86 $\pm$ 1.92	6.88 $\pm$ 0.16	11.87 $\pm$ 0.47
sFlt-1 50 (ng/mL) + SEPI 100 μ M	18.52 $\pm$ 1.22	22.89 $\pm$ 1.96	6.73 $\pm$ 0.12	10.43 $\pm$ 0.39

Tabla 6.8 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de células HTR-8/SVneo tratadas con sFlt-1 y SEPI (100 μ M). OCR-Basal: consumo de oxígeno basal, OCR-Estresado: consumo de oxígeno luego de la administración de FCCP, ECAR-Basal: acidificación extracelular basal, ECAR-Estresado: acidificación extracelular luego de la administración de FCCP.

Hasta el momento, los resultados obtenidos indican que SEPI en concentraciones de 100 μ M permite restablecer el fenotipo metabólico en CEs expuestas a sFlt-1. Mientras que en trofoblastos, ya que el efecto de sFlt-1 no es tan dramático con respecto a la bioenergética mitocondrial; los efectos de SEPI no indican un efecto en el restablecimiento de la función metabólica de esta línea celular.

En esta investigación también se demostró que TNF- α es otra molécula capaz de conllevar a cambios metabólicos, tanto en CEs como en trofoblastos, en la sección “**capítulo II** de Resultados”, TNF- α demostró tener un efecto a nivel metabólico, en la función bioenergética mitocondrial de CEs y trofoblastos, por lo tanto; el siguiente enfoque fue conocer el papel de SEPI 100 μ M, en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial de CEs y trofoblastos expuestos a TNF- α en concentración de 50 ng/mL.

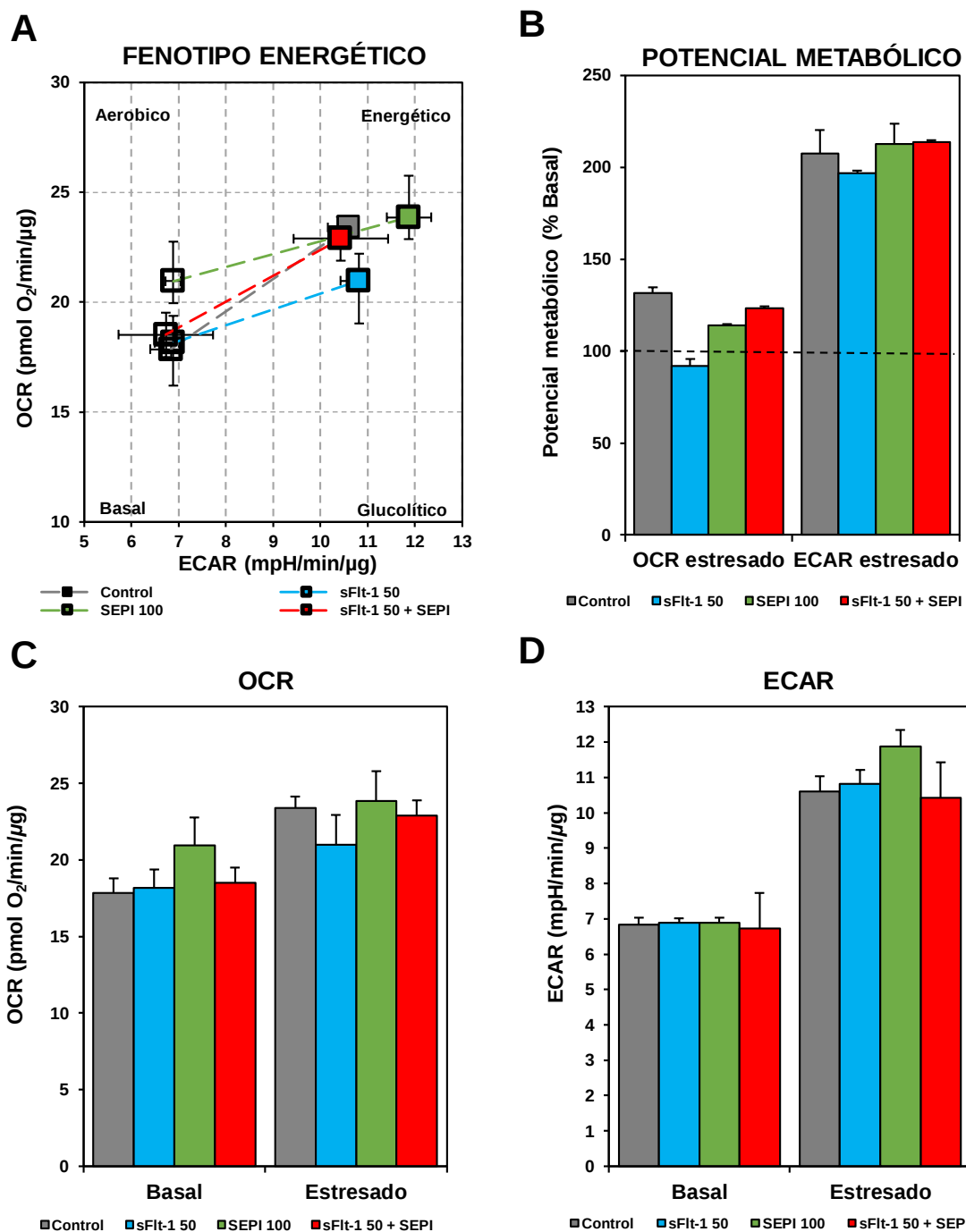


Figura 6.13 Efectos de la administración exógena de SEPI (100μM) en el restablecimiento del fenotipo metabólico de trofoblastos expuestos a sFlt-1. Células HTR-8/SVneo fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh sFlt-1 (50 ng/mL) y SEPI (100μM), durante 24 horas. Se determinó el fenotipo metabólico empleando la tecnología Seahorse-Agilent en CE. (A) Fenotipo energético, (B) potencial metabólico, (C) OCR y (D) ECAR en trofoblastos expuestos a sFlt-1 (50 ng/mL) y SEPI (100 μM). Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5, ANOVA, Bonferroni's post-hoc test).

En la **figura 6.14 A** se representa el OCR con respecto al tiempo de CEs expuestas a TNF- α y suplementadas también con SEPI (100 μ M). El OCR-Máximo determinado bajo estos tratamientos fue: 6.00 ± 0.26 pmol O₂/min/ μ g de proteína en el control, 5.50 ± 0.31 pmol O₂/min/ μ g de proteína en células tratadas con SEPI, 2.40 ± 0.3 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 2.80 ± 0.26 pmol O₂/min/ μ g de proteína en células tratadas con TNF- α 50 ng/mL y TNF- α 50 ng/mL + SEPI, respectivamente. Las últimas dos mediciones mostraron ser diferentes estadísticamente con respecto al control ($P=0.008$) (**Figura 6.14 B**). En concordancia, los niveles de OCR-Reserva detectados fueron: en el control: 1.90 ± 0.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína, con SEPI 2.00 ± 0.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína, en células tratadas con TNF- α : 0.10 ± 0.6 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 1.00 ± 0.3 pmol O₂/min/ μ g de proteína en aquellas tratadas con TNF- α 50 ng/mL y suplementadas con SEPI (**Figura 6.14 C**). Tal como fue demostrado en secciones anteriores de esta investigación; TNF- α 50 ng/mL es capaz de afectar la capacidad de reserva respiratoria en CEs. La administración de SEPI logra mejorar esta medición, sin embargo, sus niveles no lograron restablecerse a nivel del control.

Entre otras determinaciones, el OCR-Basal obtenido en el control fue: 15.60 ± 0.9 pmol O₂/min/ μ g de proteína, en células tratadas con SEPI: 16.10 ± 0.5 pmol O₂/min/ μ g de proteína, 13.50 ± 1.3 pmol O₂/min/ μ g de proteína y 13.60 ± 1.0 pmol O₂/min/ μ g de proteína para células tratadas con TNF- α 50 ng/mL y TNF- α 50 ng/mL + SEPI, respectivamente. La diferencia estadística observada en los grupos tratados con TNF- α 50 ng/mL con respecto al control, se mantuvieron incluso luego de administrar SEPI ($P=0.03$) (**Figura 6.14 D**). El OCR acoplado a la producción de ATP en el control fue: 13.10 ± 0.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína en el control, 14.10 ± 0.8 pmol O₂/min/ μ g de proteína con SEPI, 11.00 ± 0.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína, en presencia de TNF- α 50 ng/mL y 10.70 ± 0.3 pmol O₂/min/ μ g de proteína. Las diferencias de los grupos tratados con TNF- α 50 ng/mL fueron estadísticamente significativas a pesar de la suplementación con SEPI ($P=0.03$) (**Figura 6.14 E**). Finalmente, el OCR acoplado a la fuga de protones medido en el control fue: 2.50 ± 0.1 pmol O₂/min/ μ g de proteína, con SEPI: 2.10 ± 0.1 pmol O₂/min/ μ g de proteína, 2.50 ± 0.2 pmol O₂/min/ μ g de proteína con TNF- α 50 ng/mL y 2.80 ± 0.1 pmol O₂/min/ μ g de proteína con TNF- α 50 ng/mL + SEPI. Esta determinación fue significativamente menor en el grupo tratado con SEPI con respecto al control ($P=0.01$) y significativamente mayor en células tratadas con TNF- α 50 ng/mL + SEPI ($P=0.04$) (**Figura 6.14 F**).

Basado en estas determinaciones; se calculó el fenotipo y potencial metabólico de CEs expuestas a TNF- α y SEPI. En la **tabla 6.9** se muestran los resultados obtenidos con respecto a OCR-Basal, OCR-Estresado, ECAR-Basal y ECAR-Estresado de CEs bajo los tratamientos ya descritos. La administración de SEPI no logró restablecer el fenotipo metabólico de CEs expuestas a tratamiento con TNF- α 50 ng/mL (**Figura 6.15**).

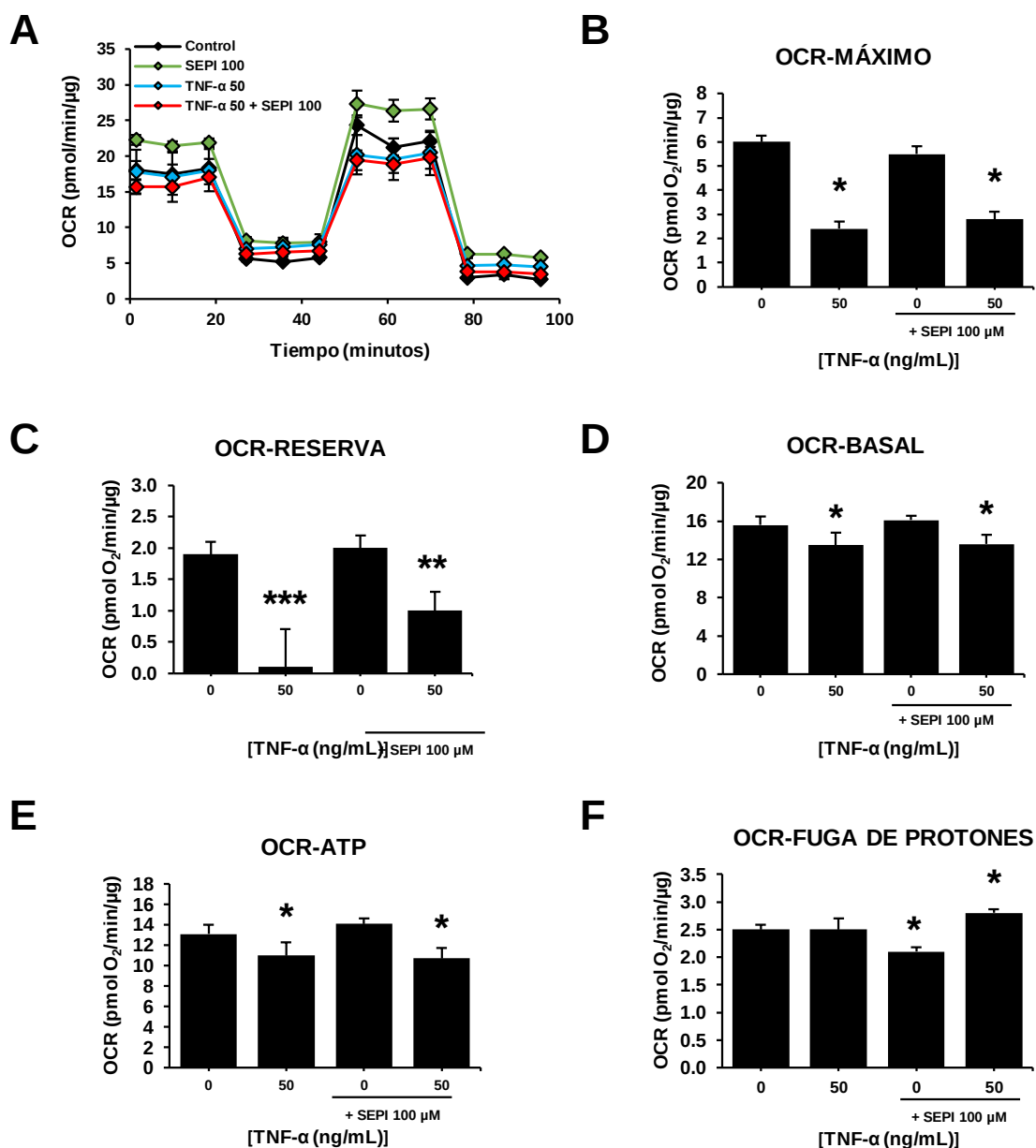


Figura 6.14 Efecto de la administración de SEPI (100µM) en la función bioenergética mitocondrial de CE en modelo *in vitro* de PE inducido por la administración de TNF-α. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh TNF-α (50 ng/mL) y suplementadas con SEPI 100 µM, durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-Fuga de protones. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.01 con respecto al control. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Fenotipo metabólico				
Tratamiento	Consumo de oxígeno (OCR) pmol O ₂ /min/μg de proteína		Acidificación extracelular (ECAR) mpH/min/μg de proteína	
	OCR-Basal	OCR-Estresado	ECAR-Basal	ECAR-Estresado
Control	18.27 ± 1.36	24.29 ± 1.38	2.38 ± 0.23	6.68 ± 0.51
TNF-α 50 (ng/mL)	18.01 ± 2.96	20.43 ± 3.15	3.20 ± 0.19	7.14 ± 0.09
SEPI 100 μM	21.87 ± 0.60	27.32 ± 1.88	2.22 ± 0.09	6.59 ± 0.24
TNF-α 50 (ng/mL) + SEPI 100 μM	17.00 ± 0.96	19.77 ± 1.51	3.39 ± 0.26	7.36 ± 0.30

Tabla 6.9 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de células CE tratadas con TNF-α (50 ng/mL) y SEPI (100μM). OCR-Basal: consumo de oxígeno basal, OCR-Estresado: consumo de oxígeno luego de la administración de FCCP, ECAR-Basal: acidificación extracelular basal, ECAR-Estresado: acidificación extracelular luego de la administración de FCCP.

En células HTR-8/SVneo también se evaluó el papel de SEPI en el restablecimiento del fenotipo metabólico de trofoblastos expuestos a TNF-α. En la **figura 6.16 A** se muestra el consumo de oxígeno con respecto al tiempo de células trofoblásticas que fueron expuestas a TNF-α (50 ng/mL) y también suplementadas con SEPI (100μM). El OCR-Máximo determinado en el control fue: 13.26 ± 0.7 pmol O₂/min/μg de proteína, con SEPI: 14.71 ± 1.3 pmol O₂/min/μg de proteína, 9.96 ± 0.7 pmol O₂/min/μg de proteína en presencia de TNF-α y 10.54 ± 1.3 pmol O₂/min/μg de proteína con TNF-α y SEPI. En presencia de TNF-α se observó una diferencia estadísticamente significativa de esta medición ($P=0.03$) (**Figura 6.16 B**). Los resultados del OCR-Reserva medidos para el control fueron: 1.74 ± 0.3 pmol O₂/min/μg de proteína, 5.29 ± 1.8 pmol O₂/min/μg de proteína en presencia de SEPI, 1.82 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína con TNF-α y 1.75 ± 0.5 pmol O₂/min/μg de proteína con TNF-α + SEPI. Con respecto a esta medición, el grupo de células expuesto a SEPI mostró un restablecimiento de la OCR-Reserva, sin embargo, las células igualmente tratadas con TNF-α no mostraron ninguna diferencia estadísticamente ($P=0.002$) (**Figura 6.16 C**).

Con respecto al OCR-Basal, en el control se determinó: 11.52 ± 0.8 pmol O₂/min/μg de proteína, con SEPI: 8.14 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína, en presencia de TNF-α: 10.65 ± 1.3 pmol O₂/min/μg de proteína y en co-tratamiento con SEPI: 9.55 ± 0.7 pmol O₂/min/μg de proteína. Con respecto a TNF-α, se encontró una diferencia estadística en comparación al control, que durante el co-tratamiento de TNF-α + SEPI se logró restablecer ($P=0.008$) (**Figura 6.16 D**). Con respecto al OCR-ATP, en el control se determinó 7.57 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína, con SEPI: 7.43 ± 1.1 pmol O₂/min/μg de proteína, con TNF-α: 5.49 ± 0.3 pmol O₂/min/μg de proteína; mientras que con TNF-α + SEPI se midió: 6.73 ± 0.5 pmol O₂/min/μg de proteína. Tal como se determinó en el OCR-Basal, sólo la medición de OCR-ATP en células tratadas con TNF-α, mostró una diferencia estadísticamente con respecto al control ($P=0.03$) (**Figura 6.16 E**). Finalmente, el OCR acoplado a la fuga de protones en el

control fue: 3.95 ± 0.4 pmol O₂/min/μg de proteína, con SEPI: 2.65 ± 0.2 pmol O₂/min/μg de proteína, en presencia de TNF-α y TNF-α + SEPI: 3.60 ± 0.3 pmol O₂/min/μg de proteína y 2.82 ± 0.3 pmol O₂/min/μg de proteína, respectivamente (**Figura 6.16 F**).

En base a las observaciones en la **figura 6.16**, se determinó el fenotipo y potencial metabólico de células HTR-8/SVneo expuestas a TNF-α y SEPI. En la **tabla 6.10** se muestran los valores obtenidos de OCR-Basal y OCR-Estresado, así como el ECAR-Basal y ECAR-Estresado (**Figura 6.17**). La suplementación con SEPI, en células tratadas con TNF-α no tiene efecto en el fenotipo metabólico de células trofoblásticas. El OCR-Estresado en trofoblastos expuestos a SEPI, es significativamente mayor con respecto al control ($P=0.02$) (**Figura 6.17 C**).

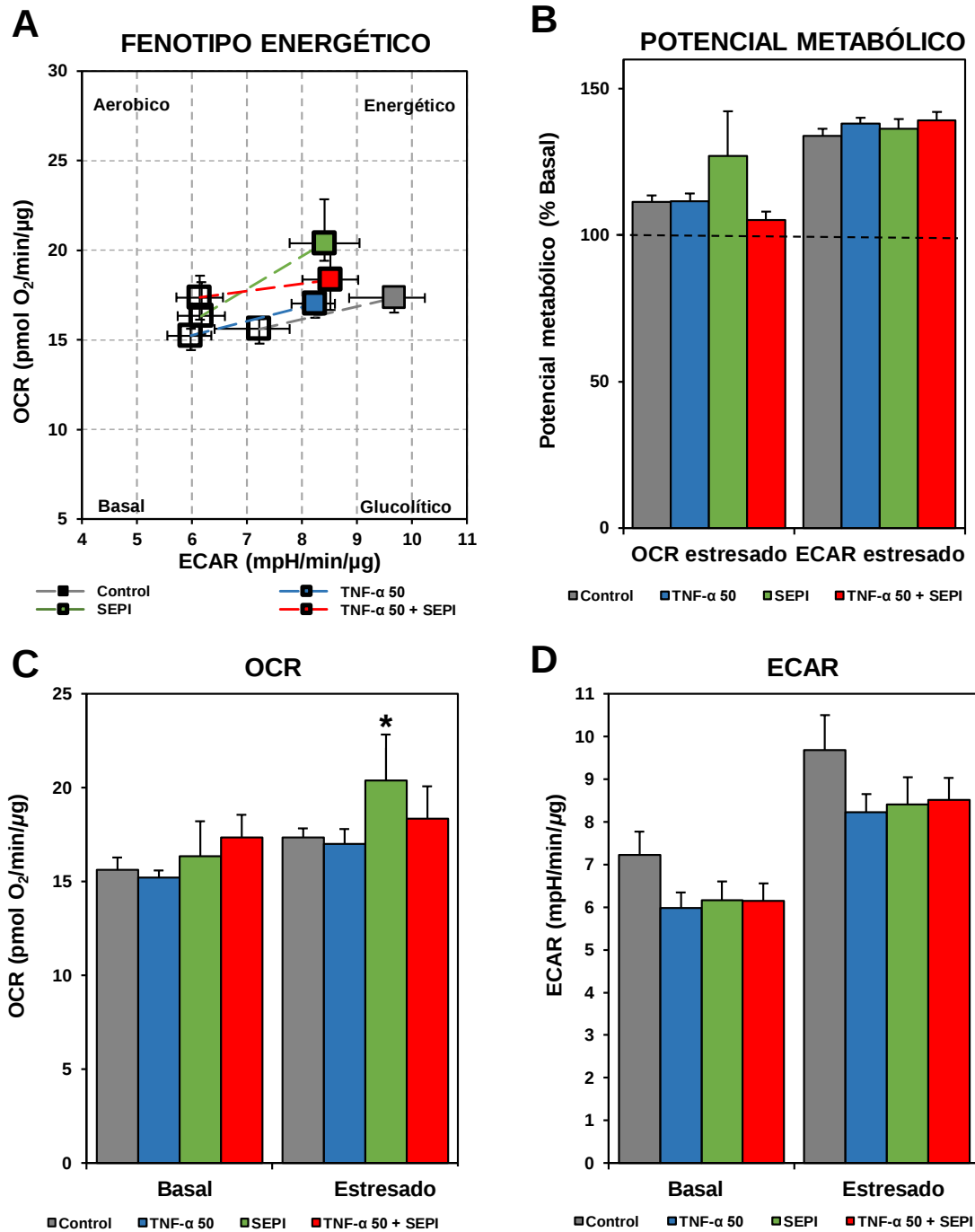


Figura 6.15 Efectos de la administración exógena de SEPI (100 μ M) en el restablecimiento del fenotipo metabólico de CE's expuestas a TNF- α . Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh TNF- α (50 ng/mL) y suplementadas con SEPI 100 μ M, durante 24 horas. Se determinó el fenotipo metabólico empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Fenotipo energético, (B) potencial metabólico, (C) OCR y (D) ECAR en trofoblastos expuestos a sFlt-1 y SEPI 100 μ M. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * P <0.05, con respecto al control. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

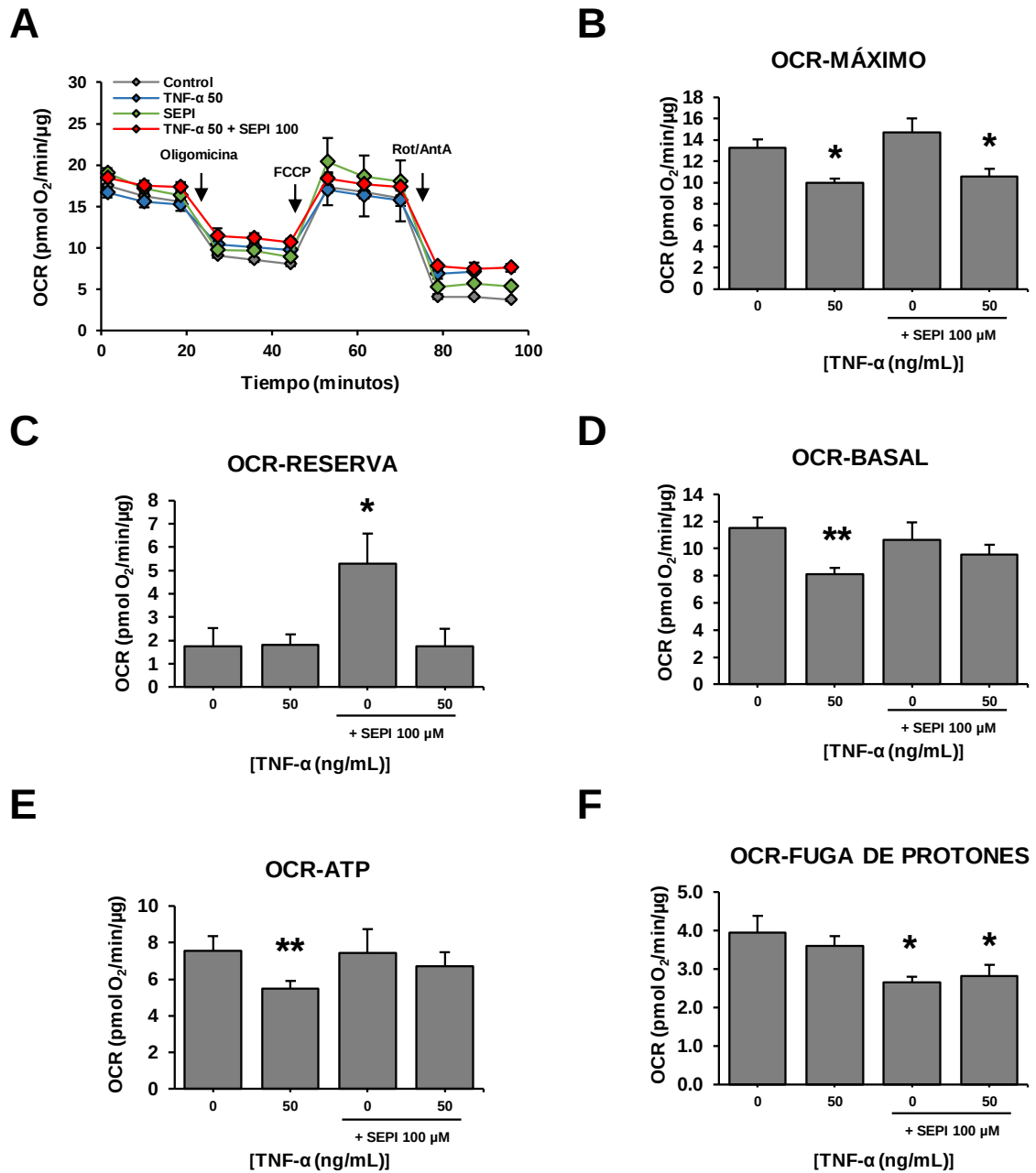


Figura 6.16 Efecto de la administración de SEPI (100µM) en la función bioenergética mitocondrial de trofoblastos en modelo *in vitro* de PE inducido por la administración de TNF-α. Células HTR-8/SVneo fueron sembradas en densidad de 4.0 x 10⁴ células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh TNF-α (50 ng/mL) y suplementadas con SEPI 100 µM, durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-Fuga de protones. Los datos están presentados con la media ± SEM. (n=5), *P<0.05, **P<0.01 con respecto al control. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Fenotipo metabólico				
Tratamiento	Consumo de oxígeno (OCR) pmol O ₂ /min/μg de proteína		Acidificación extracelular (ECAR) mpH/min/μg de proteína	
	OCR-Basal	OCR-Estresado	ECAR-Basal	ECAR-Estresado
Control	15.62 ± 0.68	17.36 ± 0.48	7.23 ± 0.55	9.68 ± 0.82
TNF-α 50 (ng/mL)	15.23 ± 0.38	17.02 ± 0.78	5.98 ± 0.37	8.23 ± 0.42
SEPI 100 μM	16.34 ± 1.87	20.40 ± 2.43	6.17 ± 0.43	8.41 ± 0.64
TNF-α 50 (ng/mL) + SEPI 100 μM	17.36 ± 1.21	18.36 ± 1.70	6.14 ± 0.42	8.52 ± 0.51

Tabla 6.10 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de células HTR-8/SVneo tratadas con TNF-α (50 ng/mL) y SEPI (100μM). OCR-Basal: consumo de oxígeno basal, OCR-Estresado: consumo de oxígeno luego de la administración de FCCP, ECAR-Basal: acidificación extracelular basal, ECAR-Estresado: acidificación extracelular luego de la administración de FCCP.

6.6 SEPI reestablece la función endotelial en el modelo de correlación *in vitro* de PE.

Para evaluar el papel de SEPI en el restablecimiento de la función endotelial *in vitro*, se cultivaron células CE en presencia de sueros de pacientes control no embarazadas, normotensas (NOR) y preeclámpticas (PE) (2% de suero). Además del tratamiento de estas células con sueros, se suplementaron con SEPI (100 μM). Los niveles de •NO se determinaron por quimioluminiscencia, al medir los niveles de NO₂⁻. En CE, los niveles de NO₂⁻ detectados en el sobrenadante celular en el grupo control fueron: 95 ± 5 nmol NO₂⁻/μg de proteína, en células tratadas con SEPI: 94 ± 2 nmol NO₂⁻/μg de proteína, 90 ± 7 nmol NO₂⁻/μg de proteína y 79 ± 3 nmol NO₂⁻/μg de proteína, en CE tratadas con sueros de pacientes NOR y PE, respectivamente.

Cuando las células fueron tratadas con sueros de pacientes NOR y además suplementadas con SEPI se determinaron niveles de NO₂⁻ de 89 ± 5 nmol NO₂⁻/μg de proteína y cuando se administró suero proveniente de pacientes preeclámpticas y SEPI, se logró restablecer la producción de •NO a nivel de 86 ± 3 nmol NO₂⁻/μg de proteína. El análisis estadístico mostró una diferencia estadísticamente significativa entre las mediciones de NO₂⁻ con sueros de pacientes preeclámpticas con respecto al control (*P*=0.03). La administración de SEPI a este grupo de células permitió restablecer la producción de •NO (**Figura 6.18**).

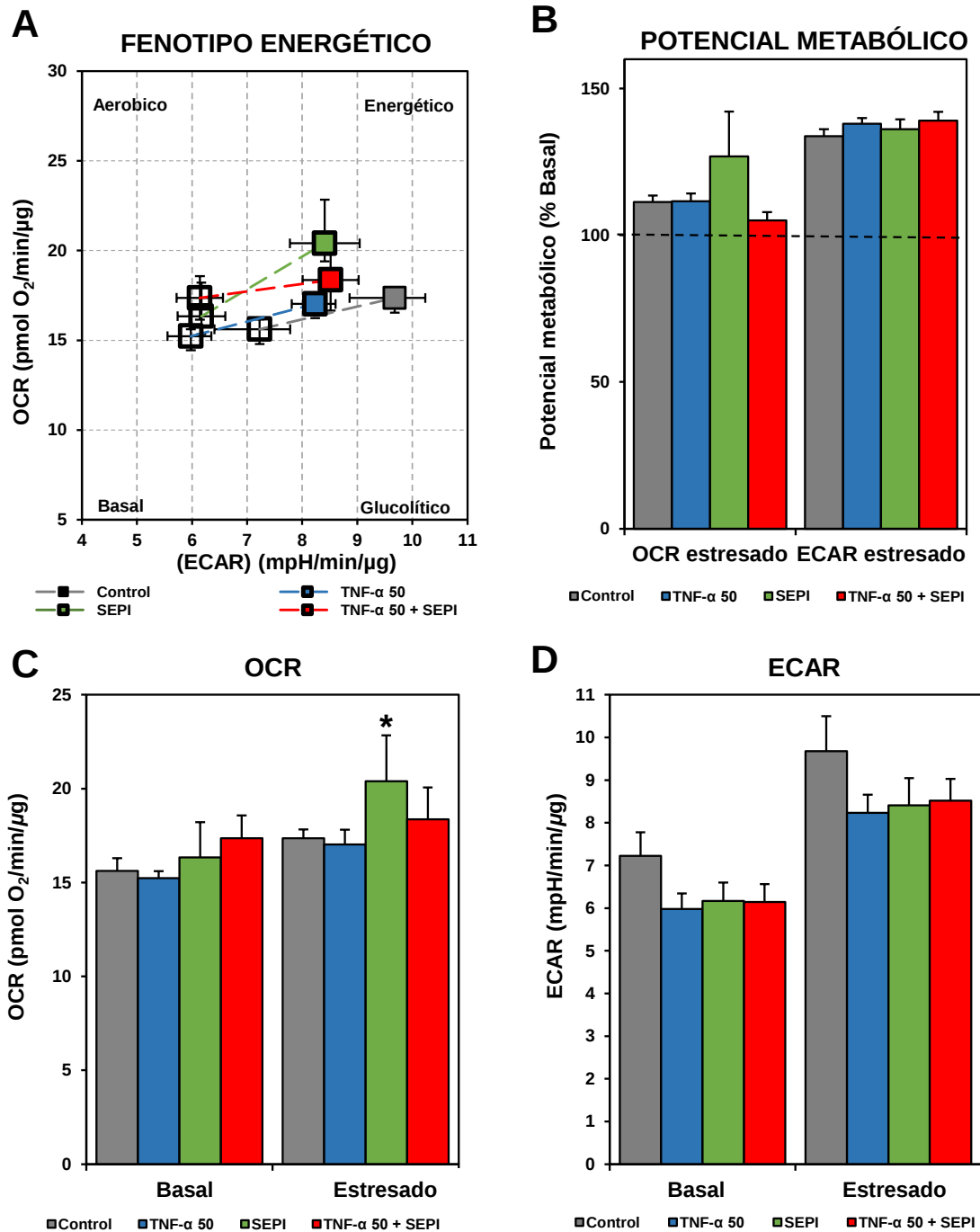


Figura 6.17 Efecto de la administración de SEPI (100 μ M) en la función bioenergética mitocondrial de trofoblastos en modelo *in vitro* de PE inducido por la administración de 50 ng/mL de TNF- α . Células HTR-8/SVneo fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con rh TNF- α (50 ng/mL) y suplementadas con SEPI 100 μ M, durante 24 horas. Se determinó el fenotipo metabólico empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-Fuga de protones. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * P <0.05, ** P <0.01 con respecto al control. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

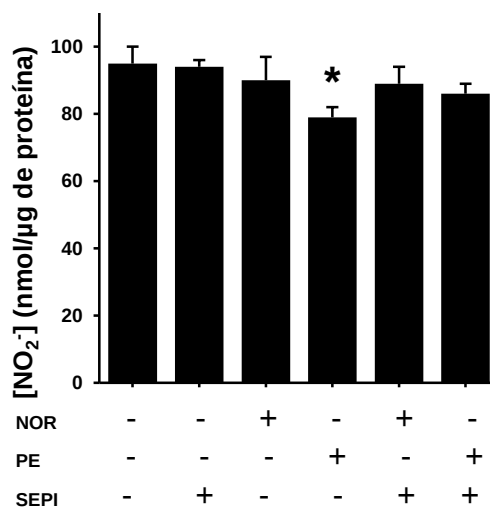


Figura 6.18 Restablecimiento de la función endotelial en modelo de correlación *in vitro* empleando sueros de pacientes en cultivo de CEs. Los niveles de •NO fueron medidos como la concentración de NO₂⁻ (nmol NO₂⁻/ μg de proteína) por quimioluminiscencia, luego del tratamiento con sueros de pacientes (2%) y SEPI (100μM) durante 24 horas. Los datos están presentados con la media ± SEM. (n=3, *P<0.05, con respecto al control, ANOVA, Bonferroni's post-hoc test).

6.7 SEPI reestablece la función bioenergética mitocondrial y fenotipo metabólico en el modelo de correlación *in vitro* de PE.

La administración de SEPI demostró el restablecimiento de función endotelial en el modelo de correlación *in vitro* de PE con sueros de pacientes (sección 6.6). En adición, SEPI logró disminuir la formación de mROS y el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial en el modelo *in vitro* con sFlt-1 y TNF-α (secciones 6.4 y 6.5). En base a estas observaciones, se determinó el efecto de SEPI en la función bioenergética mitocondrial de células tratadas con sueros de pacientes (2%) y suplementadas con SEPI (100μM).

En la **tabla 6.11** se resumen las mediciones de OCR-Máximo en células CEs tratadas con sueros de pacientes y suplementadas con SEPI. Tal como se observa en la **figura 6.19 A**, la adición de SEPI permite incrementar del OCR-Máximo de células tratadas con sueros de pacientes del grupo NOR y de aquellas tratadas con sueros de pacientes PE ($P=0.0018$) (**Figura 6.19 A**). El OCR-Máximo, a pesar de ser diferente estadísticamente con respecto a los grupos de células tratados con sueros NOR y PE, respectivamente, no logró restablecerse a nivel del control. En la **tabla 6.12** se muestran los datos obtenidos con respecto al OCR-Reserva de células CEs tratadas con sueros de pacientes y SEPI. En este caso, la administración de SEPI mejoró significativamente la capacidad de reserva respiratoria en células tratadas con sueros de pacientes NOR y PE ($P=0.0032$). Nuevamente se observó que los niveles no fueron restablecidos a nivel del control (**Figura 6.19 B**).

Tratamiento	OCR-Máximo (pmol O ₂ /min/μg de proteína)		
	Grupos experimentales		
	CTL	NOR	PE
Suero	30.4 ± 0.7	17.7 ± 0.8*	15.7 ± 0.6**
Suero + SEPI	27.9 ± 0.7	22.8 ± 0.6#	22.6 ± 1.5##

Tabla 6.11 Niveles de OCR-Máxima en células CE's tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE además de la suplementación de SEPI (100 μM). (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto al control, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ con respecto al grupo PE, ANOVA. (Bonferroni's post-hoc test).

Tratamiento	OCR-Reserva (pmol O ₂ /min/μg de proteína)		
	Grupos experimentales		
	CTL	NOR	PE
Suero	13.7 ± 0.2	6.87 ± 1.0*	4.48 ± 1.1**
Suero + SEPI	12.1 ± 1.6	10.41 ± 1.2#	7.7 ± 3.5##

Tabla 6.12 Niveles de OCR-Reserva en células CE's tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE además de la suplementación de SEPI (100 μM). (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto al control, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ con respecto al grupo PE. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Con respecto al papel de SEPI en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial en HTR-8/SVneo; en la **figura 6.19 C-D** se muestra la representación gráfica de los niveles de OCR-Máxima y OCR-Reserva determinados en esta línea celular y que se representan en las **tablas 6.13 y 6.14**, respectivamente. Es interesante que el suero NOR no conlleva a cambios significativos con respecto al control, pero la administración de sueros de pacientes del grupo PE sí lo hace ($P=0.02$).

La administración de SEPI mantiene niveles de OCR-Máxima de células tratadas con NOR en niveles que no son diferentes estadísticamente al grupo NOR o al grupo control. Mientras que, SEPI sí logró restablecer el consumo de oxígeno en células tratadas con sueros de pacientes PE ($P=0.01$), incluso a niveles que no fueron estadísticamente distintos al grupo control ($P=0.19$) (**Figura 6.19 C**). Finalmente, el OCR-Reserva en trofoblastos mostró un comportamiento similar a la observación anterior. La administración de SEPI logró restablecer la capacidad de reserva respiratoria a niveles que no son estadísticamente diferentes al control ($P=0.08$) (**Figura 6.19 D**).

Tratamiento	OCR-Máximo (pmol O ₂ /min/μg de proteína)		
	Grupos experimentales		
	CTL	NOR	PE
Suero	6.8 ± 0.7	6.43 ± 0.2	4.55 ± 0.5*
Suero + SEPI	6.9 ± 0.3	6.8 ± 0.4	5.7 ± 0.6#

Tabla 6.13 Niveles de OCR-Máxima en células HTR-8/SVneo tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE además de la suplementación de SEPI (100 μM). (n=5), **P*<0.05, con respecto al control, #*P*<0.05, con respecto al grupo PE. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Tratamiento	OCR-Reserva (pmol O ₂ /min/μg de proteína)		
	Grupos experimentales		
	CTL	NOR	PE
Suero	0.68 ± 0.4	0.69 ± 0.4	-0.56 ± 0.1*
Suero + SEPI	0.82 ± 0.5	0.75 ± 0.3	0.22 ± 0.1#

Tabla 6.14 Niveles de OCR-Reserva en células HTR-8/SVneo tratadas con sueros de pacientes de los grupos CTL, NOR y PE además de la suplementación de SEPI (100 μM). (n=5), **P*<0.05, con respecto al control, #*P*<0.05, con respecto al grupo PE. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

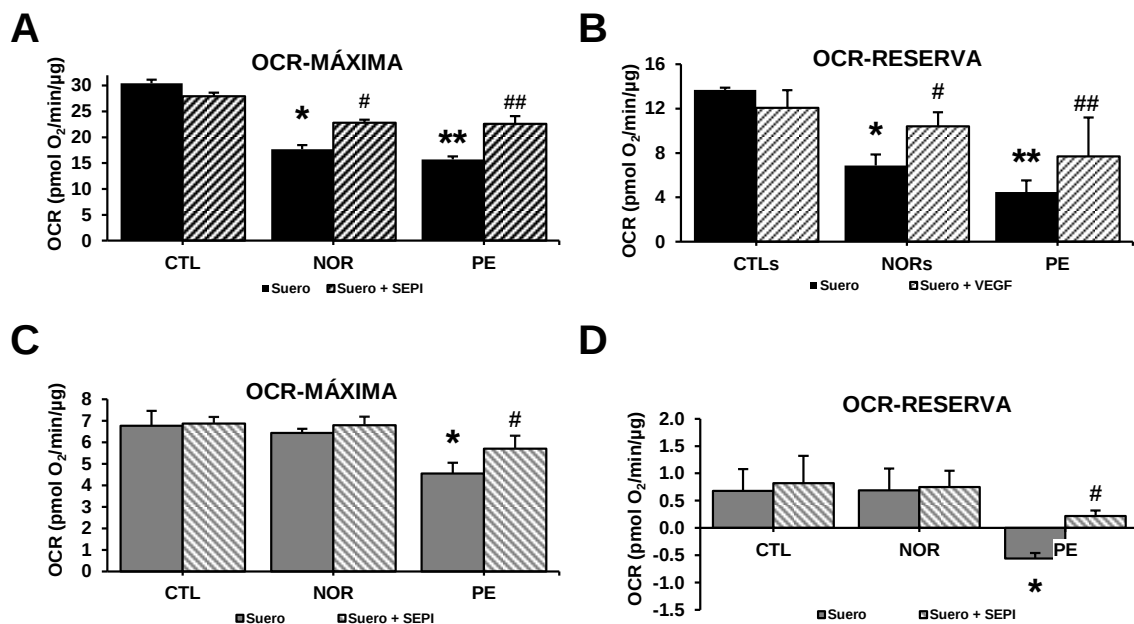


Figura 6.19 Cambios en la función energética mitocondrial luego de la administración de SEPI en modelo de correlación *in vitro* de PE establecido con el tratamiento con sueros de pacientes en CEs y trofoblastos. CEs y HTR-8/SVneo fueron sembradas en densidad de 4.0 x 10⁴ células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con sueros de pacientes en estudio (2%) control (CTLs), normotensas (NORs) y preeclámpsicas (PE) y suplementadas con SEPI 100 μM, durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent.

OCR-Máxima de (A) CEs y (B) HTR-8/SVneo. (C) OCR-Reserva de CEs y (D) HTR-8/SVneo. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto al control, # $P < 0.05$ con respecto al grupo PE. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

6.8 SEPI disminuye la producción de mROS en el modelo de correlación *in vitro* de PE.

En el capítulo anterior, “**capítulo II** de Resultados”, sección 5.6, se demostró que la administración de sueros de pacientes del grupo PE, conlleva a un incremento en la producción de mROS en CEs. Mientras que en células trofoblásticas; tanto sueros de pacientes NOR, como PE conllevan a un incremento de esta misma medición. En este capítulo, sección 6.4, también se demostró que SEPI restablece la producción de mROS en células expuestas a sFlt-1 y TNF- α . Finalmente, ya que en el modelo de correlación *in vitro* se evidenció un efecto de los sueros de pacientes en la producción de mROS; se evaluó el papel de SEPI en la formación de mROS, medido con la sonda fluorescente MitoSOX Red por microscopía de fluorescencia.

Para este fin, CEs fueron sembradas en placas de 24 pozos en densidad de 5.0×10^4 células/pozo, tratadas durante 24 horas con sueros de pacientes en estudio (2%). Al finalizar el tiempo de tratamiento, se determinó por microscopía de fluorescencia, la producción de mROS. Vale acotar que también se administró SEPI (100 μ M) en co-tratamiento, durante 24 horas. En la **figura 6.20** se muestran microfotografías de células CEs expuestas a sueros de pacientes control y preeclámpticas, así como la suplementación con SEPI. En presencia de SEPI, se disminuye significativamente la formación de mROS en función al control. Mientras que el suero PE induce la formación de mROS significativamente ($P=0.0001$). La administración de SEPI a células expuestas con suero de pacientes PE, restablece los niveles de mROS ($P=0.0002$) en comparación a células expuestas a sueros de grupo PE. Estos resultados muestran que SEPI permite abrogar la formación de mROS y restablecer sus niveles, incluso a menor escala de lo observado en el control.

Por último, en células HTR-8/SVneo (**figura 6.21**), se evaluó también el papel de SEPI en la formación de mROS en el modelo de correlación *in vitro* de PE con sueros, establecidos al igual que en el caso anterior con CEs. En concordancia con las observaciones en CEs, los trofoblastos mostraron una disminución en la formación de mROS en presencia de SEPI ($P=0.0002$). Cuando estas células fueron tratadas con sueros provenientes del grupo PE, el incremento de mROS fue significativo ($P=0.003$). Finalmente, la suplementación con SEPI, de células tratadas con sueros de pacientes del grupo PE, mostraron una disminución significativa en la formación de mROS, en niveles inferiores a los observados en el grupo control ($P=0.00004$) (**Figura 6.21**).

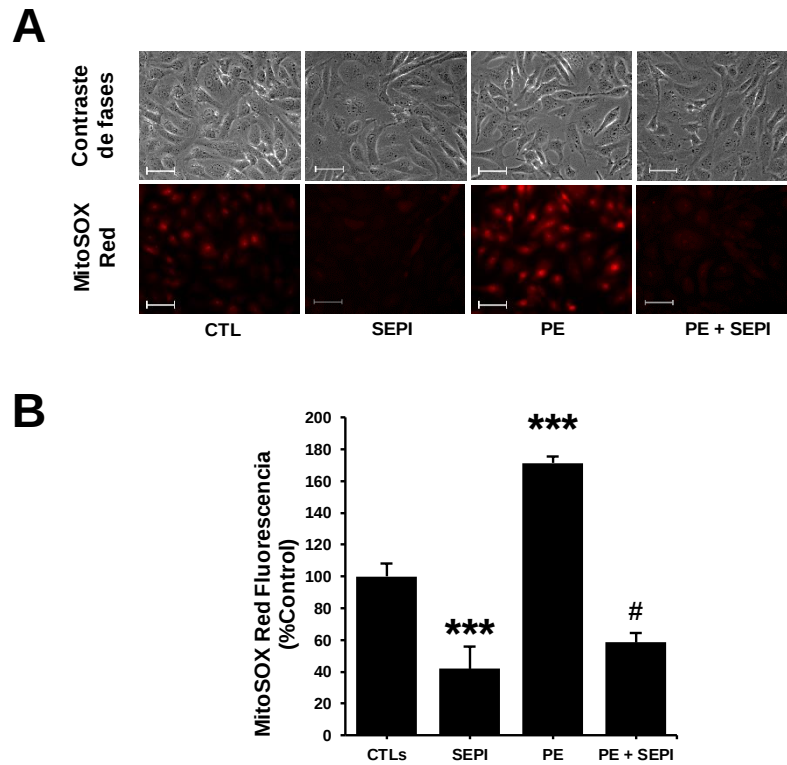


Figura 6.20 Efecto de la administración de SEPI en la formación de mROS en modelo de correlación *in vitro* de PE establecido con el tratamiento con sueros de pacientes en estudio en CEs. (A) Microscopía de contraste de fases y fluorescencia con MitoSOX Red (40X) (B) Incremento en la formación de mROS con respecto al control, 24 horas post-tratamiento con 2% de sueros de pacientes control (CTL) y preeclámpticas (PE). Además, se administró 100 μ M de SEPI para observar su efecto durante la administración de suero PE. Barra: 50 μ m. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 con respecto al control, # P <0.001 con respecto al grupo PE. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

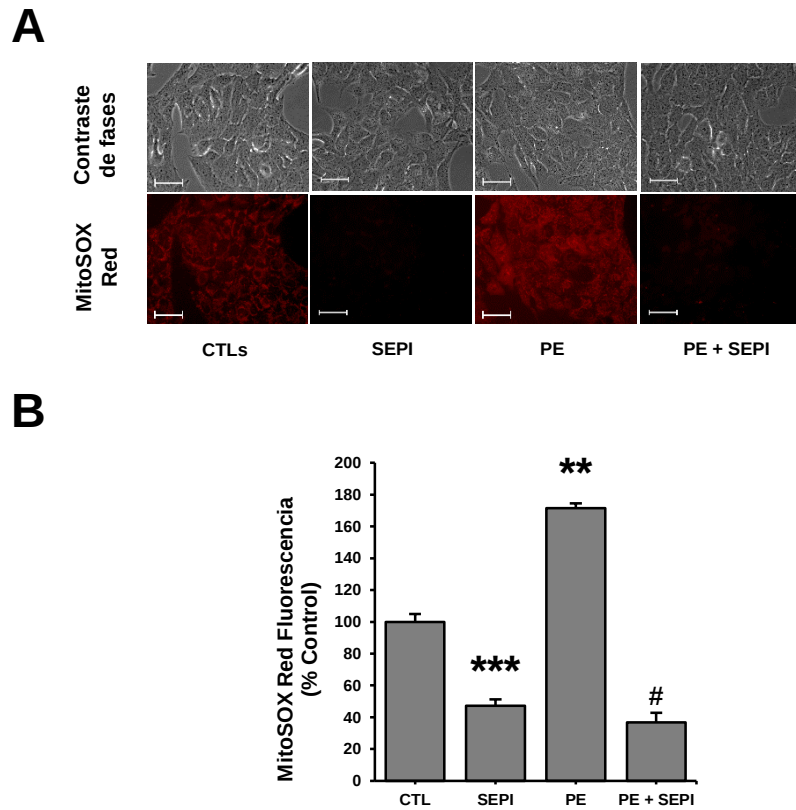


Figura 6.21 Efecto de la administración de SEPI en la formación de mROS en modelo de correlación *in vitro* de PE establecido con el tratamiento con sueros de pacientes en estudio en trofoblastos. (A) Microscopía de contraste de fases y fluorescencia con MitoSOX Red (40X) (B) Incremento en la formación de mROS con respecto al control, 24 horas post-tratamiento con 2% de sueros de pacientes control (CTL), normotensas (NOR) y preeclámpticas (PE). Además, se administró 100 μ M de SEPI para observar su efecto durante la administración de suero PE. Barra: 50 μ m. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=3), * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 con respecto al control, # P <0.001 con respecto al grupo PE. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

7. Resultados

Capítulo IV. La sepiapterina, a través de la vía salvaje, reestablece el fenotipo metabólico en CEs tratadas con sFlt-1, al funcionar como un potencial agente antioxidante.

7.1 Introducción.

El cofactor tetrahidrobiopterina (BH4), es crucial en el acoplamiento y funcionamiento de eNOS y por consiguiente en la producción de •NO (265). Más allá de sus funciones como agente acoplante de la enzima productora de •NO, otra de las funciones que se le ha atribuido a BH4, es la de agente antioxidante. Sin embargo, esta función, ha sido muy poco explorada. Patel et al., 2002 demostraron que BH4 es capaz de neutralizar ROS, mostrando inclusive mayor reactividad como antioxidante que el ácido ascórbico (204). Recientemente, Sethumadhavan et al., 2016 encontraron en un modelo *in vivo* con ratones con sobreexpresión específica de GTPCH-1 en cardiomiocitos, que niveles elevados de BH4, disminuyen significativamente el estatus redox celular, sin afectar los niveles celulares de •NO (209). Más allá de estas observaciones, se ha considerado que el papel de BH4 como agente antioxidante es improbable (265).

Sin embargo, ya hace más de 40 años, Rembold et al., 1972 demostraron que BH4 se localiza a nivel mitocondrial, doblando el contenido presente en el citoplasma (estudio hecho con mitocondrias provenientes de hepatocitos de rata). Inclusive, demostraron que BH4 es un estimulador del consumo de oxígeno mitocondrial capaz de reducir a *citocromo c* (270). En aquel entonces, Rembold et al., 1972 demostraron en otra publicación, que BH4 se incorpora en la mitocondria; y propusieron un mecanismo análogo al intercambiador glicerol-fosfato/malato para el transporte de poder reductor hacia la mitocondria (271). Además, reconocieron que el nivel de NADH intra-mitocondrial juega un papel determinante en la concentración de BH4 a nivel mitocondrial (271). Estas evidencias sugieren que BH4 efectivamente puede actuar como un potente agente antioxidante, que podría modular la actividad de los complejos mitocondriales (271).

Los hallazgos de esta investigación evidencian que SEPI, análogo precursor de BH4, es capaz de restablecer el fenotipo metabólico en CEs expuestas a FAAs como sFlt-1, además de conllevar al acoplamiento de eNOS y restablecimiento de los niveles de •NO en situaciones de DE. Pero, ¿a través de qué mecanismos moleculares SEPI logra prevenir el cambio de fenotipo metabólico en el modelo *in vitro* de PE? La respuesta a esta pregunta sugirió dos opciones; la primera, que el restablecimiento del fenotipo metabólico ocurriría vía •NO (BH4 como cofactor enzimático permitiría el restablecimiento de la producción de •NO y este mediador a su vez, por mecanismos aún no definidos, potenciaría un cambio de fenotipo metabólico con aumento del consumo de oxígeno mitocondrial). La segunda opción

correspondería a que BH4, actuaría como un agente antioxidante en la mitocondria, capaz de favorecer el consumo de oxígeno y de restablecer el fenotipo metabólico (Ver figura 7.1).

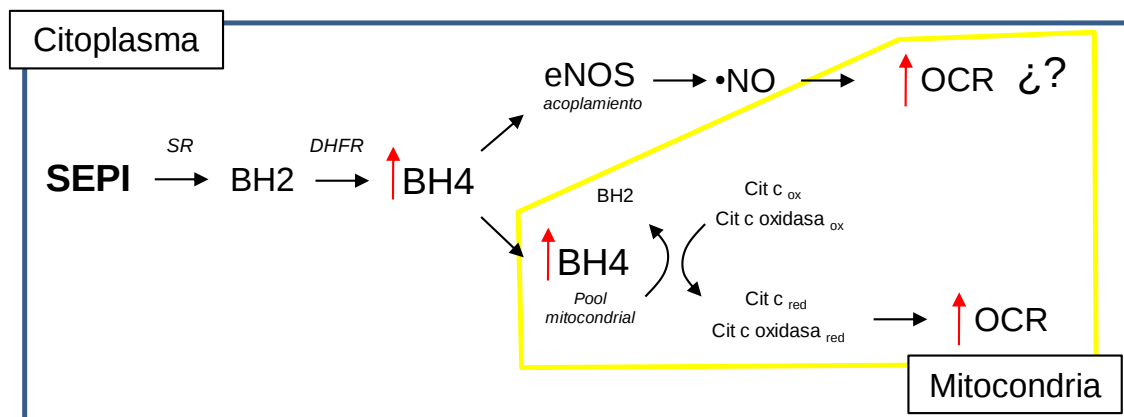


Figura 7.1 Representación esquemática de los posibles mecanismos moleculares a través de los cuáles SEPI restablece el fenotipo endotelial en el modelo *in vitro* de PE. SEPI (sepiapterina), a través de la *vía salvaje* y la acción de SR (sepiapterina reductasa) y DHFR (dihidrofolato reductasa), respectivamente; aumenta la concentración de BH4 (tetrahidrobiopterina) citoplasmática. En la primera hipótesis: BH4 acopla la enzima eNOS (sintasa de óxido nítrico endotelial), permitiendo el aumento en la producción de •NO (óxido nítrico); por mecanismos desconocidos, el •NO permitiría el aumento del OCR (consumo de oxígeno). En la segunda hipótesis: BH4 aumenta su concentración intra-mitocondrial (pool mitocondrial), permitiendo la reducción de complejos mitocondriales, Cit C_{ox}: citocromo c oxidado y Cit c oxidasa_{ox}: citocromo c oxidasa oxidado a Cit c_{red}: citocromo c reducido y Cit c oxidasa_{red}: citocromo c oxidasa reducido, lo cual favorece el consumo de oxígeno y con ello el restablecimiento del fenotipo metabólico.

Para determinar qué mecanismos moleculares estarían implicados en este efecto de SEPI a nivel metabólico, se evaluaron estas dos posibles opciones al emplear inhibidores como L-NAME y metotrexato (MTX) y donadores de •NO como la nitroglicerina (GTN).

7.2 Papel del •NO en el restablecimiento del fenotipo metabólico en CEs, luego de la administración exógena de sFlt-1.

La primera hipótesis que se abordó en este capítulo, corresponde a que el •NO sería el responsable del restablecimiento del fenotipo metabólico observado en CEs expuestas a sFlt-1 y SEPI. Tal como se evidenció en secciones anteriores de esta investigación; sFlt-1 es capaz de conllevar a un cambio de fenotipo metabólico en CEs, de un fenotipo bioenergético mitocondrial a un fenotipo glucolítico (**capítulo I de Resultados**). Además, en la sección **capítulo III de Resultados**, se observó que la administración de SEPI, restablece la producción de •NO y también restablece el fenotipo metabólico mitocondrial en CEs expuestas a sFlt-1. Sin embargo, los mecanismos moleculares que permiten estos efectos no fueron respondidos en dicho capítulo. Ya que SEPI, es conocida por prevenir el

desacoplamiento de eNOS y por ende de mantener la producción de •NO, las observaciones de esta investigación sugirieron que probablemente el •NO estaría involucrado en este efecto metabólico que SEPI tiene en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial.

Vale destacar que en la sección “**capítulo III** de Resultados”, se demostró que la administración de SEPI (100 μ M) no conlleva a un aumento estadísticamente significativo en la producción de •NO en CEs en condiciones basales (ver **tabla 6.1** y **figura 6.1** en sección “**capítulo III** de Resultados”). En células tratadas con sFlt-1 y TNF- α , así como en el modelo de correlación *in vitro* establecido con sueros de pacientes en estudio, SEPI permitió restablecer los niveles de •NO. Sin embargo, el restablecimiento de los mismos fue siempre significativamente menor con respecto al control y a las células tratadas con SEPI (ver **tabla 6.1** y **figuras 6.1** y **6.18**, en sección “**capítulo III** de Resultados”). Esta observación desfavorece la aceptación de la hipótesis en cuestión, ya que de haberse encontrado niveles de •NO significativamente mayores a los medidos en el control o inclusive niveles significativamente mayores de ONOO⁻ (“**capítulo III** de Resultados”) en presencia de SEPI, se sugeriría que •NO es el responsable de estos eventos.

Ya que la administración de SEPI si restableció la producción de •NO en CEs sometidas a tratamiento con sFlt-1, TNF- α y sueros de pacientes; el siguiente enfoque de esta investigación se enfocó en conocer el papel del •NO en la función bioenergética mitocondrial de CEs expuestas a sFlt-1. Se logró este enfoque al inhibir competitivamente la actividad de la enzima eNOS, empleando el inhibidor L-NG-Nitroarginine methyl ester (L-NAME) en concentración de 2 mM. En la **tabla 7.1** se representan los resultados obtenidos de consumo de oxígeno en CEs expuestas a sFlt-1, tratadas con SEPI (100 μ M) y además con tratamiento con L-NAME (2 mM).

Tratamiento	Consumo de oxígeno (OCR) pmol O ₂ /min/ μ g de proteína				
	OCR-Máximo	OCR-Reserva	OCR-Basal	OCR-ATP	OCR-Fuga de protones
Control	21.47 $\pm$ 1.7	10.29 $\pm$ 1.5	11.28 $\pm$ 0.5	10.02 $\pm$ 0.4	1.27 $\pm$ 0.2
sFlt-1 (50 ng/mL)	13.35 $\pm$ 0.3	0.26 $\pm$ 0.06	12.09 $\pm$ 0.6	11.98 $\pm$ 0.6	1.12 $\pm$ 0.1
SEPI (100 μ M)	21.45 $\pm$ 1.8	9.47 $\pm$ 1.3	11.98 $\pm$ 0.5	10.94 $\pm$ 0.6	0.4 $\pm$ 0.3
L-NAME (2 mM)	19.23 $\pm$ 1.8	9.22 $\pm$ 1.1	11.01 $\pm$ 1.0	9.61 $\pm$ 0.7	1.04 $\pm$ 0.1
sFlt-1 (50 ng/mL) + SEPI (100 μ M) + L-NAME (2 mM)	18.66 $\pm$ 1.0	18.66 $\pm$ 1.0	12.63 $\pm$ 0.3	11.70 $\pm$ 0.3	0.98 $\pm$ 0.2

Tabla 7.1 Consumo de oxígeno (OCR) de CEs tratadas con sFlt-1, SEPI y L-NAME. El tratamiento con; sFlt-1 (50 ng/mL), SEPI (100 μ M) y L-NAME (2 mM) se empleó durante 24 horas en CEs, los parámetros de bioenergética mitocondrial se determinaron por la tecnología Seahorse-Agilent. OCR-Máximo: Consumo de oxígeno máximo, OCR-Reserva: Capacidad de reserva respiratoria, OCR-

Basal: Consumo de oxígeno basal, OCR-ATP: Consumo de oxígeno acoplado a la producción de ATP, OCR-Fuga de protones: Consumo de oxígeno acoplado a la fuga de protones.

En la **Figura 7.2 A** se representa esquemáticamente el OCR de CEs tratadas con sFlt-1 (50 ng/mL), SEPI (100µM) y L-NAME (2 mM) con respecto al tiempo. La evaluación de la bioenergética mitocondrial por la tecnología Seahorse-Agilent, permitió observar que el OCR en CEs tratadas con sFlt-1 (50 ng/mL), tal como ha sido previamente establecido en esta investigación, afecta el OCR-Máximo, mientras que la administración de SEPI (100µM) y L-NAME (2 mM) no tienen efecto en esta determinación. El OCR-Máximo en CEs tratadas con sFlt-1 presentó un valor de P de 0.001 (**Figura 7.2 B**). Cuando se administró L-NAME (2 mM) junto a sFlt-1 (50 ng/mL) y SEPI (100µM), se observó una tendencia del OCR-Máximo a disminuir. Sin embargo, esta ligera disminución no fue significativa estadísticamente. En consistencia a esta determinación; la medición del OCR-Reserva que representa la capacidad respiratoria máxima de las células, se encontró significativamente disminuida en CEs tratadas con sFlt-1 ($P=0.0001$). Cuando se evaluó el papel del •NO al añadir L-NAME (2 mM) a CEs tratadas con sFlt-1 (50 ng/mL) y SEPI (100µM), se observó una diferencia significativa con respecto al control, así mismo se observó una diferencia significativa con respecto a células tratadas con sFlt-1, ya que se mejoró el OCR-Reserva en más de seis unidades de medición ($P=0.02$) (**Figura 7.2 C**).

Los resultados de OCR-Basal, representados en la **tabla 7.1**, muestran que no existen cambios estadísticamente significativos con ninguno de los tratamientos aplicados ($P=0.3$) (**Figura 7.2 D**). Con respecto al OCR-ATP, se observó gran variabilidad en los resultados obtenidos, a pesar de las diferencias, desde el punto de vista estadístico, estas no fueron significativas (**Figura 7.2 E**). Finalmente, el OCR acoplado a la fuga de protones, la administración de sFlt-1 no mostró diferencias significativas con respecto al control, la administración de SEPI (100µM) disminuyó significativamente esta medición ($P=0.003$), mientras que al administrar L-NAME (2 mM) también se observó una disminución significativa. Vale acotar que cuando se co-administró sFlt-1 (50 ng/mL) + SEPI (100µM) + L-NAME (2 mM), también se observó una disminución significativa del OCR-Fuga de protones, con respecto al control ($P=0.001$), el análisis estadístico también mostró una mejoría significativa de esta medición, al comparar con las mediciones en células tratadas con sFlt-1 ($P=0.02$) (**Figura 7.2 F**).

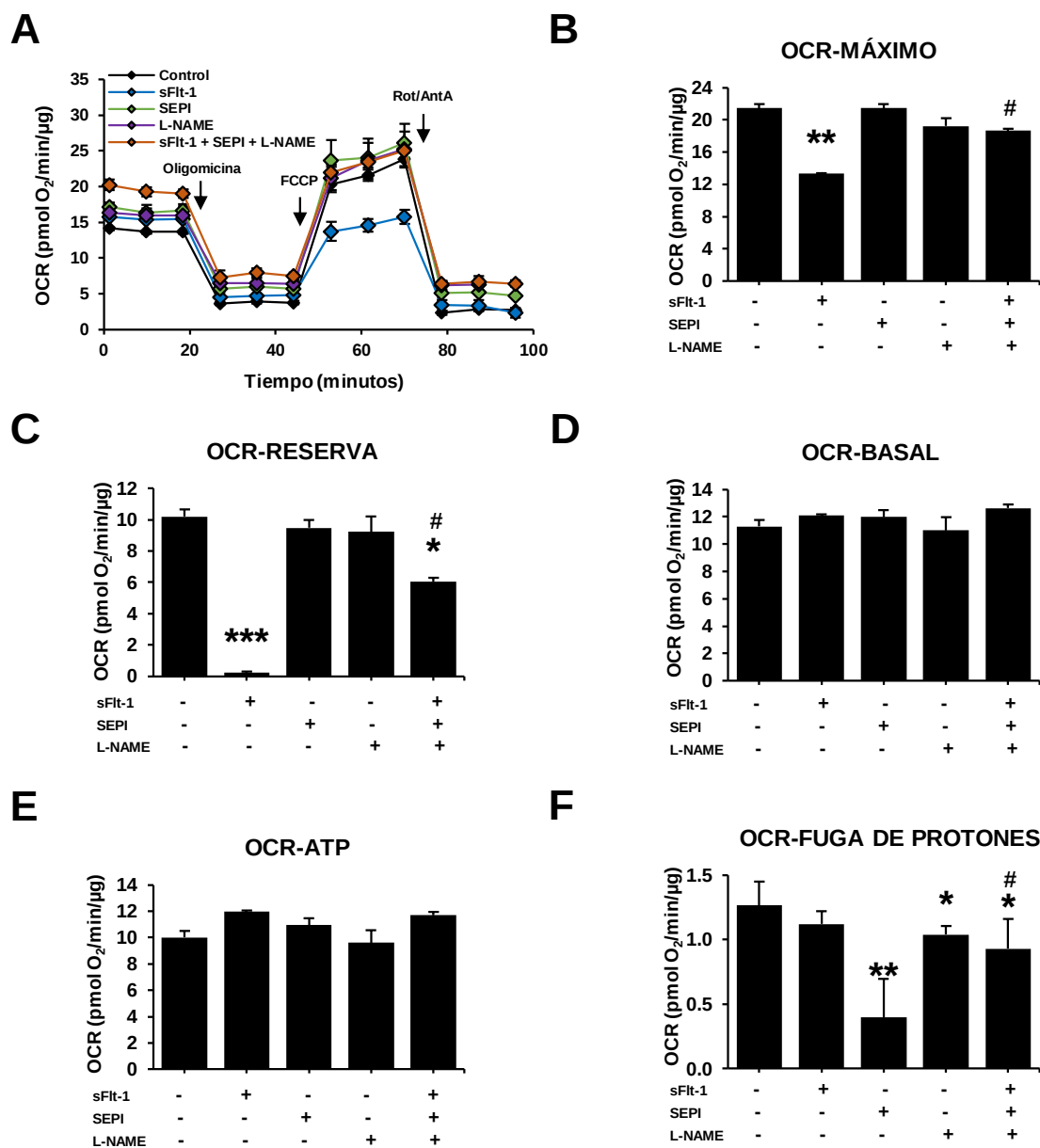


Figura 7.2 Función bioenergética mitocondrial de CE's tratadas con sFlt-1, SEPI y L-NAME. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con sFlt-1 (50 ng/mL), SEPI (100μM) y L-NAME (2 mM), durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-Fuga de protones. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto al control, # $P < 0.05$ con respecto a células tratadas con 50 ng/mL de sFlt-1. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

En base a los resultados obtenidos, se calculó el fenotipo metabólico de CEs expuestas a tratamiento con sFlt-1 (50 ng/mL), suplementadas con SEPI (100 μ M) y además tratadas con el inhibidor competitivo de eNOS, L-NAME (2 mM). En la **tabla 7.2** se resumen las mediciones de OCR-Basal, OCR-Estresado, ECAR-Basal y ECAR-Estresado de los diversos tratamientos en estudio. Además, en la **figura 7.3** se representan estos resultados gráficamente. En la **figura 7.3 A** se evidencia el fenotipo metabólico, es interesante que la co-administración de sFlt-1 + SEPI + L-NAME logra mejorar el fenotipo metabólico, sin embargo, no se logra un restablecimiento a nivel del control. En la **figura 7.3 C** y **D**, respectivamente, se observa el efecto en el OCR que ejerce sFlt-1 cuando se administra en presencia de SEPI y L-NAME; en este caso, se observa que la administración de L-NAME no desfavorece el OCR en CEs expuestas a SEPI. Sin embargo, se observó una tendencia a su disminución. Cuando se compara esta medición con células tratadas con sFlt-1 únicamente, se observa que el consumo de oxígeno mejora significativamente ($P=0.02$) (**Figura 7.3 C**). Mientras que con respecto al ECAR, los efectos de sFlt-1 en el aumento de la acidificación celular permanecen cuando se administra SEPI + L-NAME, siendo significativamente mayores con respecto al control ($P=0.03$) (**Figura 7.3 D**).

Tratamiento	Fenotipo metabólico			
	Consumo de oxígeno (OCR) pmol O ₂ /min/ μ g de proteína		Acidificación extracelular (ECAR) mpH/min/ μ g de proteína	
	OCR-Basal	OCR-Estresado	ECAR-Basal	ECAR-Estresado
Control	13.64 $\pm$ 0.90	23.83 $\pm$ 2.23	1.01 $\pm$ 0.15	5.55 $\pm$ 0.42
sFlt-1 50 (ng/mL)	15.47 $\pm$ 1.02	15.74 $\pm$ 0.49	1.26 $\pm$ 0.20	7.65 $\pm$ 0.5
SEPI 100 μM	16.41 $\pm$ 0.90	27.35 $\pm$ 2.75	1.08 $\pm$ 0.08	5.48 $\pm$ 0.27
L-NAME (2 mM)	17.25 $\pm$ 0.99	27.33 $\pm$ 2.32	1.16 $\pm$ 0.19	5.87 $\pm$ 0.43
sFlt-1 50 ng/mL + (SEPI 100 μM) + L-NAME (2 mM)	19.02 $\pm$ 0.42	25.06 $\pm$ 1.39	2.32 $\pm$ 0.15	7.16 $\pm$ 0.23

Tabla 7.2 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de células CEs tratadas con sFlt-1, SEPI y L-NAME. El tratamiento con; sFlt-1 (50 ng/mL), SEPI (100 μ M) y L-NAME (2 mM) se empleó durante 24 horas. OCR-Basal: consumo de oxígeno basal, OCR-Estresado: consumo de oxígeno luego de la administración de FCCP, ECAR-Basal: acidificación extracelular basal, ECAR-Estresado: acidificación extracelular luego de la administración de FCCP.

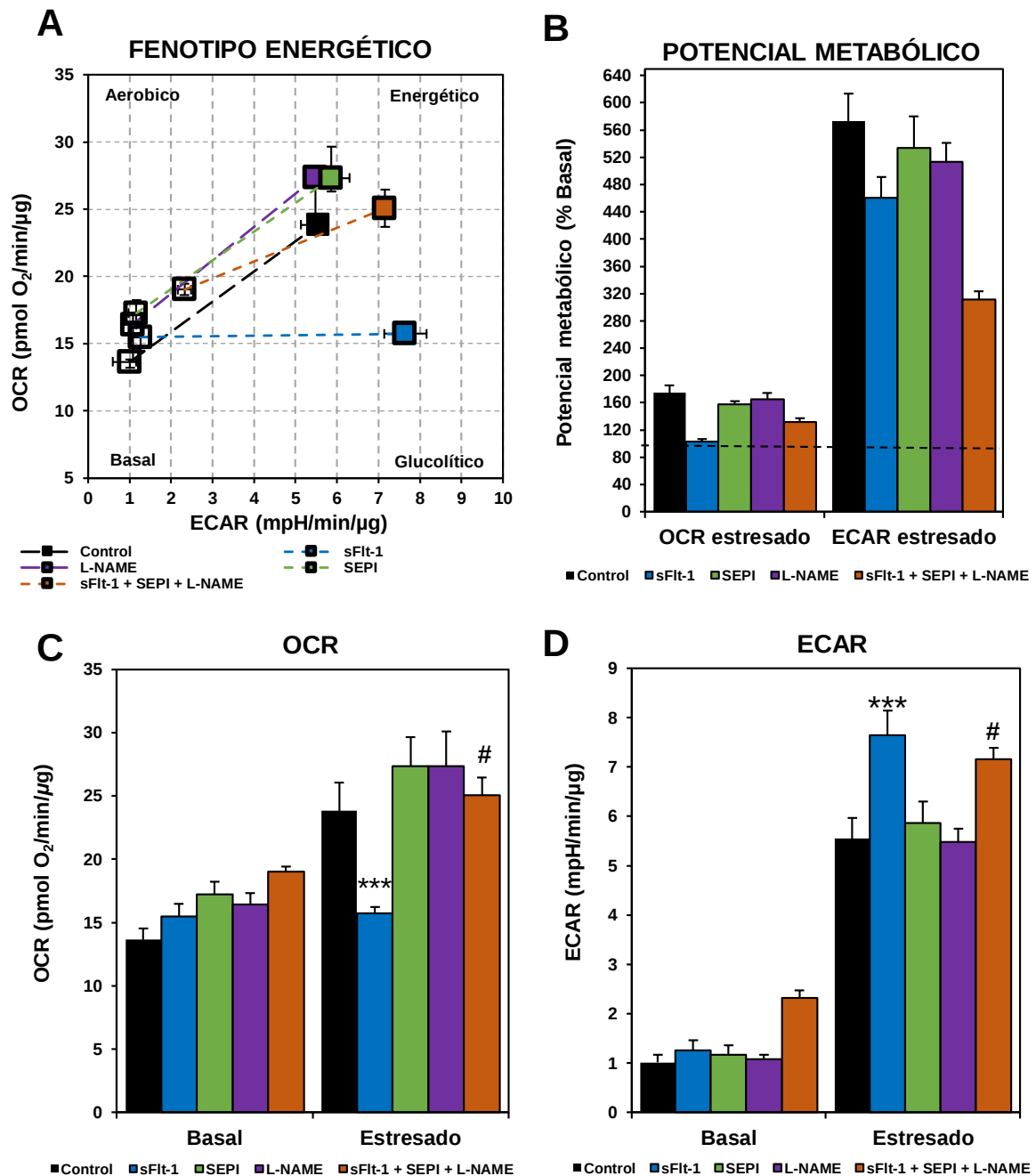


Figura 7.3 Fenotipo metabólico de CE tratadas con sFlt-1, SEPI y L-NAME. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con sFlt-1 (50 ng/mL), SEPI (100 μ M) y L-NAME (2 mM), durante 24 horas. Se determinó el fenotipo metabólico empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Fenotipo energético, (B) potencial metabólico, (C) OCR y (D) ECAR. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 con respecto al control, # P <0.05 con respecto a células tratadas con 50 ng/mL de sFlt-1. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Los resultados observados en esta sección, donde se inhibió la producción de $\bullet\text{NO}$, al emplear el inhibidor competitivo de L-arginina, L-NAME, muestran que al inhibir la producción de $\bullet\text{NO}$, los efectos de SEPI son parcialmente limitados. El $\bullet\text{NO}$ quizás no juega un papel central en el restablecimiento de la bioenergética mitocondrial, mediada por la suplementación con SEPI. Pero, su papel en el acoplamiento y mejoramiento en la producción de $\bullet\text{NO}$ si está involucrado en el mecanismo de acción de SEPI.

En otras investigaciones, se ha reconocido el papel de $\bullet\text{NO}$ como un potente inhibidor de la respiración mitocondrial (272). Es interesante que, en esta investigación se muestre que el $\bullet\text{NO}$ sí podría estar involucrado en el mecanismo de SEPI para restablecer el fenotipo metabólico. Vale destacar que observaciones previas relacionadas al papel de $\bullet\text{NO}$ como inhibidor de la respiración mitocondrial indican que el $\bullet\text{NO}$ interactúa con la CTE de diferentes maneras:

- a) El $\bullet\text{NO}$ causa una inhibición rápida, selectiva e irreversible del citocromo c oxidasa y,
- b) las especies reactivas de nitrógeno (RNS), tal como ONOO^- , entre otras, causan inhibición lenta, no selectiva e irreversible de diversos componentes mitocondriales (272).

Por lo tanto, el $\bullet\text{NO}$ podría causar citotoxicidad y estar involucrado en la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mROS) al afectar la respiración mitocondrial (273). Para constatar el papel del $\bullet\text{NO}$ en estos efectos protectores de la función bioenergética mitocondrial de SEPI, se evaluó el papel de nitroglicerina (GTN), donador de $\bullet\text{NO}$, en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial de CEs tratada con sFlt-1.

La nitroglicerina o glicerol trinitrato (GTN), fue descubierta en 1847 por Ascanio Sobrero y hoy en día cuenta con más de 160 años desde que ha comenzado a emplearse con fines terapéuticos (274). Es importante recalcar que GTN posee varios mecanismos de liberación para el $\bullet\text{NO}$; uno de ellos involucra la interacción entre nitroglicerina y receptores celulares sulfhidrilos (-SH), la administración repetida de GTN conlleva al agotamiento de -SH por oxidación y con ello conlleva a tolerancia a GTN (275). Otro mecanismo de bio-activación de GTN involucra la actividad de enzimas aldehído deshidrogenasas mitocondriales que intervienen en la reducción de nitroglicerina a nitrito y $\bullet\text{NO}$ (275). Además, Bonini et al., 2008 demostró que GTN activa las sintasas de óxido nítrico constitutivas (NOS), como una ruta de GTN para mediar vasodilatación (276). En su investigación, Bonini demostró con el empleo de inhibidores de eNOS, tal como; *L-N⁵-(1-iminoethyl) ornithine dihydrochloride* (L-NIO), la inhibición de los efectos de GTN en la disminución de la presión arterial en un modelo *in vivo* con ratas (276). Años después, su grupo de investigación demostró que la activación de NOS por GTN ocurre vía PI-3K/Akt (277).

Para probar el papel del $\bullet$ NO en el restablecimiento de la función endotelial en CEs expuestas a sFlt-1, se empleó GTN en concentración de 1 μ M. Además, se empleó L-NAME (2 mM) para inhibir competitivamente a la enzima eNOS; en la **tabla 7.3** se resumen las mediciones de OCR en CEs luego de la administración de sFlt-1 (50 ng/mL), GTN (1 μ M) y L-NAME (2 mM).

Tratamiento	Consumo de oxígeno (OCR) pmol O ₂ /min/ μ g de proteína				
	OCR-Máximo	OCR-Reserva	OCR-Basal	OCR-ATP	OCR-Fuga de protones
Control	23.64 $\pm$ 0.8	14.74 $\pm$ 0.9	8.89 $\pm$ 0.3	7.73 $\pm$ 0.3	1.16 $\pm$ 0.1
GTN (1 μ M)	22.67 $\pm$ 2.1	14.08 $\pm$ 1.8	8.59 $\pm$ 0.3	7.74 $\pm$ 0.4	0.85 $\pm$ 0.1
L-NAME (2 mM)	23.41 $\pm$ 1.4	13.70 $\pm$ 1.6	9.71 $\pm$ 0.5	8.51 $\pm$ 0.2	1.19 $\pm$ 0.6
sFlt-1 (50 ng/mL) + GTN (1 μ M) + L-NAME (2 mM)	19.01 $\pm$ 1.0	7.61 $\pm$ 0.8	10.40 $\pm$ 0.3	9.18 $\pm$ 0.3	2.23 $\pm$ 0.2

Tabla 7.3 Consumo de oxígeno (OCR) de células CEs tratadas con sFlt-1, GTN y L-NAME. El tratamiento con; sFlt-1 (50 ng/mL), GTN (1 μ M) y L-NAME (2 mM) se empleó durante 24 horas. OCR-Máximo: Consumo de oxígeno máximo, OCR-Reserva: Capacidad de reserva respiratoria, OCR-Basal: Consumo de oxígeno basal, OCR-ATP: Consumo de oxígeno acoplado a la producción de ATP, OCR-Fuga de protones: Consumo de oxígeno acoplado a la fuga de protones.

En la **figura 7.4 A** se evidencia el consumo de oxígeno con respecto al tiempo de CEs sometidas a los tratamientos ya descritos. El OCR-Máximo determinado, mostró diferencias estadísticamente significativas en el grupo de células tratadas con sFlt-1 + GTN + L-NAME, con respecto al control ($P=0.02$) (**Figura 7.4 B**). En concordancia a esta observación, el OCR-Reserva medido demostró que, bajo este mismo tratamiento, se evidencia una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($P=0.001$) (**Figura 7.4 C**). Estas observaciones sugieren que L-NAME, actuando como inhibidor de eNOS, permite la inhibición de la formación de $\bullet$ NO y con ello, los efectos protectores en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial en células sometidas a tratamiento con sFlt-1.

Entre otras mediciones realizadas, no se encontraron diferencias estadísticas con respecto al OCR-Basal bajo los diversos tratamientos aplicados ($P=0.62$) (**Figura 7.4 D**). El OCR acoplado a la producción de ATP, no fue diferente estadísticamente; ($P=0.23$) (**Figura 7.4 E**). Mientras que, con respecto al OCR acoplado a la fuga de protones, se observó una diferencia significativa en el grupo de células tratadas con sFlt-1 + GTN + L-NAME, con respecto al control ($P=0.002$) (**Figura 7.4 F**).

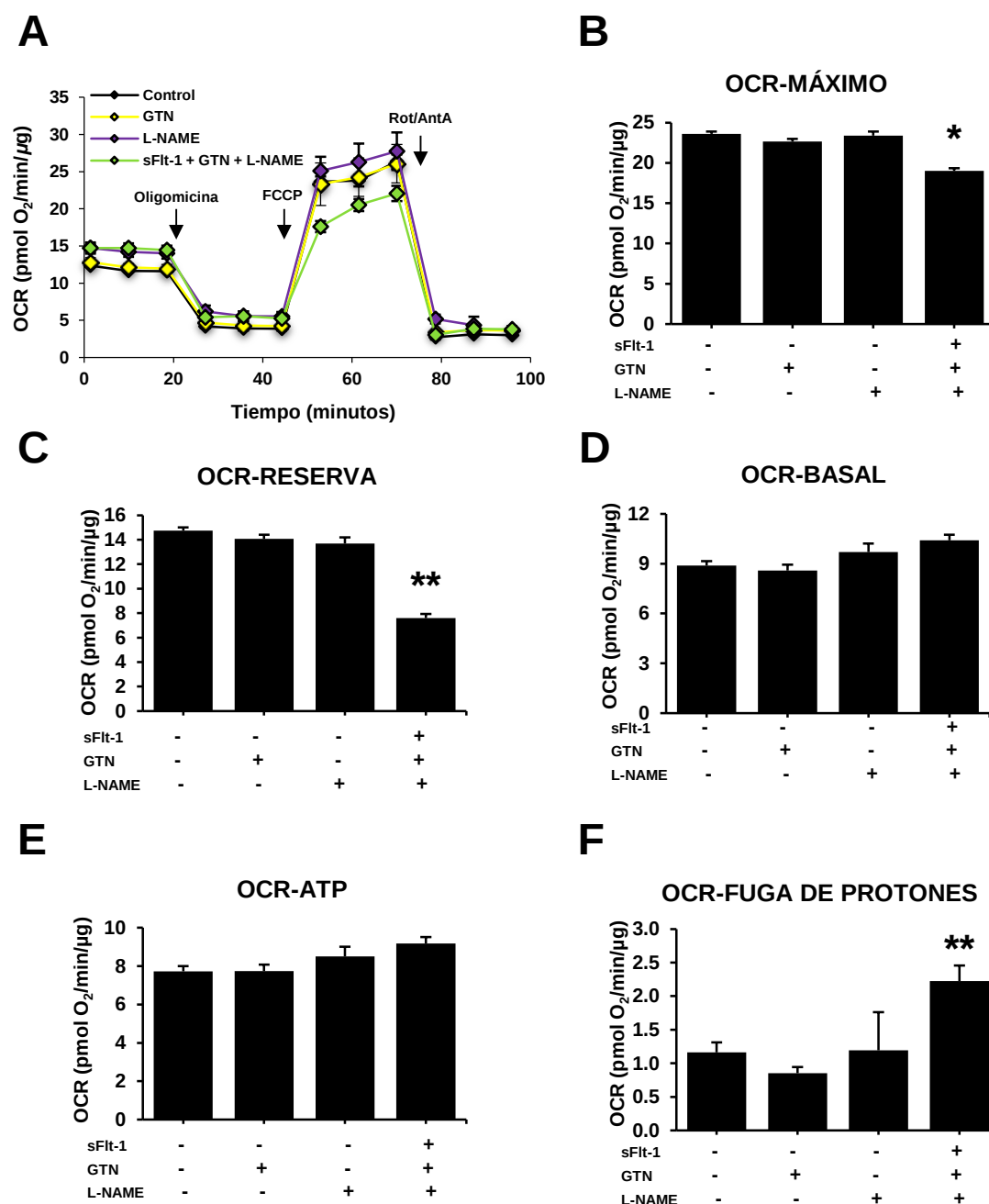


Figura 7.4 Función bioenergética mitocondrial de CE's tratadas con sFlt-1, GTN y L-NAME. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con sFlt-1 (50 ng/mL), GTN (1μM) y L-NAME (2 mM), durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-Fuga de protones. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto al control. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

Los resultados obtenidos con respecto al fenotipo metabólico se muestran en la **tabla 7.4**. Al estudiar el fenotipo metabólico de CEs tratadas con sFlt-1, GTN y L-NAME, se observó que en células expuestas a estos tratamientos que, el OCR-basal tiende a ser significativamente mayor con respecto al control, sin ser estadísticamente significativo ($P=0.06$) (**Figura 7.4 C**). De la misma manera, el OCR-Estresado determinado fue mucho menor en este grupo de estudio, en comparación con el control ($P=0.003$) (**Figura 7.4 C**). Por otra parte, se observó que el ECAR-Basal fue significativamente mayor en el grupo de células expuestas a sFlt-1 + GTN + L-NAME, con respecto al control ($P=0.03$) (**Figura 7.4 D**). Finalmente, el ECAR-Estresado determinado demostró que en presencia de sFlt-1 + GTN + L-NAME aumenta significativamente en comparación con el control ($P=0.005$) (**Figura 7.4 D**).

Tratamiento	Fenotipo metabólico			
	Consumo de oxígeno (OCR) pmol O ₂ /min/μg de proteína		Acidificación extracelular (ECAR) mpH/min/μg de proteína	
	OCR-Basal	OCR-Estresado	ECAR-Basal	ECAR-Estresado
Control	11.61 ± 0.12	26.36 ± 0.94	1.18 ± 0.09	4.89 ± 0.16
GTN 1 μM	11.98 ± 0.55	26.06 ± 2.59	1.43 ± 0.22	5.44 ± 0.34
L-NAME (2 mM)	14.03 ± 0.71	27.74 ± 2.53	1.66 ± 0.21	5.92 ± 0.34
sFlt-1 50 (ng/mL) + (GTN 1 μM) + L-NAME (2 mM)	14.45 ± 0.61	22.05 ± 1.03	2.80 ± 0.28	7.35 ± 0.44

Tabla 7.4 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de CEs tratadas con sFlt-1, GTN y L-NAME. El tratamiento con; sFlt-1 (50 ng/mL), GTN (1 μM) y L-NAME (2 mM) se empleó durante 24 horas. OCR-Basal: consumo de oxígeno basal, OCR-Estresado: consumo de oxígeno luego de la administración de FCCP, ECAR-Basal: acidificación extracelular basal, ECAR-Estresado: acidificación extracelular luego de la administración de FCCP.

GTN es un vasodilatador potente cuyo efecto farmacológico ha sido considerado que es dependiente de la generación de •NO (277). Los mecanismos a través de los cuales GTN produce •NO han sido investigados durante más de 100 años. En esta investigación, una desventaja de emplear GTN como donador de •NO, es que su liberación y efecto vasodilatador puede ocurrir por diversos mecanismos, que incluyen; la actividad de enzimas como xantina oxidasa, glutatióna S-transferasa, y la enzima aldehído deshidrogenasa mitocondrial (ALDH-2) (276, 277).

Los mecanismos a través de los cuales GTN libera •NO en el modelo *in vitro* de PE empleado en esta investigación, podrían no ser los más adecuados para permitir evidenciar el efecto del •NO en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial. Por consiguiente, para tener un acercamiento más concluyente en el papel del •NO en el restablecimiento del fenotipo metabólico en células endoteliales tratadas con sFlt-1, se propone el empleo de otros donadores de •NO.

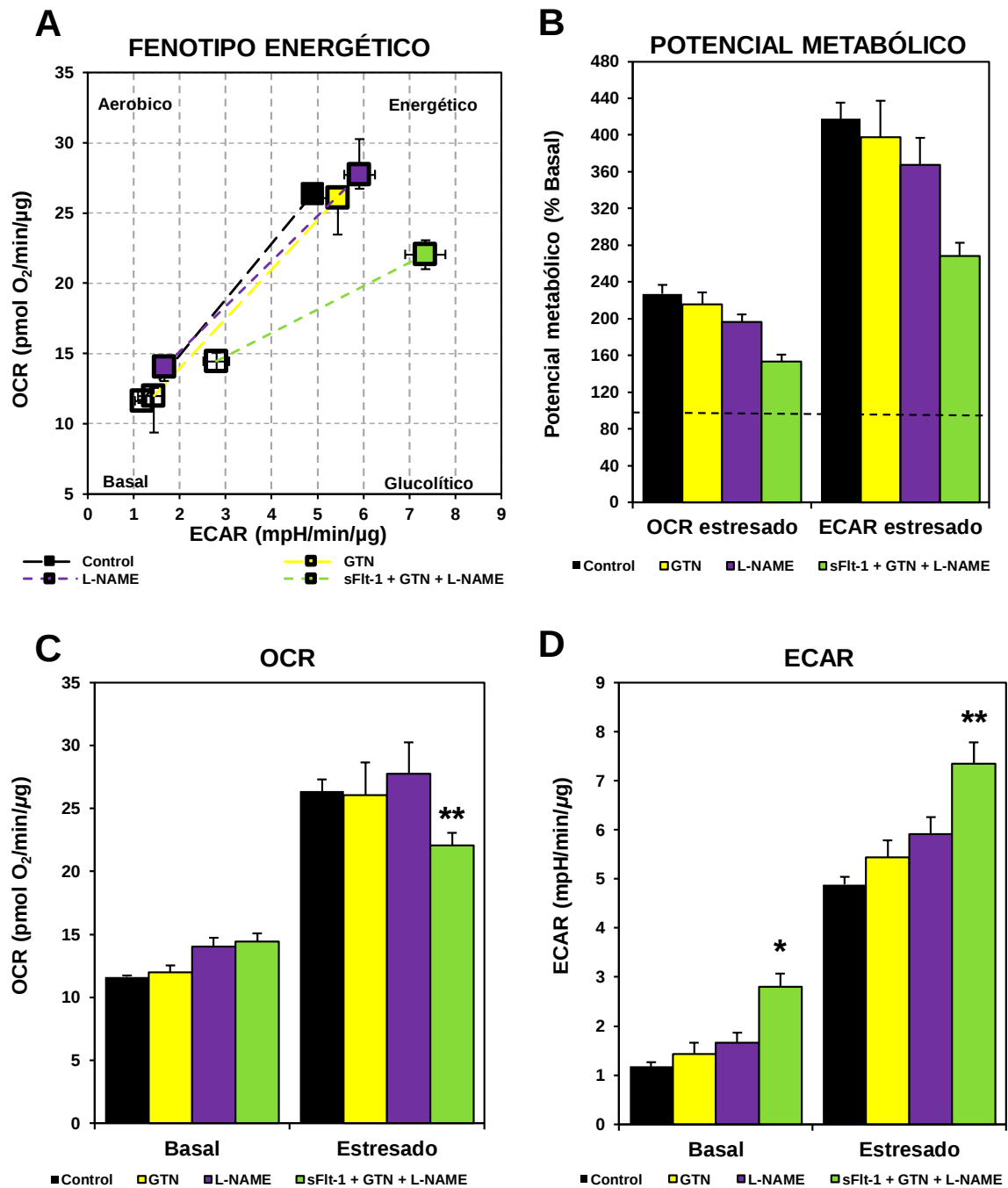


Figura 7.5 Fenotipo metabólico de CE tratadas con sFlt-1, GTN y L-NAME. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con sFlt-1 (50 ng/mL), GTN (1 μM) y L-NAME (2 mM), durante 24 horas. Se determinó el fenotipo metabólico empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Fenotipo energético, (B) potencial metabólico, (C) OCR y (D) ECAR. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto al control. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

7.3 La conversión de BH2 a BH4 vía DHFR es esencial para el restablecimiento del fenotipo metabólico en CEs en el modelo *in vitro* de PE.

Para entender mejor el papel de SEPI en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial de células tratadas con sFlt-1; se evaluó su papel como potencial agente antioxidante mitocondrial. En secciones anteriores de esta investigación, se demostró que SEPI es capaz de abrogar la producción de superóxido de origen mitocondrial. Además, la producción de ROS ($O_2^{\cdot-}$) también disminuye significativamente en presencia de SEPI, en células tratadas con sFlt-1 (Sección “**capítulo III** de Resultados”). Estas observaciones sugirieron que SEPI, podría actuar como un “scavenger” o neutralizador de ROS y con esto, mejorar la respiración mitocondrial en células que se encuentran bajo tratamiento con disruptores de la mitocondria, tal como sFlt-1.

Para probar esta hipótesis, se inhibió el metabolismo de SEPI a BH4 por la vía salvaje, al inhibir la actividad de la enzima DHFR. Esta enzima permite la reducción de BH2 a BH4, la cual, corresponde a la molécula biológicamente activa y que tendría actividad potencial como antioxidante. Para lograr la inhibición de DHFR se empleó la droga MTX en concentración de 100 μ M. Se evaluó la función bioenergética mitocondrial y fenotipo metabólico de CEs expuestas a sFlt-1, SEPI y MTX. En primer lugar, se determinó la dosis de MTX más aceptable para causar un efecto inhibitorio de DHFR que no conllevara a muerte celular, dado que MTX es una droga citotóxica.

Con esta finalidad, se realizó un ensayo de viabilidad con la prueba de MTT. En la **figura 7.5** se representan los resultados del ensayo de MTT, expresados en función al control. Se emplearon tratamientos con MTX en concentraciones de: 12.5, 25, 50, 100 y 5000 μ M y se obtuvieron resultados en función al control de: 90, 91, 87, 82 y 53 %, respectivamente. La concentración de 5000 μ M de MTX conllevó a la pérdida de viabilidad celular en un 47% ($P=0.003$), por lo tanto se empleó la concentración de: 100 μ M, que conllevó a una viabilidad de más del 80% y que además, en otras investigaciones ha sido reportada como la concentración a emplear en modelos *in vitro* (278, 279).

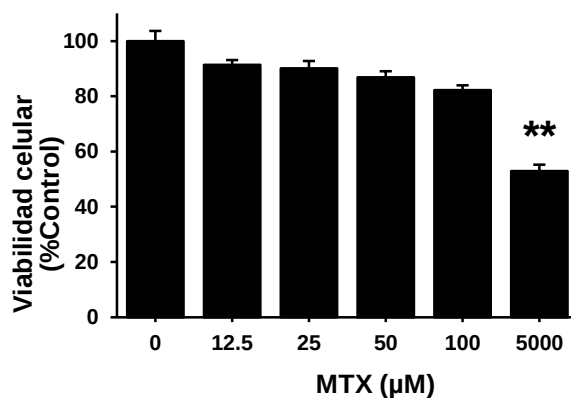


Figura 7.6 Viabilidad celular de CE expuestas a diferentes concentraciones de MTX. La droga metotrexato (MTX) se administró en concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 5000 µM. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT, luego de administrar tratamientos durante 24 horas. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM con respecto al control. (n=3), * P <0.05, ** P <0.01 con respecto al control. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

A continuación, se evaluó la importancia del metabolismo de SEPI a BH₄, vía DHFR, como mecanismo molecular que permite los efectos de SEPI en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial de CE expuestas a sFlt-1. En la **tabla 7.5** se representan los datos obtenidos con respecto al consumo de oxígeno de CE que fueron tratadas con sFlt-1, SEPI Y MTX.

Tratamiento	Consumo de oxígeno (OCR) pmol O ₂ /min/µg de proteína				
	OCR-Máximo	OCR-Reserva	OCR-Basal	OCR-ATP	OCR-Fuga de protones
Control	30.47 $\pm$ 2.1	20.51 $\pm$ 2.1	9.95 $\pm$ 0.1	8.93 $\pm$ 0.2	1.03 $\pm$ 0.2
SEPI (100 µM)	31.85 $\pm$ 1.1	22.03 $\pm$ 1.0	9.81 $\pm$ 0.2	9.48 $\pm$ 0.3	0.80 $\pm$ 0.1
MTX (100 µM)	30.54 $\pm$ 1.1	18.76 $\pm$ 1.7	11.78 $\pm$ 0.6	10.32 $\pm$ 0.6	1.44 $\pm$ 0.2
sFlt-1 (50 ng/mL) + SEPI (100 µM) + MTX (100 µM)	23.77 $\pm$ 2.5	11.81 $\pm$ 2.0	11.96 $\pm$ 1.0	10.99 $\pm$ 0.8	0.97 $\pm$ 0.2

Tabla 7.5 Consumo de oxígeno (OCR) de células CE tratadas con sFlt-1, SEPI y MTX. El tratamiento con; sFlt-1 (50 ng/mL), SEPI (100 µM) y MTX (100 µM) se empleó durante 24 horas. OCR-Máximo: Consumo de oxígeno máximo, OCR-Reserva: Capacidad de reserva respiratoria, OCR-Basal: Consumo de oxígeno basal, OCR-ATP: Consumo de oxígeno acoplado a la producción de ATP, OCR-Fuga de protones: Consumo de oxígeno acoplado a la fuga de protones.

En la **figura 7.6 A** se muestran los datos de consumo de oxígeno con respecto al tiempo, de CE sometidas a los tratamientos ya descritos. La evaluación de la bioenergética mitocondrial por la tecnología Seahorse-Agilent, permitió observar

que el OCR-Máximo determinado en CEs tratadas con SEPI y MTX no es diferente estadísticamente con respecto al control ($P=0.13$); mientras que, al administrar sFlt-1 + SEPI + MTX, los efectos protectores en la función bioenergética mitocondrial de SEPI son abrogados, conllevando a una disminución significativa del OCR-Máximo ($P=0.01$) (**Figura 7.6 B**). En concordancia con esta observación, el OCR-Reserva determinado en CEs tratadas con sFlt-1 + SEPI + MTX determinó resultados significativamente menores con respecto al control ($P=0.002$) (**Figura 7.6 C**). A diferencia de aquellas células tratadas con SEPI o MTX únicamente, donde no se evidenció cambios estadísticamente significativos con respecto al control ($P=0.33$).

Entre otras determinaciones; el OCR-Basal determinado bajo los diversos tratamientos no mostró diferencias estadísticamente significativas ($P=0.29$) (**Figura 7.6 D**). Con respecto al OCR acoplado a la producción de ATP, se observó una tendencia a incrementar esta medición en CEs tratadas con MTX, en tratamiento único o en co-administración con sFlt-1 y SEPI. A pesar de esto, estadísticamente esta tendencia a incrementar no fue significativa ($P=0.08$) (**Figura 7.6 E**). Por último, el OCR acoplado a la fuga de protones medido fue significativamente mayor en CEs tratadas con MTX únicamente ($P=0.04$) (**Figura 7.6 F**). Al determinar el fenotipo metabólico en presencia de MTX se demostró que el metabolismo de SEPI a BH4 es esencial para que SEPI pueda restablecer el fenotipo metabólico en células tratadas con sFlt-1. En la **tabla 7.6** se muestran los resultados obtenidos con respecto al OCR-Basal, OCR-Estresado, ECAR-Basal y ECAR-Estresado en CEs tratadas con sFlt-1, MTX y SEPI.

Tratamiento	Fenotipo metabólico			
	Consumo de oxígeno (OCR) pmol O ₂ /min/μg de proteína		Acidificación extracelular (ECAR) mpH/min/μg de proteína	
	OCR-Basal	OCR-Estresado	ECAR-Basal	ECAR-Estresado
Control	13.71 ± 0.12	34.23 ± 2.62	1.04 ± 0.08	4.44 ± 0.16
SEPI (100 μM)	15.61 ± 0.49	37.64 ± 1.38	0.91 ± 0.05	3.97 ± 0.27
MTX (100 μM)	18.04 ± 0.50	36.81 ± 2.05	1.08 ± 0.06	4.5 ± 0.16
sFlt-1 50 (ng/mL) + (SEPI 100 μM) + MTX (100 μM)	15.63 ± 1.06	27.43 ± 2.63	1.84 ± 0.30	5.67 ± 0.72

Tabla 7.6 Consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) de células CEs tratadas con sFlt-1, SEPI y MTX. El tratamiento con; sFlt-1 (50 ng/mL), SEPI (100 μM) y MTX (100 μM) se empleó durante 24 horas. OCR-Basal: consumo de oxígeno basal, OCR-Estresado: consumo de oxígeno luego de la administración de FCCP, ECAR-Basal: acidificación extracelular basal, ECAR-Estresado: acidificación extracelular luego de la administración de FCCP.

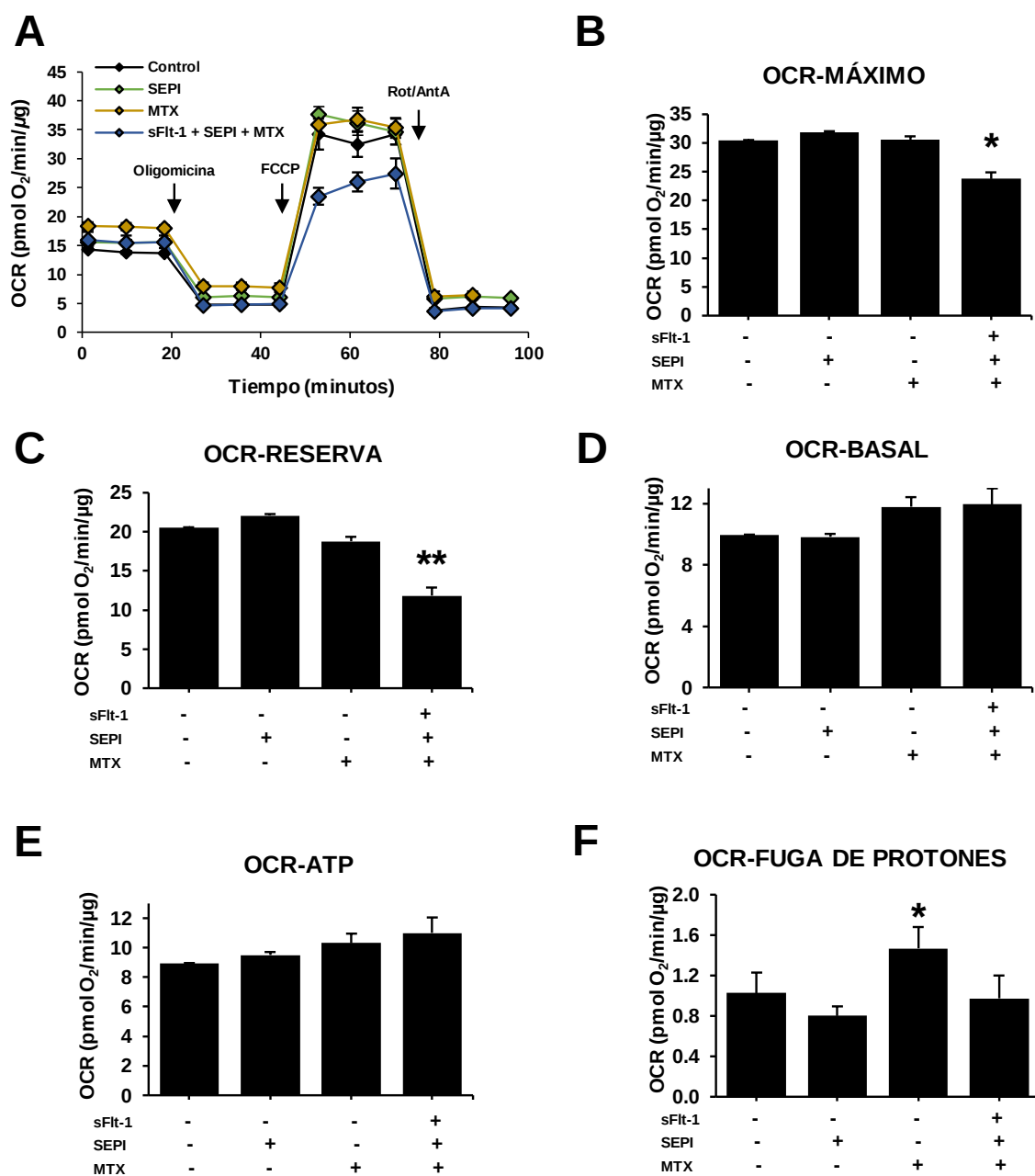


Figura 7.7 Función bioenergética mitocondrial de CEs tratadas con sFlt-1, SEPI y MTX. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con sFlt-1 (50 ng/mL), SEPI (100μM) y MTX (100μM), durante 24 horas. Se determinó la actividad bioenergética mitocondrial empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Curso de tiempo en la medición de OCR (B) OCR- máximo, (C) OCR-reserva, (D) OCR-basal, (E) OCR-ATP y (F) OCR-Fuga de protones. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto al control. ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

No se observaron diferencias estadísticas en el OCR-Basal con respecto al control ($P=0.18$) (**Figura 7.7 C**). Con respecto al OCR-Estresado, se observó que la co-administración de sFlt-1 + MTX + SEPI, el OCR disminuyó significativamente ($P=0.01$). Incluso, el análisis estadístico mostró que este grupo presenta una diferencia significativamente menor con respecto al grupo tratado con MTX únicamente ($P=0.02$), lo cual sugiere que los efectos observados en el OCR-Estresado dependen de la acción de sFlt-1 como agente disruptor del metabolismo mitocondrial (**Figura 7.7 C**).

Por otra parte, se calculó el ECAR-Basal, no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos en estudio. Sin embargo, en el grupo de células tratadas con sFlt-1 + MTX + SEPI se observó una tendencia a aumentar el ECAR, probablemente debido a la presencia de sFlt-1, que como ha sido previamente demostrado en esta investigación, conlleva a un cambio de fenotipo metabólico que favorece la obtención de energía a partir de glucólisis ($P=0.06$) (**Figura 7.7 D**). Finalmente, el ECAR-Estresado observado en células tratadas con sFlt-1 + MTX + SEPI mostró diferencias significativas con respecto al grupo control ($P=0.04$), probablemente debido a la actividad citotóxica de la droga MTX (**Figura 7.7 D**).

Estos resultados obtenidos sugieren que SEPI podría estar actuando como una droga análoga precursora de BH4, capaz de modular la función endotelial al servir como cofactor enzimático de eNOS, que promueve la formación de NO . Además, SEPI también demostró un papel importante en el restablecimiento de la función metabólica mitocondrial y como un potencial agente antioxidante mitocondrial, que favorece la disminución de la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en la mitocondria.

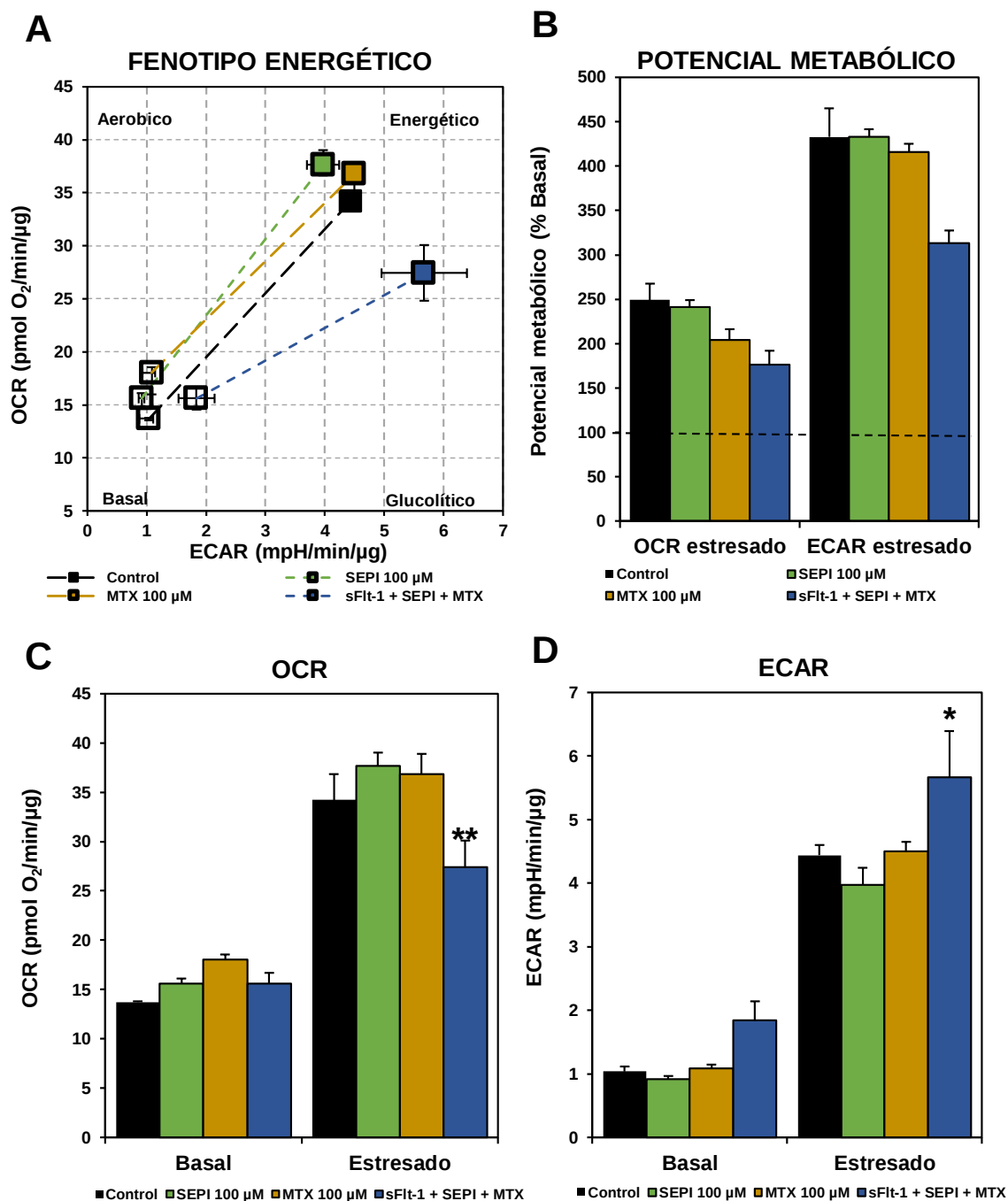


Figura 7.8 Fenotipo metabólico de CEs tratadas con sFit-1, SEPI y MTX. Células endoteliales fueron sembradas en densidad de 4.0×10^4 células/pozo en placas V7 (Seahorse-Agilent), tratadas con sFit-1 (50 ng/mL), SEPI (100µM) y MTX (100µM), durante 24 horas. Se determinó el fenotipo metabólico empleando la tecnología Seahorse-Agilent. (A) Fenotipo energético, (B) potencial metabólico, (C) OCR y (D) ECAR en CEs expuestas a 50 ng/mL de rh sFit-1. Los datos están presentados con la media $\pm$ SEM. (n=5), * P <0.05, ** P <0.01 con respecto al control, ANOVA (Bonferroni's post-hoc test).

8. Discusión

8.1 El factor anti-angiogénico soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) causa disfunción endotelial; favorece el desacoplamiento de eNOS e induce cambios en el fenotipo metabólico en preeclampsia, al interferir en la señalización dependiente de VEGF.

8.1.1 Modelo in vitro de PE con administración exógena de sFlt-1. Líneas celulares y determinación de concentraciones de trabajo.

Modelo in vitro para el estudio de PE.

Para poder entender el papel de sFlt-1 en la enfermedad, se emplearon dos líneas celulares derivadas de dos tejidos que esencialmente están afectados durante PE; el endotelio y la placenta. Por tal motivo, CEs y trofoblastos fueron cultivados *in vitro* en presencia de proteína rh sFlt-1 en diversas concentraciones. Como modelo de endotelio, se emplearon células endoteliales aórticas bovinas (BAEC), que a lo largo del texto fueron presentadas como células endoteliales (CEs). En esta investigación se hace referencia a las BAEC como CEs ya que previamente, dichas células han sido ampliamente utilizadas como modelo de endotelio celular (280-283). Todo esto, basado en que presentan 100% de homología con las NOS de origen humano, además que comparten una serie de factores de trans-activación basal del promotor de eNOS (227).

En PE, tanto la hipertensión, como la proteinuria, implican al endotelio como el tejido blanco de la enfermedad (71). Por su parte, la hipertensión se caracteriza por vasoconstricción periférica (284). Mientras que, la proteinuria, se asocia a un signo patognomónico de la enfermedad como lo es la endoteliosis glomerular, en la cual las células endoteliales del glomérulo renal, aumentan de tamaño y pierden sus fenestraciones características (285). Basado en estas evidencias en el tejido endotelial, en esta investigación fue clave conocer, a nivel molecular, los efectos que sFlt-1 puede desencadenar para conllevar a PE. Motivo por el cual, el empleo de las CEs, fue determinante y clave en este estudio.

Por otra parte, dado que las células trofoblásticas son naturalmente productoras de sFlt-1 (25), su estudio fue esencial para completar los hallazgos en endotelio. El Dr. Charles Graham, en el año 1998 (228), publicó un estudio en el cual demostró la inmortalización de células trofoblásticas de las extra vellosidades de placenta, obtenidas de pacientes de primer trimestre; denominadas, HTR-8/SVneo. Dichas células, mantienen una morfología similar a los trofoblastos parentales HTR-8. Además, son 100% positivos para citoqueratina, lo cual confirma que mantienen un fenotipo de tipo epitelial. El uso de esta línea celular en esta investigación, fue muy importante para establecer los efectos de sFlt-1 y para la correlación *in vitro* de PE usando sueros provenientes de pacientes. Todo esto, ya que los trofoblastos de las

extra vellosidades de la placenta, juegan un papel crucial en etapas tempranas del proceso de placentación (286). Para este estudio, donde se buscó conocer las perturbaciones metabólicas tempranas que sFlt-1 conllevaría hasta la instauración de enfermedad, el uso de las células HTR-8/SVneo, fue una ventaja, frente a modelos *in vitro* con trofoblastos a término, que por su condición terminal, constitutivamente están sujetas a muerte celular. Por su puesto, todo modelo presenta desventajas, que en este caso podrían no ser tan relevantes. Los trofoblastos de extra vellosidades de placenta han mostrado estar parcialmente involucrados en la liberación de biomarcadores de detección de PE (286), motivo por el cual la interpretación y análisis de resultados en lo concerniente a la liberación de sFlt-1 o TNF- α en sobrenadante celular (**capítulo II** de “Resultados”) debió ser rigurosamente analizada.

Determinación de concentraciones exógenas de sFlt-1 para el establecimiento del modelo in vitro de PE.

Dado que en PE, por factores aún desconocidos, los niveles de sFlt-1 superan drásticamente a los niveles encontrados en mujeres sanas (45); el primer enfoque de este estudio fue conocer el impacto que tiene sFlt-1 en etapas tempranas del embarazo. Al referirse a etapas tempranas del embarazo, se hace referencia a cuando los niveles circulantes de sFlt-1 comienzan a elevarse, pero antes de que se produzca una respuesta anti-angiogénica. Previamente, se ha demostrado que a lo largo del proceso de gestación y en el embarazo normal, los niveles circulantes de sFlt-1 aumentan progresivamente mientras avanza la edad gestacional (64) y junto a VEGF, regulan el complejo proceso de angiogénesis (80).

En general, el incremento de los niveles de FAAs en el embarazo tiene el efecto de aumentar el tono vascular materno y mantener la perfusión uterina normal (15), actuando también como un regulador angiogénico (80). Sin embargo, por mecanismos que aún son desconocidos (84), en PE, los niveles de sFlt-1 superan un umbral que dicta la aparición de la enfermedad. En esta investigación, se buscó conocer los efectos de sFlt-1 como perturbador temprano en PE, es decir, al trasladar del modelo *in vitro* a situaciones reales e *in vivo*. En este estudio se buscó conocer los efectos moleculares de sFlt-1 antes que ese umbral sea superado. La forma de definir dicho umbral, se basó en la respuesta anti-angiogénica de sFlt-1.

Tal como ha sido establecido anteriormente, otros investigadores han empleado el ensayo de formación de tubos, para el estudio de la angiogénesis en PE (42, 81, 287, 288). Por ejemplo, en el estudio de Maynard et al. 2003, mediante el ensayo de formación de tubos, los investigadores demostraron que sFlt-1, al ser añadido exógenamente a células tratadas con suero proveniente de pacientes normotensas, conllevaba a la inhibición de la formación de tubos (81). En la presente investigación, por razones de disponibilidad de reactivos, se llevó a cabo otro ensayo, que al igual que en el caso de formación de tubos, es indicativo del proceso de angiogénesis. Este ensayo corresponde al “Wound Healing Assay” (WHA). El

WHA es un ensayo muy bien descrito en donde se puede observar la migración celular, tal como ocurriría en un proceso de cicatrización de heridas (230). Otros investigadores han empleado el WHA para conocer los efectos de factores anti-angiogénicos en el proceso de angiogénesis, asociada a la cicatrización de heridas en modelos *in vivo* con transfección génica de la forma soluble del receptor 2 de VEGF (Flk-1) (289).

Tal como se observa en la **figura 4.1** de esta investigación, en el modelo *in vitro* de endotelio con CEs, se trataron concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ng/mL de rh sFlt-1. Hasta 50 ng/mL, no se observó respuesta anti-angiogénica. Mientras que, en concentraciones de 100 ng/mL, a pesar que estadísticamente no indicó una diferencia significativa con respecto al control, se observó una ligera tendencia a disminuir la capacidad migratoria celular (**Figura 4.1 A y C**). De la misma manera, en el modelo de trofoblastos provenientes de las extra vellosidades de placentas de primer trimestre, HTR-8/SVneo, en concentraciones de: 10-100 ng/mL no se observaron cambios estadísticamente significativos en la migración celular (**Figura 4.1 B y D**).

En los últimos años, las concentraciones empleadas de sFlt-1 para inducir un modelo de PE han sido variables; se han administrado concentraciones desde 10 ng/mL (81), hasta 1 µg/pozo de sFlt-1 (42), logrando una respuesta anti-angiogénica bastante elegante, determinada por el ensayo de formación de tubos. Una de las razones por las cuales las concentraciones de sFlt-1 varían entre estos estudios, se debe a que los medios de cultivo tienen remanentes de factores angiogénicos que disminuyen la biodisponibilidad de sFlt-1 y con ello su actividad como factor anti-angiogénico. En base a esta observación, la concentración más adecuada de sFlt-1 en este estudio fue determinada por el WHA, ya que observaciones de otros autores, no necesariamente serán iguales en otras condiciones, con diferentes reactivos, medios de cultivos, entre otros. Incluso, vale acotar que, para el ensayo de formación de tubos, uno de los reactivos necesarios para dicha prueba es el matrigel. El matrigel, según la casa comercial, lote, etc.; puede incluir remanentes de factores angiogénicos que vayan a variar considerablemente la concentración del factor anti-angiogénico que permita establecer un efecto anti-angiogénico deseado.

Ya que en este estudio las concentraciones de 10-50 ng/mL de sFlt-1 mostraron que no inducen respuesta anti-angiogénica a las 24 horas de tratamiento, tanto en CEs como en trofoblastos, se definió este rango de concentraciones para las diversas pruebas. Tal como se observó en la **figura 4.1**, concentraciones de 100 ng/mL tampoco conllevaron a una respuesta significativamente estadística en esta prueba de angiogénesis. Sin embargo, se observó una tendencia de las CEs a que dicha respuesta anti-angiogénica fuera evidente desde el punto de vista estadístico; motivo por el cual, no se incluyó esta concentración en los análisis.

8.1.2 sFlt-1 afecta la función endotelial en CEs y trofoblastos al reducir la biodisponibilidad de VEGF.

El •NO es un importante mediador del proceso de angiogénesis (239). Hasta el momento, los mecanismos moleculares a través de los cuales el •NO promueve la angiogénesis, no han sido totalmente identificados. Múltiples esfuerzos en investigación, han indagado en conocer su mecanismo y han identificado que; el •NO, es un factor de sobrevivencia que inhibe la apoptosis en CEs (53). Además, promueve la proliferación del endotelio (66) y desde el punto de vista hemodinámico; actúa como vasodilatador, efecto clave en el proceso angiogénico (239). En PE, el papel del •NO, no ha sido tan bien identificado como en otros modelos de patología cardiovascular. Existen controversias con respecto a la función del •NO en la fisiopatología de PE, e incluso con respecto al tipo de muestra más idónea en cual establecer las determinaciones de •NO y en la técnica de determinación más adecuada (11) debido a su corto tiempo de vida media (290).

Diversos grupos de investigación se han esforzado en conocer los niveles del •NO durante el embarazo y más precisamente, al comparar mujeres normotensas y preeclámpticas. En la **tabla 1.1** se resumió los valores de •NO determinados por diversos grupos de investigación a nivel mundial. Dicha tabla presenta una recopilación de investigaciones que han buscado conocer los niveles de •NO y su relación a PE. Para esta investigación, fue muy importante dar a conocer que los niveles de •NO y su relación a PE siguen siendo controversiales. Por ese motivo, como parte del proceso de formación académica y parte de la producción bibliográfica relacionada a la creación de este trabajo de tesis, dicha tabla fue publicada en el año 2014 (11).

Dadas las controversias asociadas a las determinaciones de •NO, realizadas principalmente en plasma/suero de mujeres en gestación; el determinar los niveles de •NO propiamente en tejido placentario, parecería ser un enfoque más apropiado. En base a esta observación, Tortladze et al. 2012 (291), determinaron en un grupo de 50 mujeres preeclámpticas y 30 gestantes sanas, el contenido de •NO en el tejido placentario, empleando el método de resonancia paramagnética del electrón (EPR). En ese estudio, se demostró que el contenido de •NO en la placenta es menor en mujeres con PE, que en aquellas normotensas. En base a dicho estudio, que por su enfoque, determina los niveles de •NO directamente en tejido placentario; y al considerar, que la PE, manifiesta características fisiopatológicas donde se presume que los niveles de •NO deberían estar disminuidos. En esta investigación se determinaron los niveles de •NO, al medir los niveles de su sustituto el NO_2^- por quimioluminiscencia, en el modelo *in vitro* de PE establecido con sFlt-1 y con sueros de pacientes normotensas y preeclámpticas.

Un primer hallazgo en esta investigación fue que sFlt-1 definitivamente conlleva a la disminución en la producción de •NO en CEs y en trofoblastos (ver **figura 4.4**), también. La determinación de NO_2^- se realizó en CEs y trofoblastos que fueron

expuestos a la administración exógena de sFlt-1 (50 ng/mL), durante 24 horas. Previamente, otros investigadores han encontrado que los niveles séricos de sFlt-1 se correlacionan negativamente con la producción de •NO en PE (85) e incluso que sFlt-1 es capaz de modular la señalización del •NO (292). Tal como se comentó anteriormente, existen muchas controversias asociadas a la determinación de •NO en PE. Sin embargo, ya que este es un modelo *in vitro*, con la administración exógena de sFlt-1, se pudo observar el efecto de este factor anti-angiogénico directamente en la producción de •NO. En este orden de ideas, si bien se encontró que sFlt-1 afecta la producción de •NO, los mecanismos moleculares para explicar este efecto aún están por ser explicados en este estudio.

Por ello, basado en que en el sistema vascular, la actividad de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), es el mayor regulador de la producción de •NO (293). Se evaluó el papel de sFlt-1 como antagonista en la señalización de VEGF, para disminuir la activación de rutas de señal dependiente de VEGF en la producción de •NO. Además de VEGF, otros factores de crecimiento incrementan la fosforilación de eNOS en el residuo de serina 1177; evento que se asocia a un aumento en la actividad enzimática de eNOS (294). Cuando los niveles circulantes de sFlt-1 aumentan, tal como ocurre en PE, se reduce la biodisponibilidad de VEGF, lo cual se manifiesta en un proceso de disfunción endotelial (295). En base a estas observaciones, Burke et al. 2016, demostraron en su estudio, empleando un modelo animal con sobreexpresión de sFlt-1, que dicho aumento en la expresión de sFlt-1, se correlaciona con una reducción en la fosforilación de eNOS en tejido placentario, proveniente de mujeres con PE (296).

En esta investigación, la administración de 20 ng/mL de VEGF restableció la producción de •NO (**Figura 4.4**), lo cual se correspondió con observaciones previas que ubican a sFlt-1 como un antagonista de VEGF capaz de alterar su cascada de señalización (292, 296-298). El antagonismo en la señalización de VEGF, que afecta la activación y fosforilación de eNOS (296), también fue observada en el presente estudio. El administrar VEGF exógeno, permitió restablecer la activación de eNOS, tal como se demuestra en las **figuras 4.5 y 4.6** de este estudio. De hecho, los resultados observados en la presente investigación, muestran una correlación inversa entre los niveles de •NO (medidos como NO_2^- por quimioluminiscencia) y la activación de eNOS, con respecto a la concentración de sFlt-1 administrada, lo cual se corresponde con observaciones previas de otros investigadores (85). A diferencia del estudio de Sandrim et al. 2008, citado anteriormente; el presente estudio se refiere a un estudio *in vitro*. Sandrim et al. 2008, midieron los niveles de NO_2^- en plasma, empleando la misma técnica de quimioluminiscencia que se empleó en este estudio. A pesar de la diferencia con el estudio de Sandrim, en lo concerniente al modelo experimental, los resultados de su investigación y de la presente, se corresponden a cabalidad. Tal como se determinó en dicho estudio, los niveles de sFlt-1 aumentados en circulación materna se relacionaron inversamente a los niveles de •NO (85). Además, tal como fue recientemente publicado por Burke et al. 2016, la presente investigación soporta el concepto de la

existencia de un proceso de disfunción endotelial, debido al incremento en los niveles de sFlt-1 (296).

Los mecanismos moleculares que conllevan a que sFlt-1 disminuya la activación de eNOS y la producción de $\bullet\text{NO}$, tal como se muestra en las **figuras 4.4, 4.5 y 4.6**, están vinculados a la disminución de la biodisponibilidad de VEGF, al tener sFlt-1 en exceso. En la figura que se muestra a continuación; se resumen lo eventos moleculares, descritos en la presente investigación, que estarían conllevando a que sFlt-1 regule inversamente la producción de $\bullet\text{NO}$, al disminuir la disponibilidad de VEGF (Figura 8.1).

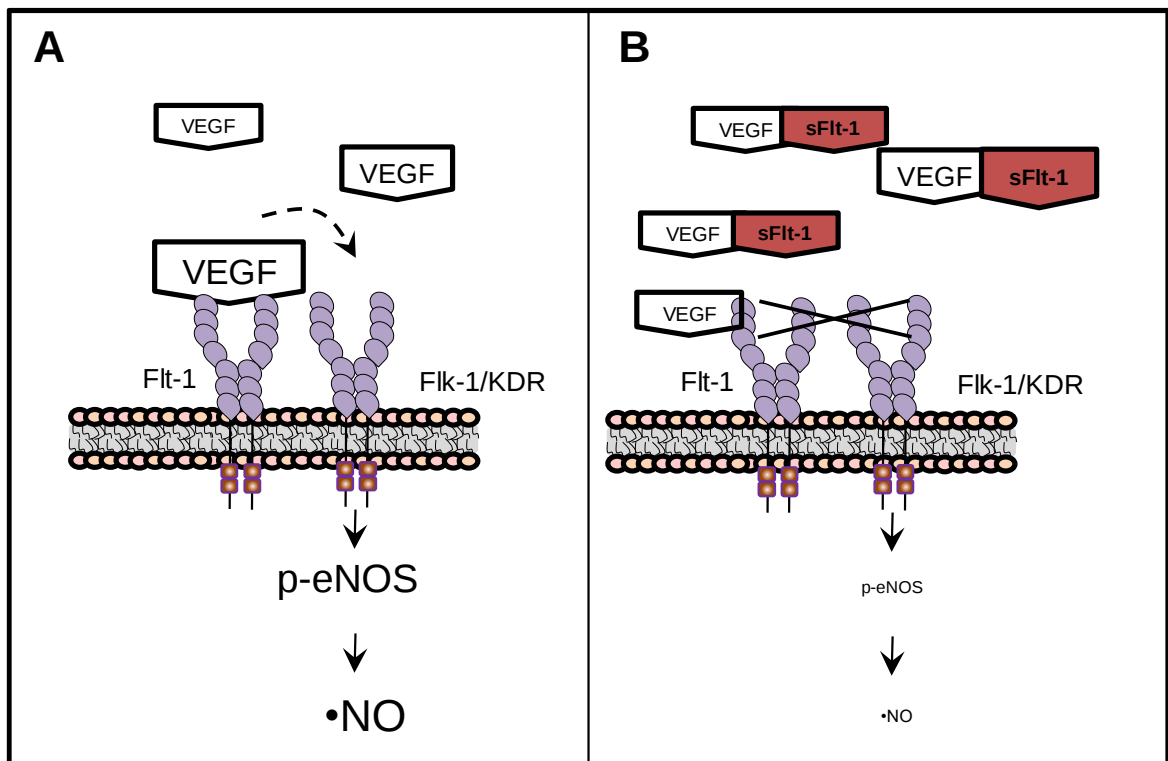


Figura 8.1 sFlt-1 afecta la función endotelial en CE y trofoblastos al reducir la biodisponibilidad de VEGF. (A) La función endotelial normal implica la señalización de VEGF, que al interactuar con sus receptores Flt-1 y Flk-1/KDR, desencadena una ruta de señales intracelulares que permiten la activación de eNOS (p-eNOS) y la consecuente formación de $\bullet\text{NO}$. (B) Cuando los niveles de sFlt-1 aumentan, la biodisponibilidad de VEGF disminuye, por lo que la interacción con sus receptores se reduce y con ello, la activación de eNOS (p-eNOS) y la formación de $\bullet\text{NO}$ también disminuye.

8.1.3 sFlt-1 desacopla la enzima eNOS al disminuir los niveles de tetrahidrobiopterina (BH4).

Al analizar los hallazgos en este estudio, donde se encontró que el modelo *in vitro* de PE con sFlt-1, existe disfunción endotelial, con disminución de la activación de

eNOS y de la producción de $\bullet\text{NO}$, surgió la incógnita de cuáles mecanismos estarían involucrados en estos eventos (**ver figuras 4.4, 4.5 y 4.6**).

Tal cómo se observó en este estudio; la biodisponibilidad de VEGF es crucial en la señalización de VEGF/ $\bullet\text{NO}$ (**ver figuras 4.4, 4.5 y 4.6**). Sin embargo, la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), para permitir la producción de $\bullet\text{NO}$, requiere el adecuado acoplamiento de sus dominios oxidasa y reductasa (198). Estas observaciones de otros autores, orientaron a considerar la posibilidad de que la producción baja de $\bullet\text{NO}$ y la activación disminuida de la enzima eNOS, podrían estar obedeciendo a un proceso de desacoplamiento de la enzima. Ya hace casi 19 años, Vásquez-Vivar et al, 1998 demostraron que el acoplamiento de eNOS esta mediado por la presencia de su cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) (164). Vásquez-Vivar et al, 1998, publicaron un estudio donde se demostraban los mecanismos de formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a partir de eNOS, usando la tecnología de EPR. En ese estudio, se demostró que la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ proviene del dominio oxidasa de la enzima, luego de la disociación y desacoplamiento de la enzima. Además, encontraron que BH4 previene la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ al impedir la disociación de eNOS (164).

En base a estas observaciones, se consideró que en esta investigación podrían estar ocurriendo dos procesos moleculares completamente distintos;

- a) Por una parte, sFlt-1, podría estar funcionando como un antagonista en la señalización de VEGF, impidiendo su cascada de señalización intracelular. Que tal como se observa en la **figura 8.1 B**, sFlt-1 impediría desde el enlace de VEGF a los receptores tipo RTKs, Flk-1 y Flt-1, hasta la señalización intracelular que incluye la activación de PI-3K/Akt, eNOS y la producción de $\bullet\text{NO}$ (ver también la **figura 8.2** y **figura 8.3 A**).
- b) Mientras que, tal como otros han reportado, la presencia del cofactor BH4, es esencial para el acoplamiento adecuado de la enzima eNOS y con ello su activación y producción de $\bullet\text{NO}$ (ver **figura 1.7**). Y, por lo tanto, de existir niveles disminuidos de este cofactor, se podría pensar en un proceso de desacoplamiento enzimático de eNOS; que podría estar ocurriendo en conjunto o independientemente al antagonismo de sFlt-1 por la señalización de VEGF/ $\bullet\text{NO}$ (ver **figura 8.3 B**)

En la sección 8.1.1 y 8.1.2 se discutió ampliamente la actividad antagonista de sFlt-1 en la señalización de VEGF/ $\bullet\text{NO}$ y las observaciones obtenidas en este estudio, con respecto a otros autores. Mientras que, esa producción disminuida de $\bullet\text{NO}$, también sugirió que probablemente la enzima eNOS estaría desacoplada. Para entender el papel de sFlt-1 en el desacoplamiento de eNOS, se evaluó la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en presencia de sFlt-1 empleando la sonda HE y además se midieron los niveles de BH4, también por HPLC.

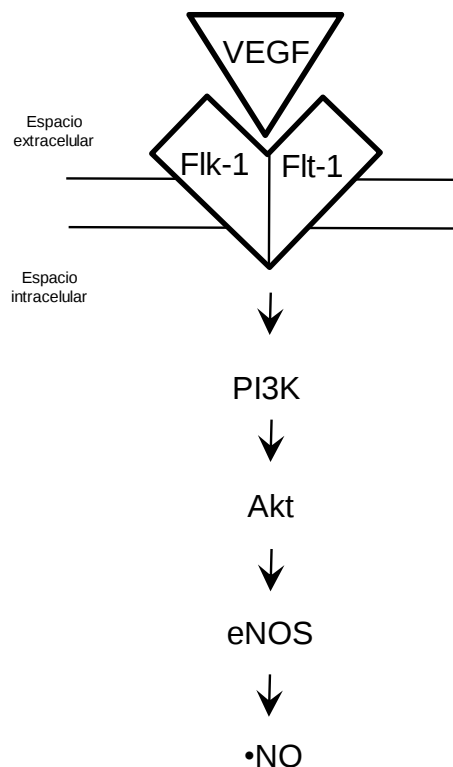


Figura 8.2 Señalización de VEGF y producción de $\bullet\text{NO}$. El enlace de VEGF a sus receptores tipo RTKs, Flk-1 y Flt-1 permite la cascada de señalización intracelular con la activación de PI-3K, Akt, eNOS y, por consiguiente, la producción de $\bullet\text{NO}$.

La medición de $\text{O}_2^{\bullet-}$ se hizo inicialmente para entender el papel de sFlt-1 en el desacoplamiento de eNOS. Sin embargo, a pesar que la determinación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ se realizó al cuantificar el producto de oxidación de la sonda HE, 2-OH- E^+ , que resulta ser uno de los métodos más elegantes y más precisos en la determinación de estrés oxidativo, precisamente $\text{O}_2^{\bullet-}$ (299); la metodología empleada no permitió dilucidar si ese incremento en los niveles de $\text{O}_2^{\bullet-}$, realmente provenía de eNOS desacoplada.

Tal como se indicó en la sección “Materiales y métodos”: Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante HPLC; la sonda fluorescente HE, oxidada en presencia de $\text{O}_2^{\bullet-}$, forma etidio (E^+) como producto de la oxidación de 2e^- a partir de HE. La fluorescencia emitida por el producto E^+ es proporcional a la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ intracelular. La oxidación de HE a E^+ no ocurre directamente por la oxidación HE mediada por $\text{O}_2^{\bullet-}$, en lugar, otro producto el 2-hidroxietidio (2-OH- E^+), con propiedades fluorescentes similares a E^+ se forma en la reacción de HE con $\text{O}_2^{\bullet-}$ (234). Afortunadamente, la reacción de HE con otras especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, tales como (ONOO^- , $\text{OH}^\bullet$, H_2O_2) no forma 2-OH- E^+ , mientras que si permite la formación de otros productos de oxidación de HE, tales como dímeros de E^+ (E^+-E^+). Con este fundamento, la determinación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ mediante HPLC que se llevó a cabo en este estudio (**figura 4.7**), permitió evidenciar que efectivamente sFlt-

1 conlleva a un estado de estrés oxidativo, mediado por aumentos de $O_2^{\cdot-}$. Pero, ¿de qué fuente proviene dicho $O_2^{\cdot-}$?

El ión $O_2^{\cdot-}$, puede ser producido endógenamente por diversas fuentes intracelulares. Entre ellas, se destacan procesos enzimáticos de las enzimas NADPH oxidasas, a nivel del complejo I y complejo III de la CTE, en la mitocondria, xantina oxidasa, citocromo p450, lipooxigenasas, eNOS, entre otras (300). Por tal motivo, en este estudio, se puede confirmar la detección de $O_2^{\cdot-}$ elevado debido a sFlt-1, más no su fuente de producción. Hasta el momento, este es el primer enfoque *in vitro*, con administración exógena de sFlt-1 donde los niveles de $O_2^{\cdot-}$ han sido cuantificados a partir del producto oxidado de HE, el 2-OH-E⁺. No obstante, estos resultados reflejan y soportan observaciones de otros autores, que, empleando otras técnicas, han medido la producción de $O_2^{\cdot-}$ en presencia de niveles elevados de sFlt-1 (124, 301-303).

Tal es el caso del grupo de investigación del Dr. Granger del Centro Médico de la Universidad de Mississippi, en USA. En el año 2011, su grupo publicó un artículo en el cual demostraban un incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en tejido placentario de ratas, tratadas con infusión exógena de sFlt-1. En este estudio, se demostró por una técnica empleando lucigenina, que los niveles de $O_2^{\cdot-}$ tisular, aumentan significativamente cuando los niveles de sFlt-1 están elevados también. Otro hallazgo interesante de este estudio fue que la estimulación con NADPH, les sugirió a los autores, que la enzima NADPH oxidasa podría estar implicada en el aumento de $O_2^{\cdot-}$ observado. Sin embargo, los resultados que muestran los investigadores no evidencian este efecto en sus datos y/o gráficos, en lugar, pareciera que el efecto de la estimulación con NADPH fue mínimo en la generación de $O_2^{\cdot-}$. Sin ánimos de criticar el análisis de los autores, fue evidente que el estrés oxidativo, mediado por $O_2^{\cdot-}$ se manifiesta ante el aumento de sFlt-1. Sin embargo, la fuente de éste podría no haber sido del todo concluyente (124). En concordancia con las observaciones de la presente investigación (ver **figura 4.7**); otros investigadores han empleado la sonda DHE para monitorear la producción de ROS en explantes de placentas de ratas Sprague-Dawley. En este estudio, se determinó un incremento de la fluorescencia de la sonda DHE en tejidos expuestos a hipoxia, en los cuales los niveles de sFlt-1 determinados, también fueron más elevados, con respecto a los tejidos mantenidos en condiciones normóxicas (302).

Una observación interesante de la **figura 4.7**, corresponde a que la administración de VEGF, en concentración de 20 ng/mL, disminuyó significativamente la producción de $O_2^{\cdot-}$, en células que fueron tratadas con 50 ng/mL de sFlt-1. Estos datos sugieren que el restablecimiento del balance angiogénico permite disminuir la formación de $O_2^{\cdot-}$ *in vitro*. En base a esta observación, un estudio de Gilbert et al. 2012, estudió los efectos del restablecimiento del balance angiogénico, mediante el ejercicio, en el estatus antioxidante del modelo animal estudiado. Los investigadores demostraron que las ratas expuestas a ciclos de actividad física controlada, lograban aumentar la biodisponibilidad de VEGF y reducir la razón sFlt-1/VEGF.

Asimismo, este efecto se acompañaba de un aumento de la capacidad antioxidante total, medido en fluido amniótico (304). En dicho estudio, el aumento en los niveles de VEGF fue mediado por el ejercicio, a diferencia del presente estudio, donde la biodisponibilidad de VEGF fue administrada exógenamente. La ventaja de comparar el modelo de este estudio, con el empleado en la investigación de Gilbert et al. 2012, es que su estudio muestra los efectos como podrían estar ocurriendo *in vivo*. Sus observaciones además soportan los beneficios de la actividad física durante la gestación, ya reportados (305). Mientras que, en esta investigación, se pudo demostrar *in vitro*, que dichos efectos en el restablecimiento de los niveles de ROS, ocurren debido a VEGF y confirman las observaciones de otros investigadores (304).

En relación al estatus oxidativo y ROS; previamente, se ha reportado que un incremento en los niveles de ROS a nivel intrauterino se asocia a la programación del desarrollo fetal. Sin embargo, aún no se conoce si una disminución de ROS podría tener efectos desfavorables en el desarrollo fetal (118). De allí que el mantenimiento del balance angiogénico mediado por VEGF/sFlt-1 también estaría implicado en el proceso de programación fetal dependiente de ROS. Todo esto es indicativo que el balance angiogénico debe ser delicadamente regulado durante la gestación. En esta investigación se empleó 20 ng/mL de VEGF, basado en observaciones de otros autores que en estudios *in vitro* han empleado dicha concentración (306, 307). Sin embargo, en base a las observaciones de éste y otros estudios como el de Gilbert et al. 2012, sugieren que para encontrar un balance en la formación de ROS que fisiológicamente sean necesarias para el desarrollo fetal, la titulación de concentraciones de VEGF en el modelo *in vitro* con sFlt-1 podrían afianzar los hallazgos del presente estudio en relación al balance angiogénico de VEGF/sFlt-1. Todo esto, ya que se ha demostrado previamente, que VEGF en ciertas concentraciones puede aumentar la producción de ROS, específicamente $O_2^{\cdot-}$, demostrado por la técnica de EPR (308).

Hasta el momento, los resultados de esta investigación han mostrado que el modelo *in vitro* de PE con sFlt-1, conlleva a una disminución en la producción de $\bullet NO$, acompañada de una baja activación de eNOS. Aunado a esto, el modelo en estudio demostró que sFlt-1 conlleva a estrés oxidativo, mediante el incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ (ver **figuras 4.4 – 4.7**). Pero, ¿el desacoplamiento de eNOS es responsable de estos eventos? Ya que la determinación de $O_2^{\cdot-}$ no permitió dilucidar la fuente de origen de estos niveles aumentados de $O_2^{\cdot-}$. El enfoque empleado para entender el papel de eNOS y su acoplamiento, se orientó al papel que cumple el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4), en el acoplamiento de la enzima.

Como fue comentado anteriormente, Vásquez-Vivar et al. 1998, demostraron que el acoplamiento de eNOS esta mediado por la presencia de su cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) (164). Ya que BH4 previene la formación de $O_2^{\cdot-}$ al impedir la disociación de eNOS (164); se determinaron los niveles citosólicos de este cofactor en CEs expuestas a sFlt-1 durante 24 horas y la determinación se

realizó por HPLC. En la **figura 4.8**, se demostró que la administración exógena de sFlt-1 (50 ng/mL), conlleva a la disminución, estadísticamente significativa, de los niveles de BH4 en CEs. Incluso, se demostró que niveles de 10 ng/mL de sFlt-1 pueden afectar los niveles de BH4, de forma significativa, también. Este hallazgo fue relevante, ya que demostró que sFlt-1, por mecanismos asociados a la disminución de los niveles de BH4, es capaz de conllevar al desacoplamiento de eNOS, demostrado previamente mediante la baja activación de la enzima y la formación de $O_2^{\cdot-}$. Además, los resultados de la **figura 4.8** sugieren que, bajas concentraciones de sFlt-1, que no conllevan a respuesta anti-angiogénica (**figura 4.1**), pueden desacoplar la enzima eNOS y se presume, que incluso a esta concentración de 10 ng/mL, se evidenciaría la aparición de disfunción endotelial.

Basado en la literatura revisada hasta la fecha, el papel de sFlt-1 en los niveles de BH4 como potencial mecanismo fisiopatológico de la enfermedad, no ha sido reportado anteriormente. En esta investigación se demostró por primera vez, que sFlt-1 disminuye significativamente los niveles de BH4 y la administración de VEGF no logra restablecer estos efectos (**Figura 4.8**). Es decir, en este estudio se evidenció que sFlt-1 no sólo afecta la biodisponibilidad de VEGF, sino que tiene un impacto en el metabolismo de BH4, lo cual repercute en la producción de $\bullet NO$ y por ende en el proceso de DE. Basado en las evidencias obtenidas en este estudio, se propone que sFlt-1 afecta la producción de $\bullet NO$ por dos potenciales mecanismos (**Figura 8.3**). En el primero, sFlt-1 intervendría en el metabolismo y disponibilidad de BH4, lo cual afectaría el acoplamiento de eNOS y conllevaría a una baja producción de $\bullet NO$ y aumentada producción de $O_2^{\cdot-}$. En el segundo mecanismo propuesto, sFlt-1, antagonista de VEGF, disminuiría su biodisponibilidad y con ello afectaría la señalización dependiente de VEGF/ $\bullet NO$.

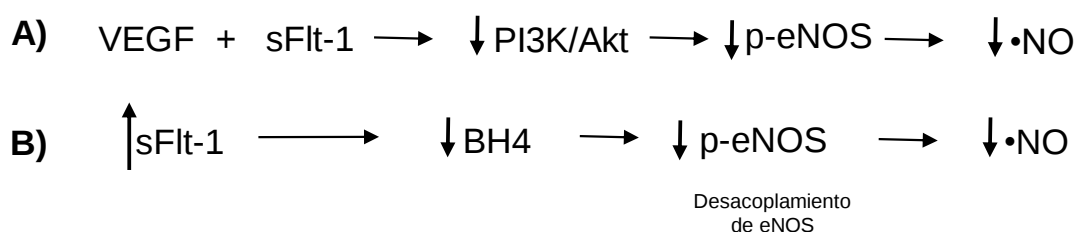


Figura 8.3 Posibles mecanismos moleculares mediante los cuales se explicaría la producción reducida de $\bullet NO$ en el modelo *in vitro* de PE con la administración exógena de sFlt-1. **(A)** La presencia de niveles aumentados de sFlt-1 en medio de cultivo celular, disminuiría la biodisponibilidad de VEGF y por ende, la cascada de señalización intracelular, con la disminución de la activación de PI-3K/Akt, eNOS y por consiguiente la producción de $\bullet NO$. **(B)** El aumento de los niveles de sFlt-1 mediaría la disminución de los niveles del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4), con ello, disminuiría el acoplamiento de eNOS y su activación, resultados en una baja producción de $\bullet NO$.

Tal como se muestra en la **figura 1.7**, el metabolismo de BH4 puede ocurrir mediante dos rutas; la vía biosintética *de novo* y la vía salvaje (*salvage pathway*) (197). La primera enzima de la vía biosintética y también la enzima limitante en la

síntesis de BH4 es la GTP ciclohidrolasa 1 (GTPCH-1). En esta investigación se demostró que sFlt-1 no afecta la expresión de GTPCH, en CEs ni en trofoblastos (**Figura 4.9**). Ya que no existen abordajes similares a esta investigación; estas observaciones pueden contrastarse con la medición de la actividad de GTPCH y otras enzimas involucradas en la vía *de novo* en la síntesis de BH4 tal como; Piruvil tetrahidrobiopterina sintasa (PTPS) y sepiapterina reductasa (SR). Este contraste permitiría entender mejor el papel de la vía biosintética *de novo* en la producción de BH4 y a su vez, el papel que jugaría sFlt-1 en estas reacciones (**Figura 8.4**). En base a este supuesto, un estudio de Iwanaga et al. 2004, demostró que la actividad de GTPCH es detectable solamente en placentas provenientes de embarazos de primer trimestre, pero en etapas más avanzadas del embarazo, la actividad de GTPCH, PTPS y SR no pudo ser identificada (309). Otros hallazgos sugieren que la síntesis *de novo* de BH4 podría ser insuficiente para mantener los niveles de BH4 en el tejido placentario (310).

Ya que no se puede afirmar que la biosíntesis de BH4 no es afectada por sFlt-1 (la expresión de GTPCH-1 permanece intacta, pero su actividad no fue evaluada); el enfoque de estas observaciones se basó en el papel de VEGF para restablecer los niveles de BH4 a nivel del control. Tal como se observó en la **figura 4.9**, VEGF no permite restablecer los niveles de BH4, afectados por sFlt-1. Estos hechos y las evidencias demostradas en esta investigación, indican que sFlt-1, por mecanismos no relacionados al antagonismo en la biodisponibilidad de VEGF, puede modular los niveles de BH4 que a su vez ocurren por mecanismos diferentes a los involucrados en la síntesis *de novo* de este importante cofactor (**Figura 8.4**).

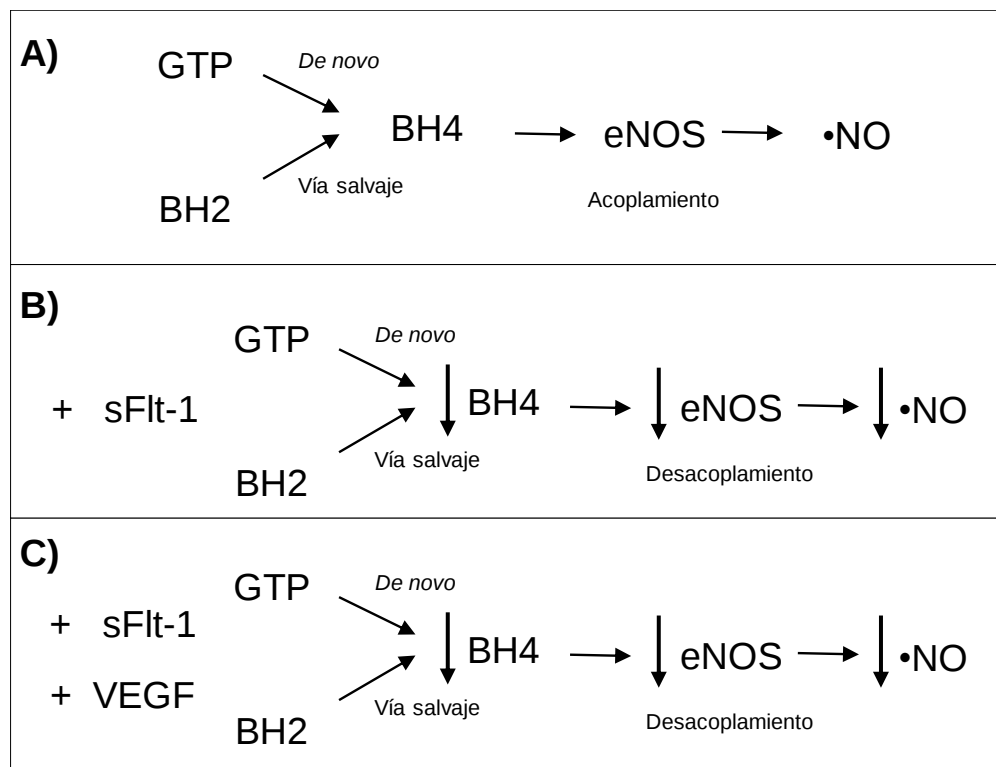


Figura 8.4 VEGF falla en restablecer los niveles de tetrahydrobiopterina (BH4) en CE's tratadas con sFlt-1. **(A)** La obtención de BH4 ocurre por dos vías; la vía *de novo* (biosintética) y la vía salvaje (reciclaje), BH4 permite el acoplamiento de eNOS y favorece la producción de •NO. **(B)** La presencia de niveles aumentados de sFlt-1 tiene efectos en el metabolismo de BH4, lo cual ocasiona de que sus niveles disminuyan y esto afecte el acoplamiento de eNOS y por ende, la producción de •NO. **(C)** La administración de VEGF a células tratadas con sFlt-1 no permite restablecer el metabolismo de BH4 a nivel del control, por lo que sus niveles permanecen disminuidos, eNOS desacoplada y la producción de •NO, disminuida.

8.1.4 El factor anti-angiogénico sFlt-1 afecta la función bioenergética mitocondrial y conlleva a un cambio de fenotipo metabólico en CE's, pero no en trofoblastos.

El estatus nutricional materno es muy importante durante la gestación, no sólo desde el punto de vista fisiológico, sino que predispone a la aparición de enfermedades metabólicas como la diabetes gestacional (133). La mitocondria, tiene una función determinante en la aparición de ciertas enfermedades, entre ellas enfermedades cardiovasculares (135), tal como PE (136). En este orden de ideas, en estudios funcionales y morfológicos, se ha demostrado una asociación entre la mitocondria y PE. En mujeres preeclápticas, se han evidenciado cambios histológicos en las mitocondrias de CE's, con pérdida de las crestas mitocondriales, estos cambios son sugestivos de un desorden sistémico de tipo metabólico (139). Recientemente, un estudio *in vivo*, en ratones, demostró que la infusión exógena de sFlt-1 conduce a los bien definidos signos clínicos de PE, tal como; hipertensión y proteinuria (125). Además, demostraron que sFlt-1 induce cambios histológicos en

la mitocondria, detectados por microscopía electrónica, junto a un aumento en marcadores de apoptosis en el tejido placentario (125). Estas observaciones sugieren que la mitocondria y la disfunción mitocondrial, podrían tener un papel clave en la aparición de PE.

En los resultados de esta investigación se demostró que sFlt-1, dosis dependientemente, es capaz de modular la función bioenergética mitocondrial de CEs (**Figura 4.12**), mientras que este impacto no es tan evidente en trofoblastos (**Figura 4.13**). sFlt-1 provoca una disminución en el consumo de oxígeno mitocondrial y de forma correspondiente, provoca un cambio de fenotipo metabólico a glucólisis en CEs (**Figura 4.14 y 4.15**); lo que probablemente implica un mecanismo compensatorio de las células para soportar sus demandas energéticas. Sin embargo, estos efectos no se observaron en trofoblastos (**Figura 4.16**).

Impacto de sFlt-1 en el metabolismo de CEs.

Las CEs contienen mitocondrias completamente funcionales que a través de la formación de ROS mitocondriales (mROS), participan activamente en el proceso de angiogénesis (311). Las mitocondrias, presentes en células endoteliales, se consideran orgánulos citoplasmáticos de señal, que pueden modular el proceso de angiogénesis, debido a la formación de (mROS) (311), que incluso se han asociado activamente con el proceso de placentación (118). Basado en este precepto, el enfoque de esta investigación fue conocer el papel de moduladores angiogénicos en la función bioenergética mitocondrial. sFlt-1 demostró afectar la función bioenergética mitocondrial de CEs y estos efectos fueron dependiente de las dosis de sFlt-1 administradas (**Figura 4.12**). Este efecto en el metabolismo mitocondrial conllevó a un efecto compensatorio en la activación de la glucólisis (**Figura 4.14**).

Para entender lo que implica el cambio metabólico observado en CEs expuestas a sFlt-1, en esta sección se hizo una comparación, quizás un poco drástica, pero factible; con un proceso patológico, como lo es el cáncer. A lo que se hace referencia en este segmento, es que muchos de los procesos proliferativos, invasivos y de tolerancia inmune que soportan el embarazo, han sido evidenciados en procesos malignos como el cáncer, con la finalidad que el proceso maligno pueda establecer un suministro de nutrientes y para evadir la respuesta inmune. Tanto las células tumorales, como aquellas células relacionadas al desarrollo de la placenta, crean un microambiente que soporta la angiogénesis y el privilegio de la tolerancia (en el caso del embarazo) y la evasión (en el caso del cáncer), del sistema inmune (312).

El principal cambio metabólico descrito en células tumorales es el incremento en la captación de glucosa, mayor aprovechamiento de la capacidad glucolítica y producción elevada de lactato; junto a una reducción en la respiración, a pesar de existir una elevada concentración de O₂ disponible (313). La hipótesis de glucólisis aerobia de Warburg, ha sido desafiada en los últimos años, cuando las investigaciones científicas han apuntado a unificar las diversas teorías del

metabolismo tumoral, a considerar que la respiración mitocondrial y la glucólisis cooperarían para mantener el suplemento energético necesario para la tumorigénesis (314). Por ejemplo, la proliferación de células tumorales conlleva a un cambio de fenotipo metabólico de respiración mitocondrial a glucólisis, lo cual le permitiría a estas células obtener mayor cantidad de ATP en menor tiempo, tal como fue demostrado en células HepG2 (315).

Sin embargo, no hace falta comparar con células que han sufrido cambios de malignidad, para entender cómo las CEs, dependiendo de sus condiciones metabólicas y de microambiente celular, son capaces de alterar su metabolismo. Algunos autores han denominado como “flexibilidad metabólica” a la posibilidad de ciertas células a alternar la glucólisis y la respiración celular, en respuesta a sus necesidades fisiológicas. Louis Pasteur demostró que la mayoría de las células animales, disminuyen la tasa glucolítica en su metabolismo, en presencia de O₂ (Efecto Pasteur) (314). Inclusive, el metabolismo celular de células normales puede variar ampliamente de acuerdo a su tejido de origen (316). Por ello, el metabolismo de células normales puede adaptarse de acuerdo a las condiciones metabólicas y del microambiente que rodea dichas células. En evidencia a esto, otros autores han reportado en estudios *in vitro*, que diversas condiciones de crecimiento pueden alterar el metabolismo, contribuyendo a una mayor dependencia de las células en la glucólisis con fines de obtención de ATP (314).

Con respecto a las CEs, éstas se han considerado células con alta plasticidad metabólica, que pueden cambiar de ser células quiescentes a células energéticas y activas, luego de la estimulación con factores de crecimiento y en condiciones hipóxicas (317). Ya que las CEs revisten los vasos sanguíneos, poseen un acceso inmediato al O₂ transportado en el torrente sanguíneo, lo cual podría promover la respiración mitocondrial. Sin embargo, son muchos los estudios que reportan que las CEs son dependientes del metabolismo oxidativo, sino que son células altamente glucolíticas, generando cerca del 80% del ATP a través de la ruta glucolítica (317, 318). No obstante, cuando los niveles de glucosa son escasos, la oxidación de glucosa, palmitato y amino ácidos se incrementa; lo cual indica que las CEs pueden cambiar a metabolismo mitocondrial cuando las condiciones glucolíticas del microambiente celular son insuficientes (Efecto Crabtree) (319). En condiciones proliferativas, las CEs incrementan la tasa glucolítica celular (317). En condiciones patológicas: por ejemplo, en hipertensión pulmonar, la glucólisis incrementa, mientras que el consumo de oxígeno se reduce (320). Por ende, las CEs pueden actuar como otros tipos celulares que proliferan rápidamente en condiciones fisiológicas e incluso parecerse a células malignas (321).

Ya ha quedado establecido que las CEs tienen plasticidad y flexibilidad metabólica frente a las condiciones del microambiente en el cual se encuentran expuestas. Pero, ¿por qué sFlt-1, antagonista de VEGF, conlleva a incrementar aún más la tasa glucolítica, en células que de por sí, dependen de la glucólisis? Para entender esta incógnita, primero se debe hacer referencia al papel de VEGF en el metabolismo.

Por una parte, VEGF regula la expresión de GLUT-1, transportador de glucosa, dicha regulación ocurre a través de la cascada de señalización de VEGF, vía PI-3K/Akt (322). Además, se ha demostrado que VEGF favorece la glucólisis al incrementar los niveles de fosfofructoquinasa-2/fructosa-2-6-bisfosfatasa, isoenzima 3 (PFKFB3) (317, 323), que permite la síntesis de fructosa-2-6-bisfosfato, activador alostérico de 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1), el cual es un fuerte y potente estimulador de la glucólisis (324). Por otra parte, VEGF estimula la biogénesis mitocondrial vía Akt (145). Mientras que, con respecto a la oxidación de ácidos grasos, VEGF activa a la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4), la cual es una chaperona intracelular de lípidos, que favorece la proliferación de CEs *in vitro* (325).

Con respecto a sFlt-1, este es el primer reporte que estudia los efectos de niveles elevados de sFlt-1 en el metabolismo celular con fines energéticos. Por primera vez, se reporta que sFlt-1 es capaz de disminuir la capacidad de reserva respiratoria dependiente de la dosis de sFlt-1 administrada en CEs (**Figura 4.12**) y de inducir un incremento de la glucólisis (**Figura 4.14**) conllevando a un cambio de fenotipo metabólico de respiración mitocondrial (basal) a fenotipo glucolítico (**Figura 4.15**).

Ya que no es posible comparar estos hallazgos con otros que hayan estudiado los efectos de sFlt-1 en el metabolismo celular y su impacto en la mitocondria como perturbador temprano; se analizaron los hallazgos de otros autores que han estudiado los efectos de terapias anti-angiogénicas, para antagonizar los efectos de VEGF en procesos tumorales. El estudio de Curtarello et al. 2015, mostró que tumores con alta dependencia a la glucólisis adquieren rápidamente resistencia a la neutralización de VEGF con terapias anti-VEGF (326). Este grupo de investigación analizó 4 modelos diferentes de tumores y reportaron por primera vez en su área de estudio, que la terapia anti-VEGF causa que los tumores que son altamente dependientes de glucólisis, a pesar de disminuir transitoriamente su dependencia por esta ruta metabólica, ante terapias prolongadas de la terapia anti-VEGF, se adaptan nuevamente a la glucólisis.

Los investigadores también analizaron *in vitro*, los efectos de la terapia anti-VEGF, específicamente el bevacizumab, en la dependencia metabólica de las células en estudio. Los investigadores hallaron que la terapia con la droga bevacizumab (anti-VEGF) en cultivos *ex vivo*, inhibe el OCR (estudiado con la tecnología Seahorse-Agilent). En sus ensayos, la terapia anti-VEGF disminuyó el OCR acoplado a ATP y abolió completamente el OCR acoplado a la respiración máxima y capacidad de reserva respiratoria; ya que luego de la administración de FCCP en su prueba, el OCR no aumentó con respecto a la respiración basal. Vale acotar que, hasta este punto, las observaciones de Curtarello et al, son bastante similares a lo observado en las pruebas realizadas en CEs con dosis crecientes de sFlt-1 de esta investigación, en la cual, ya se ha establecido en varias oportunidades que sFlt-1 funciona como un antagonista de VEGF (ver **figura 4.12**).

Tal como Curtarello et al. 2015, sugieren en su estudio, las observaciones de la presente investigación, implican que las células adquieren un fenotipo Warburg, al utilizar la glucólisis con fines energéticos ante cualquier situación que conlleve a un incremento en su demanda energética (sFlt-1), más allá de su capacidad respiratoria basal (ver **figura 4.15**). Al igual que en la presente investigación (ver **figura 4.14**), en la investigación de Curtarello et al., se observó un aumento de ECAR, lo cual indicó que existe un incremento y mayor aprovechamiento de la glucólisis, levemente canalizado hacia el ciclo de Krebs, conllevando a un incremento en la conversión de piruvato a lactato. En el presente estudio, dicha medición de la conversión de piruvato a lactato no fue llevada a cabo. Sin embargo, dada la similitud de los presentes hallazgos con los de Curtarello y otros (327, 328), se puede sugerir que de medir dichos niveles de lactato, muy probablemente se encontrarían aumentados y la conversión de piruvato a lactato estaría aumentada también. En base a este análisis, se sugiere complementar con estas pruebas para poder afirmar este hecho.

Un mecanismo que podría explicar esta respuesta metabólica ante terapias anti-VEGF y que podría ayudar a explicar por qué se incrementa la glucólisis luego de administrar sFlt-1 en CEs, corresponde a que en respuesta al antagonismo instaurado contra VEGF, las células liberarían factores pro-angiogénicos para sobrepasar los efectos de la neutralización de VEGF. Estos efectos han sido previamente observados en estudios con células mieloides y su papel en la progresión de la angiogénesis en tumores (329). Otros autores también han reportado, que el bloqueo de VEGF evoca mecanismos de escape del tumor, a través de la revascularización al promover la liberación de señales pro-angiogénicos adicionales (330, 331).

Este es el primer reporte que demuestra el impacto de sFlt-1 en el metabolismo mitocondrial de CEs. A través de la gestación, los niveles circulantes de FAAs incrementan en función a la edad gestacional. Sin embargo, en PE, por mecanismos aún desconocidos, sFlt-1 es producido drásticamente y desproporcionadamente en la placenta (25). Los datos obtenidos en este estudio indican que el incremento en los niveles de sFlt-1 puede resultar en la pérdida de la función endotelial en etapas tempranas del embarazo, conllevando a un fenotipo metabólico mitocondrial alterado y disfunción endotelial generalizada.

Impacto de sFlt-1 en el metabolismo de trofoblastos.

En contraste a las observaciones en CEs, las células trofoblásticas HTR-8/SVneo, demostraron poseer un metabolismo glucolítico basal, con un elevado consumo de oxígeno (**Figura 4.13**). El impacto de sFlt-1 en la función bioenergética mitocondrial de trofoblastos fue mucho menor que en CEs (**Figuras 4.12 y 4.13**). En contraste con las observaciones en CEs, se observó que las HTR-8/SVneo tienen una elevada OCR basal y una reducida reserva respiratoria al comparar con el perfil respiratorio de CEs (**Figura 4.12 A y 4.13 A**, respectivamente). Estas diferencias sugieren que

las células trofoblásticas en condiciones basales, poseen mitocondrias altamente funcionales y que, en condiciones de estrés metabólico, (por ejemplo, tras la administración de FCCP), no dependen de la actividad metabólica mitocondrial para soportar sus requerimientos metabólicos. El perfil metabólico que mostró HTR-8/SVneo fue inesperado. Fue difícil entender que los trofoblastos de las vellosidades de la placenta, que provienen de la proliferación rápida de los STB (332), realmente no basaban sus requerimientos metabólicos en la mitocondria. Además, ese impacto metabólico débil, comparado con CEs, sugirió que ya que la principal fuente de sFlt-1, proveniente de los trofoblastos, ya que son células productoras de sFlt-1 (25), podrían estar programadas metabólicamente para sopesar estos efectos en la respiración mitocondrial.

Con respecto a esto, se podría entender que los trofoblastos estarían metabólica y genéticamente programados para sopesar ciertas condiciones del microambiente en el cual se desarrollan. Para entender esta programación de las células trofoblásticas, se debe recordar uno de eventos inicial en el proceso de la gestación, como lo es la hipoxia. La hipoxia conlleva a una serie de respuestas; entre ellas la angiogénesis y la eritropoyesis, que en la placenta involucra un incremento en la densidad de las vellosidades placentarias (333, 334), incremento en la liberación de VEGF (335), sobrevivencia celular y adaptaciones metabólicas para aumentar el suplemento de energía a través de mecanismos no oxidativos, tal como rutas metabólicas anaerobias. En la placenta, estos mecanismos de adaptación metabólica se han demostrado por el incremento en el consumo de glucosa y la producción aumentada de lactato en hipoxia (336), así como el incremento en la expresión de transportadores de glucosa (337), junto a otros elementos clave en la glucólisis (338). La reprogramación metabólica produce un estado hipometabólico, caracterizado por la reducción del consumo de oxígeno, para aumentar la disponibilidad de O₂ a nivel celular. Este estado es reversible y la hipoxia, es el responsable del cambio metabólico de la oxidación de carbohidratos a la glucólisis anaerobia. Dicho cambio metabólico no ocurre por defectos a nivel de la CTE en la mitocondria, ni por la disminución de O₂ disponible; en su defecto, corresponde al resultado de la activación de procesos que limitan el consumo de O₂ (333). La reprogramación metabólica incluye una serie de procesos que conllevan a:

- a) Inhibición directa del consumo de O₂.
- b) La utilización de carbohidratos por rutas metabólicas no oxidativas.
- c) Reducción de la masa mitocondrial.

Todos estos eventos se relacionan a la hipoxia y a la expresión aumentada de HIF-1 α (333).

Todos estos eventos ya descritos, apuntan a que los trofoblastos, dadas sus condiciones hipoxicas durante la gestación, ciertamente se ven obligadas a tener una reprogramación metabólica que les permita adaptarse a su entorno de desarrollo. Sin embargo, en esta investigación se reporta por primera vez el perfil

metabólico de los trofoblastos, HTR-8/SVneo, los cuales son trofoblastos de las extra vellosidades de placenta inmortalizados. No existen reportes previos que permitan comparar los hallazgos de este estudio en lo concerniente al efecto de sFlt-1 en el metabolismo mitocondrial de estas células. No obstante, la biología asociada al proceso de gestación si es bien conocida, lo cual permite argumentar que efectivamente los trofoblastos HTR-8/SVneo, son células reprogramadas metabólicamente y dicha reprogramación (**Figura 4.13**), le permite estar “blindada” ante los efectos de sFlt-1 en concentraciones que *in vitro*, se encuentran entre: 10 a 25 ng/mL. A pesar de esto, tal como se observó en la **figura 4.16**, la administración de sFlt-1 50 ng/mL conlleva a una tendencia, que a pesar de no haber sido significativa estadísticamente, evidencia el efecto que tiene sFlt-1, en elevadas concentraciones en este tipo de células. Las evidencias de este estudio sugieren que sFlt-1, producido inicialmente en la placenta, podría tener efectos paracrinós en el endotelio materno, induciendo cambios metabólicos que impactan la viabilidad, proliferación y crecimiento del endotelio.

sFlt-1 demostró en este estudio que puede actuar como un agente disruptor del metabolismo mitocondrial, principalmente en CEs, pero también en trofoblastos (**figura 4.17**). Los experimentos de viabilidad celular en presencia de sFlt-1, con sustitución de glucosa como fuente de carbonos por galactosa, fue determinante para este hallazgo. Al sustituir la principal fuente de carbonos (glucosa) por galactosa, no se genera producción neta de ATP, por ello, bajo estas condiciones, las células dependen de la fosforilación oxidativa para generar suficiente ATP para la sobrevivencia celular (229). Con este ensayo, evidenciado en la **figura 4.17**, se pudo entender que la administración de sFlt-1, efectivamente conlleva a un cambio de fenotipo metabólico que favorece la glucólisis y dado que el cultivo en medio con galactosa, fuerza la obtención de energía vía mitocondria, sFlt-1 conlleva a disminuir la viabilidad y proliferación de CEs (**Figura 4.17 C y E**). Mientras que, con este ensayo, también se constató la dependencia metabólica de las HTR-8/SVneo en glucólisis. Incluso en ausencia de sFlt-1, el cultivo de trofoblastos en medio con galactosa, afectó la viabilidad y proliferación celular (**Figura 4.17 D y F**).

Otros estudios en citotrofoblastos aislados de placentas a término, han demostrado que los trofoblastos a término exhiben elevada capacidad de reserva respiratoria (339) al comparar con los resultados de esta investigación en HTR-8/SVneo. Esto sugiere que las células trofoblásticas, en etapas tempranas de la gestación, están metabólicamente programadas para sobreponerse y compensar el efecto de disruptores metabólicos. Basado en las observaciones con respecto a HTR-8/SVneo y las observaciones de otros autores (339); se presume que ya en etapas finales del embarazo, cuando la función de la placenta llega a su inevitable fin, el perfil metabólico de los trofoblastos cambia en función a la culminación de sus funciones biológicas. Además, es importante tener presente que, los trofoblastos aislados de placentas y mantenidos en cultivo, al cabo de 48 horas manifiestan un cambio en la expresión génica que afecta la invasión y proliferación *in vitro* (340). Estas observaciones sugieren que, las células aisladas de placentas a término,

podrían no ser el enfoque más apropiado para estudiar los efectos de disruptores tempranos del metabolismo, tal como sFlt-1 ha mostrado en esta investigación.

8.1.5 sFlt-1 conlleva a disfunción mitocondrial en células endoteliales, pero no en trofoblastos.

Los cambios en el metabolismo mitocondrial están generalmente asociados a cambios en el potencial de membrana mitocondrial y a la producción de mROS (248, 249). Por este motivo, se evaluó la formación de mROS y del potencial de membrana mitocondrial en CEs y trofoblastos expuestos a sFlt-1. Tal como se observa en la **figura 4.18**, las CEs expuestas a 50 ng/mL de sFlt-1, presentan una mayor producción de mROS, detectado por fluorescencia con la sonda MitoSOX. Estos resultados se corresponden con observaciones previas en este estudio (**Figura 4.12**), donde se observó el efecto de sFlt-1 en la función bioenergética mitocondrial. El incremento en la producción de mROS y la disminución en la respiración mitocondrial, aunado al incremento de la capacidad y actividad glucolítica (**Figura 4.14**) de estas CEs expuestas a sFlt-1, sugiere que la administración de sFlt-1, conlleva aun cambio de fenotipo metabólico que favorece la disponibilidad de O₂, que a su vez, es empleado en la mitocondria en la formación de mROS.

Tal como ha sido previamente expuesto, en el embarazo normal, existe un estado de estrés oxidativo fisiológico (118), detectado al medir marcadores de estrés oxidativo en sangre y orina de las maternas (341, 342). Este incremento de estrés oxidativo, se ha asociado a un aumento en el metabolismo; tanto de la placenta, como el metabolismo materno (118). Estas observaciones de otros autores sugieren que sFlt-1 tiene un papel clave en la modulación y reprogramación metabólica durante el embarazo. Mientras que, cuando sus niveles incrementan drásticamente, su papel se balancea hacia la instauración de un proceso patológico como la PE.

Los resultados de esta investigación demostraron que sFlt-1, administrado exógenamente, es capaz de inducir la producción de mROS (**figura 4.18**) y de alterar el potencial de membrana mitocondrial en CEs (**figura 4.19**); pero estos efectos no fueron observados en células trofoblásticas. En los trofoblastos, se estudió también los efectos en la producción de mROS y en la disipación (disminución) el potencial de membrana mitocondrial ante la exposición a sFlt-1 (**Figuras 4.20 y 4.21**, respectivamente). Tal como se evidencia en las figuras citadas, sFlt-1 no conlleva a cambios en la función mitocondrial en trofoblastos. En este punto, es importante recordar que, en los estudios de bioenergética mitocondrial, los efectos de sFlt-1 en la función mitocondrial fueron mucho menores que en CEs. Además, que antes concentraciones de sFlt-1 de 50 ng/mL, los cambios en la bioenergética mitocondrial, más que ser significativos, mostraron fue una tendencia a disminuir (**Figura 4.13 y 4.16**).

En relación a estas observaciones, otros autores han demostrado que la disminución de la biodisponibilidad de VEGF, debido a niveles aumentados de sFlt-1, se asocia al aumento en la producción de $O_2^{\cdot -}$ tanto en la placenta como en el tejido vascular (301). Incluso, en estudios *in vivo*, con administración exógena de sFlt-1 se ha evidenciado un aumento de estrés oxidativo en múltiples tejidos (124). Por otra parte, la administración de Tempol, agente farmacológico que mimetiza los efectos de la enzima superóxido dismutasa (SOD), revirtió los efectos hipertensivos en las ratas tratadas con sFlt-1 (124). Lo cual demuestra, una vez más, el papel de las ROS en PE y a su vez, el protagonismo de sFlt-1 en la inducción de la enfermedad.

Ya que elevadas concentraciones de sFlt-1 (50 ng/mL) no sólo conllevan a perturbaciones metabólicas sino a cambios en la función mitocondrial, los resultados obtenidos sugieren que en etapas tardías del embarazo (después de la semana 20 de gestación), cuando los niveles circulantes de FAAs como sFlt-1 aumentan drásticamente, superando el umbral para el freno angiogénico fisiológico, no sólo existirá un compromiso a nivel metabólico en el endotelio materno, sino el establecimiento de un proceso de disfunción mitocondrial.

8.2 Modelo de correlación *in vitro* de PE. sFlt-1 y TNF- α como moduladores del metabolismo, función endotelial y función bioenergética mitocondrial en PE.

8.2.1 Modelo de correlación *in vitro* de PE. Reclutamiento de pacientes para el estudio.

El embarazo es un complejo proceso, orientado por un adecuado balance angiogénico (133) y por el reconocimiento, comunicación y reparación celular mediada por el SI (343). Además del papel que juegan los FAAs en PE, esta enfermedad también se ha considerado que tiene una base inmunológica (92, 251, 252). Dada la importancia que juega el SI y los FAAs en PE, se estableció un modelo de correlación *in vitro*, empleando sueros de pacientes gestantes normotensas y preeclámpticas. En ocasiones previas, otros autores han empleado modelos de correlación *in vitro* de PE, empleando en sus cultivos suero (81, 344) o plasma (160, 345) de mujeres embarazadas. Con el empleo de sueros en el modelo de correlación *in vitro*, se logró evidenciar los efectos de factores presentes en el torrente sanguíneo materno, que fueran capaces de conllevar a enfermedad. Vale acotar que los sueros fueron colectados antes del parto, es decir, cuando las condiciones de PE ya estaban completamente instauradas.

Fue importante observar los efectos del suero, a pesar de que ya la PE estaba completamente establecida, porque de esta manera se podría observar si efectivamente, los factores presentes en el suero materno, conllevan a alteraciones en la función endotelial y metabólica. En futuras ocasiones, se plantea que los estudios con sueros de maternas en gestación puedan realizarse a través de un

estudio de cohorte, que permita evidenciar si en condiciones tempranas de la enfermedad, incluso antes de detectarse síntomas, ya pueda establecerse un proceso de disfunción endotelial y la existencia de perturbaciones metabólicas tempranas que orienten al clínico, a detectar la enfermedad de manera oportuna. Por otra parte, en este estudio también se incluyó un grupo de pacientes no embarazadas como grupo control para el modelo de correlación, con la finalidad de comparar más objetivamente y discriminar entre los efectos hallados entre los grupos de pacientes normotensas y preeclámpticas, que dadas su condición de embarazo, se encuentran bajo un incremento en la demanda energética (346).

El reclutamiento de pacientes se hizo con la finalidad de obtener muestras de suero; los tres grupos de pacientes definidos se caracterizaron por estar emparejados en cuanto a la edad. Tal como se observó en la **tabla 5.1**, se encontraron diferencias en función a la edad gestacional de las pacientes embarazadas, este hecho respondió a que las pacientes preeclámpticas por su condición patológica, fueron des-embarazadas hacia la semana 33 (pretérmino). No se encontraron diferencias entre el índice de masa corporal (IMC) de las pacientes normotensas y preeclámpticas, este hecho se corresponde con observaciones de otros investigadores que, a diferencia de los supuestos que relacionan a preeclámpsia con obesidad, confirman que la obesidad es sólo un factor de riesgo para la enfermedad (347), ya que mujeres no obesas también pueden desarrollar PE. Tal como ha sido definido por la *American College of Obstetricians and Gynecologist*, la PE se caracteriza por una presión sistólica y diastólica aumentada, asociada generalmente a proteinuria (7); observaciones que también fueron obtenidas y consideradas al reclutar las pacientes en el estudio.

Ya que la finalidad del reclutamiento de pacientes fue obtener muestras de suero que fueran mejores representativas del proceso patológico de PE; se midieron los niveles de sFlt-1 en suero de dichas pacientes (**Figura 5.1**). Tal como ha sido previamente identificado, los niveles de sFlt-1 están aumentados en la circulación de maternas preeclámpticas (43-45, 348). En esta investigación, las determinaciones también se realizaron en pacientes controles no embarazadas, lo que permitió identificar que efectivamente los niveles de sFlt-1 aumentan durante el embarazo en comparación a pacientes no gestantes.

8.2.2 Papel de la señalización de VEGF en el establecimiento de disfunción endotelial en PE.

En este estudio se propuso evaluar el papel del sFlt-1, en exceso en circulación de maternas preeclámpticas, como agente causal de la disfunción endotelial, y con ello, conocer el papel de sFlt-1 como antagonista de la señalización de VEGF. Una vez establecidos los niveles de sFlt-1 presentes en sueros de pacientes normotensas y preeclámpticas (**figura 5.1**), se evaluó el papel de sFlt-1 en el establecimiento de DE. Para ello, se cultivaron CEs en presencia de sueros provenientes de pacientes

en estudio (2% de suero) y se administró proteína rh VEGF (20 ng/mL). La determinación de los niveles de •NO fueron medidos mediante la cuantificación de su sustituto, NO₂⁻, por quimioluminiscencia.

Ante los tratamientos, se observó que el suero de pacientes normotensas no afectó la función endotelial, ya que los niveles de •NO permanecieron similares a los obtenidos en CEs expuestas a sueros de pacientes no embarazadas (**figura 5.2**). Estos hallazgos se corresponden con observaciones previas que han estudiado la función endotelial (a través de ensayo de formación de tubos), donde los investigadores observaron que luego de la administración de sueros de pacientes normotensas, la formación de tubos ocurre normalmente (81). Consistentemente, cuando se evaluó la función endotelial de CEs expuestas a sueros de pacientes PE, se observó la disminución en la producción de •NO (**figura 5.2**). Nuevamente, estos hallazgos se corresponden con observaciones previas en ensayos de formación de tubos (81).

En este estudio, al co-administrar VEGF exógeno (20 ng/mL), junto a los sueros de las pacientes, los niveles de •NO aumentaron significativamente; pero, a diferencia de observaciones de otros investigadores en la función endotelial, los niveles de •NO, no fueron completamente restablecidos a nivel del control (81). Es muy importante recalcar que, en esta investigación, uno de los objetivos fue conocer los efectos a nivel de la producción de •NO; los ensayos de formación de tubos (investigación de Maynard et al. 2003) son representativos del proceso de angiogénesis. Lo cual quiere decir, que si bien el ensayo de formación de tubos, es un ensayo que permite entender el proceso de angiogénesis *in vitro*, el enfoque de esta investigación fue mucho más delimitado, no estuvo orientado al proceso de angiogénesis visto de forma integral, sino a entender el papel de los FAAs, presentes en el suero de las maternas, capaces de alterar los niveles de •NO. Finalmente, el enfoque en esta presente investigación estuvo orientado a conocer los mecanismos de señal derivados de esa relación y balance angiogénico de sFlt-1/VEGF y la señalización de VEGF/•NO. Al no observar el restablecimiento de la producción de •NO ante la administración exógena de VEGF, los resultados mostrados en la **figura 5.2**, indican que otras moléculas presentes en suero de pacientes preeclámpticas, están involucradas en el proceso de disfunción endotelial, característico de la enfermedad.

8.2.3 La administración exógena de VEGF no reestablece la función bioenergética mitocondrial de CEs y HTR-8/SVneo expuestas al modelo de correlación in vitro de PE.

Para conocer el impacto de los sueros provenientes de pacientes normotensas y preeclámpticas en la bioenergética mitocondrial de CEs y trofoblastos, se cultivaron células en presencia de 2% de suero de las pacientes; empleando como control, sueros de pacientes no embarazadas. Los análisis de bioenergética mitocondrial

con la tecnología Seahorse-Agilent, permitieron identificar que la administración de sueros de pacientes gestantes normotensas brinda un perfil mitocondrial similar al observado en presencia de sueros de pacientes control, tanto en CEs (**figura 5.3**), como en trofoblastos (**figura 5.4**). Con respecto a la administración de sueros de pacientes preeclámpticas, se observó que tanto en CEs como en trofoblastos, la respiración máxima y capacidad de reserva respiratoria, disminuyen significativamente al comparar con células expuestas a pacientes controles y normotensas (**Figuras 5.3 y 5.4**, respectivamente).

Lo interesante de la tecnología Seahorse-Agilent es que permite la medición del OCR y ECAR, en tiempo real y en células intactas (Ver “Materiales y métodos”, sección: Función bioenergética mitocondrial y metabolismo). Entre las diferentes determinaciones posibles: El OCR-Máximo, corresponde al máximo consumo de oxígeno al complejo IV de la CTE. La tasa de respiración máxima se obtiene por la adición del agente desacoplante de la CTE, FCCP. Bajo esta condición, se refleja una tendencia del agente desacoplante en estimular la respiración, tal como ocurriría en estudios con mitocondrias aisladas al añadir sustrato en exceso. A pesar que este estado artificial de exceso de demanda energética, no evoca las condiciones fisiológicas de incorporación de sustrato al interior de la célula, permite entender y conocer las capacidades metabólicas de las células, en condiciones de incremento de la demanda energética (349). Cuando la concentración del agente desacoplante es adecuada; las tasas de consumo de oxígeno máximo identificadas, reportan la máxima actividad de la CTE y la máxima oxidación de sustratos posible, para las células bajo las condiciones de cultivo (349). La disminución en el consumo de oxígeno máximo observado en CEs y trofoblastos tratados con 2% de suero de pacientes preeclámpticas, es un indicador de disfunción mitocondrial (**Figuras 5.3 B y 5.4 B**), tal como ha sido previamente identificado en otros escenarios patológicos (349, 350).

Los efectos en la respiración máxima causados por el suero de pacientes preeclámpticas, se correspondieron con las observaciones de la capacidad de reserva respiratoria (**Figuras 5.3 C y 5.4 C**). La medición del OCR-Reserva permite conocer la habilidad de las células a responder a demandas energéticas, así como a la capacidad de incorporación de sustratos para suplir dichas demandas. Este valor se obtiene con la diferencia entre el consumo de oxígeno en el estado de respiración 3 (respiratory state 3) (OCR-Máximo) y el OCR-Basal (349). En casos como el observado en CEs y trofoblastos expuestos a sueros de pacientes preeclámpticas, la ausencia de capacidad de reserva respiratoria, indica un estado de disfunción mitocondrial que puede no ser evidente en condiciones basales (**Figuras 5.3 C y 5.4 C**). Es decir, cuando la tasa de respiración depende del metabolismo de ATP, pero que se manifiesta únicamente en condiciones de demanda energética, que superan la tasa de oxidación de sustratos que limitan el proceso de respiración (349).

Tal como se observó anteriormente en esta investigación, la administración de VEGF parcialmente restableció la producción de •NO en el modelo de correlación *in vitro* de PE (**figura 5.2**). Por ello, se esperaban los mismos efectos de VEGF en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial del modelo de correlación con sueros de pacientes. Sin embargo, fue evidente que, en la función mitocondrial, los efectos de VEGF fueron mucho menos significativos que con respecto al restablecimiento de los niveles de •NO (**figura 5.5**). Estas evidencias sugieren que la biodisponibilidad de VEGF es necesaria para mantener el estatus metabólico celular, pero además indican que los efectos del suero de pacientes preeclámpticas en la función bioenergética mitocondrial, van más allá de la acción de sFlt-1 (aumentado en sueros de pacientes preeclámpticas) al actuar como un antagonista en la señalización de VEGF.

Es probable que otras moléculas presentes en el suero materno de mujeres preeclámpticas (y a menor escala en sueros de pacientes normotensas), podrían ser responsables de desencadenar los efectos observados a nivel metabólico. Al contrastar estos resultados con las observaciones previas en relación a sFlt-1 exógena, es posible que sFlt-1 promueva la liberación de otras moléculas que potencialmente impacten a nivel metabólico y establezcan perturbaciones metabólicas tempranas a nivel mitocondria. Tomando en cuenta que la PE tiene una base inmunológica, se consideró que entre estas posibles moléculas que podrían estar involucradas en eventos metabólicos tempranos en PE, podrían considerarse citoquinas, tal como TNF- α (92, 251, 252).

Entre otras observaciones de este estudio, la administración de sueros de pacientes preeclámpticas para el cultivo de CE y trofoblastos, se observó que desencadenó un incremento en la producción de mROS (**figuras 5.6 A-B y 5.7 A-B**) así como la disipación (disminución) del Ψ_m (**figuras 5.6 A-B y 5.7 A-B**). En concordancia con las observaciones correspondientes a la función bioenergética mitocondrial, la administración de VEGF logró disminuir significativamente la producción de mROS en comparación a las células tratadas con sueros proveniente de mujeres con PE (**figuras 5.6 A-B y 5.7 A-B**). Además, la administración de VEGF logró una tendencia a aumentar el Ψ_m en CE (**figura 5.6 C**), que fue significativa estadísticamente en trofoblastos (**figura 5.7 C**).

Es importante recalcar que la administración de sueros de pacientes normotensas, en CE, no conllevó a cambios significativos en la producción de mROS, ni tampoco efectos en el Ψ_m (**Figura 5.6**). Mientras que, en trofoblastos, el suero de pacientes normotensas, aumentó significativamente la producción de mROS (**figura 5.7 A-B**). Este hecho peculiar, podría responder a algunas de las incógnitas anteriormente establecidas con respecto al papel de sFlt-1 en trofoblastos (sección 8.1). En este estudio, se observó que el efecto de sFlt-1 en trofoblastos es mínimo, comparado a lo observado en CE y se sugirió que dado el origen y producción exacerbado de sFlt-1 proviene de la placenta (25), las células trofoblásticas estarían blindadas ante los efectos perjudiciales de sFlt-1 en el metabolismo de este tipo de células. La

mayor producción de mROS vista en trofoblastos expuestos a sueros provenientes de maternas normotensas se corresponde con observaciones previas de otros autores. En primer lugar, con el hecho que el estatus oxidativo y ROS están incrementados a nivel intrauterino y este hecho se relaciona a la programación del desarrollo fetal (118). Por ello, esta producción aumentada de mROS, comparada con aquellas células trofoblásticas tratadas con sueros de mujeres no gestantes, podría significar un evento completamente fisiológico. Por otra parte, tal como se estableció en la sección anterior (sección 8.1), los trofoblastos son células con un metabolismo dependiente principalmente de la glucólisis, que no dependen de la actividad metabólica mitocondrial para soportar sus requerimientos metabólicos, lo cual aumenta la disponibilidad del O₂ para otros fines metabólicos. Finalmente, existen reportes en otros escenarios fisiológicos y patológicos, donde las mROS han demostrado que permiten orientar la proliferación y diferenciación celular en diversos tipos celulares (351, 352).

8.2.4 Efectos de TNF- α en la función endotelial y función bioenergética mitocondrial de CEs y trofoblastos.

En el embarazo normal, la decidua contiene un número elevado de células inmunes, tales como: macrófagos, células NK y células T reguladoras (353). Los macrófagos, se infiltran en la decidua materna alrededor de los trofoblastos invasores (343). Existe una teoría que intenta explicar el embarazo, como un proceso anti-inflamatorio, con una respuesta inmune predominantemente tipo Th2 (354). La PE, se ha asociado a una excesiva respuesta inflamatoria, que involucra una producción aumentada de citoquinas pro-inflamatorias de la respuesta inmune tipo Th1, tal como TNF- α . Además, de una reducida respuesta inmune de tipo Th2, tal como IL-10; que conlleva a un cambio del balance Th1/Th2 a una respuesta predominantemente de tipo Th1 en PE. La respuesta tipo Th1 en PE, conlleva a una tolerancia disminuida por parte del SI materno, que resulta en una invasión trofoblástica deficiente y placentación alterada (98).

Dado que las observaciones con sueros de pacientes y VEGF, no demostró que la función endotelial y bioenergética mitocondrial puede ser restablecida al incrementar la biodisponibilidad de VEGF (**Figura 5.5**); el siguiente enfoque en este estudio, se orientó hacia el papel de TNF- α , como principal mediador de la respuesta inmune tipo Th1 y al bien establecido FAAs, sFlt-1. Otros investigadores han postulado que el antagonismo de VEGF mediado por sFlt-1 en CEs, genera mayor sensibilidad de estas células a FPIs (65). Partiendo de este hecho, se evaluó el papel de TNF- α como mediador de DE y como mediador de perturbaciones metabólicas en PE.

Para establecer la relación entre las observaciones del modelo de correlación *in vitro* con sueros de pacientes, TNF- α y disfunción mitocondrial, se midieron los niveles circulantes de TNF- α de las maternas en estudio (**figura 5.8**). En esta

investigación se identificaron niveles circulantes de este FPIs, significativamente aumentados en comparación a los niveles en maternas normotensas, tal como ha sido identificado por otros investigadores (355-357). Para entender el papel de TNF- α en el establecimiento de disfunción endotelial, se estudió por western blot la expresión y activación de eNOS (p-eNOS) en CE y trofoblastos expuestos a TNF- α recombinante. Para este ensayo, las células fueron tratadas con TNF- α durante 15 minutos (**figuras 5.9 y 5.10**). En este estudio, la expresión de eNOS no varió luego de la administración de TNF- α . Estos hallazgos difieren de otras observaciones de otros autores que indican que TNF- α es capaz de disminuir la expresión de eNOS (254, 261). La activación de eNOS, medida como la fosforilación de eNOS en el residuo de serina 1177, disminuyó significativamente en esta investigación (**figura 5.10**).

Por otra parte, la administración de TNF- α demostró afectar la función bioenergética mitocondrial de CE y trofoblastos (**figura 5.12**) y trofoblastos (**figura 5.13**). TNF- α afectó el consumo de oxígeno basal en ambas líneas celulares. Tal como se describió en la sección “Materiales y métodos”: Función bioenergética mitocondrial y metabolismo; la respiración basal es controlada por la producción de ATP, oxidación de sustratos y por la fuga de protones. Por lo tanto, puede verse alterada en respuesta a la demanda de ATP (349). Tal como se demostró en esta investigación, la administración de TNF- α , afecta la viabilidad y proliferación celular (**figura 5.11**).

Estos hechos han sido previamente identificado en células tratadas con TNF- α exógeno y se ha identificado que TNF- α impacta directamente en la mitocondria e induce apoptosis por la vía intrínseca mitocondrial (358-360). Las observaciones en la función bioenergética mitocondrial mediadas por TNF- α indican su papel como agente disruptor mitocondrial. Además del OCR-Basal, el OCR-Máximo y OCR-Reserva fueron afectados por la administración de TNF- α en CE y en trofoblastos también. Tal como se comentó anteriormente; el OCR-Máximo y OCR-Reserva, reflejan la habilidad de las células para obtener energía más allá de su máxima capacidad. Estos resultados indican que TNF- α afecta dramáticamente la obtención de energía de las CE y trofoblastos cultivados con esta importante citoquina. En otros escenarios diferentes a PE, se ha demostrado el papel de TNF- α como agente inductor de disfunción mitocondrial. En estudios *in vitro* empleando neuronas HT-22, se determinó que tras la administración de TNF- α exógena, se observa una reducción de la función mitocondrial, detectado por la tecnología Seahorse-Agilent (361).

Entre otras determinaciones; la determinación el OCR-ATP, se calculó luego de la administración de la droga oligomicina en el ensayo. Ya que la oligomicina inhibe el complejo V (ATP sintasa), las células hacen un cambio a partir de la respiración celular a glucólisis para soportar la demanda de ATP (349). En situaciones como la observada en este estudio, en respuesta a TNF- α , donde el OCR-ATP disminuyó significativamente, indica que las células no son capaces de copar su demanda energética de ATP a través de otras rutas como la glucólisis (**figuras 5.12 y 5.13**).

Finalmente, el OCR acoplado a la fuga de protones, fue significativamente en células tratadas con TNF- α con respecto al control. A medida que la determinación de OCR-Fuga de protones aumenta, la severidad de daño y la disfunción mitocondrial aumenta también (349).

Por último, el potencial metabólico de las células, representa su habilidad para obtener sus demandas energéticas vía respiración mitocondrial y/o glucólisis. Los resultados observados en este estudio, se corresponden con las observaciones de la actividad bioenergética mitocondrial de células expuestas a TNF- α (**figuras 5.14 y 5.15**). Esta citoquina, tal como se observó a lo largo de los experimentos de la función mitocondrial (**figuras 5.12 – 5.15**), afecta la función mitocondrial, aumentando la formación de mROS (**figura 5.16**) y la disipación (disminución) del Ψ_m (**figura 5.17**). En conjunto, los resultados mostrados en esta sección indican que los efectos de TNF- α en la viabilidad y proliferación celular no pueden ser soportados por un cambio de fenotipo metabólico. En este orden de ideas; es importante tener en cuenta que TNF- α , al enlazarse con su receptor 1 (TNFR1), puede de forma alternativa conllevar a muerte celular o a una respuesta de sobrevivencia a través de la formación de dos complejos ligando-receptor, diferentes (362). Los mecanismos de muerte celular estimulados por TNF- α , dependen de la formación de un complejo que conllevara a un mecanismo apoptótico dependiente de caspasas (363). Por ello, se entiende que los efectos de TNF- α en CE y trofoblastos, para conllevar a muerte celular son directos hacia la activación de la apoptosis vía caspasas, lo cual no involucra reprogramación metabólica, que permita mantener la viabilidad celular, debido a que las señales de muerte celular del complejo ligando-receptor hacia apoptosis, son inminentes.

8.2.5 VEGF, regulador maestro de la producción de sFlt-1 y TNF- α .

Los hallazgos en esta investigación demostraron que no sólo sFlt-1 es responsable de desencadenar eventos moleculares que conllevan a PE (sección 8.1). También, tal como fue demostrado en el modelo *in vitro* de PE con la administración de TNF- α , se demostró que esta molécula es capaz de desencadenar cambios en la función mitocondrial en CE y trofoblastos (sección 8.2.4). Tanto sFlt-1, como TNF- α , parecen ser líderes en el establecimiento de disfunción mitocondrial en el modelo *in vitro* de PE. Además, en el modelo de correlación *in vitro*, se demostró no sólo que sus niveles están aumentados en suero materno de mujeres preeclámpticas, sino que su presencia en el suero es clave para el establecimiento de disfunción endotelial y mitocondrial. Por estos motivos, el siguiente enfoque de este estudio se orientó a conocer: ¿qué mecanismos moleculares pueden regular a sFlt-1 y a TNF- α , aumentados en PE y potencialmente responsables de su fisiopatología?

Esta incógnita trajo a colación la teoría, antes expuesta, que intenta explicar el embarazo, como un proceso anti-inflamatorio, característico de una respuesta inmune predominantemente tipo Th2 (354). A diferencia de los embarazos

normales, la PE, se ha asociado a una excesiva respuesta inflamatoria, que involucra una producción aumentada de citoquinas pro-inflamatorias de la respuesta inmune tipo Th1, tal como TNF- α (98). Inclusive, TNF- α juega un papel muy importante en el proceso de proliferación y diferenciación de trofoblastos, adhesión celular, remodelación del tejido y apoptosis de trofoblastos de las vellosidades de la placenta y liberación de hormonas por parte de las células trofoblásticas (364). Procesos que ya han sido identificados ser responsables de la actividad de VEGF.

VEGF, además de otros factores de crecimiento, estimulan la actividad invasiva de los trofoblastos y juega un papel central en la placentación (365). Tal como ha sido identificado en escenarios diferentes a PE; la angiogénesis tiene una función a nivel de la inflamación. En la artritis reumatoidea, la formación del tejido conectivo inflamatorio, rico en vasos sanguíneos, depende de la actividad de VEGF (366). Asimismo, se ha demostrado que VEGF es capaz de conllevar a un fenotipo Th1 en células T (367). Estas observaciones sugieren que TNF- α y VEGF podrían relacionados.

Además de estas evidencias, en estudios *ex vivo* con explantes de placenta, se ha demostrado que el incremento en los niveles de TNF- α se acompaña de incrementos en los niveles de sFlt-1 (106-109). Se demostró en un modelo animal de PE (modelo isquémico RUPP) que la infusión crónica de TNF- α , aumenta la presión arterial y los niveles circulantes de sFlt-1 (107). Previamente se ha demostrado que VEGF es capaz de regular la expresión y producción de sFlt-1 y TNF- α (262). No obstante, la regulación de TNF- α y sFlt-1, mediante VEGF, no había sido abordada anteriormente. Por tales motivos, en esta investigación se propuso el siguiente enfoque integral, para evaluar los mecanismos a través de los cuales, los incrementos de TNF- α y sFlt-1 podrían inducir a DE, impactando en el metabolismo celular. Para responder a esta incógnita e integrar los eventos moleculares fisiopatológicos mediados por TNF- α y sFlt-1; se propuso que VEGF podría ser un regulador maestro de ambas moléculas en PE (**figura 8.5**).

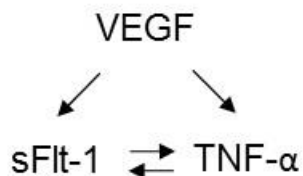


Figura 8.5 VEGF, como potencial agente regulador maestro de la producción de sFlt-1 y TNF- α . En esta figura se muestra gráficamente la hipótesis regulatoria de sFlt-1 y TNF- α , mediada por VEGF y la posible regulación cruzada en la producción de sFlt-1 y TNF- α .

Para evaluar el papel de VEGF como regulador de la señalización de VEGF/sFlt-1 y VEGF/TNF- α ; se midió a través de ELISA, los niveles de TNF- α (bovino) en CEs expuestas a VEGF (**figura 5.19**). Asimismo, se evaluó los niveles de sFlt-1 en células trofoblásticas y CEs expuestas a VEGF (**figura 5.18 A y B**, respectivamente). En este estudio se demostró que la administración de VEGF permite el aumento de los niveles de sFlt-1 en sobrenadante de CEs expuestas a este importante factor angiogénico (**figura 5.18**). Las células trofoblásticas, no mostraron variaciones de los niveles de sFlt-1 dosis dependiente a VEGF (**figura 5.18**). Esta observación fue muy interesante, ya que ha sido previamente publicado un incremento en los niveles de ARNm de sFlt-1 en trofoblastos de las extra vellosidades de placenta. El estudio de Fan et al. 2014, demostró que los trofoblastos de las extra vellosidades de placenta de su modelo murino, incrementan la producción de ARNm, en respuesta a la sobreexpresión de VEGF. Vale acotar que este estudio, además de ser un estudio *in vivo*, involucró la sobre expresión de VEGF, a través del establecimiento de un modelo transgénico con expresión específica de VEGF en el miometrio (25).

En el modelo *in vitro* empleado en la presente investigación, se evaluaron concentraciones de VEGF de 10 y 20 ng/mL, que no necesariamente tendrían el mismo impacto en la producción de sFlt-1, que modelos como el descrito por Fan et al. 2014 (25). Sin embargo, sin ánimos de desprestigiar el enfoque propuesto, se sugiere que la administración de VEGF podría ampliarse a concentraciones más elevadas. Todo esto, porque se sabe muy bien el papel del balance angiogénico y su papel en el desarrollo de PE. Además, que la decidua materna, en contacto íntimo con trofoblastos invasores de las extra vellosidades de placenta, son productores de VEGF (25). Esto explicaría la necesidad de titular concentraciones más apropiadas de VEGF, que sí permitieran observar cuál concentración conllevaría a un incremento en los niveles de sFlt-1. Por ello, se plantea que para llevar el análisis del papel de VEGF en la producción de sFlt-1 en trofoblastos, la concentración empleada de VEGF pueda ser mucho más amplia y utilizar concentraciones más elevadas que simulen los efectos *in vivo*, donde los trofoblastos de las extra vellosidades de placenta, dada su capacidad invasiva en la decidua materna, se enfrentan a elevados niveles de VEGF durante el desarrollo de la placenta. Es interesante que dosis de 10 ng/mL de VEGF desencadenan un incremento drástico de los niveles de sFlt-1 en CEs (**figura 5.18 A**); este incremento podría significar el establecimiento de un freno angiogénico, donde las CEs podrían ser claves, para la regulación del balance angiogénico.

Por otra parte, se midieron los niveles de TNF- α en CEs tratadas con VEGF (**figura 5.19**). Se demostró que VEGF es capaz de incrementar los niveles de TNF- α en estas células y se confirmaron afirmaciones previas de otros investigadores que en escenarios diferentes a PE, encontraron una interrelación entre VEGF y TNF- α (368).

Por último, otros investigadores han sugerido una relación entre TNF- α y sFlt-1 (98, 107, 110, 260). Por una parte, TNF- α favorece la producción de sFlt-1, demostrado en estudios *ex vivo* con explantes de placenta (110). En contraste, existe al momento un reporte de Xu et al., 2009 que indica que sFlt-1 también puede favorecer la producción de TNF- α en tejido placentario (98). Esto sugiere una posible asociación entrecruzada entre TNF- α y sFlt-1. Este mismo estudio sugiere que sFlt-1 y TNF- α podrían contribuir de forma sinérgica en el establecimiento de DE (98). En la presente investigación, se observó que las CE expuestas a TNF- α producen niveles elevados de sFlt-1 en sobrenadante (**figura 5.20**), incluso ante concentraciones de TNF- α (10 ng/mL); los incrementos de los niveles de sFlt-1 llegaron a una fase de plateau a partir de 25 ng/mL en CE (**figura 5.20 A**). Vale acotar que estas concentraciones, al trasladarlas a situaciones fisiológicas, son excesivamente elevadas, comparado con los valores normalmente encontrados en circulación materna (355, 356). Sin embargo, este enfoque demuestra que los efectos de regulatorios TNF- α sobre sFlt-1 son inminentes.

Finalmente, la administración de sFlt-1 también conllevó a incrementos en los niveles de TNF- α detectados en el sobrenadante de cultivo celular en CE (**figura 5.21**). Dado que en este estudio no se contó con la posibilidad de medir los niveles de TNF- α en células trofoblásticas expuestas a sFlt-1, la discusión en este tema es limitada. El incremento en los niveles de TNF- α se triplicó ante concentraciones de sFlt-1 de 10 ng/mL; que en este estudio demostraron que conlleva a cambios metabólicos tempranos y al cambio de fenotipo metabólico en CE. Esta regulación cruzada entre TNF- α y sFlt-1, dirigidas principalmente por VEGF, indica que existe un potencial mecanismo regulatorio de VEGF sobre la producción de sFlt-1 y TNF- α a través de la señalización de VEGF/sFlt-1 y VEGF/TNF- α , respectivamente. Además, los resultados de este estudio sugieren la existencia de mecanismos cruzados de regulación entre estos dos factores (TNF- α y sFlt-1).

8.3 Sepiapterina, análogo precursor de tetrahidrobiopterina, reestablece la función endotelial, acoplamiento de eNOS y el fenotipo metabólico en CE.

La PE, representa un problema de salud pública global. Aun así, no existe un tratamiento terapéutico, no invasivo, que permita la resolución de la enfermedad. Muchas de las estrategias terapéuticas preventivas que se han propuesto han sido ineficaces (369, 370); probablemente, por el hecho que la fisiopatología de la enfermedad aún no ha sido bien establecida. Recientemente, fue propuesto un procedimiento terapéutico basado en la remoción de sFlt-1 por aféresis, con la finalidad de disminuir los niveles de sFlt-1, circulantes en sangre materna (225). Sin embargo, el impacto que este tipo de procedimiento invasivo podría tener en la madre y en el feto aún está por ser esclarecido en futuras investigaciones (225). No obstante, ya que la DE ha mostrado ser uno de los principales mecanismos responsables de la instauración de PE en muchas investigaciones (71, 371, 372), incluyendo el presente estudio (*secciones 8.1 y 8.2*); una droga capaz de impactar

directamente en el restablecimiento de la función endotelial, podría ser prometedora y eficaz para prevenir PE. El empleo de una terapéutica eficaz y de bajo riesgo para prevenir la PE, podría disminuir el gran impacto que esta enfermedad acarrea en la sociedad del país y en todo el mundo.

La sepiapterina (SEPI), precursor de la tetrahidrobiopterina (BH4), es un análogo precursor del cofactor esencial para la actividad de eNOS (198, 199). Se ha demostrado que SEPI ser un precursor efectivo y sustituto de BH4 (210, 212). Este cofactor estabiliza la actividad de eNOS, permitiendo la formación de •NO y con ello la relajación vascular (198, 199). Dado el efecto beneficioso de SEPI como agente potenciador de la función endotelial vía el restablecimiento de la actividad de eNOS (198, 199) y la biodisponibilidad de •NO (203), su uso podría presentarse como un agente terapéutico potencial en el tratamiento de la DE ocasionada por sFlt-1 y TNF- α en PE. De allí que SEPI, se presenta como una droga de uso potencial, demostrada previamente ser segura durante el embarazo (210), para tratar oportunamente la aparición de la enfermedad.

8.3.1 SEPI reestablece la producción de •NO al favorecer el acoplamiento de eNOS en CEs y HTR-8/SVneo.

La administración de BH4 ha demostrado que reestablece la función endotelial en pacientes con hipertensión, diabetes, aterosclerosis, hipercolesterolemia y con falla cardíaca crónica (203, 373). En el año 2007, la “Food and Drug Administration” (FDA) aprobó el uso de la primera formulación de BH4 (dicloruro de sapropterina, llamada comercialmente, *Kuvan*), para su uso en pacientes con fenilcetonuria (210). El dicloruro de sapropterina, es el primer fármaco aprobado con funciones análogas a BH4. Experimentalmente, la administración oral de L-sepiapterina, precursor de BH4, ha demostrado reestablecer la DE y reducir el estrés oxidativo en un modelo *in vivo* empleando arterias mesentéricas aislada de ratones diabéticos (db/db) (212). SEPI, funciona como precursor de BH4 por la *vía salvaje*, aumenta los niveles de BH4 y acopla eNOS, para el restablecimiento de la función endotelial (203). Como ha sido previamente descrito, SEPI, al actuar como un análogo precursor de BH4, permite reestablecer el acoplamiento de eNOS, en casos de baja disponibilidad de este importante cofactor (212). En un modelo animal de hipertensión en el embarazo en ratas, se demostró que la suplementación con SEPI, aumentó la producción de •NO y disminuyó la formación de ROS dependiente de eNOS (202).

Los resultados mostrados en secciones anteriores de esta investigación (sección 8.1), han demostrado que sFlt-1 es un agente que conlleva a DE, y los posibles mecanismos a través de los cuales logra este efecto incluyen;

- a) disminución de la biodisponibilidad de VEGF y
- b) desacoplamiento de eNOS mediado por disminuidos niveles de BH4.

Ya que SEPI ha demostrado en otros escenarios, que es capaz de restablecer la función endotelial (203, 373); el siguiente enfoque de esta investigación fue probar el papel de SEPI en el restablecimiento de la función endotelial en el modelo *in vitro* de PE inducido con proteína rh de sFlt-1 y TNF- α . SEPI demostró que su administración en concentración de 100 μ M, logra restablecer la producción de $\bullet$ NO tanto en CEs, como en trofoblastos (**figura 6.1**); tal como ha sido previamente identificado por otros grupos de investigación, en modelos *in vitro* e *in vivo* (212, 265).

La enzima eNOS, requiere de un adecuado acoplamiento de sus dominios oxidasa y reductasa, para la formación de $\bullet$ NO (164). En el año 2000, Walter et al., publicaron una carta al editor en la revista científica *Cardiology*, donde reportaban niveles de BH4, medidos en pacientes sanos y pacientes asintomáticos con enfermedad coronaria. Los pacientes no mostraron evidencia de alteraciones en la función renal, cáncer o enfermedades inmunes. En este estudio, se determinó por HPLC, niveles de BH4 en pacientes sanos de 6.05 nmol/L y en pacientes asintomáticos con enfermedad coronaria: 5.69 nmol/L (374). La finalidad de ese estudio estaba enfocada en el papel de la determinación de BH4 para la detección temprana de enfermedad coronaria; aspecto que no tiene relación con la presente investigación. Sin embargo, permite orientar la idea a lo que cuantitativamente se desea manifestar cuando se indican “niveles disminuidos de BH4” o “baja disponibilidad de BH4”, como ha sido indicado por algunos autores. Por ejemplo; se hace referencia al estudio de Vásquez-Vivar et al. 1998, donde la autora indica que existen niveles de BH4 por debajo de lo normalmente establecido, lo cual favorece la formación de $O_2^{\bullet-}$ y la disminución de $\bullet$ NO (164).

En la presente investigación, se evaluó el papel de SEPI, en el restablecimiento de la activación de eNOS, evaluada por la fosforilación del residuo de serina 1177 de la enzima, en CEs expuestas a sFlt-1 (**figura 6.2**). La administración de 100 μ M de SEPI restableció la activación de la enzima eNOS en CEs (**figura 6.2**). El restablecimiento de la activación de eNOS al administrar SEPI, se corresponde con otros autores que han encontrado que SEPI restablece la función endotelial (212). En situaciones de baja disponibilidad de BH4, la enzima eNOS genera no solamente $\bullet$ NO, sino $O_2^{\bullet-}$ (212). Este proceso ha sido demostrado que ocurre por el desacoplamiento de la enzima, que conlleva a la subsecuente formación de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (375). Ya que esta investigación identificó que la administración de SEPI restablece la función endotelial de células tratadas con sFlt-1, así como de TNF- α (**Figuras 6.1 y 6.2**); se evaluó el papel de BH4 en el restablecimiento del acoplamiento de eNOS y en el restablecimiento de la disponibilidad biológica de BH4.

Se midieron los niveles de $O_2^{\bullet-}$ por HPLC empleando la sonda fluorescente 2-OH-E $^+$ en presencia de SEPI y se identificó que los niveles de $O_2^{\bullet-}$ disminuyen significativamente (**figura 6.4**). Estos hechos confirman el papel de SEPI, análogo precursor, de BH4, en el restablecimiento y acoplamiento de la enzima eNOS, ya

descrito anteriormente (265). Además, la administración de SEPI logró restablecer los niveles de BH4 en células tratadas con sFlt-1 y TNF- α (**figura 6.3**). Esta observación se corresponde con otros autores, que en escenarios diferentes, han evidenciado el aumento de los niveles de BH4, luego de la suplementación con SEPI (196, 213). No obstante, es importante comentar que este es el primer enfoque que evidencia una relación entre sFlt-1 y bajos niveles de BH4 en CEs. Estos hechos sugieren que el metabolismo de SEPI a través de la enzima DHFR, hasta BH4; podría ser crucial para el restablecimiento de los niveles normales de BH4 en situaciones patológicas con elevados niveles de sFlt-1 y TNF- α , tal como PE.

8.3.2 Efectos de la administración de SEPI en la formación de ROS y RNS.

En escenarios de estrés oxidativo, la formación de un intermediario inestable formado por la reacción de $\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$, denominado peroxinitrito (ONOO^-) (267), ha sido detectado en sistemas biológicos, como una molécula capaz de conllevar a daño endotelial (267, 376). En base a este hecho, vale la pena traer a colación ciertas evidencias que se han logrado establecer en este estudio:

- a) La administración de sFlt-1 y TNF- α conlleva a incrementos en la producción de ROS (específicamente $\text{O}_2^{\bullet-}$) (**figura 4.7**), lo cual se entiende como un proceso de estrés oxidativo, a expensas de $\text{O}_2^{\bullet-}$, mediado por sFlt-1 y TNF- α , determinado en CEs.
- b) La administración de SEPI conlleva al restablecimiento de la función endotelial, con incremento en la producción de $\bullet\text{NO}$ (**figura 6.1**), lo cual indica un aumento en la producción de $\bullet\text{NO}$ en presencia de SEPI.

Con referencia a estas evidencias, se podría pensar que ante el co-tratamiento de CEs con sFlt-1 y SEPI o TNF- α y SEPI, probablemente se evidenciaría una producción exacerbada de ONOO^- . Mientras que;

- c) a pesar de esas observaciones, también se observó en este estudio, que la administración de SEPI, disminuye la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (**figura 6.4**).

Vale recordar que, tal como se explicó en la sección 8.1, la fuente de formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$, mediada por sFlt-1, no fue esclarecida en este estudio. El ión $\text{O}_2^{\bullet-}$, puede ser producido endógenamente por diversas fuentes intracelulares. Entre ellas, se destacan procesos enzimáticos de las enzimas NADPH oxidasas, a nivel del complejo I y complejo III de la CTE, en la mitocondria, xantina oxidasa, citocromo p450, lipooxigenasas, eNOS, entre otras (300). Ya que BH4 permite acoplar eNOS y con ello disminuir la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a expensas de eNOS desacoplada, estos resultados sugirieron que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ detectado, podría provenir de cualquiera de estas fuentes citadas y la administración de SEPI podría prevenir la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a partir de eNOS y con ello, los niveles de ONOO^- no tendrían por qué aumentar.

Para detectar la formación de ONOO^- , se empleó la sonda boronato de cumarina (CBA) y su detección se hizo mediante fluorescencia empleando lector de placas. El tiempo de vida media del ONOO^- en sistemas biológicos, se limita a pocos milisegundos (377). Por lo tanto, las metodologías para detectar la formación de ONOO^- se basan en la descomposición del ONOO^- en NO_2^- , OH^- y trióxido de carbono (CO_3^-) y la consecuente formación de nitrotirosina. Sin embargo, la interpretación de los datos puede ser tediosa e inespecífica, debido a mecanismos alternos que conllevan a la formación de nitrotirosina, por ejemplo (267). Para la detección de ONOO^- se empleó la sonda CBA, que permitió detectar en tiempo real, la formación de ONOO^- . Tal como se describió en la sección “Materiales y métodos; Niveles de ONOO^- ”; la detección de ONOO^- se hizo bajo tres condiciones o tratamientos que permitieron discriminar entre la formación de ONOO^- y H_2O_2 (**Figura 3.11**).

- 1) En una primera condición, se administró la sonda CBA; que reacciona con ONOO^- y H_2O_2 .
- 2) Ya que la sonda también reacciona con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se administró catalasa, con la finalidad de descomponer el H_2O_2 en O_2 y agua; por lo que el producto detectado bajo esta condición correspondió a ONOO^- .
- 3) Además, se administró L-NAME, inhibidor competitivo de la enzima eNOS que inhibe la formación de $\bullet\text{NO}$ y con ello la tasa de producción de ONOO^- disminuye, de tal manera que el metabolito que bajo estas condiciones reaccionó con la sonda correspondió a H_2O_2 .

La identificación de nitrotirosina ha sido considerada por muchos autores como un indicador indirecto de la formación de ONOO^- (378). En estudios previos de otros investigadores, se demostró la presencia de nitrotirosina en tejido renal y en placas arterioescleróticas durante hipertensión (379). Asimismo, en PE, se ha reportado nitrotirosina en vellosidades de placenta (380) y en el sistema vascular de mujeres preeclámpicas (381). En esta investigación, se determinó directamente la formación de ONOO^- empleando la sonda CBA (**figura 6.5**). Este es el primer estudio en el cual se ha determinado directamente la formación de ONOO^- en un modelo *in vitro* de PE.

En CEs, se encontró que no existen diferencias en la formación de ONOO^- en células que fueron tratadas con sFlt-1 o $\text{TNF-}\alpha$, con respecto a aquellas en las cuales se co-administró SEPI (**figura 6.5 A**). Es interesante este hecho, ya que en este estudio se observó un incremento en la formación de $\bullet\text{NO}$ mediado por SEPI. Sin embargo, en este ensayo se pudieron concluir dos aspectos muy importantes;

- a) el primero, que la administración de sFlt-1 y $\text{TNF-}\alpha$ conllevan a un incremento en los niveles de H_2O_2 , medido en la reacción de CBA + L-NAME, mientras que los niveles de ONOO^- en este caso, fueron similares al control, a pesar que se demostró en secciones anteriores de esta investigación que, tanto sFlt-1 como $\text{TNF-}\alpha$ disminuyen la producción de $\bullet\text{NO}$ (**figuras 4.4 y 6.1**).

- b) En segundo lugar, con este ensayo se observó que las células en la cuales se co-administró SEPI, los niveles de H_2O_2 , medidos a través de la reacción de la sonda CBA + L-NAME, fueron significativamente menores, incluso que el control. Este hecho sugirió que SEPI, reacopla la enzima eNOS y con ello los niveles de $\text{O}_2^{\cdot-}$ disminuyen y por supuesto, los niveles de ONOO^- no fueron elevados, tal como se esperaba.

Con respecto a las células trofoblásticas; la medición de H_2O_2 al emplear la sonda CBA + L-NAME, también mostró resultados interesantes (**figura 6.5 B**). A diferencia del patrón observado en CEs, donde la formación de $\bullet\text{NO}$ y H_2O_2 se correspondió a los niveles totales determinados sólo con la sonda CBA; en trofoblastos, la formación de H_2O_2 fue mucho mayor que lo observado en CEs. En secciones previas de esta investigación, se evidenció que en el modelo de correlación *in vitro* de PE con sueros de pacientes, inclusive los sueros de pacientes normotensas conllevan a la formación aumentada de ROS (**figura 5.7 A-B**). Estas evidencias soportan conclusiones previas de este estudio, en donde se observa que el consumo de oxígeno de trofoblastos (sección 8.1), parece no ser inicialmente guiado a la obtención de energía mediante la respiración celular, sino que sirve de fuente para la formación de ROS, que tendría funciones importantes en la proliferación, diferenciación y comportamiento de los trofoblastos y por ende en la placenta.

Hasta el momento, los resultados obtenidos en esta investigación han evidenciado que SEPI favorece el acoplamiento de la enzima eNOS y a su vez, el restablecimiento de la producción de $\bullet\text{NO}$ (sección 8.3.1). Otro hallazgo importante, fue la disminución de la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en presencia de SEPI (sección 8.3.1). Además, durante la determinación de los niveles de ONOO^- , la suplementación con SEPI conllevó a determinar niveles de H_2O_2 menores que los determinados en el grupo control. Estas observaciones sugieren que SEPI podría, además de favorecer el acoplamiento de eNOS, actuar como un potencial agente antioxidante.

Más allá de sus funciones como agente acoplante de eNOS, otra de las funciones que se le ha atribuido a BH_4 , es la de agente antioxidante. Sin embargo, esta función, ha sido muy poco explorada. Patel et al., 2002 demostraron que BH_4 es capaz de neutralizar ROS, mostrando inclusive mayor reactividad como antioxidante que el ácido ascórbico (204). Recientemente, Sethumadhavan et al., 2016 encontraron en un modelo *in vivo* con ratones con sobreexpresión específica de GTPCH-1 en cardiomiocitos, que dada la sobreexpresión de GTPCH-1, niveles aumentados de BH_4 , disminuyen significativamente el estatus redox celular, sin afectar los niveles celulares de $\bullet\text{NO}$ (209).

Asimismo, ya hace más de 40 años, Rembold et al., 1972 demostraron que BH_4 se localiza a nivel mitocondrial, doblando el contenido presente en el citoplasma (estudio hecho con mitocondrias provenientes de hepatocitos de rata). Inclusive, demostraron de BH_4 es un estimulador del consumo de oxígeno mitocondrial capaz

de reducir a *citocromo c* (270). En aquel entonces, Rembold et al., 1972 demostraron en otra publicación, que BH4 se incorpora en la mitocondria; y propusieron un mecanismo análogo al intercambiador glicerol-fosfato/malato para el transporte de poder reductor hacia la mitocondria (271). Además, reconocieron que el nivel de NADH intra-mitocondrial juega un papel determinante en la concentración de BH4 a nivel mitocondrial.

Con base a estas evidencias, el siguiente enfoque con respecto al papel de SEPI en el restablecimiento de la función endotelial, además de la disminución de $O_2^{\cdot-}$ vista en la sección anterior, fue evaluar el papel de SEPI como un potencial agente antioxidante a nivel mitocondrial. Para ello, se midió la formación de mROS empleando la sonda mitoSOX Red, en CEs, expuestos a sFlt-1, TNF- α y sueros de pacientes en estudio. Con la administración de SEPI en concentración de 100 μ M. Con este ensayo se identificó que efectivamente SEPI, es capaz de limitar la producción de mROS tanto en el modelo *in vitro* de PE establecido con sFlt-1 (**figura 6.6**) y TNF- α (**figura 6.7**). Como en el modelo de correlación *in vitro* establecido con sueros de pacientes preeclámpticas en estudio (**figuras 6.20 y 6.21**). Estas observaciones concuerdan con las evidencias demostradas en esta investigación y plantean que, BH4, en situaciones no dependientes de la actividad de eNOS, podría actuar como un potente agente antioxidante, incluso a nivel mitocondrial.

8.3.3 SEPI reestablece la función bioenergética mitocondrial y fenotipo metabólico in vitro.

Uno de los hallazgos más interesantes en este estudio correspondió a que SEPI, posee capacidad neutralizadora de ROS y potencial función como antioxidante (sección 8.3.2). Dadas las observaciones al determinar la producción de mROS, disminuidas en presencia de SEPI, el siguiente enfoque de esta investigación fue conocer el impacto de SEPI en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial de células expuestas a agentes disruptores de la mitocondria, tales como: sFlt-1 y TNF- α y sueros de pacientes preeclámpticas.

Sorpresivamente, en este estudio se demostró que SEPI, en concentraciones de 100 μ M restableció el fenotipo bioenergético mitocondrial de CEs expuestas a sFlt-1 (**figuras 6.10 y 6.11**) y sueros de pacientes preeclámpticas (**figura 6.19**). Mientras que el efecto de sFlt-1 en la función bioenergética mitocondrial de trofoblastos, no fue restablecida a nivel del control a pesar de la administración de SEPI (**figura 6.12 y 6.13**). Con respecto a los trofoblastos tratados con sueros de pacientes preeclámpticas, tal como se mostró en la **figura 6.19**, se evidenció una mejoría en la función bioenergética mitocondrial de estas células, a niveles que no fueron diferentes estadísticamente a las células tratadas con sueros de pacientes normotensas.

Estas observaciones se correspondieron a las evidencias de SEPI como agente neutralizador o potencial antioxidante mitocondrial, descrito en la sección 8.3.2.

Además, vale acotar que fueron observaciones sorprendentes, debido a que existen reportes que dudan de la actividad de BH4 a nivel mitocondrial y como agente antioxidante (203). Los hallazgos de esta investigación trascienden esas dudas existentes en la comunidad científica y abren una ventana de posibilidades para el empleo de SEPI en situaciones patológicas donde la formación de ROS de origen mitocondrial, son protagonistas.

Este es el primer reporte que demuestra la habilidad de SEPI en restablecer la función bioenergética mitocondrial y fenotipo metabólico de CEs expuestas a sFlt-1 y a sueros de pacientes preeclámpticas. Además, es también el primer reporte que muestra que los efectos de SEPI en trofoblastos no son iguales que en CEs. Es decir, el metabolismo de los trofoblastos, para que puedan cumplir sus funciones en la placenta y en el mantenimiento y desarrollo del feto no son alteradas por SEPI. No obstante, SEPI demostró que es capaz de mejorar esa actividad bioenergética mitocondrial en células expuestas a factores presentes en el suero de maternas preeclámpticas y les permite restablecer su fenotipo metabólico a niveles que no son diferentes del fenotipo metabólico observado en el estudio con sueros de pacientes normotensas. Todas estas observaciones son bastante prometedoras para el empleo de SEPI en PE. Con SEPI, se podría orientar el tratamiento directamente a la función endotelial materna, sin afectar la función de los trofoblastos, encargados del desarrollo de ese órgano tan importante en la gestación, como lo es la placenta.

8.4 La sepiapterina, a través de la vía salvaje, reestablece el fenotipo metabólico en CEs tratadas con sFlt-1, al funcionar como un potencial agente antioxidante.

Para entender los mecanismos moleculares de SEPI para restablecer el fenotipo metabólico en CEs, se definieron dos posibles hipótesis de cómo ocurriría este proceso (**Ver figura 7.1**).

- a) La primera hipótesis, sugirió que el restablecimiento del fenotipo metabólico ocurriría vía $\bullet\text{NO}$ (BH4 como cofactor enzimático permitiría el restablecimiento de la producción de $\bullet\text{NO}$ y este mediador a su vez, por mecanismos aún no definidos, potenciaría un cambio de fenotipo metabólico con aumento del consumo de oxígeno).
- b) La segunda opción correspondería a que BH4, actuaría como un potencial agente antioxidante en la mitocondria, capaz de favorecer el consumo de oxígeno y de restablecer el fenotipo metabólico.

8.4 La sepiapterina, a través de la vía salvaje, reestablece el fenotipo metabólico en CEs tratadas con sFlt-1, al funcionar como un potencial agente antioxidante.

8.4.1 Papel del •NO en el restablecimiento del fenotipo metabólico de CEs.

La primera hipótesis que se abordó en este capítulo, correspondió a que el •NO sería el responsable del restablecimiento del fenotipo metabólico observado en CEs expuestas a sFlt-1 y SEPI. Tal como se evidenció en secciones anteriores de esta investigación; sFlt-1 es capaz de conllevar a un cambio de fenotipo metabólico en CEs; de un fenotipo bioenergético mitocondrial a un fenotipo glucolítico (“capítulo I de Resultados”). Además, en la sección “capítulo III de Resultados”, se observó que la administración de SEPI, restableció la producción de •NO y también el fenotipo metabólico mitocondrial en CEs expuestas a sFlt-1.

SEPI, es conocida por favorecer el acoplamiento de eNOS y por ende de restablecer la formación de •NO (359), las observaciones de esta investigación sugirieron que probablemente el •NO, estaría involucrado en este efecto metabólico que SEPI tiene en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial. En células tratadas con sFlt-1 y TNF- α (**figura 6.1**), así como en el modelo de correlación *in vitro* establecido con sueros de pacientes en estudio (**figura 6.18**), SEPI permitió restablecer los niveles de •NO. Sin embargo, el restablecimiento de los mismos fue siempre significativamente menor con respecto al control y a las células tratadas únicamente con SEPI. Basado en esta observación y en el hecho de que el •NO ha sido considerado como un inhibidor de la CTE (272); las observaciones de este estudio sugieren que el •NO podría tener un papel importante en el mecanismo de SEPI para restablecer el fenotipo metabólico. Vale destacar que observaciones previas relacionadas al papel de •NO como inhibidor de la respiración mitocondrial indican que el •NO interactúa con la CTE de diferentes maneras:

- a) El •NO causa una inhibición rápida, selectiva e irreversible del citocromo c oxidasa y,
- b) las especies reactivas de nitrógeno (RNS), tal como ONOO⁻, entre otras, causan inhibición lenta, no selectiva e irreversible de diversos componentes mitocondriales (272).

Por lo tanto, el •NO podría causar citotoxicidad y estar involucrado en la producción de mROS al afectar la respiración mitocondrial (273). Sin embargo, ya que la finalidad de esta sección de la investigación fue conocer el papel del •NO en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial, de CEs expuestas a sFlt-1, se realizaron diversos tratamientos a las células. Además de ser tratadas con sFlt-1 y sFlt-1 + SEPI, se hicieron tratamientos con L-NAME, inhibidor competitivo de eNOS y además un co-tratamiento de sFlt-1 + SEPI + L-NAME. La administración de L-NAME en los ensayos de esta investigación demostró, mediante la inhibición

competitiva de eNOS, que el •NO, tiene una función parcial en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial y fenotipo metabólico (**figura 7.2 y 7.3**).

Para soportar estos hallazgos se administró nitroglicerina (GTN) como donador de •NO (**figura 7.4 y 7.5**). La GTN, fue descubierta en 1847 por Ascanio Sobrero y hoy en día cuenta con más de 160 años desde que ha comenzado a emplearse con fines terapéuticos (274). Sin embargo, GTN posee varios mecanismos de liberación para el •NO; entre los que se encuentran:

- a) La interacción entre nitroglicerina y receptores celulares sulfhidrilos (-SH), la administración repetida de GTN conlleva al agotamiento de -SH por oxidación y con ello conlleva a tolerancia a GTN (275).
- b) Otro mecanismo de bio-activación de GTN involucra la actividad de enzimas aldehído deshidrogenasas mitocondriales que median la reducción de nitroglicerina a nitrito y •NO (275).
- c) Además, Bonini et al., 2008 demostró que GTN activa las sintasas de óxido nítrico constitutivas (NOS), como una ruta de GTN para mediar vasodilatación (276); en su investigación, Bonini demostró con el empleo de inhibidores de eNOS, tal como; L-N⁵-(1-iminoethyl) ornithine dihydrochloride (L-NIO), la inhibición de los efectos de GTN en la disminución de la presión arterial en un modelo *in vivo* con ratas (276). Años después, su grupo de investigación demostró que la activación de NOS por GTN ocurre vía PI-3K (277).

Una de las desventajas de emplear GTN como donador de •NO se fundamenta en los diversos mecanismos de bio-activación, ya comentados. Sin embargo, muchos autores han empleado GTN con fines terapéuticos en diversos escenarios. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración de bajas concentraciones de GTN (menores que µM), inhiben la actividad de células malignas en lo correspondiente a invasividad, metástasis y resistencia a drogas (382, 383). En referencia a PE, como ya se ha comentado en secciones anteriores, existe una gran controversia con respecto a los niveles de •NO en PE (11). No obstante, estudios en tejido placentario indican que sus niveles están disminuidos en esta enfermedad (291).

En relación al empleo de GTN, un estudio demostró que su administración, inhibe la apoptosis en STB, estudiado en explantes de placenta, expuestos a períodos de hipoxia/reperfusión (384). Por otra parte, se demostró que GTN disminuye la liberación de sFlt-1 y sEng en explantes de placentas a término, expuestas a hipoxia. A pesar que los niveles de ARNm de sFlt-1 y sEng incrementaron con la hipoxia, la administración de GTN disminuyó significativamente la expresión de estas moléculas a nivel de la transcripción y la expresión de las mismas. Este estudio sugirió que la habilidad de GTN para disminuir la expresión de sFlt-1, estaba relacionada a su capacidad de modular los mecanismos de señal asociados a la hipoxia, HIF-α y la consecuente expresión de sFlt-1 y sEng (385). Otro estudio de Groesch et al. 2012, encontró resultados similares, en un estudio fundamentalmente

basado en la misma estrategia experimental que el de Barsoum et al. 2011, con la diferencia que emplearon nitroprusiato de sodio (SNP) como donador de •NO (295).

Estos estudios citados relacionan a la administración exógena de •NO, empleando donadores exógenos, con la disminución de la transcripción y expresión de factores anti-angiogénicos y el incremento en la expresión de factores pro-angiogénicos (295, 385). Es probable, que los efectos observados en esta investigación, en referencia a GTN (**figura 7.4 y 7.5**), estén asociadas a estos mismos mecanismos. Sin embargo, para comprobar este supuesto y para demostrar el papel que cumple el •NO en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial de CEs, expuestas a sFlt-1, se plantea la determinación de la expresión de ARNm de sFlt-1, sEng y VEGF en CEs tratadas con GTN y sFlt-1. Además, dados los mecanismos de bio-activación de los donadores de •NO citados y para obtener una conclusión más objetiva con respecto al papel del •NO en el restablecimiento del fenotipo metabólico en CEs, se recomienda el empleo de otros agentes donadores de •NO, como por ejemplo; Diethylenetriamine NONOate (DETA NONOate).

8.4.2 La conversión de BH2 a BH4 vía DHFR es esencial para el restablecimiento del fenotipo metabólico en CEs en el modelo in vitro de PE.

En secciones anteriores de esta investigación se demostró que SEPI es capaz de disminuir la producción de ROS de origen mitocondrial (sección 8.3.2). Además, la producción de ROS citosólico ($O_2^{\cdot -}$) también disminuye significativamente en presencia de SEPI, en células tratadas con sFlt-1 (sección 8.3.1). Estas observaciones sugirieron que SEPI, podría actuar como un “scavenger” o neutralizador de ROS y con esto, mejorar la respiración mitocondrial en células que se encuentran bajo tratamiento con disruptores de la mitocondria, tal como sFlt-1. Sin embargo, hasta el momento, no se ha determinado si el papel de SEPI se debe a su metabolismo a BH2 (vía SR) o propiamente a su metabolito final, BH4 (vía DHFR) (ver **figura 8.6**).



Figura 8.6 Metabolismo de SEPI a tetrahidrobiopterina (BH4). SEPI, análogo precursor de BH4, se administra exógenamente y se metaboliza a 7,8 dihidrobiopterina (BH2) donde interviene la enzima sepiapterina reductasa (SR) y de éste a tetrahidrobiopterina (BH4) con la intervención de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR).

Para entender el papel de BH2 y BH4 en la función de SEPI como agente capaz de restablecer la función bioenergética mitocondrial de CEs, expuestas a sFlt-1; se estableció la inhibición farmacológica de la enzima DHFR empleando el inhibidor metotrexato (MTX). La enzima DHFR permite la reducción de BH2 a BH4 por la vía salvaje (ver **figuras 1.6 y 8.6**) (386, 387). Mientras que, MTX, al inhibir la enzima

DHFR, permite la disminución de BH4 intracelular y el incremento en los niveles de BH2, lo cual disminuye el radio BH4:BH2 (246, 388-390).

El empleo de MTX en concentración de 100 μ M ha sido previamente empleado en otros modelos fisiopatológicos *in vitro* (278, 279). Su utilización permite inhibir la actividad de DHFR y con ello, el metabolismo de BH2 a BH4, la cual es la molécula biológicamente activa. MTX es una molécula citotóxica y teratogénica, que ejerce sus efectos principalmente al inhibir la enzima DHFR y con ello el metabolismo de tetrahidrofolatos (391). También se han documentados otros mecanismos de acción de MTX, que incluyen la inhibición de enzimas involucradas en el metabolismo de purinas, que conllevan a la acumulación de adenosina e inhibición de enzimas metiltransferasas (392).

En esta investigación, el empleo de MTX (**figuras 7.7 y 7.8**), demostró que el metabolismo completo de SEPI a BH4 es necesario para el establecimiento de las funciones de SEPI como agente capaz de restablecer la función bioenergética mitocondrial en CEs. No obstante, el empleo de MTX probablemente no representa el mejor enfoque para la inhibición del metabolismo de BH2 a BH4 por la *vía salvaje*, por varias razones:

- a) MTX es una droga con elevada toxicidad, que al interferir en el metabolismo de BH2 a BH4 impacta en otras rutas metabólicas, que incluyen el metabolismo del ácido fólico (393).
- b) Al disminuir el radio BH4:BH2, los niveles de BH4 disminuyen significativamente, lo cual impacta en el acoplamiento de la enzima eNOS y en la producción de $\bullet$ NO.

Por ende, el empleo de MTX, para observar el papel de SEPI como agente neutralizador de ROS es limitado, sus resultados pueden estar siendo enmascarados por esas dos vertientes descritas anteriormente que no permitirían dilucidar por completo esta posible función como antioxidante. Sin embargo, el enfoque propuesto tiene también sus fortalezas. El empleo de MTX permitió obtener un amplio panorama de la implicación de BH4 en el restablecimiento del fenotipo metabólico en PE y de la importancia del metabolismo completo de SEPI a BH4. Por una parte:

- a) Se confirmó que el metabolito que está cumpliendo con las habilidades de SEPI en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial es BH4 y no su predecesor BH2.
- b) Además, al desestabilizar el radio BH4:BH2 citosólico, los efectos en el estatus redox celular fueron evidentes. Lo cual orienta a considerar el papel de BH4 como potencial agente antioxidante.
- c) Nuevamente, este estudio con MTX orienta a profundizar en el estudio del papel de eNOS/ $\bullet$ NO en la función bioenergética mitocondrial en el modelo *in vitro* de PE con sFlt-1.

Para poder establecer un juicio más concreto en el papel de BH4 como agente acoplante de eNOS o como agente antioxidante; se sugiere el empleo de células en cultivo con inhibición mediante silenciamiento o “knockout” de DHFR. A través de este enfoque se limitarían los inconvenientes de citotoxicidad del empleo de MTX para la inhibición de la enzima DHFR. También sería necesario medir la razón BH4:BH2, citosólico e intramitocondrial, para confirmar los efectos del silenciamiento de DHFR y contrastar estas observaciones con el estatus redox celular, dentro y fuera de la mitocondria. Finalmente, se propondría que estas observaciones sean comparadas con la determinación del acoplamiento de eNOS, formación de $O_2^{\cdot-}$ dependiente de eNOS y su fosforilación en el residuo de serina 1177, junto a la determinación del dímero y monómero de la enzima a través de western blot.

Tal como se comentó anteriormente (sección 8.4.1), para responsabilizar al $\bullet NO$ de los efectos benéficos de SEPI, se propone emplear donadores de $\bullet NO$ como el DETA NONOate y para conocer mejor su habilidad como antioxidante mitocondrial, se propone contrastar sus efectos con los de antioxidantes dirigidos a la mitocondria como mito vitamina-E.

9. Consideraciones finales

La desregulación en los niveles circulantes de FAAs está fuertemente asociada al establecimiento de preeclampsia. En esta investigación, se ha identificado por primera vez, que sFlt-1 es capaz de modular la función endotelial a través de mecanismos dependientes de la biodisponibilidad de BH4/•NO y además, se demostró que, sFlt-1 altera el metabolismo bioenergético mitocondrial en preeclampsia. En esta investigación, fue muy importante conocer los eventos moleculares que ocurren en preeclampsia, antes que se establezca el proceso patológico. Por tales motivos el enfoque se orientó en conocer las perturbaciones metabólicas tempranas, que conllevan al establecimiento de un proceso patológico per se.

La etiología de preeclampsia sigue siendo un enigma, incluso hoy en día, cuando los avances científicos abarcan el estudio de sistemas biológicos complejos. Una de las razones por las cuales el origen de preeclampsia sigue siendo desconocido, es que esta es una enfermedad multifactorial, con factores de riesgo poblacionales y que no obedecen a una única regla o patrón. A pesar de esto, se ha identificado que factores anti-angiogénicos y pro-inflamatorios están involucrados en su aparición. La formación de un nuevo ser vivo implica un balance en el delicado proceso angiogénico, orquestado por VEGF. En esta investigación se propuso un enfoque integral, que ubica a VEGF como un regulador maestro en la regulación de la producción de sFlt-1 y TNF- α . A su vez, se identificó que sFlt-1 y TNF- α pueden regularse de forma entrecruzada, lo que por una parte esclarece el entendimiento del proceso patológico. Este enfoque propuesto en esta investigación, apunta a un enfoque integral de la preeclampsia, protagonizado por VEGF y efectuado por factores anti-angiogénicos y pro-inflamatorios involucrados en cambios bioenergéticos y de fenotipo metabólico; predictores de la enfermedad.

Como fortalezas en este estudio se encuentra el empleo de un modelo de correlación *in vitro*, donde se identificaron elevados, los dos principales exponentes propuestos en esta investigación; sFlt-1 y TNF- α . Con dicho modelo de correlación, se observó de forma más objetiva a la preeclampsia, desde el punto de vista molecular. También, se pudo entender que los cambios metabólicos preceden los eventos moleculares fisiopatológicos en la enfermedad. Además, se identificó un papel de sFlt-1 como disruptor mitocondrial que afecta, no sólo la señalización de VEGF/•NO, sino que tiene un impacto en la regulación de tetrahidrobiopterina; otro mecanismo propuesto en esta investigación como responsable del proceso de disfunción endotelial en preeclampsia. Este estudio propone por primera vez, el empleo de sepiapterina como potencial agente terapéutico para el tratamiento de preeclampsia. En este estudio se identificó que sepiapterina se metaboliza a tetrahidrobiopterina, y su metabolismo es crucial para observar los efectos benéficos de la droga en el restablecimiento de la función bioenergética mitocondrial en el modelo propuesto de preeclampsia.

10. Perspectivas futuras

Al momento de finalizar este estudio, mientras que las interrogantes iniciales de la investigación comenzaron a responderse, otras más comenzaron a surgir y a invadir el deseo científico de conocer mejor, qué está sucediendo en preeclampsia. Tal como se estableció anteriormente; en este estudio se reporta por primera vez el papel de sFlt-1 en la fisiopatología de la enfermedad y a su vez, se propone una terapéutica para su tratamiento. Sin embargo, en lo concerniente a esta terapéutica basada en el uso de sepiapterina, aún es importante conocer los mecanismos moleculares que ubican a ésta, como una droga de uso potencial en el tratamiento de preeclampsia. En esta investigación hemos propuesto que su mecanismo de acción involucra la producción de óxido nítrico y también actividad antioxidante. No obstante, para completar estas afirmaciones, es necesario llevar a cabo estudios con agentes antioxidantes mitocondriales, tal como mito-vitamina E y donadores de óxido nítrico. Este enfoque permitiría comparar el mecanismo de sepiapterina con antioxidantes orientados a la mitocondria y agentes donadores de óxido nítrico que cumplan con las exigencias de nuestro modelo. Por ello una primera perspectiva futura apunta al estudio *in vitro*, de los mecanismos moleculares de sepiapterina como antioxidante.

Por otra parte, aún debemos indagar en el mecanismo a través del cual sFlt-1 conlleva a cambios en el fenotipo metabólico en células endoteliales. Una propuesta inclina a considerar que sFlt-1 podría ejercer cambios en el estatus redox celular. Cuando el estatus redox celular esta alterado, la suplementación de la mitocondria con sustratos energéticos es limitada. Por ejemplo; incrementos en los niveles de NADH citoplasmáticos conllevan a la inhibición de la entrada de piruvato a la mitocondria. Por tales motivos, proponemos el estudio del estatus redox celular mediante la determinación por HPLC de la razón NAD^+/NADH . Asimismo, proponemos el estudio de los sustratos que suplementan la obtención de energía a través de la respiración mitocondrial por espectrometría de masas. El indagar el papel de sFlt-1 en el estatus redox celular, se propone inicialmente como un estudio *in vitro*, que puede completar la perspectiva propuesta en el párrafo anterior. Además, para entender mejor el papel del estatus redox también se propone completar con un estudio *ex vivo*, con explantes de placenta e *in vivo* en ratones.

El siguiente paso propuesto en el camino del trabajo realizado en esta tesis, corresponde a la traslación del modelo *in vitro*, al establecimiento de un modelo *in vivo*, con ratones. Como se indicó en los párrafos anteriores, ciertas incógnitas asociadas al mecanismo de acción de sepiapterina siguen establecidas. Una vez contestadas, trasladar este estudio a un modelo *in vivo*, en donde se pueda observar de forma integral la acción de sepiapterina, demostrar la factibilidad del empleo de esta droga como terapia para preeclampsia.

11. Conclusiones

- En este estudio se demostró que sFlt-1, en concentraciones que no generan respuesta anti-angiogénica, conlleva a DE al limitar la señalización y biodisponibilidad de VEGF y con ello, conlleva a una baja producción de •NO *in vitro*. Basado en esta observación, se identificaron dos potenciales mecanismos a través de los cuales sFlt-1 conduce a DE. El primero involucra su actividad como antagonista de VEGF. El segundo, implica eventos moleculares que limitan la biodisponibilidad de BH4, a través de la vía salvaje; y que conllevan al desacoplamiento de la enzima eNOS, producción limitada de •NO y exacerbada de $O_2^{\cdot-}$.
- Por primera vez, se reporta que sFlt-1, es capaz de alterar la función bioenergética mitocondrial en CEs, de forma dosis dependiente a la administración de proteína rh sFlt-1, conllevando a un cambio de fenotipo metabólico hacia glucólisis. Se demostró que los trofoblastos inmortalizados, aislados de placentas de primer trimestre, poseen un fenotipo metabólico basal principalmente glucolítico; con elevado consumo de oxígeno basal. El consumo de oxígeno mitocondrial de los trofoblastos, se asoció a la formación de $O_2^{\cdot-}$ de origen mitocondrial. En base al metabolismo basal de los trofoblastos, se evidenció que sFlt-1 no impacta en su función bioenergética mitocondrial ni en su fenotipo metabólico con la misma trascendencia que en CEs.
- En el modelo de correlación *in vitro*, se demostró que los efectos en la función endotelial y bioenergética mitocondrial, no dependen únicamente de la disminución de la biodisponibilidad de VEGF (mediada por los elevados niveles de sFlt-1 determinados en suero de mujeres preeclámpticas). Sino que otras moléculas presentes en suero de maternas preeclámpticas, también están implicadas en el origen de la enfermedad. En este estudio se identificó que los niveles de TNF- α están elevados en suero de maternas preeclámpticas y se propuso su papel como molécula mediadora de disfunción mitocondrial en el modelo de correlación *in vitro*, establecido.
- Tal como ha sido reportado por otros autores; en esta investigación se identificaron niveles elevados de sFlt-1 y TNF- α circulantes en suero provenientes de maternas preeclámpticas. Además, se demostró *in vitro* que en PE, VEGF funciona como un regulador maestro de la producción de sFlt-1 y TNF- α . También se evidenció que sFlt-1 dosis dependientemente, regula la producción de TNF- α en CEs. Mientras que TNF- α , demostró que regula positivamente la producción de sFlt-1 en CEs y en trofoblastos.
- En relación con la terapéutica propuesta en este estudio, basada en el empleo de sepiapterina para el tratamiento de PE; se identificó que su

empleo restablece la producción de •NO y la activación de la enzima eNOS en el modelo *in vitro* de preeclampsia con sFlt-1; y en el modelo de correlación *in vitro* con sueros de pacientes preeclámpicas.

- A pesar de la producción aumentada de •NO mediada por sepiapterina, en conjunto con el incremento de estrés oxidativo inducido por el modelo *in vitro* de preeclampsia, los niveles de ONOO⁻ detectados fueron bajos. Se identificó que sepiapterina restablece la producción de ROS en el modelo *in vitro* de PE con sFlt-1 y TNF- α .
- Por primera vez, se demuestra que sepiapterina restablece los efectos adversos de sFlt-1 *in vitro*; demostrado al medir la función bioenergética mitocondrial y el fenotipo metabólico en CEs expuestas a sFlt-1 y en el modelo de correlación *in vitro*, establecido con sueros provenientes de pacientes preeclámpicas.
- La administración de sepiapterina restablece los niveles de BH4, reacopla la enzima sintasa eNOS y restablece la producción de •NO.
- Sepiapterina, a través de su metabolismo a BH4 por la vía salvaje, limita la producción de O₂⁻ citosólico y mitocondrial, al actuar como un potencial agente antioxidante.

12. Anexos

1. Aval de Comité de Ética de la Fundación Cardiovascular de Colombia.

Floridablanca, 25 de Mayo de 2012.



Doctor:
MARCOS LÓPEZ CASILLAS
Investigador Principal

9) REF. "ROL DE LA GTPCH-1, TETRAHIDROBIPTERINA Y LA SINTASA DE ÁCIDOS GRASOS EN PRE-CLAMPسيا."

Apreciado Dr.:

"El Comité de Ética en Investigación – CEI según acta N° 298 reunión Extraordinaria de fecha 24 de Mayo de 2012 revisa y aprueba las consideraciones y el componente ético del estudio de la referencia y avala su presentación a la Convocatoria Nacional para la conformación de un Banco de Proyectos Elegibles de CTeI año 2012. N° 569 de Colciencias. El CEI establece que en el caso de ser elegidos para ser financiados, antes de su iniciación deben ser revisados y aprobados los protocolos por el CEI, con todos los documentos y anexos constitutivos definitivos para su adecuado seguimiento conducción y ejecución.

El Comité de Ética en Investigación – CEI de la Fundación Cardiovascular de Colombia se rige por los lineamientos jurídicos y éticos del país a través de la resoluciones 00843 de 1993 y 002378 del 2008 de Ministerio de la Protección Social. Igualmente se siguen las normas contempladas en la Declaración de Helsinki (Seul-Corea 2008) y de la conferencia mundial de Armonización para las Buenas Prácticas Clínicas.

Solicitado y sometido a consideración por el Dr. Marcos López Casillas, Investigador Principal. Fecha 22 de Mayo de 2012. Presentado por la Dra. Norma Serrano Díaz, Directora de Investigaciones."

A la reunión asistieron:

- **Dr. Angel Maria Cháves Neira: Miembro versado, Médico Cardiólogo, Presidente.**
- **Dra. Elsa María Serpa Isaza: Miembro versado, Médica Cirujana Especialista en Adm. Servicios de Salud, Vice-Presidente.**
- **Dra. Maria Alexandra Pérez Sotelo: Miembro versado, Médica Cirujana, Especialista en Pediatría y Oncología.**
- **Maria Cristina Villamizar Villamil: Miembro versado, Enfermera Jefe y Sonografista Cardíaca.**
- **Hernán Villa-Roel Ramírez: Miembro no versado, Arquitecto.**
- **Sra. Clara Barreto: Miembro no versado, Ingeniera Industrial.**

Datos Generales de Identificación del Comité Institucional de Ética en Investigación – CEI:

- Centro Avalado: **Fundación Cardiovascular de Colombia – FCV.**

NIT: 890212568-0

Instituto del Corazón Floridablanca: Calle 155A No 23-58 Urbanización El Bosque - PBX: (73639) 9292 - (73639) 6767 Floridablanca - Santander

Instituto del Corazón Santa Marta: Carrera 4a No 26A-71 PBX: (5433) 6485 - Santa Marta

Sede FCV Bogotá: Carrera 14 No 95-73 Of: 503 - PBX: (1636) 4676 - (1522) 0126 - Bogotá D.C.

Centro Tecnológico Empresarial: Carrera 5a No 6-33 PBX: (73679) 6470 - Floridablanca - Santander

www.fcv.org



- Nombre completo del Comité: **Comité de Ética en Investigación – CEI**
- Dirección: Carrera 5ª # 6-33
- Ciudad: Floridablanca-Santander, Colombia
- Teléfono: PBX: 6796470 Ext. 4320
- Fax: 6796480
- Número de miembros del CEI: Nueve (9).
- Número de miembros para que haya quórum: Cinco (5).

Cordialmente,

ÁNGEL MARÍA CHAVES NEIRA, M.D.
Presidente Comité de Ética en Investigación
Fundación Cardiovascular de Colombia

NIT: 890212568-0

Instituto del Corazón Floridablanca: Calle 155A No 23-58 Urbanización El Bosque - PBX: (7)639 9292 - (7)639 6267 Floridablanca - Santander

Instituto del Corazón Santa Marta: Carrera 4a No 26A-71 PBX: (5)431 6485 - Santa Marta

Sede FCV Bogotá: Carrera 14 No 9B-73 Of. 503 - PBX: (1)636 4676 - (1)522 0128 - Bogotá D.C.

Centro Tecnológico Empresarial: Carrera 5a No 6-33 PBX: (7)679 6470 - Floridablanca - Santander

www.fcv.org

2. Aval del Comité de Ética de la Clínica Materno Infantil San Luis.


Clínica San Luis
para la mujer y el niño
DIRECCIÓN MEDICA

082358

Bucaramanga Mayo 6 de 2014

DM-0050-14

Doctor
MARCOS LÓPEZ CASILLAS
Director de Biotecnología, Innovación y Desarrollo Tecnológico
Unidad de Biotecnología Fundación Cardiovascular de Colombia
Cra 5 A No 6-33
Floridablanca

Ref. Proyecto investigación ROL DE LA GTPCH-1, TETRAHIDROBIOPTERINA Y LA SINTASA DE ÁCIDOS GRASOS EN PREECLAMPSIA.

En virtud a la solicitud presentada a la Clínica Materno infantil San Luis para que sea participe del estudio, mediante la recolección de muestras biológicas, datos e interacción directa con los usuarios me permito informarle que esta fue presentada en el seno del Comité de Ética Institucional efectuado el día 24 de Febrero del presente año determinándose:

- 1- Aprobar y dar viabilidad para la recolección de información, muestras biológicas necesarias para el objeto del estudio de acuerdo a los procedimientos y parámetros establecidos en el resumen ejecutivo del proyecto, así como con total apego a las normas y lineamientos que regulan este tipo de investigaciones.
- 2- Que la etapa activa de recolección de la información y muestras se efectúe de manera coordinada y organizada con los respectivos servicios fuente de información.

Cordialmente.


CHRISTIAN G. ORDÓÑEZ RAMÍREZ
Director Médico

C.C. Archivo Comité Ética

Calle 48 No. 25 - 58 • Tel: 6490026 • Fax: 6433322 • Bucaramanga, Colombia • www.clinicasanluis.com.co

13. Bibliografías

1. World Health Organization Fact Sheet N°348. 2015.
2. Say L, Chou D, Gemmill A, Tuncalp O, Moller AB, Daniels J, et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *The Lancet Global health*. 2014;2(6):e323-33.
3. Salud CMD. Situacion de salud en Colombia : Indicadores basicos 2000: Ministerio de Salud.
4. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2010;376(9741):631-44.
5. Vitoratos N, Vrachnis N, Iavazzo C, Kyrgiou M. Preeclampsia: molecular mechanisms, predisposition, and treatment. *Journal of pregnancy*. 2012;2012:145487.
6. Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Van Assche A, Moutquin JM. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertension in pregnancy*. 2001;20(1):IX-XIV.
7. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstetrics and gynecology*. 2013;122(5):1122-31.
8. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in perinatology*. 2009;33(3):130-7.
9. Health WHODoR, Research. Global Programme to Conquer: Preeclampsia/Eclampsia: World health Organization; 2001.
10. Lopez-Jaramillo P, Garcia RG, Lopez M. Preventing pregnancy-induced hypertension: are there regional differences for this global problem? *Journal of hypertension*. 2005;23(6):1121-9.
11. Sanchez-Aranguren LC, Prada CE, Riano-Medina CE, Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Frontiers in physiology*. 2014;5:372.
12. Monteiro CA, Moura EC, Conde WL, Popkin BM. Socioeconomic status and obesity in adult populations of developing countries: a review. *Bulletin of the World Health Organization*. 2004;82(12):940-6.
13. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1986;1(8489):1077-81.
14. Godfrey K, Robinson S, Barker DJ, Osmond C, Cox V. Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *BMJ*. 1996;312(7028):410-4.
15. Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nature reviews Nephrology*. 2014;10(8):466-80.
16. Taylor RN, Roberts JM, Cunningham FG, Lindheimer MD. *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*: Elsevier Science; 2014.

17. Altman D, Carroli G, Duley L, Farrell B, Moodley J, Neilson J, et al. Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;359(9321):1877-90.
18. Redman CW. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta*. 1991;12(4):301-8.
19. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998;179(5):1359-75.
20. Kanasaki K, Kalluri R. The biology of preeclampsia. *Kidney international*. 2009;76(8):831-7.
21. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *The American journal of pathology*. 2000;157(6):2111-22.
22. Osol G, Moore LG. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Microcirculation*. 2014;21(1):38-47.
23. Osol G, Mandala M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:58-71.
24. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985). 2000;88(4):1474-80.
25. Fan X, Rai A, Kambham N, Sung JF, Singh N, Petitt M, et al. Endometrial VEGF induces placental sFLT1 and leads to pregnancy complications. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(11):4941-52.
26. Kanter D, Lindheimer MD, Wang E, Borromeo RG, Bousfield E, Karumanchi SA, et al. Angiogenic dysfunction in molar pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2010;202(2):184 e1-5.
27. Billieux MH, Petignat P, Fior A, Mhawech P, Blouin JL, Dahoun S, et al. Pre-eclampsia and peripartum cardiomyopathy in molar pregnancy: clinical implication for maternally imprinted genes. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2004;23(4):398-401.
28. Prasannan-Nair C, Reynolds SF, Budden G. Partial molar pregnancy with severe pre-eclampsia at 19 weeks' gestation. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*. 2006;26(8):817.
29. Zeek PM, Assali NS. Vascular changes in the decidua associated with eclamptogenic toxemia of pregnancy. *American journal of clinical pathology*. 1950;20(12):1099-109.
30. Khong Y, Brosens I. Defective deep placentation. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2011;25(3):301-11.
31. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstetrics and gynecology annual*. 1972;1:177-91.
32. Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(3):950-60.
33. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, et al. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy

for successful endovascular invasion? The Journal of clinical investigation. 1997;99(9):2139-51.

34. Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. Trends in biochemical sciences. 1997;22(7):251-6.

35. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, et al. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. The American journal of pathology. 2002;160(4):1405-23.

36. Robson A, Harris LK, Innes BA, Lash GE, Aljunaidy MM, Aplin JD, et al. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2012;26(12):4876-85.

37. Rajakumar A, Whitelock KA, Weissfeld LA, Daftary AR, Markovic N, Conrad KP. Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2alpha, in placentas from women with preeclampsia. Biology of reproduction. 2001;64(2):499-506.

38. Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. Placenta. 2009;30 Suppl A:S32-7.

39. Redman C. The six stages of pre-eclampsia. Pregnancy hypertension. 2014;4(3):246.

40. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. American journal of obstetrics and gynecology. 1989;161(5):1200-4.

41. Sankaralingam S, Arenas IA, Lalu MM, Davidge ST. Preeclampsia: current understanding of the molecular basis of vascular dysfunction. Expert reviews in molecular medicine. 2006;8(3):1-20.

42. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. Nature medicine. 2006;12(6):642-9.

43. Belgore FM, Blann AD, Li-Saw-Hee FL, Beevers DG, Lip GY. Plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptor (SFlt-1) in essential hypertension. The American journal of cardiology. 2001;87(6):805-7, A9.

44. Chedraui P, Lockwood CJ, Schatz F, Buchwalder LF, Schwager G, Guerrero C, et al. Increased plasma soluble fms-like tyrosine kinase 1 and endoglin levels in pregnancies complicated with preeclampsia. The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet. 2009;22(7):565-70.

45. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. The New England journal of medicine. 2006;355(10):992-1005.

46. Keelan JA, Mitchell MD. Placental cytokines and preeclampsia. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library. 2007;12:2706-27.

47. Bounds KR, Newell-Rogers MK, Mitchell BM. Four Pathways Involving Innate Immunity in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2015;2:20.
48. Adair TH, Montani J-P. *Angiogenesis*. San Rafael, Calif. (1537 Fourth Street, San Rafael, CA 94901 USA): Morgan & Claypool,; 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.4199/C00017ED1V01Y201009ISP010>.
49. Sherer DM, Abulafia O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta*. 2001;22(1):1-13.
50. Zygmont M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2003;110 Suppl 1:S10-8.
51. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*. 1997;277(5332):1669-72.
52. Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(3):535-40.
53. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(21):13313-6.
54. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76.
55. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 1992;255(5047):989-91.
56. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(43):26988-95.
57. Lawson ND, Mugford JW, Diamond BA, Weinstein BM. phospholipase C gamma-1 is required downstream of vascular endothelial growth factor during arterial development. *Genes & development*. 2003;17(11):1346-51.
58. Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2011;4:51.
59. Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(52):49289-98.
60. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Molecular cell*. 1999;4(6):915-24.
61. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological reviews*. 2004;56(4):549-80.
62. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998;92(6):735-45.

63. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(22):10705-9.
64. Maynard SE, Venkatesha S, Thadhani R, Karumanchi SA. Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. *Pediatric research*. 2005;57(5 Pt 2):1R-7R.
65. Cindrova-Davies T, Sanders DA, Burton GJ, Charnock-Jones DS. Soluble FLT1 sensitizes endothelial cells to inflammatory cytokines by antagonizing VEGF receptor-mediated signalling. *Cardiovascular research*. 2011;89(3):671-9.
66. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*. 1999;18(13):2221-30.
67. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *The American journal of physiology*. 1993;265(2 Pt 2):H586-92.
68. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(12):3131-9.
69. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003;113(6):685-700.
70. Gregory AL, Xu G, Sotov V, Letarte M. Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta*. 2014;35 Suppl:S93-9.
71. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 2011;123(24):2856-69.
72. Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*. 2005;46(5):1077-85.
73. Stepan H, Jank A. [Angiogenic factors and their role in pathogenesis and prediction of preeclampsia]. *Zeitschrift fur Geburtshilfe und Neonatologie*. 2009;213(3):101-5.
74. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:147-58.
75. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;349(5):427-34.
76. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380(6573):439-42.
77. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nature genetics*. 1994;8(4):345-51.
78. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, et al. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*. 1999;284(5419):1534-7.

79. Martin E, Ray PD, Smeester L, Grace MR, Boggess K, Fry RC. Epigenetics and Preeclampsia: Defining Functional Epimutations in the Preeclamptic Placenta Related to the TGF-beta Pathway. *PloS one*. 2015;10(10):e0141294.
80. Furuya M, Kurasawa K, Nagahama K, Kawachi K, Nozawa A, Takahashi T, et al. Disrupted balance of angiogenic and antiangiogenic signalings in preeclampsia. *Journal of pregnancy*. 2011;2011:123717.
81. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(5):649-58.
82. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *The New England journal of medicine*. 2004;350(7):672-83.
83. Smith GC, Crossley JA, Aitken DA, Jenkins N, Lyall F, Cameron AD, et al. Circulating angiogenic factors in early pregnancy and the risk of preeclampsia, intrauterine growth restriction, spontaneous preterm birth, and stillbirth. *Obstetrics and gynecology*. 2007;109(6):1316-24.
84. Zhao S, Gu Y, Fan R, Groome LJ, Cooper D, Wang Y. Proteases and sFlt-1 release in the human placenta. *Placenta*. 2010;31(6):512-8.
85. Sandrim VC, Palei AC, Metzger IF, Gomes VA, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. *Hypertension*. 2008;52(2):402-7.
86. Hassan MF, Rund NM, Salama AH. An Elevated Maternal Plasma Soluble fms-Like Tyrosine Kinase-1 to Placental Growth Factor Ratio at Midtrimester Is a Useful Predictor for Preeclampsia. *Obstetrics and gynecology international*. 2013;2013:202346.
87. Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003;188(1):177-82.
88. Tidwell SC, Ho HN, Chiu WH, Torry RJ, Torry DS. Low maternal serum levels of placenta growth factor as an antecedent of clinical preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2001;184(6):1267-72.
89. Williams Z. Inducing tolerance to pregnancy. *The New England journal of medicine*. 2012;367(12):1159-61.
90. Alijotas-Reig J, Llurba E, Gris JM. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: a new challenging role for regulatory T cells. *Placenta*. 2014;35(4):241-8.
91. Laresgoiti-Servitje E, Gomez-Lopez N, Olson DM. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia. *Human reproduction update*. 2010;16(5):510-24.
92. Kharfi A, Giguere Y, Sapin V, Masse J, Dastugue B, Forest JC. Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. *Clinical biochemistry*. 2003;36(5):323-31.

93. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1999;180(2 Pt 1):499-506.
94. Laskowska M, Leszczynska-Gorzela B, Laskowska K, Oleszczuk J. Evaluation of maternal and umbilical serum TNF α levels in preeclamptic pregnancies in the intrauterine normal and growth-restricted fetus. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2006;19(6):347-51.
95. Spradley FT, Palei AC, Granger JP. Immune Mechanisms Linking Obesity and Preeclampsia. *Biomolecules*. 2015;5(4):3142-76.
96. Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. 2013;22 Suppl 1:8-19.
97. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clinical and experimental immunology*. 1996;106(1):127-33.
98. Xu B, Thornton C, Tooher J, Hennessy A. Exogenous soluble VEGF receptor-1 (sFlt-1) regulates Th1/Th2 cytokine production from normal placental explants via intracellular calcium. *Hypertension in pregnancy*. 2009;28(4):448-56.
99. Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol*. 1999;163(6):3491-5.
100. Young SH, Ye J, Frazer DG, Shi X, Castranova V. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α production in 1 $\rightarrow$ 3- β -glucan (zymosan)-activated macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(23):20781-7.
101. Yang Y, Yelavarthi KK, Chen HL, Pace JL, Terranova PF, Hunt JS. Molecular, biochemical, and functional characteristics of tumor necrosis factor- α produced by human placental cytotrophoblastic cells. *J Immunol*. 1993;150(12):5614-24.
102. Alexander BT, Cockrell KL, Massey MB, Bennett WA, Granger JP. Tumor necrosis factor- α -induced hypertension in pregnant rats results in decreased renal neuronal nitric oxide synthase expression. *American journal of hypertension*. 2002;15(2 Pt 1):170-5.
103. Kupferminc MJ, Peaceman AM, Aderka D, Wallach D, Peyser MR, Lessing JB, et al. Soluble tumor necrosis factor receptors in maternal plasma and second-trimester amniotic fluid. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1995;173(3 Pt 1):900-5.
104. Garcia RG, Cledon J, Sierra-Laguado J, Alarcon MA, Luengas C, Silva F, et al. Raised C-reactive protein and impaired flow-mediated vasodilation precede the development of preeclampsia. *American journal of hypertension*. 2007;20(1):98-103.
105. Teran E, Escudero C, Moya W, Flores M, Vallance P, Lopez-Jaramillo P. Elevated C-reactive protein and pro-inflammatory cytokines in Andean women with pre-eclampsia. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2001;75(3):243-9.

106. Rajakumar A, Powers RW, Hubel CA, Shibata E, von Versen-Hoynck F, Plymire D, et al. Novel soluble Flt-1 isoforms in plasma and cultured placental explants from normotensive pregnant and preeclamptic women. *Placenta*. 2009;30(1):25-34.
107. Murphy SR, LaMarca BB, Parrish M, Cockrell K, Granger JP. Control of soluble fms-like tyrosine-1 (sFlt-1) production response to placental ischemia/hypoxia: role of tumor necrosis factor-alpha. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2013;304(2):R130-5.
108. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(6):2505-12.
109. Benyo DF, Miles TM, Conrad KP. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(5):1582-8.
110. Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ. Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. *The American journal of pathology*. 2004;164(3):1049-61.
111. Durackova Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiological research*. 2010;59(4):459-69.
112. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clinical endocrinology*. 2002;57(5):609-13.
113. Sharma JB, Sharma A, Bahadur A, Vimala N, Satyam A, Mittal S. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2006;94(1):23-7.
114. Myatt L, Webster RP. Vascular biology of preeclampsia. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7(3):375-84.
115. Redman CW, Sargent IL. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta*. 2009;30 Suppl A:S38-42.
116. Wang Y, Walsh SW, Kay HH. Placental lipid peroxides and thromboxane are increased and prostacyclin is decreased in women with preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1992;167(4 Pt 1):946-9.
117. Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;222(3):222-35.
118. Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*. 2010;31 Suppl:S66-9.
119. Jones ML, Mark PJ, Mori TA, Keelan JA, Waddell BJ. Maternal dietary omega-3 fatty acid supplementation reduces placental oxidative stress and increases fetal and placental growth in the rat. *Biology of reproduction*. 2013;88(2):37.
120. Yang X, Guo L, Li H, Chen X, Tong X. Analysis of the original causes of placental oxidative stress in normal pregnancy and pre-eclampsia: a hypothesis. *The*

journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet. 2012;25(7):884-8.

121. Karacay O, Sepici-Dincel A, Karcaaltincaba D, Sahin D, Yalvac S, Akyol M, et al. A quantitative evaluation of total antioxidant status and oxidative stress markers in preeclampsia and gestational diabetic patients in 24-36 weeks of gestation. *Diabetes research and clinical practice*. 2010;89(3):231-8.

122. Nakatsukasa Y, Tsukahara H, Tabuchi K, Tabuchi M, Magami T, Yamada M, et al. Thioredoxin-1 and oxidative stress status in pregnant women at early third trimester of pregnancy: relation to maternal and neonatal characteristics. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2013;52(1):27-31.

123. Genc H, Uzun H, Benian A, Simsek G, Gelisgen R, Madazli R, et al. Evaluation of oxidative stress markers in first trimester for assessment of preeclampsia risk. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2011;284(6):1367-73.

124. Tam Tam KB, Lamarca B, Arany M, Cockrell K, Fournier L, Murphy S, et al. Role of reactive oxygen species during hypertension in response to chronic antiangiogenic factor (sFlt-1) excess in pregnant rats. *American journal of hypertension*. 2011;24(1):110-3.

125. Jiang Z, Zou Y, Ge Z, Zuo Q, Huang SY, Sun L. A Role of sFlt-1 in Oxidative Stress and Apoptosis in Human and Mouse Pre-Eclamptic Trophoblasts. *Biology of reproduction*. 2015;93(3):73.

126. Raijmakers MT, Dechend R, Poston L. Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension*. 2004;44(4):374-80.

127. Tipple TE, Rogers LK. Methods for the determination of plasma or tissue glutathione levels. *Methods Mol Biol*. 2012;889:315-24.

128. Kharb S. Low whole blood glutathione levels in pregnancies complicated by preeclampsia and diabetes. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2000;294(1-2):179-83.

129. Knapen MF, Mulder TP, Van Rooij IA, Peters WH, Steegers EA. Low whole blood glutathione levels in pregnancies complicated by preeclampsia or the hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets syndrome. *Obstetrics and gynecology*. 1998;92(6):1012-5.

130. von Versen-Hoeynck FM, Powers RW. Maternal-fetal metabolism in normal pregnancy and preeclampsia. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:2457-70.

131. King JC, Butte NF, Bronstein MN, Kopp LE, Lindquist SA. Energy metabolism during pregnancy: influence of maternal energy status. *The American journal of clinical nutrition*. 1994;59(2 Suppl):439S-45S.

132. Pipe NG, Smith T, Halliday D, Edmonds CJ, Williams C, Coltart TM. Changes in fat, fat-free mass and body water in human normal pregnancy. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1979;86(12):929-40.

133. Shenoy V, Kanasaki K, Kalluri R. Pre-eclampsia: connecting angiogenic and metabolic pathways. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2010;21(9):529-36.

134. Pagliarini DJ, Rutter J. Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry. *Genes & development*. 2013;27(24):2615-27.
135. Griffiths EJ. Mitochondria and heart disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;942:249-67.
136. Shi Z, Long W, Zhao C, Guo X, Shen R, Ding H. Comparative proteomics analysis suggests that placental mitochondria are involved in the development of pre-eclampsia. *PloS one*. 2013;8(5):e64351.
137. Torbergesen T, Oian P, Mathiesen E, Borud O. Pre-eclampsia--a mitochondrial disease? *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 1989;68(2):145-8.
138. Widschwendter M, Schrocksnadel H, Mortl MG. Pre-eclampsia: a disorder of placental mitochondria? *Molecular medicine today*. 1998;4(7):286-91.
139. Shanklin DR, Sibai BM. Ultrastructural aspects of preeclampsia. II. Mitochondrial changes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1990;163(3):943-53.
140. Matsubara S, Minakami H, Sato I, Saito T. Decrease in cytochrome c oxidase activity detected cytochemically in the placental trophoblast of patients with pre-eclampsia. *Placenta*. 1997;18(4):255-9.
141. Furui T, Kurauchi O, Tanaka M, Mizutani S, Ozawa T, Tomoda Y. Decrease in cytochrome c oxidase and cytochrome oxidase subunit I messenger RNA levels in preeclamptic pregnancies. *Obstetrics and gynecology*. 1994;84(2):283-8.
142. Illsinger S, Janzen N, Sander S, Schmidt KH, Bednarczyk J, Mallunat L, et al. Preeclampsia and HELLP syndrome: impaired mitochondrial function in umbilical endothelial cells. *Reprod Sci*. 2010;17(3):219-26.
143. Kirkinezos IG, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Seminars in cell & developmental biology*. 2001;12(6):449-57.
144. Leung DN, Smith SC, To KF, Sahota DS, Baker PN. Increased placental apoptosis in pregnancies complicated by preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2001;184(6):1249-50.
145. Wright GL, Maroulakou IG, Eldridge J, Liby TL, Sridharan V, Tsiichlis PN, et al. VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(9):3264-75.
146. Chen XG, Lv YX, Zhao D, Zhang L, Zheng F, Yang JY, et al. Vascular endothelial growth factor-C protects heart from ischemia/reperfusion injury by inhibiting cardiomyocyte apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*. 2016;413(1-2):9-23.
147. Duvekot JJ, Cheriex EC, Pieters FA, Menheere PP, Peeters LH. Early pregnancy changes in hemodynamics and volume homeostasis are consecutive adjustments triggered by a primary fall in systemic vascular tone. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1993;169(6):1382-92.
148. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995;9(13):1319-30.
149. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(19):13725-8.

150. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal*. 1994;298 (Pt 2):249-58.
151. Lopez-Jaramillo P, Narvaez M, Calle A, Rivera J, Jacome P, Ruano C, et al. Cyclic guanosine 3',5' monophosphate concentrations in pre-eclampsia: effects of hydralazine. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1996;103(1):33-8.
152. Calvin S, Corrigan J, Weinstein L, Jeter M. Factor VIII: von Willebrand factor patterns in the plasma of patients with pre-eclampsia. *American journal of perinatology*. 1988;5(1):29-32.
153. Lockwood CJ, Peters JH. Increased plasma levels of ED1+ cellular fibronectin precede the clinical signs of preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1990;162(2):358-62.
154. Nova A, Sibai BM, Barton JR, Mercer BM, Mitchell MD. Maternal plasma level of endothelin is increased in preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1991;165(3):724-7.
155. Chambers JC, Fusi L, Malik IS, Haskard DO, De Swiet M, Kooner JS. Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia. *Jama*. 2001;285(12):1607-12.
156. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1998;274(3 Pt 2):H1054-8.
157. Gonzalez-Garrido Chem JA, Olivares-Corichi IM, Tovar-Rodriguez JM, Hernandez-Santana NA, Mendez-Bolaina E, Ceballos-Reyes GM, et al. Influence of the AT(2) receptor on the L-arginine-nitric oxide pathway and effects of (-)-epicatechin on HUVECs from women with preeclampsia. *Journal of human hypertension*. 2013;27(6):355-61.
158. Pimentel AM, Pereira NR, Costa CA, Mann GE, Cordeiro VS, de Moura RS, et al. L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress in plasma and platelets of patients with pre-eclampsia. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2013;36(9):783-8.
159. Matsubara K, Matsubara Y, Hyodo S, Katayama T, Ito M. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2010;36(2):239-47.
160. Baker PN, Davidge ST, Roberts JM. Plasma from women with preeclampsia increases endothelial cell nitric oxide production. *Hypertension*. 1995;26(2):244-8.
161. Davidge ST, Baker PN, Roberts JM. NOS expression is increased in endothelial cells exposed to plasma from women with preeclampsia. *The American journal of physiology*. 1995;269(3 Pt 2):H1106-12.
162. Zyzdorczyk C, Comte B, Huyard F, Cloutier A, Germain N, Bertagnolli M, et al. Developmental programming of eNOS uncoupling and enhanced vascular oxidative stress in adult rats after transient neonatal oxygen exposure. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2013;61(1):8-16.
163. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free radical research*. 2003;37(2):121-7.

164. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(16):9220-5.
165. Qian J, Fulton D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Frontiers in physiology*. 2013;4:347.
166. Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1994;171(4):944-8.
167. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 1995;311(6998):171-4.
168. Lyall F, Young A, Greer IA. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1995;173(3 Pt 1):714-8.
169. Davidge ST, Stranko CP, Roberts JM. Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1996;174(3):1008-13.
170. Nobunaga T, Tokugawa Y, Hashimoto K, Kimura T, Matsuzaki N, Nitta Y, et al. Plasma nitric oxide levels in pregnant patients with preeclampsia and essential hypertension. *Gynecologic and obstetric investigation*. 1996;41(3):189-93.
171. Pathak N, Sawhney H, Vasishta K, Majumdar S. Estimation of oxidative products of nitric oxide (nitrates, nitrites) in preeclampsia. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*. 1999;39(4):484-7.
172. Choi JW, Im MW, Pai SH. Nitric oxide production increases during normal pregnancy and decreases in preeclampsia. *Annals of clinical and laboratory science*. 2002;32(3):257-63.
173. Aydin S, Benian A, Madazli R, Uludag S, Uzun H, Kaya S. Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2004;113(1):21-5.
174. Diejomaoh FM, Omu AE, Al-Busiri N, Taher S, Al-Othman S, Fatinikun T, et al. Nitric oxide production is not altered in preeclampsia. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2004;269(4):237-43.
175. Sandrim VC, Palei AC, Metzger IF, Cavalli RC, Duarte G, Tanus-Santos JE. Interethnic differences in ADMA concentrations and negative association with nitric oxide formation in preeclampsia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2010;411(19-20):1457-60.
176. Ehsanipoor RM, Fortson W, Fitzmaurice LE, Liao WX, Wing DA, Chen DB, et al. Nitric oxide and carbon monoxide production and metabolism in preeclampsia. *Reprod Sci*. 2013;20(5):542-8.
177. Conrad KP, Kerchner LJ, Mosher MD. Plasma and 24-h NO(x) and cGMP during normal pregnancy and preeclampsia in women on a reduced NO(x) diet. *The American journal of physiology*. 1999;277(1 Pt 2):F48-57.

178. Nishikawa S, Miyamoto A, Yamamoto H, Ohshika H, Kudo R. The relationship between serum nitrate and endothelin-1 concentrations in preeclampsia. *Life sciences*. 2000;67(12):1447-54.
179. Shaamash AH, Elsnosy ED, Makhoulf AM, Zakhari MM, Ibrahim OA, HM EL-d. Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2000;68(3):207-14.
180. Vural P. Nitric oxide/endothelin-1 in preeclampsia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2002;317(1-2):65-70.
181. Teran E, Escudero C, Moya W. Abnormal release of nitric oxide from nitrosoprotein in preeclampsia. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2006;92(3):260-1.
182. Mao D, Che J, Li K, Han S, Yue Q, Zhu L, et al. Association of homocysteine, asymmetric dimethylarginine, and nitric oxide with preeclampsia. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2010;282(4):371-5.
183. Salzer L, Tenenbaum-Gavish K, Hod M. Metabolic disorder of pregnancy (understanding pathophysiology of diabetes and preeclampsia). *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2015;29(3):328-38.
184. Kalhan S, Rossi K, Gruca L, Burkett E, O'Brien A. Glucose turnover and gluconeogenesis in human pregnancy. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(7):1775-81.
185. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1991;165(6 Pt 1):1667-72.
186. Kuhl C. Aetiology of gestational diabetes. *Bailliere's clinical obstetrics and gynaecology*. 1991;5(2):279-92.
187. Parretti E, Lapolla A, Dalfra M, Pacini G, Mari A, Cioni R, et al. Preeclampsia in lean normotensive normotolerant pregnant women can be predicted by simple insulin sensitivity indexes. *Hypertension*. 2006;47(3):449-53.
188. Armanini D, Sabbadin C, Dona G, Andrisani A, Ambrosini G, Bordin L. Maternal and Fetal Outcomes in Preeclampsia: Interrelations Between Insulin Resistance, Aldosterone, Metabolic Syndrome, and Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2015;17(10):783-5.
189. Kaaja R. Insulin resistance syndrome in preeclampsia. *Seminars in reproductive endocrinology*. 1998;16(1):41-6.
190. de Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(17):17070-8.
191. Robb SA, Hytten FE. Placental glycogen. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1976;83(1):43-53.
192. Zamudio S, Baumann MU, Illsley NP. Effects of chronic hypoxia in vivo on the expression of human placental glucose transporters. *Placenta*. 2006;27(1):49-55.

193. Voros G, Lijnen HR. Role of placental growth factor in glucose metabolism. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006;4(9):2098-9.
194. Thadhani R, Ecker JL, Mutter WP, Wolf M, Smirnakis KV, Sukhatme VP, et al. Insulin resistance and alterations in angiogenesis: additive insults that may lead to preeclampsia. *Hypertension*. 2004;43(5):988-92.
195. Kaufman S. Tetrahydrobiopterin : basic biochemistry and role in human disease. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1997. viii, 420 p. p.
196. Nichol CA, Lee CL, Edelstein MP, Chao JY, Duch DS. Biosynthesis of tetrahydrobiopterin by de novo and salvage pathways in adrenal medulla extracts, mammalian cell cultures, and rat brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(6):1546-50.
197. Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(3):413-20.
198. Hemmens B, Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol Biol*. 1998;100:1-32.
199. Schmidt K, Werner ER, Mayer B, Wachter H, Kukovetz WR. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. *The Biochemical journal*. 1992;281 (Pt 2):297-300.
200. Siddhanta U, Wu C, Abu-Soud HM, Zhang J, Ghosh DK, Stuehr DJ. Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(13):7309-12.
201. Calcerrada P, Peluffo G, Radi R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Current pharmaceutical design*. 2011;17(35):3905-32.
202. Mitchell BM, Cook LG, Danchuk S, Puschett JB. Uncoupled endothelial nitric oxide synthase and oxidative stress in a rat model of pregnancy-induced hypertension. *American journal of hypertension*. 2007;20(12):1297-304.
203. Vasquez-Vivar J. Tetrahydrobiopterin, superoxide, and vascular dysfunction. *Free radical biology & medicine*. 2009;47(8):1108-19.
204. Patel KB, Stratford MR, Wardman P, Everett SA. Oxidation of tetrahydrobiopterin by biological radicals and scavenging of the trihydrobiopterin radical by ascorbate. *Free radical biology & medicine*. 2002;32(3):203-11.
205. Oetl K, Dikalov S, Freisleben HJ, Mlekusch W, Reibnegger G. Spin trapping study of antioxidant properties of neopterin and 7,8-dihydroneopterin. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;234(3):774-8.
206. Wunderlich C, Schober K, Schmeisser A, Heerwagen C, Tausche AK, Steinbronn N, et al. The adverse cardiopulmonary phenotype of caveolin-1 deficient mice is mediated by a dysfunctional endothelium. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2008;44(5):938-47.
207. Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic

- smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circulation research*. 2000;86(2):E36-41.
208. Mayahi L, Heales S, Owen D, Casas JP, Harris J, MacAllister RJ, et al. (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin and its stereoisomer prevent ischemia reperfusion injury in human forearm. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(6):1334-9.
209. Sethumadhavan S, Whitsett J, Bennett B, Ionova IA, Pieper GM, Vasquez-Vivar J. Increasing tetrahydrobiopterin in cardiomyocytes adversely affects cardiac redox state and mitochondrial function independently of changes in NO production. *Free radical biology & medicine*. 2016;93:1-11.
210. Sapropterin (Kuvan) for phenylketonuria. *The Medical letter on drugs and therapeutics*. 2008;50(1287):43-4.
211. Levy HL, Milanowski A, Chakrapani A, Cleary M, Lee P, Trefz FK, et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. *Lancet*. 2007;370(9586):504-10.
212. Pannirselvam M, Simon V, Verma S, Anderson T, Triggle CR. Chronic oral supplementation with sepiapterin prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in small mesenteric arteries from diabetic (db/db) mice. *British journal of pharmacology*. 2003;140(4):701-6.
213. Vasquez-Vivar J, Duquaine D, Whitsett J, Kalyanaraman B, Rajagopalan S. Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis: implications for use of oxidized tetrahydrobiopterin analogues and thiol antioxidants. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(10):1655-61.
214. Berzan E, Doyle R, Brown CM. Treatment of preeclampsia: current approach and future perspectives. *Current hypertension reports*. 2014;16(9):473.
215. Sibai BM. Treatment of hypertension in pregnant women. *The New England journal of medicine*. 1996;335(4):257-65.
216. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2000;183(1):S1-S22.
217. Knight M, Duley L, Henderson-Smart DJ, King JF. Antiplatelet agents for preventing and treating pre-eclampsia. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2000(2):CD000492.
218. Duley L, Henderson-Smart DJ, Meher S, King JF. Antiplatelet agents for preventing pre-eclampsia and its complications. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2007(2):CD004659.
219. Salam RA, Das JK, Ali A, Bhaumik S, Lassi ZS. Diagnosis and management of preeclampsia in community settings in low and middle-income countries. *Journal of family medicine and primary care*. 2015;4(4):501-6.
220. Chappell LC, Seed PT, Briley AL, Kelly FJ, Lee R, Hunt BJ, et al. Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet*. 1999;354(9181):810-6.

221. Roberts JM, Myatt L, Spong CY, Thom EA, Hauth JC, Leveno KJ, et al. Vitamins C and E to prevent complications of pregnancy-associated hypertension. *The New England journal of medicine*. 2010;362(14):1282-91.
222. Villar J, Abdel-Aleem H, Merialdi M, Mathai M, Ali MM, Zavaleta N, et al. World Health Organization randomized trial of calcium supplementation among low calcium intake pregnant women. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2006;194(3):639-49.
223. Regitz-Zagrosek V, Blomstrom Lundqvist C, Borghi C, Cifkova R, Ferreira R, Foidart JM, et al. ESC Guidelines on the management of cardiovascular diseases during pregnancy: the Task Force on the Management of Cardiovascular Diseases during Pregnancy of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*. 2011;32(24):3147-97.
224. Kwon JY, Bai SW, Kwon YG, Kim SH, Kim CH, Kang MH, et al. The effect of nicotine on the production of soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endoglin in human umbilical vein endothelial cells and trophoblasts. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2010;89(4):565-71.
225. Thadhani R, Hagmann H, Schaarschmidt W, Roth B, Cingoz T, Karumanchi SA, et al. Removal of Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 by Dextran Sulfate Apheresis in Preeclampsia. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2016;27(3):903-13.
226. Kaplan A. Complications of apheresis. *Seminars in dialysis*. 2012;25(2):152-8.
227. Karantzoulis-Fegaras F, Antoniou H, Lai SL, Kulkarni G, D'Abreo C, Wong GK, et al. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(5):3076-93.
228. Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, et al. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Experimental cell research*. 1993;206(2):204-11.
229. Marroquin LD, Hynes J, Dykens JA, Jamieson JD, Will Y. Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2007;97(2):539-47.
230. Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol*. 2005;294:23-9.
231. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2007;2(2):329-33.
232. Dranka BP, Hill BG, Darley-Usmar VM. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine*. 2010;48(7):905-14.
233. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free radical biology & medicine*. 2012;52(1):1-6.
234. Zielonka J, Zielonka M, Sikora A, Adamus J, Joseph J, Hardy M, et al. Global profiling of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems: high-

throughput real-time analyses. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(5):2984-95.

235. Robinson KM, Janes MS, Beckman JS. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nature protocols*. 2008;3(6):941-7.

236. Guibal P, Leveque N, Doummar D, Giraud N, Roze E, Rodriguez D, et al. Simultaneous determination of all forms of biopterin and neopterin in cerebrospinal fluid. *ACS chemical neuroscience*. 2014;5(7):533-41.

237. Dranka BP, Benavides GA, Diers AR, Giordano S, Zelickson BR, Reily C, et al. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free radical biology & medicine*. 2011;51(9):1621-35.

238. Ernst O, Zor T. Linearization of the bradford protein assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2010(38).

239. Cooke JP, Losordo DW. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation*. 2002;105(18):2133-5.

240. Dimmeler S, Hermann C, Galle J, Zeiher AM. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999;19(3):656-64.

241. Ahmad S, Hewett PW, Wang P, Al-Ani B, Cudmore M, Fujisawa T, et al. Direct evidence for endothelial vascular endothelial growth factor receptor-1 function in nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circulation research*. 2006;99(7):715-22.

242. Wang Y, Zang QS, Liu Z, Wu Q, Maass D, Dulan G, et al. Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *American journal of physiology Cell physiology*. 2011;301(3):C695-704.

243. Zhu M, Ren Z, Possomato-Vieira JS, Khalil RA. Restoring placental growth factor-soluble fms-like tyrosine kinase-1 balance reverses vascular hyper-reactivity and hypertension in pregnancy. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2016;311(3):R505-21.

244. Miao RQ, Fontana J, Fulton D, Lin MI, Harrison KD, Sessa WC. Dominant-negative Hsp90 reduces VEGF-stimulated nitric oxide release and migration in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(1):105-11.

245. Bussolati B, Dunk C, Grohman M, Kontos CD, Mason J, Ahmed A. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *The American journal of pathology*. 2001;159(3):993-1008.

246. Crabtree MJ, Tatham AL, Hale AB, Alp NJ, Channon KM. Critical role for tetrahydrobiopterin recycling by dihydrofolate reductase in regulation of endothelial nitric-oxide synthase coupling: relative importance of the de novo biopterin synthesis versus salvage pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(41):28128-36.

247. Illsley NP. Placental Metabolism. In: Kay H ND, Wang Y, editor. *The Placenta: From Development to Disease*

2011.

248. Bratic I, Trifunovic A. Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1797(6-7):961-7.
249. Liemburg-Apers DC, Willems PH, Koopman WJ, Grefte S. Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Archives of toxicology*. 2015;89(8):1209-26.
250. Udenze I, Amadi C, Awolola N, Makwe CC. The role of cytokines as inflammatory mediators in preeclampsia. *The Pan African medical journal*. 2015;20:219.
251. Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Molecular aspects of medicine*. 2007;28(2):192-209.
252. Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 1997;37(3):240-9.
253. Song W, Lu X, Feng Q. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis via inducible nitric oxide synthase in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovascular research*. 2000;45(3):595-602.
254. Yan G, You B, Chen SP, Liao JK, Sun J. Tumor necrosis factor-alpha downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1-alpha 1. *Circulation research*. 2008;103(6):591-7.
255. Meekins JW, McLaughlin PJ, West DC, McFadyen IR, Johnson PM. Endothelial cell activation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and the development of pre-eclampsia. *Clinical and experimental immunology*. 1994;98(1):110-4.
256. Dizon-Townson DS, Major H, Ward K. A promoter mutation in the tumor necrosis factor alpha gene is not associated with preeclampsia. *Journal of reproductive immunology*. 1998;38(1):55-61.
257. Afshari JT, Ghomian N, Shameli A, Shakeri MT, Fahmidehkar MA, Mahajer E, et al. Determination of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-alpha concentrations in Iranian-Khorasanian patients with preeclampsia. *BMC pregnancy and childbirth*. 2005;5:14.
258. Saks S, Rosenblum M. Recombinant human TNF-alpha: preclinical studies and results from early clinical trials. *Immunology series*. 1992;56:567-87.
259. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Annals of internal medicine*. 1993;119(8):771-8.
260. Parrish MR, Murphy SR, Rutland S, Wallace K, Wenzel K, Wallukat G, et al. The effect of immune factors, tumor necrosis factor-alpha, and agonistic autoantibodies to the angiotensin II type I receptor on soluble fms-like tyrosine-1 and soluble endoglin production in response to hypertension during pregnancy. *American journal of hypertension*. 2010;23(8):911-6.
261. Anderson HD, Rahmutula D, Gardner DG. Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(2):963-9.
262. Tsao PN, Chan FT, Wei SC, Hsieh WS, Chou HC, Su YN, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 protects mice in sepsis. *Critical care medicine*. 2007;35(8):1955-60.

263. Karumanchi SA, Bdolah Y. Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: the "chicken-and-egg" question. *Endocrinology*. 2004;145(11):4835-7.
264. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(9):4604-13.
265. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Whitsett J, Joseph J, Kalyanaraman B. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *The Biochemical journal*. 2002;362(Pt 3):733-9.
266. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(37):26464-72.
267. Zielonka J, Sikora A, Joseph J, Kalyanaraman B. Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(19):14210-6.
268. Taylor BA, Zaleski AL, Dornelas EA, Thompson PD. The impact of tetrahydrobiopterin administration on endothelial function before and after smoking cessation in chronic smokers. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2016;39(3):144-50.
269. Hattori Y, Hattori S, Wang X, Satoh H, Nakanishi N, Kasai K. Oral administration of tetrahydrobiopterin slows the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(4):865-70.
270. Rembold H, Buff K. Tetrahydrobiopterin, a cofactor in mitochondrial electron transfer. Effect of tetrahydropterins on intact rat-liver mitochondria. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1972;28(4):579-85.
271. Rembold H, Buff K. Tetrahydrobiopterin, a cofactor in mitochondrial electron transfer. A soluble transfer system. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1972;28(4):586-91.
272. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovascular research*. 2007;75(2):283-90.
273. Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1411(2-3):351-69.
274. Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2000;27(4):313-9.
275. Ignarro LJ. After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(12):7816-7.
276. Bonini MG, Stadler K, Silva SO, Corbett J, Dore M, Petranka J, et al. Constitutive nitric oxide synthase activation is a significant route for nitroglycerin-mediated vasodilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(25):8569-74.
277. Mao M, Sudhakar V, Ansenberger-Fricano K, Fernandes DC, Tanaka LY, Fukai T, et al. Nitroglycerin drives endothelial nitric oxide synthase activation via the

- phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *Free radical biology & medicine*. 2012;52(2):427-35.
278. Neidel J, Sova L, Schroers B, Sintermann F, Manzke O, Bohlen H. Effects of methotrexate on normal articular cartilage in vitro and in vivo. *Annals of the rheumatic diseases*. 1998;57(7):414-21.
279. Funk RS, Singh R, Pramann L, Gigliotti N, Islam S, Heruth DP, et al. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Attenuates Methotrexate Response in Juvenile Idiopathic Arthritis and In Vitro. *Clinical and translational science*. 2016;9(3):149-57.
280. DelloStritto DJ, Connell PJ, Dick GM, Fancher IS, Klarich B, Fahmy JN, et al. Differential regulation of TRPV1 channels by H₂O₂: implications for diabetic microvascular dysfunction. *Basic research in cardiology*. 2016;111(2):21.
281. Boynard M, Wautier MP, Perrotin P, Wautier JL. Mechanical properties of bovine aortic endothelial cells in suspension studied by ultrasonic interferometry. *European journal of ultrasound : official journal of the European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology*. 2000;12(1):81-8.
282. Mugge A, Peterson T, Harrison DG. Release of nitrogen oxides from cultured bovine aortic endothelial cells is not impaired by calcium channel antagonists. *Circulation*. 1991;83(4):1404-9.
283. Oike M, Kimura C, Koyama T, Yoshikawa M, Ito Y. Hypotonic stress-induced dual Ca(2+) responses in bovine aortic endothelial cells. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;279(2):H630-8.
284. Bosio PM, McKenna PJ, Conroy R, O'Herlihy C. Maternal central hemodynamics in hypertensive disorders of pregnancy. *Obstetrics and gynecology*. 1999;94(6):978-84.
285. Stillman IE, Karumanchi SA. The glomerular injury of preeclampsia. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(8):2281-4.
286. Orendi K, Kivity V, Sammar M, Grimpel Y, Gonen R, Meiri H, et al. Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia. *Placenta*. 2011;32 Suppl:S49-54.
287. Kalkunte S, Boij R, Norris W, Friedman J, Lai Z, Kurtis J, et al. Sera from preeclampsia patients elicit symptoms of human disease in mice and provide a basis for an in vitro predictive assay. *The American journal of pathology*. 2010;177(5):2387-98.
288. Moyes AJ, Maldonado-Perez D, Gray GA, Denison FC. Enhanced angiogenic capacity of human umbilical vein endothelial cells from women with preeclampsia. *Reprod Sci*. 2011;18(4):374-82.
289. Jacobi J, Tam BY, Sundram U, von Degenfeld G, Blau HM, Kuo CJ, et al. Discordant effects of a soluble VEGF receptor on wound healing and angiogenesis. *Gene therapy*. 2004;11(3):302-9.
290. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free radical biology & medicine*. 2007;43(5):645-57.
291. Tortladze M, Kintraia N, Sanikidze T. The EPR study of nitric oxide in placenta during preeclampsia. *Georgian medical news*. 2012(208-209):55-9.

292. Aguilar A. PRE-Eclampsia: sFLT1 inhibits NO signalling. *Nature reviews Nephrology*. 2016;12(8):442.
293. Sessa WC. eNOS at a glance. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 12):2427-9.
294. Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;252(3):743-6.
295. Groesch KA, Torry RJ, Wilber AC, Abrams R, Bieniarz A, Guilbert LJ, et al. Nitric oxide generation affects pro- and anti-angiogenic growth factor expression in primary human trophoblast. *Placenta*. 2011;32(12):926-31.
296. Burke SD, Zsengeller ZK, Khankin EV, Lo AS, Rajakumar A, DuPont JJ, et al. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 promotes angiotensin II sensitivity in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(7):2561-74.
297. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996;226(2):324-8.
298. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell structure and function*. 2001;26(1):25-35.
299. Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free radical biology & medicine*. 2003;34(11):1359-68.
300. Santi Nonell CF. Overview of Reactive Oxygen Species, in Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences. In: Cosa KKaG, editor. *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences*. 12016.
301. Bridges JP, Gilbert JS, Colson D, Gilbert SA, Dukes MP, Ryan MJ, et al. Oxidative stress contributes to soluble fms-like tyrosine kinase-1 induced vascular dysfunction in pregnant rats. *American journal of hypertension*. 2009;22(5):564-8.
302. George EM, Colson D, Dixon J, Palei AC, Granger JP. Heme Oxygenase-1 Attenuates Hypoxia-Induced sFlt-1 and Oxidative Stress in Placental Villi through Its Metabolic Products CO and Bilirubin. *International journal of hypertension*. 2012;2012:486053.
303. George EM, Cockrell K, Aranay M, Csongradi E, Stec DE, Granger JP. Induction of heme oxygenase 1 attenuates placental ischemia-induced hypertension. *Hypertension*. 2011;57(5):941-8.
304. Gilbert JS, Banek CT, Bauer AJ, Gingery A, Needham K. Exercise training attenuates placental ischemia-induced hypertension and angiogenic imbalance in the rat. *Hypertension*. 2012;60(6):1545-51.
305. Ramirez-Velez R, Romero M, Echeverri I, Ortega JG, Mosquera M, Salazar B, et al. A factorial randomized controlled trial to evaluate the effect of micronutrients supplementation and regular aerobic exercise on maternal endothelium-dependent vasodilatation and oxidative stress of the newborn. *Trials*. 2011;12:60.

306. Wang S, Amato KR, Song W, Youngblood V, Lee K, Boothby M, et al. Regulation of endothelial cell proliferation and vascular assembly through distinct mTORC2 signaling pathways. *Molecular and cellular biology*. 2015;35(7):1299-313.
307. Gee E, Milkiewicz M, Haas TL. p38 MAPK activity is stimulated by vascular endothelial growth factor receptor 2 activation and is essential for shear stress-induced angiogenesis. *Journal of cellular physiology*. 2010;222(1):120-6.
308. Dikalov SI, Dikalova AE, Mason RP. Noninvasive diagnostic tool for inflammation-induced oxidative stress using electron spin resonance spectroscopy and an extracellular cyclic hydroxylamine. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2002;402(2):218-26.
309. Iwanaga N, Yamamasu S, Tachibana D, Nishio J, Nakai Y, Shintaku H, et al. Activity of synthetic enzymes of tetrahydrobiopterin in the human placenta. *International journal of molecular medicine*. 2004;13(1):117-20.
310. Iwanaga N YS, Tachibana D. Plasma levels of neopterin and biopterin in the umbilical vessels and the maternal vein. *Pteridines [Internet]*. 2003; 14(1):[1-4 pp.].
311. Davidson SM, Duchon MR. Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. *Circulation research*. 2007;100(8):1128-41.
312. Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN. Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clinic proceedings*. 2009;84(11):985-1000.
313. Warburg O, Geissler AW, Lorenz S. [Genesis of tumor metabolism by vitamin B1 deficiency (thiamine deficiency)]. *Zeitschrift fur Naturforschung Teil B, Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie und verwandte Gebiete*. 1970;25(3):332-3.
314. Jose C, Bellance N, Rossignol R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807(6):552-61.
315. Nakashima RA, Paggi MG, Pedersen PL. Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cells. *Cancer research*. 1984;44(12 Pt 1):5702-6.
316. Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, Bellance N, et al. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *American journal of physiology Cell physiology*. 2006;291(6):C1172-82.
317. De Bock K, Georgiadou M, Carmeliet P. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell metabolism*. 2013;18(5):634-47.
318. Culic O, Gruwel ML, Schrader J. Energy turnover of vascular endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1997;273(1 Pt 1):C205-13.
319. Krutzfeldt A, Spahr R, Mertens S, Siegmund B, Piper HM. Metabolism of exogenous substrates by coronary endothelial cells in culture. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1990;22(12):1393-404.
320. Fijalkowska I, Xu W, Comhair SA, Janocha AJ, Mavrikakis LA, Krishnamachary B, et al. Hypoxia inducible-factor1alpha regulates the metabolic shift of pulmonary hypertensive endothelial cells. *The American journal of pathology*. 2010;176(3):1130-8.
321. Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Genes & development*. 2012;26(9):877-90.

322. Yeh WL, Lin CJ, Fu WM. Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia. *Molecular pharmacology*. 2008;73(1):170-7.
323. De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, et al. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*. 2013;154(3):651-63.
324. Van Schaftingen E, Lederer B, Bartrons R, Hers HG. A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose 2,6-bisphosphate. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1982;129(1):191-5.
325. Elmasri H, Karaaslan C, Teper Y, Ghelfi E, Weng M, Ince TA, et al. Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23(11):3865-73.
326. Curtarello M, Zulato E, Nardo G, Valtorta S, Guzzo G, Rossi E, et al. VEGF-targeted therapy stably modulates the glycolytic phenotype of tumor cells. *Cancer research*. 2015;75(1):120-33.
327. Nardo G, Favaro E, Curtarello M, Moserle L, Zulato E, Persano L, et al. Glycolytic phenotype and AMP kinase modify the pathologic response of tumor xenografts to VEGF neutralization. *Cancer research*. 2011;71(12):4214-25.
328. Xu J, Wang J, Xu B, Ge H, Zhou X, Fang JY. Colorectal cancer cells refractory to anti-VEGF treatment are vulnerable to glycolytic blockade due to persistent impairment of mitochondria. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(5):717-24.
329. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(8):618-31.
330. Verdegem D, Moens S, Stapor P, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism: parallels and divergences with cancer cell metabolism. *Cancer & metabolism*. 2014;2:19.
331. Welte J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(8):3190-200.
332. Hill M. Embryology Trophoblast 2017. Available from: <https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Trophoblast>.
333. Illsley NP, Caniggia I, Zamudio S. Placental metabolic reprogramming: do changes in the mix of energy-generating substrates modulate fetal growth? *The International journal of developmental biology*. 2010;54(2-3):409-19.
334. Zamudio S. The placenta at high altitude. *High altitude medicine & biology*. 2003;4(2):171-91.
335. Zamudio S, Wu Y, Ietta F, Rolfo A, Cross A, Wheeler T, et al. Human placental hypoxia-inducible factor-1alpha expression correlates with clinical outcomes in chronic hypoxia in vivo. *The American journal of pathology*. 2007;170(6):2171-9.
336. Kay HH, Zhu S, Tsoi S. Hypoxia and lactate production in trophoblast cells. *Placenta*. 2007;28(8-9):854-60.

337. Baumann MU, Zamudio S, Illsley NP. Hypoxic upregulation of glucose transporters in BeWo choriocarcinoma cells is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *American journal of physiology Cell physiology*. 2007;293(1):C477-85.
338. Fukasawa M, Tsuchiya T, Takayama E, Shinomiya N, Uyeda K, Sakakibara R, et al. Identification and characterization of the hypoxia-responsive element of the human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Journal of biochemistry*. 2004;136(3):273-7.
339. Maloyan A, Mele J, Muralimanohara B, Myatt L. Measurement of mitochondrial respiration in trophoblast culture. *Placenta*. 2012;33(5):456-8.
340. Zhou Y, Gormley MJ, Hunkapiller NM, Kapidzic M, Stolyarov Y, Feng V, et al. Reversal of gene dysregulation in cultured cytotrophoblasts reveals possible causes of preeclampsia. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(7):2862-72.
341. Morris JM, Gopaul NK, Endresen MJ, Knight M, Linton EA, Dhir S, et al. Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and pre-eclampsia. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1998;105(11):1195-9.
342. Palm M, Axelsson O, Wernroth L, Basu S. F(2)-isoprostanes, tocopherols and normal pregnancy. *Free radical research*. 2009;43(6):546-52.
343. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1221:80-7.
344. Rodgers GM, Taylor RN, Roberts JM. Preeclampsia is associated with a serum factor cytotoxic to human endothelial cells. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1988;159(4):908-14.
345. McCarthy C, Kenny LC. Therapeutically targeting mitochondrial redox signalling alleviates endothelial dysfunction in preeclampsia. *Scientific reports*. 2016;6:32683.
346. Durnin JV. Energy requirements of pregnancy. *Diabetes*. 1991;40 Suppl 2:152-6.
347. Fortner RT, Pekow P, Solomon CG, Markenson G, Chasan-Taber L. Prepregnancy body mass index, gestational weight gain, and risk of hypertensive pregnancy among Latina women. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2009;200(2):167 e1-7.
348. Loui A, Eilers E, Strauss E, Pohl-Schickinger A, Obladen M, Koehne P. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) levels in early and mature human milk from mothers of preterm versus term infants. *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association*. 2012;28(4):522-8.
349. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *The Biochemical journal*. 2011;435(2):297-312.
350. Nadanaciva S, Murray J, Wilson C, Gebhard DF, Will Y. High-throughput assays for assessing mitochondrial dysfunction caused by compounds that impair mtDNA-encoded protein levels in eukaryotic cells. *Current protocols in toxicology*. 2011;Chapter 3:Unit3 11.
351. Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial metabolism as a regulator of keratinocyte differentiation. *Cellular logistics*. 2013;3(1):e25456.

352. Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, et al. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity*. 2013;38(2):225-36.
353. Bulmer JN, Pace D, Ritson A. Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. *Reproduction, nutrition, developpement*. 1988;28(6B):1599-613.
354. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology today*. 1993;14(7):353-6.
355. Vitoratos N, Economou E, Iavazzo C, Panoulis K, Creatsas G. Maternal serum levels of TNF-alpha and IL-6 long after delivery in preeclamptic and normotensive pregnant women. *Mediators of inflammation*. 2010;2010:908649.
356. Founds SA, Powers RW, Patrick TE, Ren D, Harger GF, Markovic N, et al. A comparison of circulating TNF-alpha in obese and lean women with and without preeclampsia. *Hypertension in pregnancy*. 2008;27(1):39-48.
357. Lau SY, Guild SJ, Barrett CJ, Chen Q, McCowan L, Jordan V, et al. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-10 levels are altered in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70(5):412-27.
358. Mariappan N, Soorappan RN, Haque M, Sriramula S, Francis J. TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;293(5):H2726-37.
359. Rath PC, Aggarwal BB. TNF-induced signaling in apoptosis. *Journal of clinical immunology*. 1999;19(6):350-64.
360. Kim JJ, Lee SB, Park JK, Yoo YD. TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L). *Cell death and differentiation*. 2010;17(9):1420-34.
361. Doll DN, Rellick SL, Barr TL, Ren X, Simpkins JW. Rapid mitochondrial dysfunction mediates TNF-alpha-induced neurotoxicity. *Journal of neurochemistry*. 2015;132(4):443-51.
362. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003;114(2):181-90.
363. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, et al. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity*. 2004;21(3):415-28.
364. Chard T. Cytokines in implantation. *Human reproduction update*. 1995;1(4):385-96.
365. Anteby EY, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Khudyak V, et al. Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloproteinase-9. *Molecular human reproduction*. 2004;10(4):229-35.

366. Afuwape AO, Kiriakidis S, Paleolog EM. The role of the angiogenic molecule VEGF in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Histology and histopathology*. 2002;17(3):961-72.
367. Mor F, Quintana FJ, Cohen IR. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol*. 2004;172(7):4618-23.
368. Guadagni F, Ferroni P, Palmirotta R, Portarena I, Formica V, Roselli M. Review. TNF/VEGF cross-talk in chronic inflammation-related cancer initiation and progression: an early target in anticancer therapeutic strategy. *In Vivo*. 2007;21(2):147-61.
369. Sibai BM. Prevention of preeclampsia: a big disappointment. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998;179(5):1275-8.
370. McCoy S, Baldwin K. Pharmacotherapeutic options for the treatment of preeclampsia. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2009;66(4):337-44.
371. Lamarca B. Endothelial dysfunction. An important mediator in the pathophysiology of hypertension during pre-eclampsia. *Minerva ginecologica*. 2012;64(4):309-20.
372. Poston L. Endothelial dysfunction in pre-eclampsia. *Pharmacological reports* : PR. 2006;58 Suppl:69-74.
373. Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2007;113(2):47-63.
374. Walter R, Blau N, Kierat L, Schoedon G, Reinhart WH. Systemic tetrahydrobiopterin (BH4) levels and coronary artery disease. *Cardiology*. 2000;94(4):265-6.
375. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Generation of superoxide from nitric oxide synthase. *FEBS letters*. 2000;481(3):305-6.
376. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(4):1620-4.
377. Ferrer-Sueta G, Radi R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS chemical biology*. 2009;4(3):161-77.
378. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
379. Bosse HM, Bachmann S. Immunohistochemically detected protein nitration indicates sites of renal nitric oxide release in Goldblatt hypertension. *Hypertension*. 1997;30(4):948-52.
380. Myatt L, Rosenfield RB, Eis AL, Brockman DE, Greer I, Lyall F. Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertension*. 1996;28(3):488-93.
381. Roggensack AM, Zhang Y, Davidge ST. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension*. 1999;33(1):83-9.

382. Frederiksen LJ, Sullivan R, Maxwell LR, Macdonald-Goodfellow SK, Adams MA, Bennett BM, et al. Chemosensitization of cancer in vitro and in vivo by nitric oxide signaling. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(7):2199-206.
383. Frederiksen LJ, Siemens DR, Heaton JP, Maxwell LR, Adams MA, Graham CH. Hypoxia induced resistance to doxorubicin in prostate cancer cells is inhibited by low concentrations of glyceryl trinitrate. *The Journal of urology*. 2003;170(3):1003-7.
384. Belkacemi L, Bainbridge SA, Dickinson MA, Smith GN, Graham CH. Glyceryl trinitrate inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in the syncytiotrophoblast of the human placenta: therapeutic implications for preeclampsia. *The American journal of pathology*. 2007;170(3):909-20.
385. Barsoum IB, Renaud SJ, Graham CH. Glyceryl trinitrate inhibits hypoxia-induced release of soluble fms-like tyrosine kinase-1 and endoglin from placental tissues. *The American journal of pathology*. 2011;178(6):2888-96.
386. Curtius HC, Heintel D, Ghisla S, Kuster T, Leimbacher W, Niederwieser A. Tetrahydrobiopterin biosynthesis. Studies with specifically labeled (2H)NAD(P)H and 2H₂O and of the enzymes involved. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1985;148(3):413-9.
387. Bendall JK, Douglas G, McNeill E, Channon KM, Crabtree MJ. Tetrahydrobiopterin in cardiovascular health and disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(18):3040-77.
388. Crabtree MJ, Hale AB, Channon KM. Dihydrofolate reductase protects endothelial nitric oxide synthase from uncoupling in tetrahydrobiopterin deficiency. *Free radical biology & medicine*. 2011;50(11):1639-46.
389. Crabtree MJ, Channon KM. Dihydrofolate reductase and biopterin recycling in cardiovascular disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;47(6):749-51.
390. Ionova IA, Vasquez-Vivar J, Whitsett J, Herrnreiter A, Medhora M, Cooley BC, et al. Deficient BH₄ production via de novo and salvage pathways regulates NO responses to cytokines in adult cardiac myocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;295(5):H2178-87.
391. Rajagopalan PT, Zhang Z, McCourt L, Dwyer M, Benkovic SJ, Hammes GG. Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(21):13481-6.
392. Wessels JA, Huizinga TW, Guchelaar HJ. Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(3):249-55.
393. Hagner N, Joerger M. Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis. *Cancer management and research*. 2010;2:293-301.