

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**

**“Análisis de la vía trasduccional de Receptor de  
Renina Prorenina en ratas con hipertensión inducida por el  
embarazo”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS EN  
FARMACOLOGÍA**

P R E S E N T A:  
**L. O. CLAUDIA RAMÍREZ MONTERO**

Directores de tesis:

**DR. PEDRO LÓPEZ SÁNCHEZ**

**DRA. LILIANA ANGUIANO ROBLEDO**

**MÉXICO D.F., 2015**



## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS.....</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>1.</b>	
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 EMBARAZO.....</b>	<b>18</b>
1.1.1 Cambios cardiovasculares del embarazo.....	19
<b>1.2 EMBARAZO COMPLICADO CON PRECLAMPSIA.....</b>	<b>20</b>
1.2.1 Teorías encaminadas a explicar la etiología de la Preclampsia...21	
1.2.2 Cambios Cardiovasculares del embarazo complicado con preclamsia.....	22
<b>1.3 SISTEMA RENINA PRORRENINA (EMBARAZO SANO Y EMBARAZO COMPLICADO CON PREECLAMPSIA).....</b>	<b>23</b>
1.3.1 Receptor de Renina Prorenina (PRR) .....	25
1.3.2 Efectos del Receptor de Renina Prorenina.....	26
1.3.3 Estructura del Receptor de Renina Prorenina (PRR).....	28
1.3.4 Funciones del Receptor de Renina Prorenina (PRR).....	29
<b>1.4 Vía trasduccional Wnt.....</b>	<b>30</b>
1.4.1Vía trasduccional Wnt canónica.....	31
1.4.2Vía trasduccional Wnt no canónica.....	32
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>3. PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>34</b>
<b>4. HIPOTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>5.OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
5.1 Objetivo General.....	35
5.2 Objetivos Particulares.....	35



---

<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
6.1 Grupos Experimentales.....	36
6.2 Desarrollo del Modelo.....	37
6.3 Validación del Modelo.....	39
6.3.1 Determinación de la PA.....	40
6.3.2 Proteinuria.....	41
6.3.3 Peso y Tamaño de las Crías.....	42
6.4 Inmunoblot.....	43
6.4.1 Extracción de la Muestra.....	43
6.4.2 Electroforesis.....	44
6.4.3 Transferencia.....	45
6.4.4. Bloqueo de Membranas.....	46
6.4.5 Incubación del Anticuerpo.....	46
6.4.6 Reacción de Quimioluminiscencia.....	47
6.5. Análisis estadístico.....	49
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>88</b>
<b>9 CONCLUSIONES</b> .....	<b>94</b>
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	<b>95</b>



## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Medición de la Presión Arterial Sistólica (PAS) en mmHg de los grupos de ratas No Embarazadas Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....	50
<b>Gráfica 2.</b> Medición de la Presión Arterial Diastolica (PAD) en mmHg de los grupos de ratas No Embarazadas Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR.....	51
<b>Gráfica 3.</b> Excreción de proteínas en orina en los grupos No Embarazadas Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....	52
<b>Gráfica 4.</b> Numero de crías de los grupos Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....	53
<b>Gráfica 5.</b> Peso de las crías de los grupos Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....	54
<b>Gráfica 6.</b> Talla de las crías de los grupos Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....	55
<b>Gráfica 7.</b> Densidad relativa $\beta$ – catenina y DVL -1 en aorta abdominal, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....	57
<b>Gráfica 8.</b> Densidad relativa de $\beta$ - catenina y DVL – 1 en aorta torácica, , en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....	58
<b>Gráfica 9.</b> Densidad relativa de $\beta$ – catenina. Y DVL – 1 en aurículas , en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....	59



**Gráfica 10.** Densidad relativa de  $\beta$  – catenina y DVL – 1 en ventrículo Derecho, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....60

**Gráfica 11.** Densidad relativa de  $\beta$  – catenina y DVL – 1 en ventrículo Izquierdo, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR ..... 61

**Gráfica 12.** Densidad relativa de  $\beta$  – catenina y DVL – 1 en corteza Renal, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR ..... 62

**Gráfica 13.** Densidad relativa de  $\beta$  – catenina y DVL – 1 en médula Renal, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....63

**Gráfica 14.** Densidad relativa de  $\beta$  – catenina y DVL – 1 en papila Renal, en los grupos, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....64

**Gráfica 15 .** Densidad relativa de  $\beta$  – catenina y DVL – 1 en Placenta Cara Materna, en los grupos, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....65

**Gráfica 16.** Densidad relativa de  $\beta$  – catenina y DVL – 1 en placenta Cara Fetal, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....66

**Gráfica 17.** Densidad relativa de HDAC 4 en aorta Abdominal, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....67



**Gráfica 18.** Densidad relativa de HDAC4 en aorta Torácica, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....68

**Gráfica 19.** Densidad relativa de HDAC4 en aurículas, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....69

**Gráfica 20.** Densidad relativa de HDAC4 en ventrículo Derecho, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....70

**Gráfica 21.** Densidad relativa de HDAC4 en ventrículo Izquierdo, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....71

**Gráfica 22.** Densidad relativa de HDAC4 en corteza renal, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....72

**Gráfica 23.** Densidad relativa de HDAC4 en médula renal, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....73

**Gráfica 24.** Densidad relativa de HDAC4 en papila Renal, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....74

**Gráfica 25.** Densidad relativa de HDAC4 en placenta Cara Materna, en los grupos, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR.....75

**Gráfica 26.** Densidad relativa de HDAC4 en placenta Cara Fetal, en los grupos, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....76



**Gráfica 27.** Densidad relativa de JNK – 1 y PKC -  $\alpha$  en aorta abdominal, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....78

**Gráfica 28.** Densidad relativa de JNK - 1. y PKC -  $\alpha$  en aorta Torácica, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....79

**Gráfica 29.** Densidad relativa de JNK – 1 y PKC -  $\alpha$  en aurículas, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....80

**Gráfica 30.** Densidad relativa de JNK - 1. y PKC -  $\alpha$  en ventrículo derecho, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....81

**Gráfica 31.** Densidad relativa de JNK – 1 y PKC -  $\alpha$  en ventrículo izquierdo, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....82

**Gráfica 32.** Densidad relativa de JNK - 1. y PKC -  $\alpha$  en corteza renal, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....83

**Gráfica 33.** Densidad relativa de JNK – 1 y PKC -  $\alpha$  en médula renal, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....84

**Gráfica 34.** Densidad relativa de JNK - 1. y PKC -  $\alpha$  en papila renal, en los grupos No Embarazada Sham, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....85



**Gráfica 35.** Densidad relativa de JNK – 1 y PKC -  $\alpha$  en placenta cara Materna, en los grupos, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR .....86

**Gráfica 36** Densidad relativa de JNK – 1 y PKC -  $\alpha$  en placenta cara Fetal, en los grupos, Embarazada SHAM, Embarazada con CASR.....87

## ABREVIATURAS

<b>Ang 1</b>	Angiotensina I
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>AT1</b>	Receptor de angiotensina tipo 1
<b>AT2</b>	Receptor de angiotensina tipo 2
<b><math>\beta</math> – catenina</b>	Catenina beta
<b>CASR</b>	Coartación Aórtica Subrenal
<b>cAMP</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>DVL – 1</b>	Dishevelled 1
<b>ECA</b>	Enzima Convertidora de Angiotensina
<b>EHE</b>	Estados Hipertensivos del Embarazo
<b>eNOS</b>	Sintasa de Oxido Nítrico endotelial
<b>EP</b>	Receptor de prostaglandina E tipo 1
<b>EP2</b>	Receptor de prostaglandina E tipo 2
<b>GS</b>	Gasto Cardíaco
<b>HDAC4</b>	Histona desacetilasa 4
<b>HSP</b>	Proteína de Choque Térmico
<b>HTA</b>	Hipertensión Arterial



---

<b>IP</b>	Receptor de prostaciclina
<b>IP3</b>	Trifosfato de inositol
<b>JNK</b>	cinasa c – jun N – terminal
<b>LRP6</b>	Receptor de Lipoproteína 6
<b>MAPK</b>	Cinasas de Proteínas Activadas por Mitógeno
<b>ON</b>	Óxido Nítrico
<b>PAI – 1</b>	Inhibidor tipo – 1 del Activador del Plasminógeno
<b>PA</b>	Presión Arterial
<b>PAD</b>	Presión Arterial Diastolica
<b>PAS</b>	Presión Arterial Sistolica
<b>PE</b>	Preeclampsia
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PKC<math>\alpha</math></b>	Proteina kinasa C subunidad alfa
<b>PLA2</b>	Fosfolipasa A2
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLZF</b>	Proteína Promielocítica de dedos de zinc
<b>PKC <math>\alpha</math></b>	Proteína Cinasa alfa
<b>PRR</b>	Receptor de Prorenina/Renina



---

<b>SRA</b>	Sistema Renina Angiotensina
<b>TGF <math>\beta</math>1</b>	Factor de Crecimiento Epidérmico Transformante beta
<b>UA</b>	Unidades Arbitrarias
<b>VATPasa</b>	ATPasa vacuolar
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>Wnt</b>	Wingless /gen int1



## **“Análisis de la vía transduccional del receptor renina prorenina, en ratas con Hipertensión inducida por el embarazo”**

### **RESUMEN**

El embarazo es una condición fisiológica caracterizada por cambios hemodinámicos, que actúan como mecanismos de adaptación para el adecuado desarrollo del feto y la integridad de la madre. Sin embargo, cuando se presenta una adaptación inadecuada, se ocasionan complicaciones en el embarazo, una de estas complicaciones es la preclampsia. La preclampsia es un padecimiento con alta morbilidad materno – fetal que se caracteriza por un incremento de las cifras de presión arterial, presencia de proteína en orina y frecuentemente edema. Existen estudios que han identificado algunas de las posibles causas de esta mala adecuación hemodinámica, sin embargo no son concluyentes y aún no se tiene una explicación clara.

Uno de los sistemas al cual se le atribuye un papel importante en el control de la presión arterial en este padecimiento es el Sistema Renina Angiotensina (SRA), mismo que se ha estudiado durante mucho tiempo y del cual se ha descrito un nuevo componente, el receptor a renina prorenina (PRR por sus siglas en inglés), que parece estar implicado en el desarrollo de las complicaciones de la hipertensión.

El SRA se activa incrementando las concentraciones plasmáticas de Angiotensina II durante el embarazo sano, donde se produce una disminución de la respuesta vascular al efecto presor de la Angiotensina II disminuyendo las cifras de presión



arterial en respuesta a la reducida resistencia vascular (A. Tanoue, Y Nasa, T. Koshimizu, H. Shinoura et. Al., 2002). El Receptor de Renina Prorenina podría estar involucrado en los cambios de presión arterial por lo que es de interés estudiar su vía trasduccional. Este nuevo componente del SRA posee diversas funciones, entre las que destaca su comportamiento como bomba de protones participando en la acidificación del medio; el PRR al interactuar con su sustrato, prorenina o renina, es capaz de causar efectos dependientes de Angiotensina II, y efectos intracelulares como es la activación de las vías de señalización Wnt.

La vía Wnt es una cascada de señalización relacionada con procesos como embriogénesis, mitogénesis, replicación y polaridad celular. Durante la edad adulta se encuentra relacionada con la regeneración tisular y su mal funcionamiento es el causante de diversas enfermedades. La vía de señalización Wnt se divide en dos, la vía Wnt canónica o dependiente de  $\beta$  – catenina descrita en procesos de embriogénesis, y la vías no canónica relacionada con procesos de polaridad celular y liberación de calcio. Esta vía ha sido estudiada en enfermedades como cardiopatías, nefropatías y cáncer entre otras enfermedades.

Por tanto estos antecedentes plantean que existe una comunicación cruzada entre el receptor de renina prorenina y la vía Wnt involucrados en los cambios de presión arterial; como ya se ha reportado, mientras la expresión del receptor de renina prorenina se ve incrementada durante el embarazo sano en tejidos aórticos, renales y de placenta, la expresión del receptor se encuentra disminuida durante el embarazo complicado con preeclampsia lo cual sugiere que si la expresión del receptor de renina prorenina se encuentra inhibida esto impediría la activación de la vía de señalización Wnt lo que hace pensar que dicha inhibición podría estar fuertemente relacionada con la generación de la hipertensión arterial inducida por el embarazo.



Es por lo anterior que en el presente trabajo se pretendió estudiar el receptor renina prorenina y su probable papel en el proceso de la Hipertensión arterial inducida por el embarazo, siendo el objetivo determinar la relación entre el receptor de renina prorenina y la vía Wnt durante la preclampsia.

Para ello se emplearon ratas hembra de la cepa Wistar y se formaron tres grupos experimentales, un grupo control de ratas no embarazadas con cirugía simulada, un grupo de ratas embarazadas con cirugía simulada y un grupo de estudio (preclampsia) con cirugía de Coartación Aórtica Subrenal (CASR) de ratas embarazadas. El modelo de preclampsia se validó con marcadores de presión arterial, proteína en orina, peso y talla de las crías. Una vez validado el modelo se determinó la expresión basal de GAPDH y los cambios en la expresión proteica de  $\beta$  - catenina, DVL - 1, HDA4, JNK - 1, PKC  $\alpha$  en tejidos aórticos (aorta abdominal y torácica), tejido cardíaco (aurículas, ventrículo derecho, ventrículo izquierdo), tejido renal (corteza, médula, papila), placenta (cara fetal, cara materna) en cada grupo experimental.

Estos resultados mostraron un incremento en la expresión de  $\beta$  - catenina DVL - 1 en tejido cardíaco, renal, aórtico y de placenta de ratas con preclampsia, mientras que JNK se encontró aumentado en embarazo sano y disminuido durante el embarazo complicado con preclampsia en tejido de aorta, corazón, y disminuido en placenta. Lo cual sugiere que la vía Wnt canónica no se encuentra relacionada a la presión arterial durante el embarazo mientras que la vía Wnt no canónica podría estar participando en los cambios de la presión arterial durante el embarazo complicado con preclampsia.



---

## **"Analysis of the transduction pathway of the renin prorenin receptor in rats with pregnancy-induced hypertension"**

### ABSTRACT

Pregnancy is a physiological condition which is characterized by hemodynamic changes, which acts like coping mechanisms for proper fetal development and the mother integrity. However, when an inadequate adaptation occurs, can cause pregnancy complications, one of these complications is preclampsia. Preclampsia is a disease with high morbidity maternal - fetal characterized by an increase in blood pressure, proteinuria and often edema. Studies have identified some of the possible causes of this poor hemodynamic adaptation, however they are inconclusive and do not have a clear explanation yet.

One system that have attributed an important role in the blood pressure control for this condition is the Renin Angiotensin System (RAS), it has been studied for a long time and a new component has been described, the prorenin renin receptor (PRR), which appears to be involved in the development of complications of hypertension.

The SRA is activated increasing plasma concentrations of angiotensin II in the healthy pregnancy, where produce a decrease in vascular response to pressor effect of angiotensin II is produced by decreasing the blood pressure in response to reduced vascular resistance (A. Tanoue, Y Nasa, T. Koshimizu, H. Shinoura et. Al., 2002).



Renin prorenin receptor may be involved in changes in blood pressure that the reason about the interest to study its transductional pathway. This new component of the SRA have several functions, among which their behavior as proton pump participating in the acidification of the environment; PRR interacting with its substrate, prorennin or rennin, it is capable of causing Angiotensina II dependent effects, and intracellular effects Angiotensina II independent, including the activation of Wnt signaling pathways.

The Wnt pathway is a cascade of processes related signaling as embryogenesis, mitogenesis, replication and cell polarity. During adulthood is related to tissue regeneration and malfunction is the cause of various diseases. The Wnt signaling pathway is divided into two, the canonical Wnt pathway or  $\beta$  – catenina dependent, processes described in embryogenesis and noncanonical pathways related to cell polarity and processes calcium release. This pathway has been studied in diseases such as heart disease, kidney disease and cancer among other diseases.

Therefore this background suggest that there is crosstalk between renin and prorenin receptor Wnt pathway involved in the changes of blood pressure; as already reported, while the prorenin receptor expression is increased renin during pregnancy healthy aortic, renal and placental tissues, receptor expression is decreased during pregnancy complicated by preeclampsia, suggesting that if the expression prorenin receptor is inhibited renin would prevent activation of the Wnt



signaling pathway suggesting that this inhibition could be strongly related to the generation of pregnancy induced hypertension.

It is why in the present work we were trying to study the renin prorenin receptor and its probable role in the process of pregnancy-induced hypertension, with the objective to determine the relationship between renin and prorenin receptor of Wnt pathway during preclampsia.

To carry out this research, female Wistar rats were used and we made three experimental groups, a control group of non-pregnant rats with simulated surgery, a group of pregnant rats with simulated surgery and a study group (preclampsia) with subrenal aortic coarctation (CASR) surgery for pregnant rats.

The model was validated with preeclampsia markers of blood pressure, protein in urine, weight and size of the offspring. Once validated the model basal expression of GAPDH and changes in protein expression  $\beta$ -catenina, DVL - 1, HDAC4, JNK, PKC  $\alpha$  was determined in aortic tissue (abdominal and thoracic aorta) cardiac tissue (atria, right ventricle, left ventricle), renal tissue (cortex, medulla, papilla), placenta (fetal face, maternal side) in each experimental group.

These results showed an increase in expression of  $\beta$  - catenin DVL - 1 in cardiac, renal, aortic and preeclamptic placental tissue of rats, while JNK was found in healthy pregnancy increased and decreased during pregnancy complicated

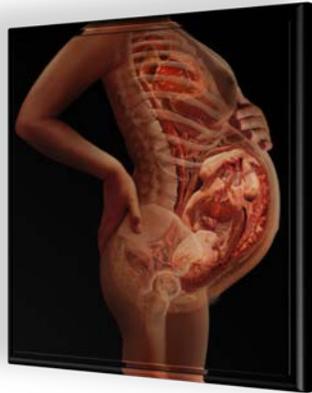


by preeclampsia in tissue aorta, heart, and decreased in placenta. This suggests that the canonical Wnt pathway blood pressure is not related during pregnancy while the noncanonical Wnt pathway may be involved in changes in blood pressure during pregnancy complicated by preeclampsia.

## **Introducción:**

### **1. EMBARAZO**

El embarazo es el estado que inicia con la fecundación y concluye 38- 40 semanas después con el parto y comprende una serie de modificaciones de los sistemas de la mujer para adaptarse a la nueva condición (Hunter S et. al 1992), necesarios para promover un adecuado desarrollo fetal como son los cambios a nivel cardiovascular que llevan a una caída de la presión arterial de la madre en condiciones normales. Si estos cambios fallan, se pueden desarrollar complicaciones importantes como la inducción de una tensión arterial elevada. En condiciones normales la presión arterial sistémica disminuye alrededor de las 20 semanas de edad gestacional y aumenta levemente a lo largo del embarazo, pero debe permanecer igual o por debajo de los valores correspondientes al estado no gestante durante todo el embarazo.



## 1.1 CAMBIOS CARDIOVASCULARES DEL EMBARAZO

El embarazo es una condición fisiológica asociada a diversos cambios hemodinámicos, principalmente en la circulación de la madre (Robson et. Al 1989) con el fin de procurar una adecuada perfusión uteroplacentaria.

Los cambios característicos de la adaptación al embarazo se le presentan en la siguiente tabla (Abbas et. al., 2005):

Tabla No.1  
Cambios hemodinámicos durante el embarazo.

Parámetros	1er Trimestre	2do Trimestre	3er Trimestre
Volumen Sanguíneo	↑	↑↑	↑↑↑
Gasto Cardíaco	↑	↑↑	↑↑↑
Volumen Latido	↑	↑↑↑	↑,↔
Frecuencia Cardíaca	↑	↑↑	↑↑
Presión Arterial Sistólica	↓	↓	↔
Presión Arterial Diastólica	↔	↓↓	↓
Presión de Pulso	↑	↑↑	↔
Resistencia Vascular Sistémica	↓	↓↓↓	↓↓

↔ No cambios comparados con pacientes no embarazadas; ↑ pequeño incremento; ↑↑ moderado incremento; ↑↑↑ gran incremento; ↓ pequeña disminución; ↓↓ moderada disminución; ↓↓↓ gran disminución.

**Figura 1.** Cambios de pacientes con preclampsia comparados con pacientes embarazadas sanas (Abbas et. Al. 2005)

Los cambios cardiovasculares comienzan desde los primeros meses del embarazo, alcanzando el mayor aumento durante el segundo trimestre del mismo, etapa durante la cual se mantienen estos cambios en meseta y van disminuyendo hasta la resolución del embarazo (Chapman et, al., 2004). El aumento del gasto cardíaco se debe principalmente a la elevación del volúmen sistólico, aunque también se ha atribuído a causa de un incremento de la frecuencia cardíaca y a la caída de las resistencias vasculares debida a la acción hormonal y a la existencia de la circulación uteroplacentaria. (Khraibi et. Al., 2002)

De acuerdo con estos parámetros es común encontrar un discreto descenso de las cifras de presión arterial durante un embarazo normoevolutivo (Carbillon et. Al., 2000).

## 2. EMBARAZO COMPLICADO CON PRECLAMPSIA (PE)

Los estados hipertensivos del embarazo (EHE) corresponden a la hipertensión gestacional y la preclampsia (Roura et. al 2007). De acuerdo con el ACOG 2014 (The American College of Obstetrics and Gynecologists) la hipertensión gestacional corresponde a cifra de presión arterial sistólica igual o mayor a 140 mmHg y una presión arterial diastólica igual o mayor a 90 mm Hg, registradas en dos ocasiones separadas por al menos 6 horas y a diferencia de un estado preclámptico, no presenta proteinuria. La hipertensión gestacional tiene resultados perinatales similares a la población de gestantes normales, y corresponde a casi un 30% de la incidencia de los EHE. La *preclampsia* PE es un estado más comprometedor que ocupa el 70 % de los EHE (Albert E. et.al 2007), se refiere a un estado de presión elevada (medida en dos ocasiones separadas por al menos 6 horas dentro de un período de 7 días) durante el embarazo, acompañada por proteinuria y por lo general edema (Bellamy et al., 2007), su diagnóstico es posible a partir de las 20 semanas de gestación y afecta al 10 % de los embarazos (Roura et. al 2007). Es una enfermedad grave con importantes repercusiones perinatales que de acuerdo con la OMS (2013), (Bamfo JE et. al., (2011) representa el **23 %** de defunciones en mujeres embarazadas y cuya causa no ha sido en su totalidad esclarecida.

Existen estudios que mencionan a la PE como un trastorno multisistémico debido a que puede afectar órganos como cerebro, pulmones, riñones e hígado (Morgan et. al.2012).

### 2.1 TEORIAS ENCAMINADAS A EXPLICAR LA ETIOLOGIA DE LA PRECLAMPSIA



Aunque su etiología se considera hasta hoy hipotética, existen varias teorías basadas en hallazgos que comprometen la función de diversos órganos del sistema cardiovascular, lo cual supone un trastorno multifactorial y multisistémico grave, que involucra la disfunción del endotelio vascular. Sin embargo se han propuesto varias teorías con el fin de explicarla. Y aunque se han sugerido por separado, no se descarta la idea de que la causa podría deberse a la convergencia de más de una de estas teorías:

**Teoría útero – placentaria:** Se ha atribuido un papel importante a la placenta en el desarrollo de la preeclampsia, debido a que ésta condición cede al momento del parto y se han descrito evidencias del remodelamiento anormal vascular de las arterias espirales uterinas que podrían desembocar en una hipoxia placentaria causando los signos que confieren dicho trastorno (Robertson et. al. 1976)

**Teoría inmunológica:** sugiere una mala adaptación por parte de la madre a los antígenos de la unión feto – placentaria (Craici, I., 2008). Estudios ex – vivo han confirmado que las células inmunes juegan un papel central en la fisiopatología de la preeclampsia (Decker 2007). La teoría sugiere que un cambio en la funcionalidad de subpoblaciones de células inmunes uterinas, refleja un sistema inmune materno inadaptado, o una pérdida de los mecanismos de tolerancia, que precede el progreso de estrés oxidativo de la placenta y la isquemia observados en la preeclampsia

**Teoría endotelial:** propone que se debe a una deficiencia en la producción de prostaglandinas (Lindheimer et al., 1985, Redman et al., 1984); y a la proteína antiangiogénica tirosina – cinasa soluble fms like (sF1t-1) (Dongxin Zhang 2013) que inhibe a las proteínas angiogénicas, factor de crecimiento placentario (PIGF) y al factor del crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (C. Lam, K. H. Lin et. al 2005).



Teoría del estrés oxidativo: El estrés oxidativo, disminuye la biodisponibilidad de Óxido Nítrico, lo cual podría contribuir con la aparición de la preeclampsia (Zalba 2001). La etiología de estrés oxidativo en mujeres con preeclampsia ha sido el foco de una extensa investigación. Los factores genéticos, ambientales e inmunológicos han sido considerados, se ha sugerido que los polimorfismos de los genes antioxidantes en el tejido placentario contribuye a la susceptibilidad a la preeclampsia (Kim YJ 2005). aunque otros autores mencionan que no existe relación (Zhang J 2008).

La ATPasa vacuolar es una molécula clave en la placentación, nuevos hallazgos sugieren que ella es un link entre varias causas de PE, VATPasa es un esencial modulador en la regulación de bioacción del RAS (Dongxin 2013).

## 2.2 CAMBIOS CARDIOVASCULARES DEL EMBARAZO COMPLICADO CON PREECLAMPSIA

En un embarazo complicado con preclampsia encontramos disminución del gasto cardiaco y volumen sanguíneo, aumento de las resistencias vasculares periféricas y por consecuencia la elevación de la tensión arterial.

Durante dicho trastorno se pueden encontrar modificaciones en el Sistema Renina Angiotensian.(Nielsen et. al 2000)



### 3. SISTEMA RENINA PRORRENINA (EMBARAZO SANO Y EMBARAZO COMPLICADO CON PRECLAMPSIA PE)

Es importante mencionar que un papel fundamental en el control de la presión arterial, lo tiene el Sistema Renina Angiotensina.

El Sistema Renina Angiotensina desempeña un rol importante al intervenir en la regulación de la Presión Sanguínea (PA) de los seres humanos (Walsh et. Al, 2005) y está compuesto por proteínas y péptidos que reaccionan en cascada.

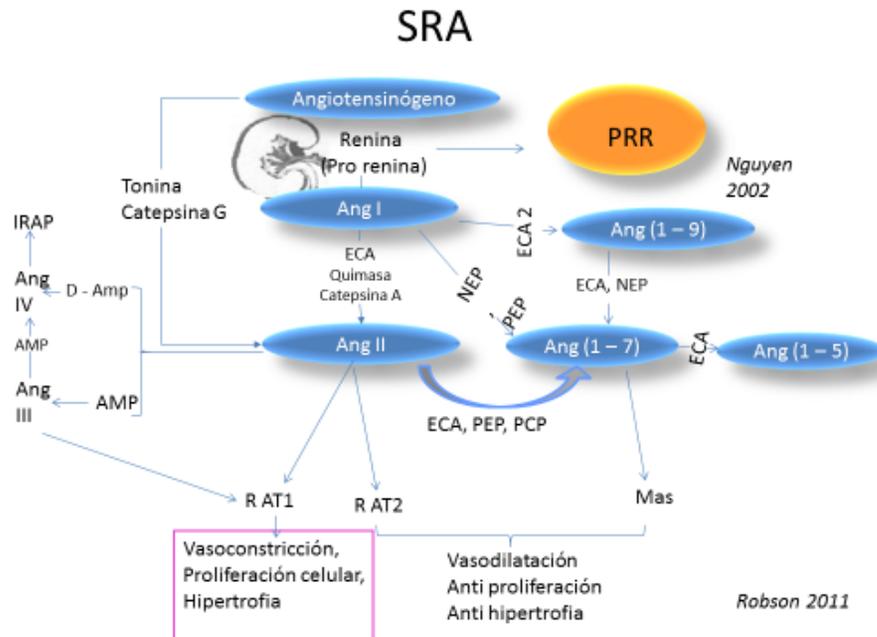
Este sistema se ha considerado como un sistema de defensa ante condiciones como la hipotensión, hipovolemia o hiponatremia, de tal forma que conllevan a una secreción de renina, por parte del riñón. La renina es una enzima proteolítica producida en las células yuxtaglomerulares, que corta al angiotensinógeno sintetizado por el hígado, produciendo angiotensina I; la enzima convertidora de angiotensina (ECA) secretada por el tejido pulmonar, corta a la angiotensina I dando lugar a angiotensina II que es un potente péptido vasoconstrictor y estimulante para la secreción de aldosterona. La aldosterona y la angiotensina II, promueven la reabsorción de sodio en el riñón (Robson, 2008) con su consecuente efecto de elevación de la tensión arterial. Otra sustancia que juega también un rol importante, es la prorrenina, derivada principalmente de las células yuxtaglomerulares del riñón como una pre hormona (Suzuki F. 2007), y de órganos reproductores, glándulas suprarrenal, submandibular, y células de Müller (Danser J 2009); posee un prosegmento que parece tener mayor afinidad con el receptor comparado con la renina y su concentración es diez veces mayor que la renina en condiciones normales, por lo que en un hallazgo contrario es señal de alerta ante alguna una condición anómala. Los niveles de renina y de prorrenina están altamente correlacionados, pero no siempre se



alteran en paralelo (Danser 1998). Ambas sustancias son liberadas desde las células yuxtglomerulares a la circulación a partir de un estímulo.

Los más recientes hallazgos de este sistema, describen la presencia de un nuevo componente una proteína llamada Receptor de Renina Prorenina (PRR por sus siglas en inglés) (Nguyen 2002).

Por otro lado el Sistema Renina Angiotensina participa importantemente en el trastorno de la PE y el nuevo componente de este sistema podría estar fuertemente implicado en la aparición de la preclampsia. Es conocido que la preclampsia está asociada al Sistema Renina Angiotensina (Nielsen et. al, 2000). Mientras que un embarazo normotenso se le relaciona con la baja respuesta a la Ag II, durante la preclampsia hay sensibilidad aumentada a ésta. Durante la preeclampsia existen niveles elevados de Ang II causantes de vasoconstricción, la actividad de la renina plasmática y la aldosterona se encuentran suprimidos con niveles relativamente altos de aldosterona para los niveles de renina (Brown et. al, 1992), lo cual sugiere que existe aumento en la sensibilidad a la Angiotensina II en las glándulas adrenales (Brown et. al, 1992)



**Figura 2.** Esquema del Sistema Renina Angiotensina y su nuevo componente el Receptor de Renina Prorenina (PRR). (Robson 2011)

### 3.1 RECEPTOR DE RENINA PRORRENINA (PRR)

En la actualidad se tiene el conocimiento de un nuevo componente del SRA, el Receptor Prorenina Renina (PRR) (Nguyen et. al., 2002). Su expresión se ha descrito a nivel de mRNA en órganos como cerebro, corazón y placenta, y en menor cantidad en hígado, páncreas y riñón (Nguyen et. al., 2002). Este receptor renina prorenina es una proteína de 350 aminoácidos con un solo dominio transmembrana (Danser J. 2009) que se une a la renina y a la prorenina, produciendo dos efectos distintos.

### 3.1.1. EFECTOS DEL RECEPTOR RENINA PRORRENINA (PRR)

La interacción de éste receptor con sus sustratos (renina o prorrenina) ocasiona efectos dependientes de la formación de Ang II, y también activa diversas vías de señalización independientes de las activadas por la Ang II (Tamargo Juan 2009)

#### A) Efectos del PRR dependiente de angiotensina II

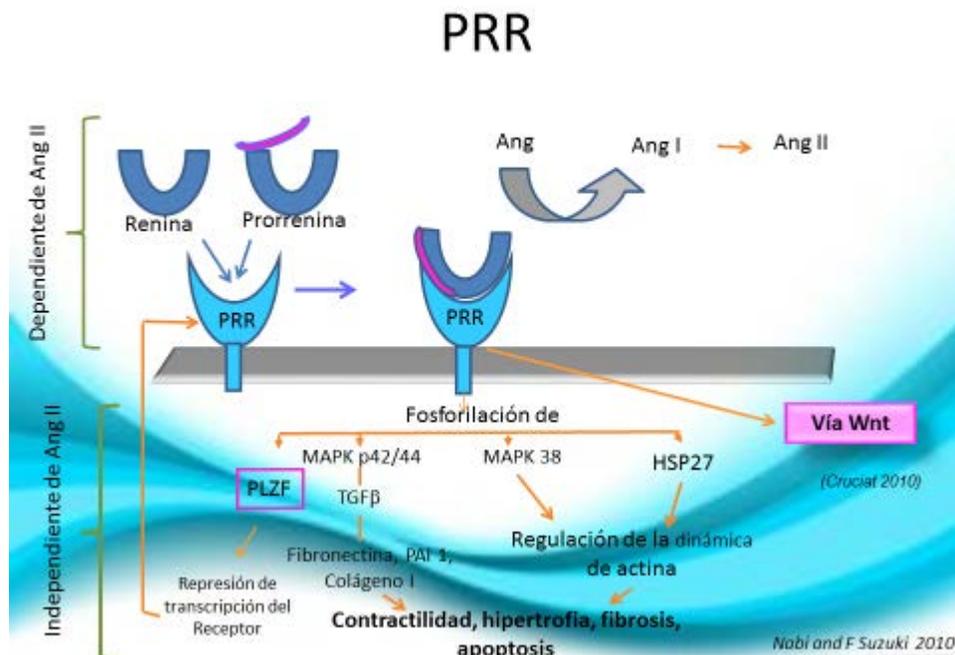
Una vía irreversible (proteolítica) (Danser et. al., 2007) donde hay un aumento de catálisis por la renina 4-5 veces mayor, acelerando la conversión del angiotensinógeno en A-I en la superficie de la membrana de las células de los órganos diana en íntimo contacto con la ECA o la quimasa y los receptores AT1; como consecuencia, aumenta la síntesis de A-II (Nguyen et. al., 2002)

Una vía reversible (activación no proteolítica) para obtener Ang I, quien por acción de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) convierte a Ang I en Ang II.

#### b) Efectos del PRR independientes de angiotensina II

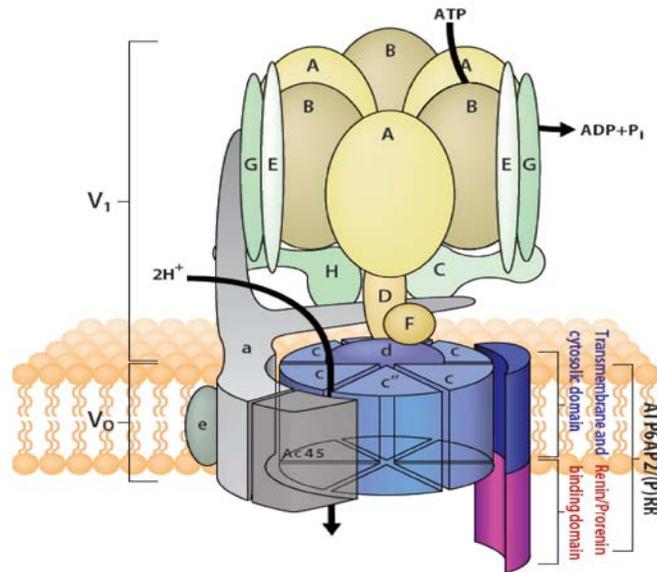
Los efectos independientes de la formación de Ang II (Campbell et. al. 2008) no están plenamente dilucidados, sin embargo se han descrito a nivel intracelular efectos tales como fosforilación de cinasas, ocasionando efectos similares a angiotensina II, como hipertrofia, proliferación celular y vasoconstricción. La interacción del receptor y sus ligandos activa al factor TGF  $\beta$ 1 el cual ocasiona la síntesis del inhibidor tipo – 1 del activador del plasminógeno (PAI – 1) el cual promueve fibrosis, apoptosis, contractilidad e hipertrofia. El PRR también puede activar a la proteína de choque térmico que promueve los mismos procesos celulares (Sakoda et, al. 2007).

Además, la proteína PZLF activada por la misma interacción, se encarga de una retroalimentación negativa que reprime la transcripción del receptor. Otro efecto independiente de angiotensina II asociado a éste receptor, y el más importante (para este proyecto de investigación) es la activación de la vía de señalización Wnt. Descrita ya en diversos mecanismos de desarrollo embrionario, y procesos vitales para un organismo saludable durante la edad adulta.



**Figura 3.** Esquema de los eventos generados tras la interacción del PRR con sus ligandos (renina y prorenina) (Nabi et. Al., 2010)

### 3.1. 2. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR RENINA PRORRENINA (PRR)



retención de retículo endoplásmico señal / recuperación

Señal de clasificación endosoma/lisosomal

Subunidad c y Dominio de Unión



**Figura 4.** Estructura Esquemática del PRR y su asociación con la bomba de ATPasa (Atsuhiko Ichihara (2011))

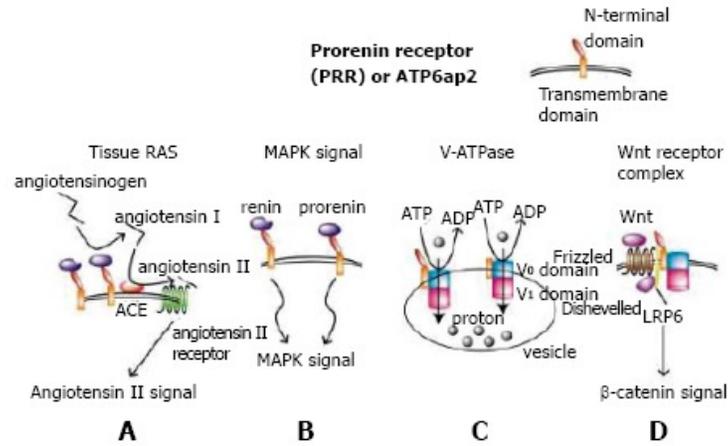
Aunque ya se había demostrado que el extremo C – terminal del PRR se asocia con la ATPasa vacuolar transportadora de protones ATP6AP2 (Ludwing 1998). es Nguyen en el 2002 el primero en describir al PRR como proteína transmembranal de 350 residuos de aminoácidos, cuya expresión es mayor en cerebro, corazón y placenta, siendo menor en hígado y riñón (Campbell et. al. 2008).

### 3.2.3. FUNCIONES DEL RECEPTOR RENINA PRORRENINA (PRR)

Datos recientes indican que el PRR puede tener funciones independientes de la activación de prorrenina y renina. Estudios de este receptor en peces cebrá o *C elegans* con supresión del gen que codifica el PRR mostró un efecto letal (Burckle C, Bader M 2006) lo cual sugirió efectos vitales por parte de este receptor.

Estudios posteriores describen que el PRR posee diversas funciones entre las que destaca la acidificación citoplasmática y de diversos organelos intracelulares como lisosomas, endosomas, y vesículas sinápticas (Timothy 2010). El complejo PRR/ATP6AP2 se expresa en cantidades mayores al interior de la célula. (Saris et. al. 2006) 2010) y en menor cantidad en la superficie celular.

Una de las funciones importantes del PRR es la activación de varias vías de señalización como la activación de las MAPK (Christine T Wong et. al., 2014) particularmente ERK ½, involucrado en inducción de células de amnion (Kirsty G Pringle 2010) y algo relevante para nuestro trabajo de investigación, es la activación de la Vía Trasduccional Wnt. Estudios recientes declaran al PRR como una proteína accesoria esencial de la ATPasa vacuolar (V – ATPasa) y su acción como intermediario en el complejo receptor de la vía Wnt. (Yoichi Oshima 2014)



**Figura 5.** Cuatro Roles del Receptor de Renina Prorenina. A) Producción de Ang II, B) Inducción de vía de señalización de MAPK, C) PRR como subunidad de la ATPasa vacuolar, D) PRR como proteína adaptadora entre V – ATPasa y LRP6 (miembros del complejo receptor Wnt). (Oshima Y et. al. 2014)

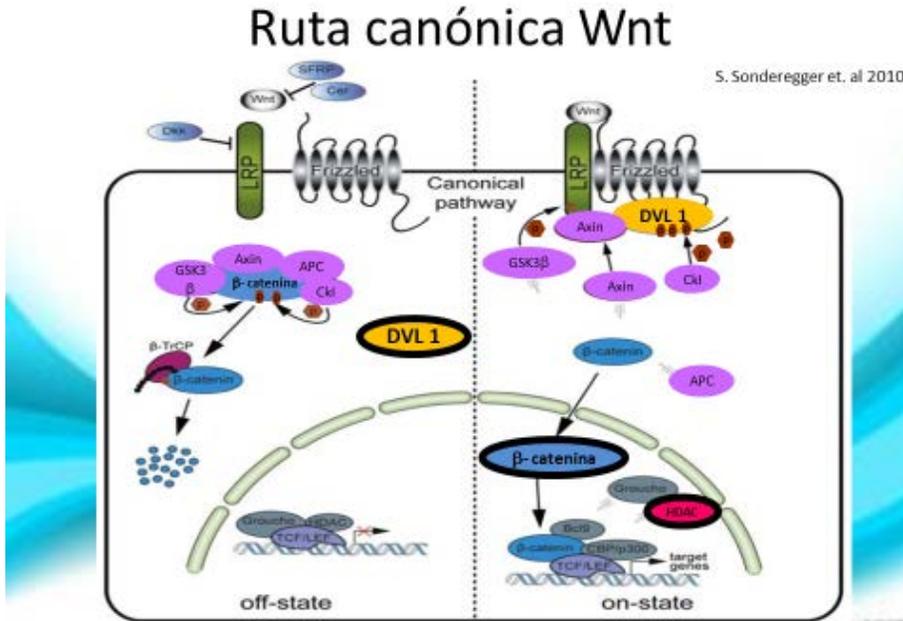
#### 4. VIA TRASDUCCIONAL WNT

Las vías de señalización Wnt son señales biológicas que regulan el desarrollo embrionario y otros procesos biológicos clave, su activación está mediada a través de la unión de un ligando Wnt a una familia de receptores (Frizzled), que transmite la señal biológica a la proteína citoplasmática Dishevelled (DVL 1). Se han descrito en células embrionarias y son de vital importancia durante el desarrollo y la enfermedad durante la edad adulta.

Se han identificado dos rutas de la vía trasduccional Wnt, la Vía Wnt canónica (dependiente de  $\beta$  – catenina) y vía Wnt no canónica.

4.1. VIA TRASDUCCIONAL WNT CANÓNICA

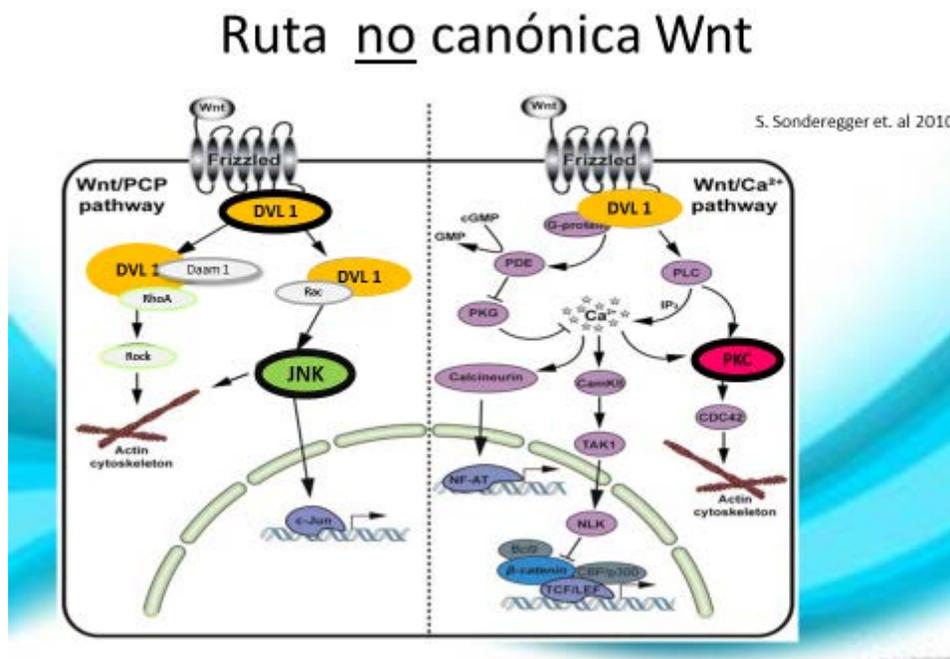
- a) Vía canónica: que actúa a través de  $\beta$ -catenina, es específica para algunos tipos celulares; controla la proliferación y apoptosis según el contexto de desarrollo



**Figura 6.** Esquema de la Ruta canónica Wnt, dependiente de  $\beta$  – catenina.  $\beta$  – catenina se encuentra encapsulada por un complejo de proteínas que impiden que se introduzca en el núcleo y se de la transcripción génica. Cuando un estímulo activa la vía,  $\beta$  – catenina es liberada por el coplejo de proteínas migra al núcleo e inicia la transcripción génica. (S. Soderengger et. al. 2010)

4.2. VIA TRASDUCCIONAL WNT NO CANÓNICA

- b) Vía no canónica (independientes de catenina): a través de JNK interviene en procesos de polaridad celular, del tejido y movimientos celulares y Wnt/Ca<sup>2+</sup>, su papel es el de ayudar a regular la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico, para controlar los niveles de calcio intracelular (Grigoryan T).



**Figura 7.** Ruta no Canónica Wnt. (S. Soderengger et. al. 2010)

La interacción renina y prorenina con el receptor PRR produce la activación de vías de señalización independientes de Angiotensina II (Nguyen 2006). Inducen la fosforilación de residuos de tirosina serina del extremo C – terminal de las cinasas reguladas por señales extracelulares ERK 1 y 2 implicadas en hipertrofia y proliferación celular (Nguyen et. al.



2002), y aumentan la concentración de  $TGF\beta 1$  que a su vez implica la activación del inhibidor tipo 1 del activador plasminógeno (PAI – 1) con propiedades profibróticas y protrombóticas así como componentes de la matriz extracelular (colágeno tipo 1, fibronectina) (Shefe et al 2006). Todos estos componentes descritos sugieren que la vía de señalización del PRR tiene relación con enzimas de la vía Wnt y algunos estudios mencionan que PRR tiene un papel conservado evolutivamente a nivel del receptor para la activación de vías de señalización de Wnt / Fz canónicos y no canónicos. (Kerstin Spirohn 2010).

**Justificación:**

La preclampsia es un problema de salud pública, ya que 23 de cada 100 defunciones de mujeres embarazadas son por causa de la preclampsia (OMS 2013), y en la actualidad no se conoce su fisiopatogenia. Dado que el sistema renina angiotensina está relacionado con los cambios de tensión arterial es de interés estudiar si su nuevo componente descrito PRR está o no implicado en la fisiopatogenia de la preclampsia. Por tanto en el actual estudio se pretende examinar tejido de aorta, corazón, riñón y placenta de ratas, para analizar la vía Wnt activada por el PRR durante el embarazo normal y complicado con preclampsia.

**Planteamiento del problema:**

Aunque diversas investigaciones han mostrado ya la existencia del PRR, se desconoce si la vía Wnt es activada por el PRR durante el embarazo normal y el embarazo complicado con preclampsia

**Hipótesis:**

El PRR y la vía Wnt aumentan durante el embarazo normotenso y disminuyen durante el embarazo complicado con preclampsia



**Objetivo General:**

Estudiar la expresión de proteínas de la vía transduccional Wnt asociada a PRR en ratas gestantes normotensas y en ratas con hipertensión arterial inducida por el embarazo (CASR)

**Objetivos Particulares:**

- a) Analizar las proteínas  $\beta$  - catenina, JNK, DVL – 1, HDAC, PKC  $\alpha$  de la vía transduccional Wnt en aorta, corazón, riñón y de ratas gestantes normotensas
- b) Analizar la proteína  $\beta$  - catenina, JNK, DVL – 1, HDAC, PKC  $\alpha$  de la vía transduccional Wnt en aorta, corazón, riñón y placenta de rata con HT inducida por el embarazo (CASR)



### **Material y Metodología:**

El manejo de los animales se realizó apegado a las normas éticas en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y cumplen con los requerimientos que en la materia determinan la **NOM – 062 – SO – 1999 ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO**, SAGARPA Y LA **GUIA PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO**, National Research Council.

Se usaron ratas de la cepa Wistar hembra de 250 gr.  $\pm$  20 gr, en condiciones normales de luz/oscuridad, con libre acceso de agua y alimento ((Rodent Laboratory Chow 5001), divididas en 3 grupos experimentales de una N de 6 animales cada uno.

### **GRUPOS EXPERIMENTALES:**

1. Preclampsia (Embarazadas con Coartación Aórtica Subrenal) – (n = 6)
2. No E SHAM (No embarazadas con cirugía simulada) – (n = 6)
3. E SHAM (Embarazadas con cirugía simulada) – (n = 6)

Una vez validado el modelo de CASR y formados los grupos experimentales se extrajo tejido vascular aórtico, cardiaco, renal y placentario para determinar la expresión proteica de las proteínas  $\beta$  – catenina, DVL – 1, HDAC, PKC  $\alpha$ , JNK mediante la técnica de inmunoblot.



## 1. MODELO CASR:

### **Material:**

+ Éter etílico

+ Cámara de anestesia

+ Yodo

+ Estuche de disección

+ Cloruro de Benzalconio

+ Aguja calibre 26

+ seda negra 000

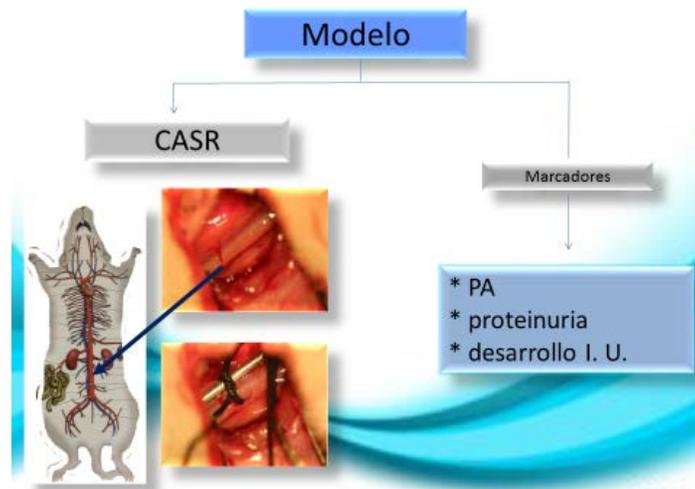
+ catgut absorbible 000

Debido a que nuestro modelo experimental se basó en la reproducción de los parámetros característicos de la preclampsia, particularmente la elevación de la presión arterial sistémica, el uso de anestésicos como el Pentobarbital se encuentra contraindicado, ya que esto alteraría los niveles de presión sanguínea en nuestro modelo experimental, además de que estos anestésicos poseen efectos teratogénicos. Por lo anterior se realizó la anestesia para la cirugía y el sacrificio para la extracción de tejidos con éter.

Por lo tanto el investigador que realizó la cirugía portó gafas, cubrebocas, guantes y bata para realizar el procedimiento quirúrgico. Y debido al uso y manejo del éter y tejidos biológicos, el

personal que se encontraba dentro del laboratorio durante la cirugía también uso bata y cubrebocas, además se usó un extractor ambiental (PAYNE).

Bajo anestesia con éter etílico (J. T. Baker 2000 – 03) inhalado, los animales se sometieron a la cirugía de Coartación Aórtica Subrenal, se afeitaron, y previa asepsia se realizó una incisión de 2 cm en la línea media abdominal aproximadamente 1 cm por debajo del apéndice xifoides, una vez localizada y disecada la aorta abdominal por debajo de la bifurcación de las arterias renales, se anudó con hilo de seda calibre 000 y ayudados con una aguja de acero calibre 26 angulada a 45 ° de manera distal reduciendo aproximadamente en 60 % del flujo sanguíneo de la aorta a partir de la anudación, se retiró la aguja y se cerró la pared abdominal con nylon 000. Una vez hecha la cirugía se colocaron dos ratas por jaula durante el periodo de recuperación que será de 15 días para cada animal) después de la recuperación se colocaron dos ratas por un macho de  $\pm 300$  gr en una jaula (durante 5 días de exposición) para el apareamiento.



**Figura 8.** Modelo de Coartación Aórtica Subrenal. Anudación de la porción subrenal aórtica, reduciendo en un 40 % el flujo sanguíneo.



El embarazo fue confirmado al final de la 3ª semana de gestación (día 20 – 21) mediante la observación de las crías en útero durante la remoción de los tejidos. Los animales se sacrificaron en el día 19 de la semana 3 para la obtención de muestras de aorta, corazón, riñón y placentas a los que se les realizó la técnica de Inmuno blot.

Para la validación del modelo se midieron los siguientes parámetros: presión arterial, cantidad de proteína en orina determinada por el método de Lowry, peso y la talla de las crías.

### **1.1 Determinación de la presión arterial:**

#### **Materiales**

+ Cepos

+ Equipo para medir presión arterial (LE 5001)

#### **Método**

La medición de la presión arterial sistólica y diastólica se realizó mediante el método pletismográfico no invasivo. Se tomó la presión de cada una de las ratas a temperatura constante, libre de ruido y con un previo entrenamiento de cada rata. Se expuso la cola de los animales al calor durante 2 minutos y posteriormente se colocó a la rata en un cepo dejando libre la extremidad caudal del animal, la cual se introdujo en un manguito de látex acoplado distalmente a un sensor óptico que registra el pulso en la arteria caudal. Se tomó la lectura del equipo de medición de presión (LE 5001 LSI) y se registró en la bitácora.



## 1.2 Determinación de proteína en orina

### Material:

+ Cajas metabólicas

+ Tubos eppendorf de 2 ml

+ Tubos de precipitado

+ Micropipetas de 1000  $\mu$ L, 100  $\mu$ L y 200  $\mu$ L

+ Puntas para micropipeta

+ Solución Standard de albumina bovina (1 mg/ml)

+ Muestra problema, de concentración desconocida

+ Reactivo de Lowry, compuesto por tres soluciones que se mezclan en el momento de usarse:

A: Carbonato sódico al 2% en NaOH 0.1 M

B: Sulfato cúprico al 1%

C: Tartrato sódico-potásico al 2%

+ Reactivo de fenoles de Folin-Ciocalteu.

+ Espectrofotómetro



Una vez formados los grupos de estudio, se colocaron a las ratas no embarazadas, embarazadas SHAM y no embarazadas SHAM en una jaula metabólica por grupos de estudio y de manera individual, desechando la primer orina de 24 hrs y recolectando la orina de las 24hrs siguientes, posteriormente cuantificaron las proteínas por el método de Lowry.

a) Método de Lowry

Para la determinación de proteínas, se utilizó el método de Lowry (1951). Para lo cual se construyó una curva de calibración empleando albúmina serica bovina de  $0.5\mu\text{g/mL}$  y se realizó una curva estándar de concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y  $50\mu\text{g/mL}$  con un volumen final de  $200\mu\text{L}$ . por otra parte, se realizaron diluciones de (1:100) de las muestras problema. Posteriormente se preparó la solución C a partir de la solución A +B y la solución C (Solución de Folin 1N).

A cada una de las soluciones se les agrego 1 mL de la solución C y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente y  $100\mu\text{L}$  de la solución C dejando incubar 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se tomó la lectura de la curva patrón y muestras problema, empleando un espectrofotómetro de luz visible a  $750\text{nm}$ . Con los datos obtenidos, se determinó la concentración de proteínas en las muestras problema.



### **1.3 Determinación del peso y la talla de las crías**

#### ***Material***

- \* Regla
  
- \* Balanza analítica digital (HM2002, AND)

#### **Método**

Al término de cada una de las tres semanas de embarazo, se sacrificaron los animales de cada grupo, se sacrificaron los fetos y posteriormente se obtuvieron los tejidos a estudiar, enseguida se registró el peso de cada cría así como el número y tamaño de las mismas. Se recolectaron los datos obtenidos para posteriormente ser analizados y graficados con ayuda de un programa informático estadístico (Graph pad).

## **2. INMUNO BLOT:**

Es una técnica utilizada para detectar proteínas específicas en células o tejidos lisados o extractos. En este trabajo obtuvimos los tejidos de aorta (abdominal y torácica), corazón (aurículas, ventrículo derecho y ventrículo izquierdo), riñón (corteza, médula, papila) y placentas de las ratas.



## 2.1 Extracción de las Muestras

### Material

\* Cámara de anestesia (deseCADador)

\* Éter etílico

\* Centrifuga SORVALL

\* Homogenizado de tejidos BIOSPEC

### Método

Los animales fueron sacrificados con éter en un desecador, para poder obtener los tejidos de aorta, corazón, riñón y placenta, los tejidos se disecaron y fueron homogenizados en tris 10mM, con un inhibidor de proteasas; se centrifugaron y se formaron alícuotas con el sobrenadante. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas en cada muestra, por el método de Lowry descrito anteriormente.

El manejo de los cadáveres y desechos derivados (RPBI) se manejarán de acuerdo a la **NOM 087 ECOL – SSA1 – 2002, protección ambiental – salud ambiental – residuos peligrosos biológico infecciosos - clasificación y especificaciones de manejo**. Los residuos patológicos, humanos o de animales (que no estén en formol) se conservarán a una temperatura no mayor de 4° C, en el almacén temporal de la Escuela Superior de medicina.



## 2.2 Electroforesis

### Material

- \* Tubos eppendorf
- \* Micropipeta de 50 a 200  $\mu$ L
- \* Puntas para micropipeta
- \* Baño maría
- \* Buffer de carga
- \*  $\beta$ -mercaptoetanol
- \* vortex
- \* Marcador de peso molecular PageRuler
- \* Equipo de electroforesis BioRad
- \* Muestras de tejido

### Método

Una vez extraídos los tejidos se separan en alícuotas de 100 $\mu$ L del homogenizado de cada tejido, a cada alícuota se le agregara 11  $\mu$ L de una solución desnaturizante compuesta por buffer de carga y de  $\beta$ -mercaptoetanol (agente reductor), se mezclaron por 1 minuto con ayuda de un vortex y se hirvieron (a 100°C durante 10min) para desnaturizar las proteínas.



Se prepararon geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% (8% para la proteína HDAC), en el primer pozo de cada gel se colocaron 5  $\mu$ L del marcador de peso molecular (Fermentas, PageRuler) y en los otros pozos se sembraron cantidades de proteínas constante de 100 g de tejido de aorta (aorta torácica, aorta abdominal), corazón (aurículas, ventrículo derecho, ventrículo izquierdo), riñón (corteza, médula, papila) y placenta (cara fetal, cara materna) de los diferentes grupos de estudio respectivamente. Posteriormente se realizó la separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular y a su carga por el método en una cámara de electroforesis (Bio Rad) a 88 volts durante 2 horas 30 minutos.

### **2.3 *Trasferencia***

#### ***Material***

- \* Equipo de transferencia en semiseco (Trans-blot SD Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad)
- \* Papel Filtro
- \* Membrana de PDVF (MILLIPORE Immobilon-P)
- \* Metanol
- \* Buffer de Transferencia

#### **Método**

Se cortaron membranas de PDVF (MILLIPORE Immobilon-P) que fueron colocadas en metanol absoluto por 30min a 4°C y después se sumergieron en un buffer de transferencia 1x, junto con los papeles filtro y se conservaron en frío (4°C) hasta el momento de la transferencia.



Una vez que las proteínas fueron separadas por electroforesis en función de su peso molecular y su carga, fueron transferidas a la membrana de PDVF con ayuda un equipo de transferencia en semiseco (Trans-blot SD Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad) conectado durante 90 minutos a 20V.

## 2.4 Bloqueo de las membranas

Una vez realizada la transferencia, las membranas se bloquearon con una solución al 5% de leche baja en grasa (svelty) y TBST, por un periodo de 2 horas a temperatura ambiente y con agitación constante.

## 2.5 Incubación con anticuerpos

### Material

\* Agitador Barnstead

Anticuerpos primarios:

\* Anticuerpo goat policlonal  $\beta$  – catenina Santa Cruz Biotechnology

\* Anticuerpo mouse monoclonal DVL – 1 Santa Cruz Biotechnology

\* Anticuerpo rabbit policlonal HDAC4 Santa Cruz Biotechnology

\* Anticuerpo mouse monoclonal JNK - 1 Santa Cruz Biotechnology

\* Anticuerpo mouse monoclonal PKC  $\alpha$  Santa Cruz Biotechnology

\* Anticuerpo goat policlonal GAPDH Santa Cruz Biotechnology



Anticuerpos secundarios:

- \* Rabbit anti-Goat IgG(H+L) HRP, Invitrogen.
- \* Anticuerpo monoclonal Anti mouse (Santa Cruz Biotechnology)
- \* TBS Tween
- \* Leche baja en grasa (Svelty)

#### Método

Después del bloqueo de las membranas de cada uno de los diferentes tejidos, fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente ( $\beta$  - Catenina, DVL – 1, HDAC, JNK – 1, PKC  $\alpha$ , GAPDH; Santa Cruz Biotechnology) con las diluciones respectivas en TBSTween - leche 5%, dejando en agitación constante a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante 24 hrs. Al día siguiente se procedió a incubar por 2 horas a temperatura ambiente el anticuerpo secundario respectivo para las proteínas anteriormente descritas a temperatura ambiente y en agitación constante. Al término de la incubación con el anticuerpo secundario las membranas fueron nuevamente lavadas (durante 3 intervalos de 10 minutos) con TBST, cada lavado con agitación constante para realizar el revelado de las bandas de cada proteína.



Anticuerpo	Dilución Aortas	Dilución Corazón	Dilución Riñón	Dilución Placenta
<b>b - catenina</b>	1: 1500	1: 1500	1: 1500	1: 2000
<b>DVL - 1</b>	1: 1000	1: 1500	1: 1500	1: 2000
<b>HDAC4</b>	1:1500	1:1500	1: 1600	1:2000
<b>JNK - 1</b>	1: 1200	1: 1000	1: 1200	1: 2000
<b>PKC a</b>	1: 1500	1: 1500	1:1500	1: 2300
<b>GAPDH</b>	1: 1200	1: 1200	1: 1200	1: 1200

## 2.6 Reacción de Quimioluminiscencia

### Material

\* Sustrato quimioluminiscente (ECL Western Blotting Luminol Reagent Santa Cruz Biotechnology)

\* Películas

\* Casset

\* Solución reveladora (Kodak Professional)

\* Solución fijadora (Kodak Professional)



\* Escáner

\* Computadora con software Quantity one

#### Método

Las membranas se expusieron a un sustrato quimioluminiscente (ECL Western Blotting Luminol Reagent Santa Cruz Biotechnology) durante 1 minuto. Posteriormente las membranas fueron expuestas a una película Kodak dentro de un casset en intervalos de tiempo variado (dependiendo de cada proteína), las películas fueron sumergidas dentro de una solución reveladora y en seguida en una solución fijadora (Kodak Professional). Las bandas obtenidas se digitalizaron con ayuda de un escáner y se guardaron las imágenes (en formato Tiff) en una computadora. Posteriormente la intensidad de las bandas se determinó empleando un software de análisis desitométrico de imagen (Quantity one 1D Image Analysis Software; Bio-Rad) normalizando con la proteína GAPDH como control interno.

#### **2.7 Análisis Estadístico**

Se realizó la comparación de la expresión de cada proteína de estudio en los tejidos anteriormente descritos con una prueba de varianza (ANOVA) de una vía seguido de pruebas post-hoc Bonferroni para establecer diferencias significativas entre cada uno de los grupos.

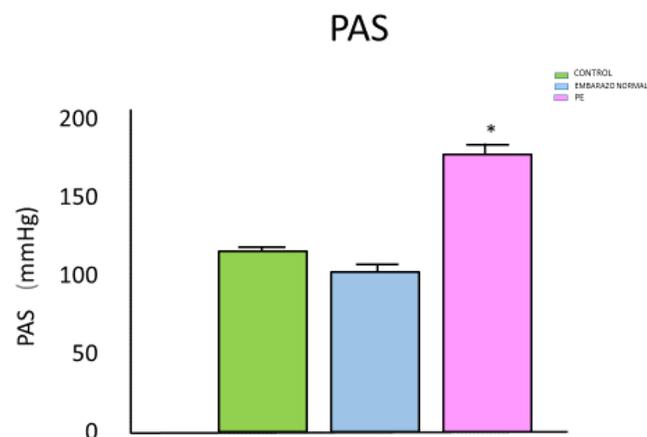
## Resultados:

### Resultados Modelo experimental

- **Medición de la Presión Arterial**

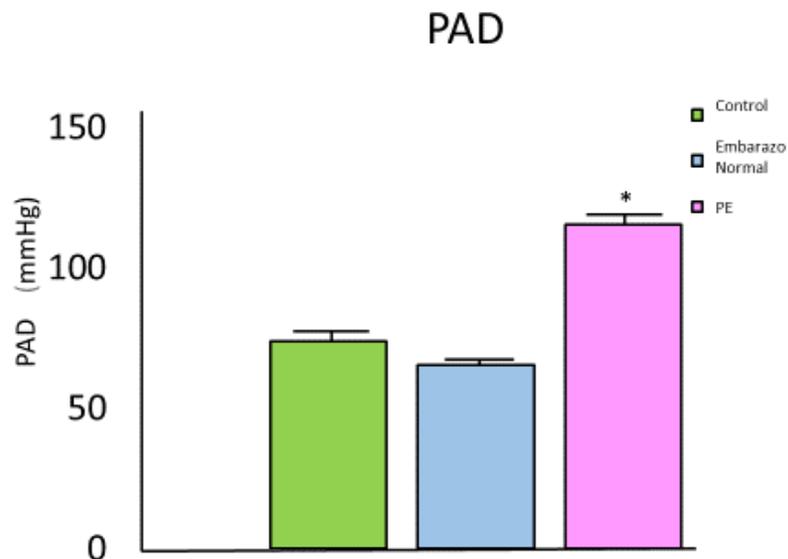
Se realizó la toma de presión arterial sistólica y diastólica por el método pletismográfico no invasivo (Tail cof), de los tres grupos experimentales formados (SHAM, EMBARAZADA SHAM y CASR), con la finalidad de determinar si el modelo de CASR produce los parámetros presentes en la preclampsia. La toma de la presión arterial se realizó en la tercera semana de gestación de las ratas preñadas.

En la **gráfica 1** se muestra en el eje de las ordenadas la medición de la PAS en mmHg contra los diferentes grupos de estudio en el eje de las abscisas, es posible observar que en el grupo control la presión arterial se mantuvo entre 110 y 120 mmHg, y una leve disminución de la presión en el grupo de embarazo sano comparado con el grupo control, mientras que existe un aumento significativo de la presión arterial sistólica en el grupo de ratas preclámpticas comparado con los grupos control.



**Grafica 1.** Medición de la Presión Arterial Sistólica (PAS) en mmHg por el método pletismográfico en los diferentes grupos de estudio (No E SHAM, E. SHAM, PE) cada grupo representa la media  $\pm$  error estándar de una n=6 experimentos p < 0.05 existe diferencia significativa (\*)

En la **gráfica 2.** Se muestra en el eje de las ordenadas la medición de la PAD medida en mmHg contra los diferentes grupos de estudio en el eje de las abscisas, se puede observar que en el grupo control la presión arterial se mantuvo entre 70 y 80 mmHg, y una leve disminución de la presión arterial en el grupo de embarazo sano comparado con el grupo control, mientras que existe un aumento significativo de la presión arterial diastólica en el grupo de ratas preclámpticas comparado con los grupos control.



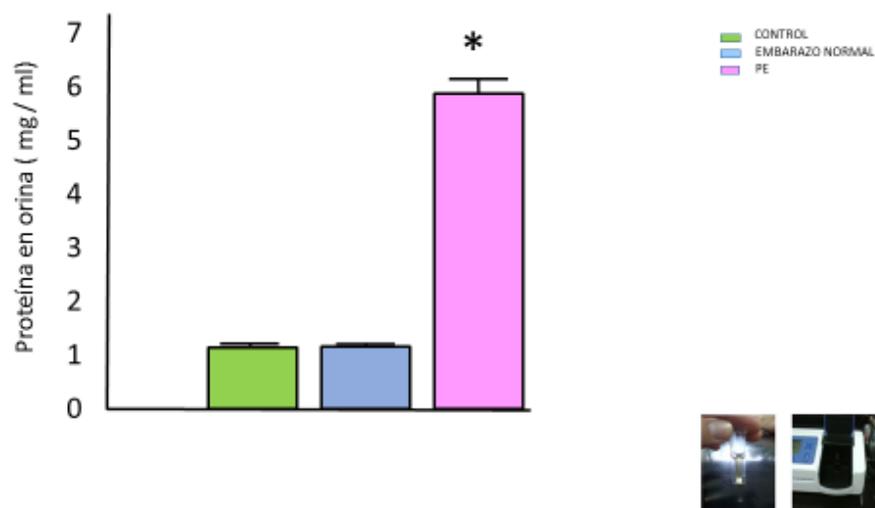
**Grafica 2.** Medición de la Presión Arterial Diastólica (PAD) en mmHg por el método pletismográfico en los diferentes grupos (No E. SHAM, E. SHAM, CASR), cada grupo representa la media  $\pm$  error estándar de una n=6 experimentos p < 0.05 existe diferencia significativa (\*).

- **Determinación de Proteínas en Orina**

Una vez formados los grupos experimentales, se colocó por separado a cada una de las ratas en una jaula metabólica, la orina de las primera 24hrs se desechó y se recolectó la orina de las 24 hrs siguientes; ya obtenidas las muestras de cada una de las ratas, se cuantificaron las proteínas por el método de Lowry.

En la **Grafica 3** Se muestran los resultados obtenidos al cuantificar las proteínas en la orina; se puede observar en el eje de las ordenadas la cantidad de proteínas en mg/ml, contra los grupos de experimentales en el eje de las abscisas, existe una excreción normal o fisiológica en los todos los grupos de estudio. Sin embargo, hay un aumento significativo en la excreción de proteínas en orina en el grupo de ratas con embarazo complicado por preclampsia comparado con sus grupos control.

## PROTEÍNA EN ORINA



**Grafica 3.** Excreción de proteínas en orina en los diferentes grupos (No E. SHAM, E. SHAM, CASR) cada grupo representa la media  $\pm$  error estándar de una n=6 experimentos  $p < 0.05$  existe diferencia significativa (\*).

- **Determinación del Crecimiento Intrauterino**

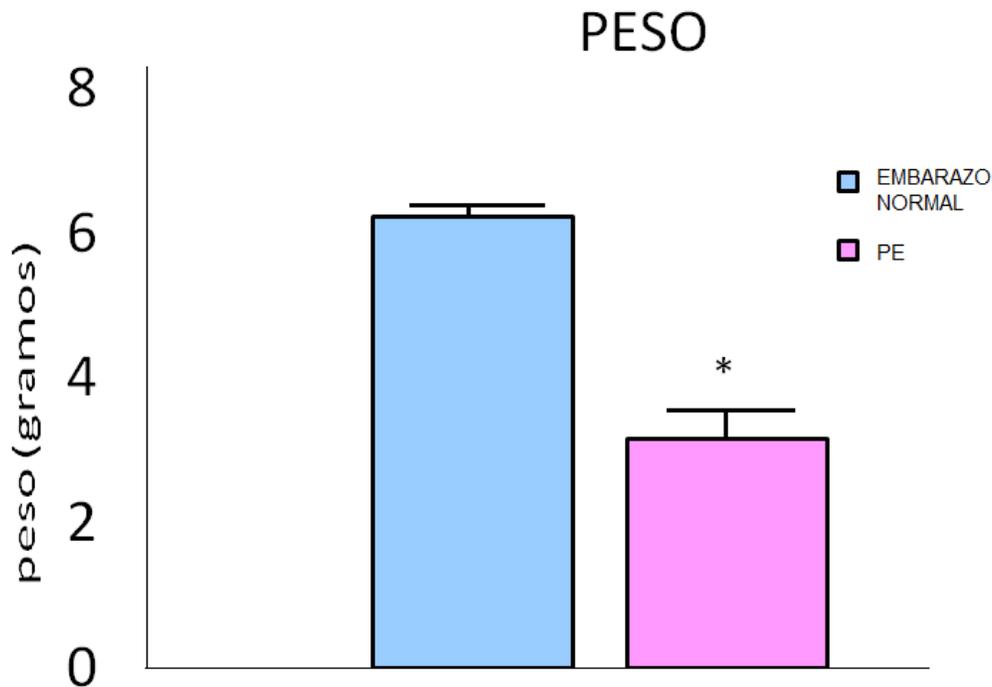
Otro parámetro que se tomó en cuenta para validar el modelo de CASR fue la restricción en el crecimiento intrauterino, lo cual se determinó en base al número, peso y tallas de las crías del grupo de ratas con embarazo normal (E. SHAM) y del grupo de ratas con embarazo complicado con preclampsia (E. CASR).

La **gráfica 4** Muestra un número de crías aproximadamente de entre doce y trece ratas del grupo de las madres con embarazo normal (E. SHAM) y un número promedio de crías disminuido en el grupo de embarazo complicado con preclampsia comparado con el grupo anterior.



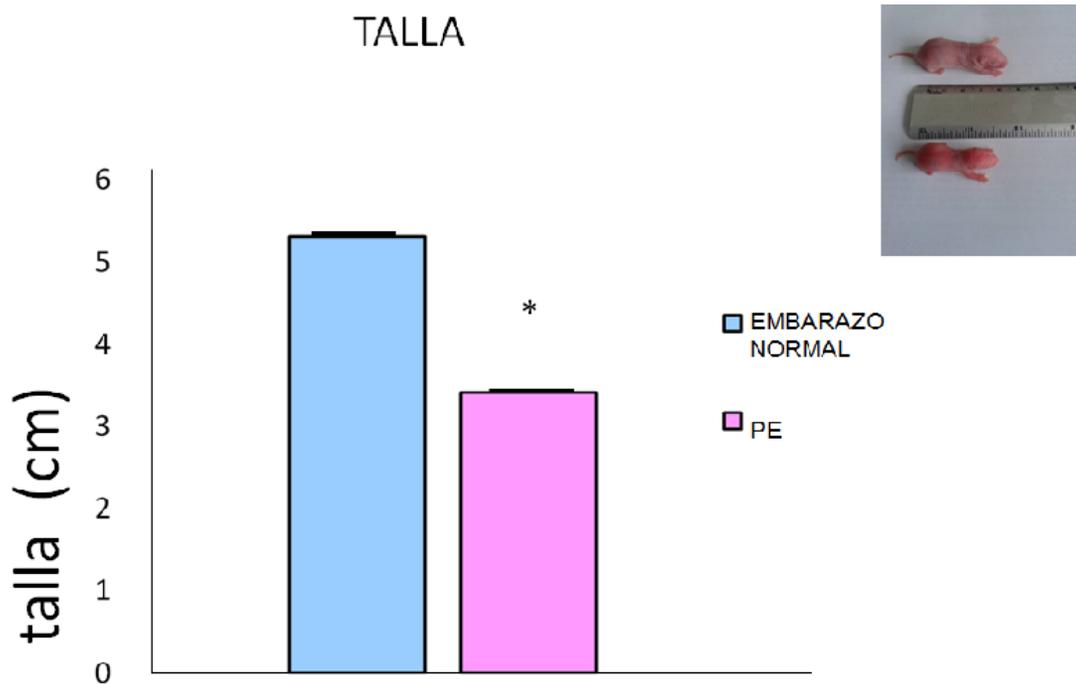
**Gráfica 4.** Esquematiza el número de crías de cada grupo de embarazo (E. SHAM, E. CASR), cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de una  $n=6$  experimentos  $p < 0.05$  hay diferencia significativa (\*)

La **gráfica 5** Representa el peso de las crías en el eje de las ordenadas registrada en gramos, contra los grupos de embarazo normal y de un embarazo con preclampsia, donde se observa que el grupo de embarazo normal tuvo crías cuyo peso se encontraba alrededor de los 600 garmos, y una disminución significativa del peso de las crías en el grupo de embarazo con preclampsia.



**Gráfica 5.** Muestra el peso de las crías, en la 3er semana de embarazo de los grupos E. SHAM y CASR, cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de una n=6 experimentos  $p < 0.05$  hay diferencia significativa (\*).

La **gráfica 6** Representa en el eje de las ordenadas, la talla de las crías medida en (cm) de un grupo de ratas con embarazo normal y un grupo de ratas preclámpticas (eje de las abscisas), y como se puede observar existe un tamaño promedio de las crías de las embarazadas normoevolutivas alrededor de 5.4 cm, y una disminución del tamaño de las crías del grupo de ratas preclámpticas en relación al grupo de embarazo normal.



**Gráfica 6** Muestra la talla de las crías en cm, de la 3er semana de embarazo de los grupos E. SHAM y CASR, cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de una n=6 experimentos  $p < 0.05$  hay diferencia significativa (\*).

### **Resultados Inmunoblot:**

#### **Vía Wnt Canónica:**

Se evaluó la expresión proteica de  $\beta$  - catenina y DVL - 1, HDAC4 normalizadas con GAPDH, en aorta (abdominal, torácica), corazón (aurículas, ventrículo derecho, ventrículo izquierdo), riñón (corteza, médula, papila), placenta (cara fetal, cara materna).

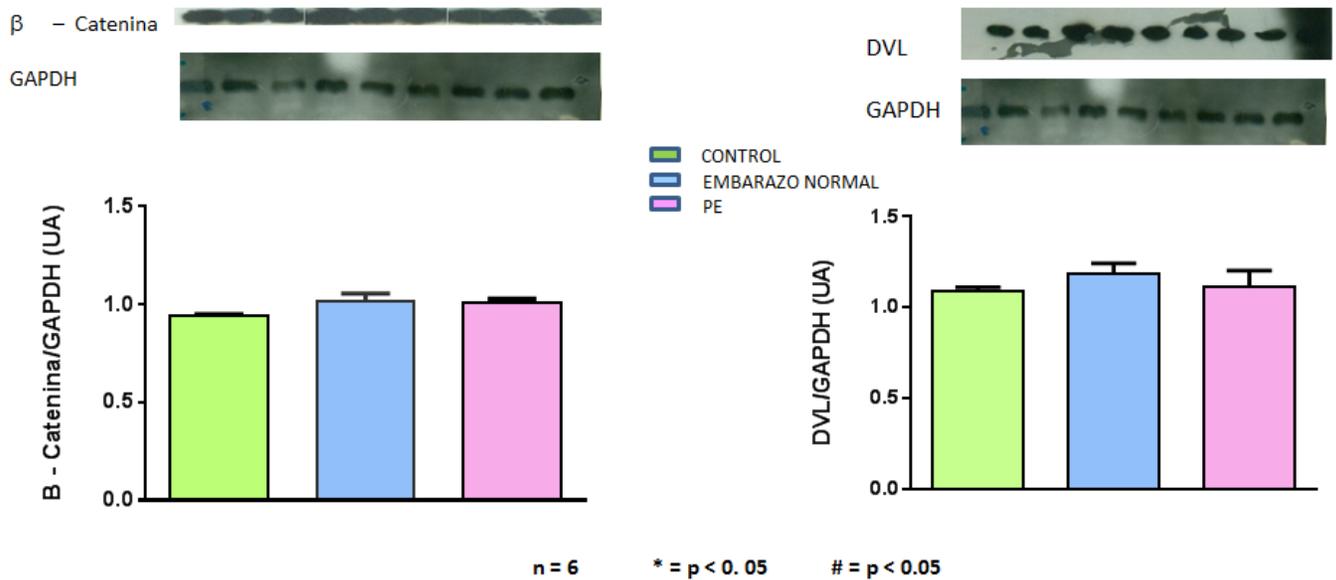
Se determinó la expresión proteica de  $\beta$  - catenina y DVL - 1, HDAC4 en aorta, corazón, riñón y placenta de los grupos experimentales de ratas No E. SHAM, E. SHAM, CASR respectivamente.

La proteína  $\beta$  - catenina se expresó de manera basal en todos los tejidos estudiados de los grupos anteriormente descritos, existiendo un aumento significativo de la expresión de la proteína en ventrículo derecho, aorta torácica y médula renal del grupo de ratas preclámpticas.

La proteína DVL se expresó de manera basal en todos los tejidos estudiados de los grupos anteriormente descritos, existiendo un aumento significativo de la expresión de la proteína en ventrículo derecho, aorta torácica y médula renal del grupo de ratas preclámpticas y una disminución significativa de la expresión de DVL en tejido de placenta cara fetal, en el grupo de ratas preclámpticas.

La proteína HDAC4 se expresó de manera basal en todos los tejidos estudiados, mostrando un aumento significativo de su expresión en ventrículo derecho, aorta torácica y médula renal en el grupo de ratas preclámpticas.

**Aorta Abdominal**

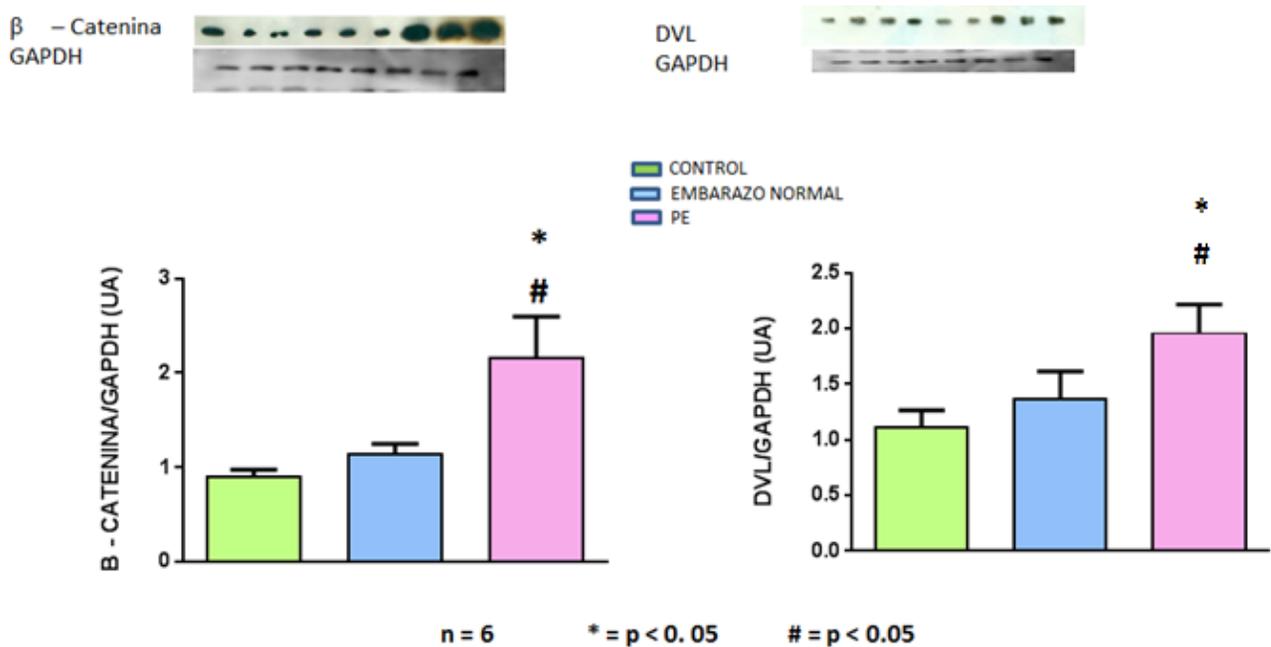


**Gráfica 7.** Densidad relativa de la proteína  $\beta$  - catenina y DVL en Aorta Abdominal en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 7 del lado izquierdo, se observa un experimento típico de  $\beta$  – catenina y su control interno GAPDH en tejido de Aorta Abdominal, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de  $\beta$  – catenina normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1, el grupo de embarazo normal y el grupo con PE no muestra cambios significativos de la expresión de la proteína  $\beta$  – catenina comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de DVL – 1 y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de DVL - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias y observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.2 aproximadamente, el grupo de embarazo normal y el grupo con PE no muestran cambios significativos en la expresión de la DVL - 1 comparados con el grupo control.

### Aorta Torácica

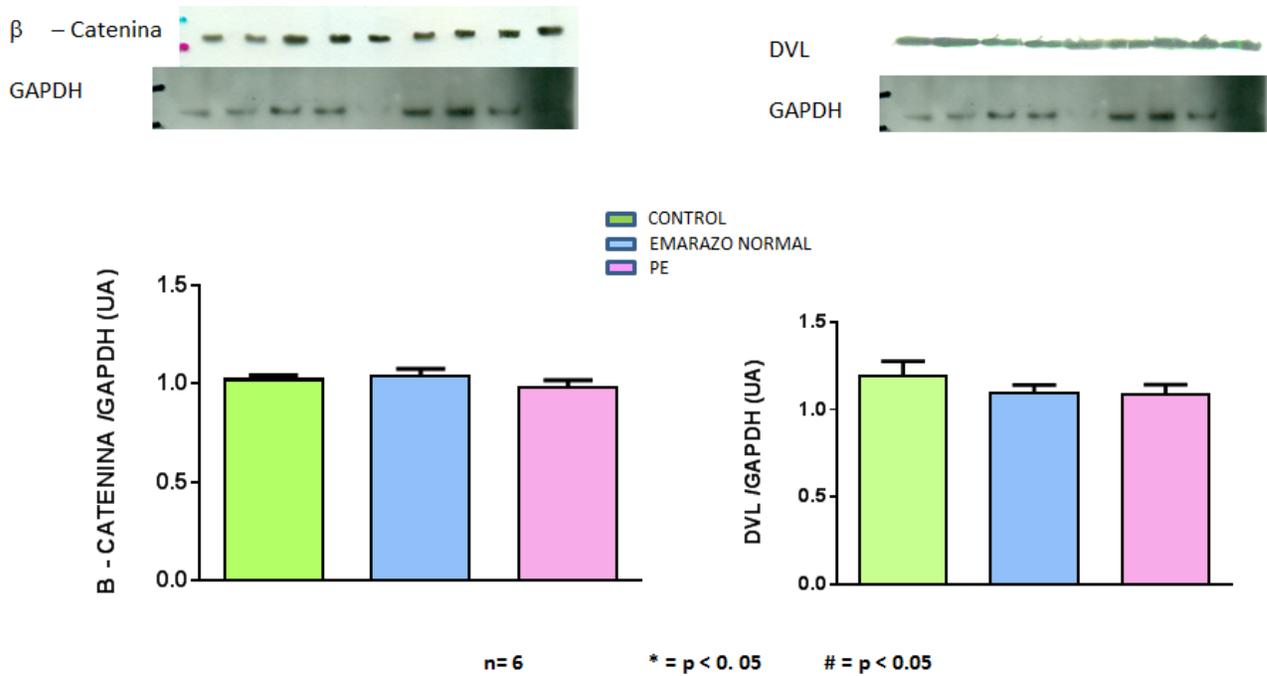


**Gráfica 8.** Densidad relativa de la proteína  $\beta$  - catenina y DVL en Aorta Torácica en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*) p < 0.05

En la gráfica 8. Muestra del lado izquierdo un experimento típico de  $\beta$  - catenina y su control interno GAPDH en tejido de Aorta Torácica, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de  $\beta$  - catenina normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 0.9 unidades arbitrarias aproximadamente, y el grupo de embarazo normal parece incrementarse ligeramente mientras que el grupo con PE incrementa de forma significativa la expresión de la proteína  $\beta$  - catenina comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de DVL - 1 y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de DVL - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.2 aproximadamente, el grupo de embarazo normal y el grupo aumenta ligeramente y el grupo con PE aumenta de forma significativa la expresión de la DVL - 1 comparados con el grupo control.

**Aurículas**

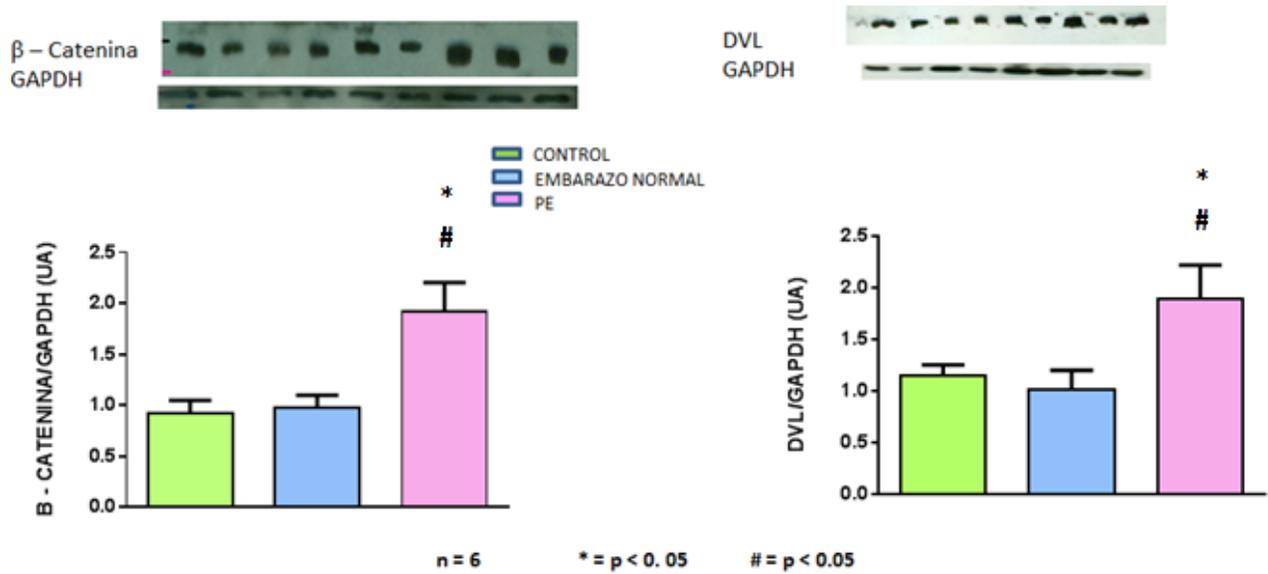


**Gráfica 9.** Densidad relativa de la proteína β - catenina y DVL en Aurículas en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*) p < 0.05

En la gráfica 9 del lado izquierdo, se observa un experimento típico de β – catenina y su control interno GAPDH en tejido de Aurículas, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de β – catenina normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1, el grupo de embarazo normal y el grupo con PE no muestra cambios significativos de la expresión de la proteína β – catenina comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de DVL – 1 y su control interno GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de DVL - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, podemos observar que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.5 aproximadamente, el grupo de embarazo normal y el grupo con PE muestran una discreta tendencia a disminuir sin embargo no presentan cambios significativos en la expresión de la DVL - 1 comparados con el grupo control.

**Ventrículo Derecho**

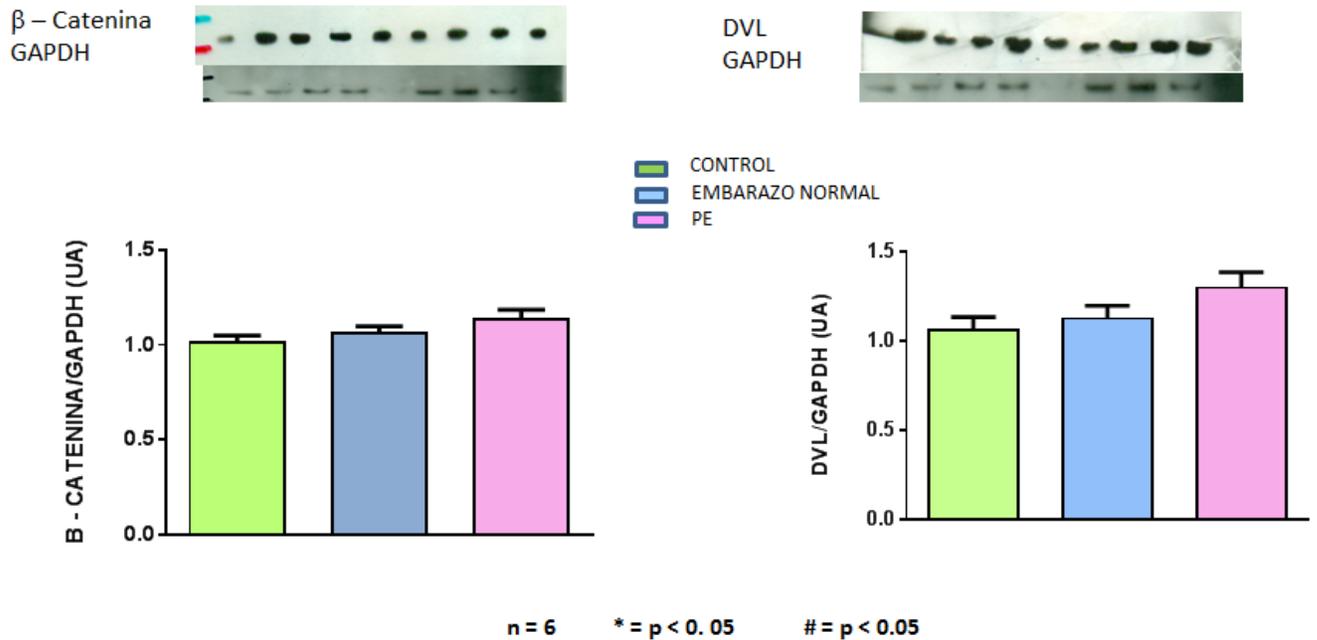


**Gráfica 10.** Densidad relativa de la proteína β - catenina y DVL en Ventrículo Derecho en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*) p< 0.05

En la gráfica 10. Se muestra del lado izquierdo un experimento típico de β – catenina y su control interno GAPDH en tejido de Ventrículo Derecho, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de β – catenina normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 0.9 unidades arbitrarias aproximadamente, y el grupo de embarazo normal parece incrementarse ligeramente mientras que el grupo con PE incrementa de forma significativa la expresión de la proteína β – catenina comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de DVL – 1 y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de DVL - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.0 aproximadamente, en el grupo de embarazo normal parece disminuir ligeramente la expresión de DVL - 1 pero no de forma significativa y en el grupo con PE si existe aumento significativo de la expresión de la DVL - 1 comparados con el grupo control.

### Ventrículo Izquierdo

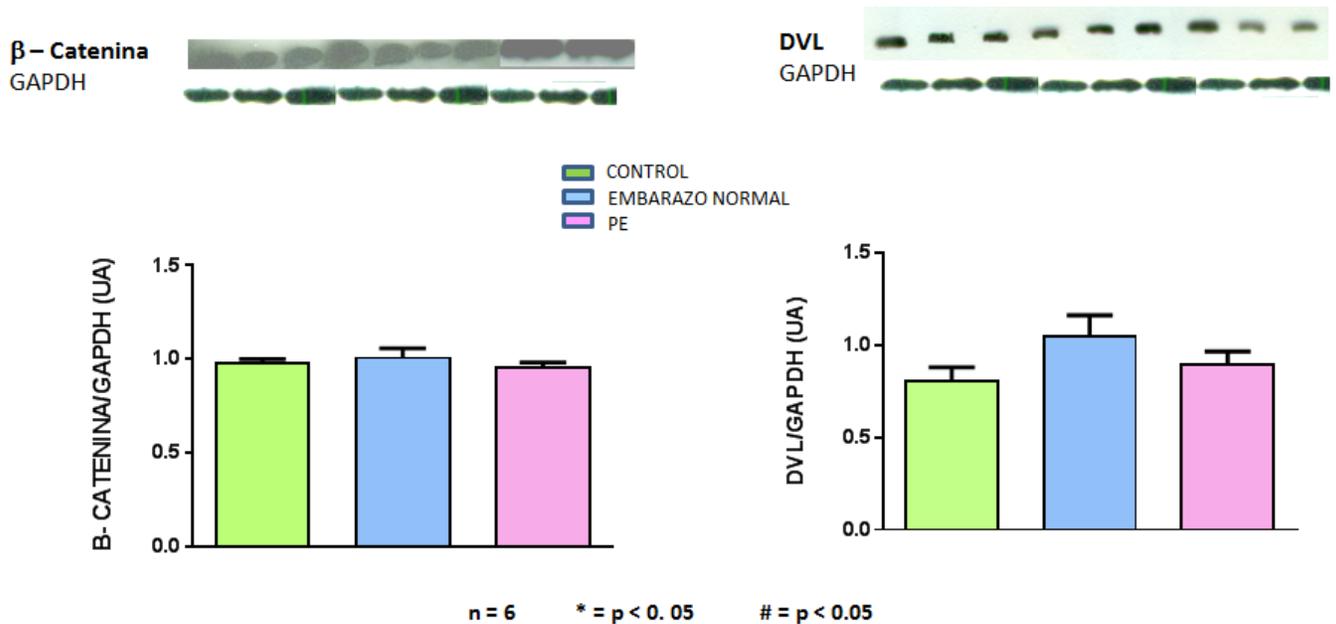


**Gráfica 11.** Densidad relativa de la proteína  $\beta$  - catenina y DVL en Ventrículo Izquierdo en los grupos experimentales No E SHAM, E. SHAM, CASR. (\*) p < 0.05

La gráfica 11. Muestra del lado izquierdo un experimento típico de  $\beta$  – catenina y su control interno GAPDH en tejido de Ventrículo Izquierdo, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de  $\beta$  – catenina normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.0 UA y tanto en el grupo de embarazo normal como en el grupo de PE parece no modificarse la expresión de la proteína  $\beta$  – catenina comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de DVL – 1 y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de DVL - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.0 UA aproximadamente, en el grupo de embarazo normal y en el grupo de PE y el grupo con PE no existe cambio significativo de la expresión de la DVL - 1 comparados con el grupo control.

**Corteza Renal**

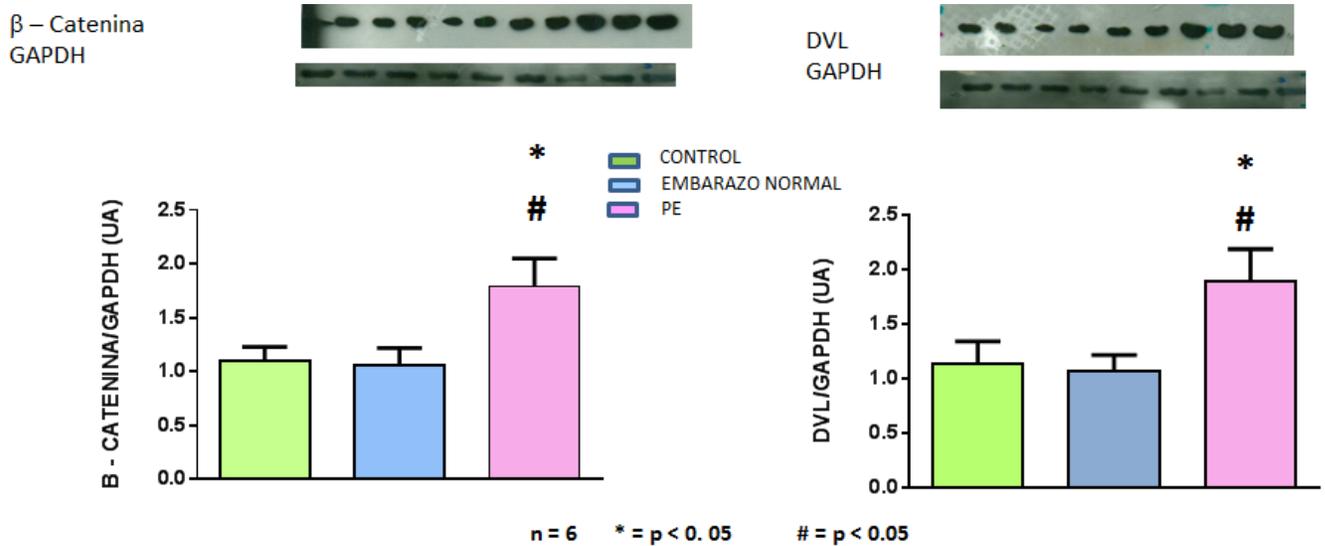


**Gráfica 12.** Densidad relativa de la proteína  $\beta$  - catenina y DVL en Corteza Renal en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*) p < 0.05

En la gráfica 12. Se muestra del lado izquierdo un experimento típico de  $\beta$  – catenina y su control interno GAPDH en tejido de Corteza Renal, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de  $\beta$  – catenina normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.0 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo normal y embarazo con PE parece no modificar la expresión de la proteína  $\beta$  – catenina comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de DVL – 1 y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de DVL - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 0.8 UA aproximadamente, en el grupo de embarazo normal parece incrementarse la expresión de DVL – 1 y en el grupo de embarazo con PE parece disminuir ligeramente, sin embargo no de forma significativa.

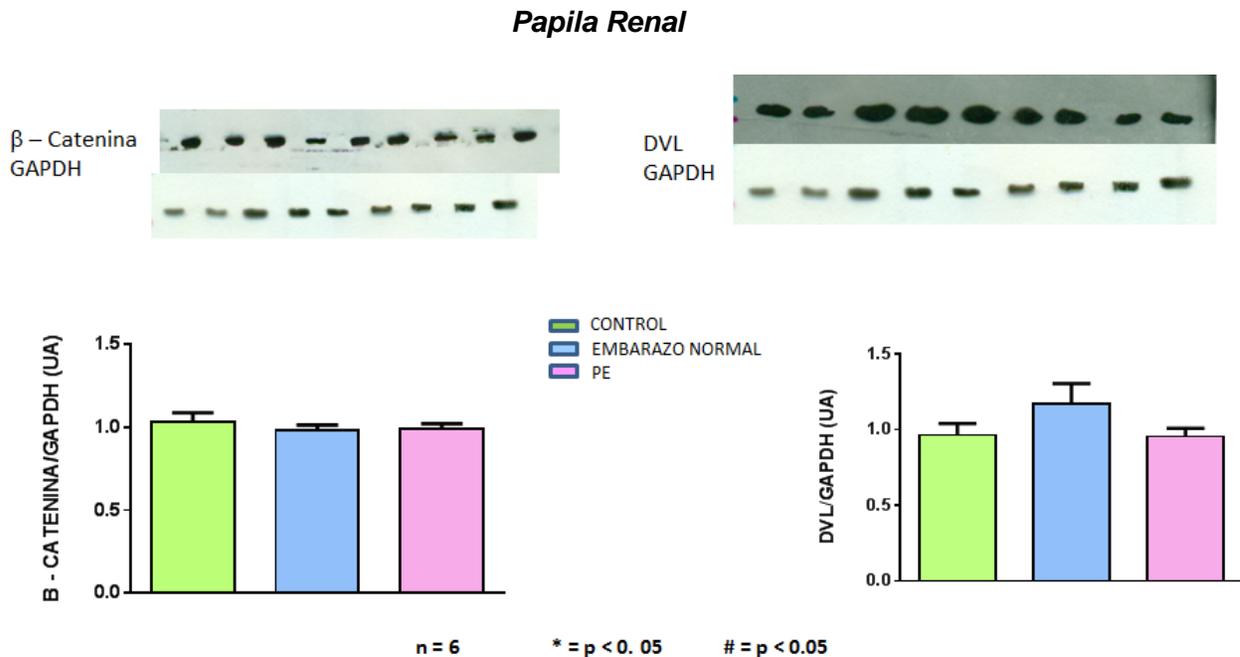
### Médula Renal



**Gráfica 13.** Densidad relativa de la proteína  $\beta$  - catenina y DVL en Médula Renal en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 13. Muestra del lado izquierdo un experimento típico de  $\beta$  – catenina y su control interno GAPDH en tejido de Médula Renal, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de  $\beta$  – catenina normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.0 UA aproximadamente, y el grupo de embarazo normal parece no modificar la expresión de dicha proteína mientras que el grupo con PE incrementa de forma significativa la expresión de la proteína  $\beta$  – catenina comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de DVL – 1 y GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de DVL - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.0 aproximadamente, el grupo de embarazo normal no modifica la expresión de la proteína mientras que el grupo con PE aumenta de forma significativa la expresión de la DVL - 1 comparados con el grupo control.

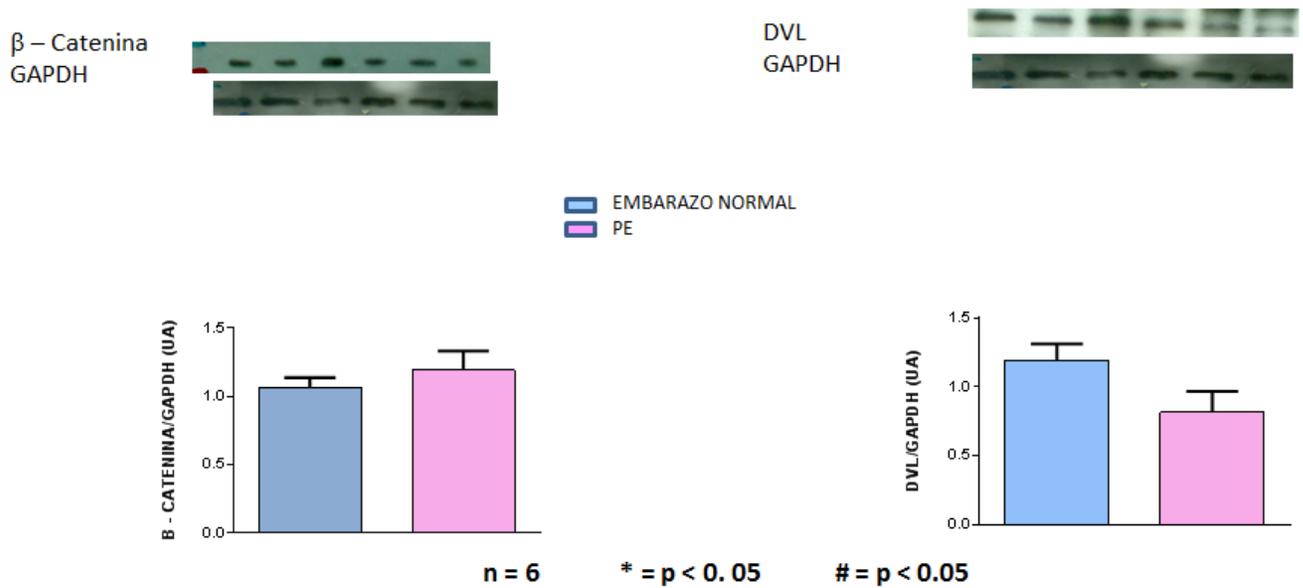


**Gráfica 14.** Densidad relativa de la proteína  $\beta$  - catenina y DVL en Papila Renal en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 14 del lado izquierdo, se observa un experimento típico de  $\beta$  - catenina y su control interno GAPDH en tejido de Papila Renal, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de  $\beta$  - catenina normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1, el grupo de embarazo normal y el grupo con PE no muestra cambios significativos de la expresión de la proteína  $\beta$  - catenina comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de DVL - 1 y su control interno GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de DVL - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, podemos observar que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 0.9 aproximadamente, el grupo de embarazo normal parece aumentar la expresión de la proteína DVL - 1 y el grupo con PE muestra una discreta tendencia a disminuir sin embargo no presentan cambios significativos en la expresión de la DVL - 1 comparados con su grupo control.

**Placenta Cara Materna**

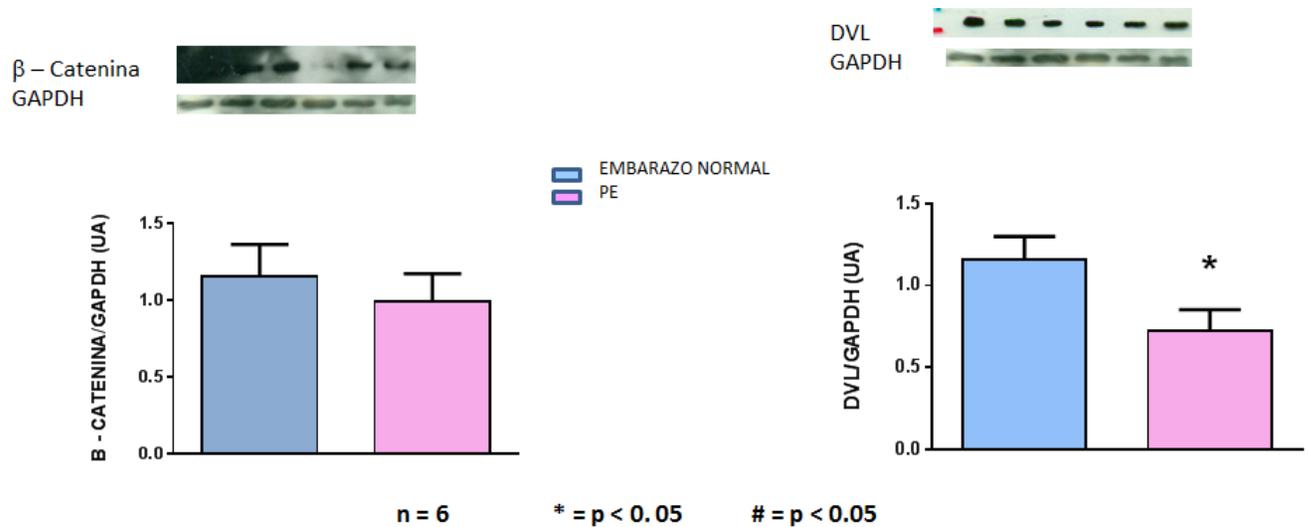


**Gráfica 15.** Densidad relativa de la proteína  $\beta$  - catenina y DVL en Placenta cara materna de los grupos experimentales E. SHAM y CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 15 del lado izquierdo, se observa un experimento típico de  $\beta$  – catenina y su control interno GAPDH en tejido de placenta cara materna, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de  $\beta$  – catenina normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.1 UA aproximadamente, el grupo de embarazo complicado con PE aunque parece aumentar la expresión de la proteína  $\beta$  – catenina, no muestra cambios significativos comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de DVL – 1 y su control interno GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de DVL - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, podemos observar que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.2 aproximadamente, el grupo de con PE muestra una tendencia a disminuir sin embargo no presentan cambios significativos en la expresión de la DVL - 1 comparados con el grupo de embarazo normal.

### Placenta Cara Fetal

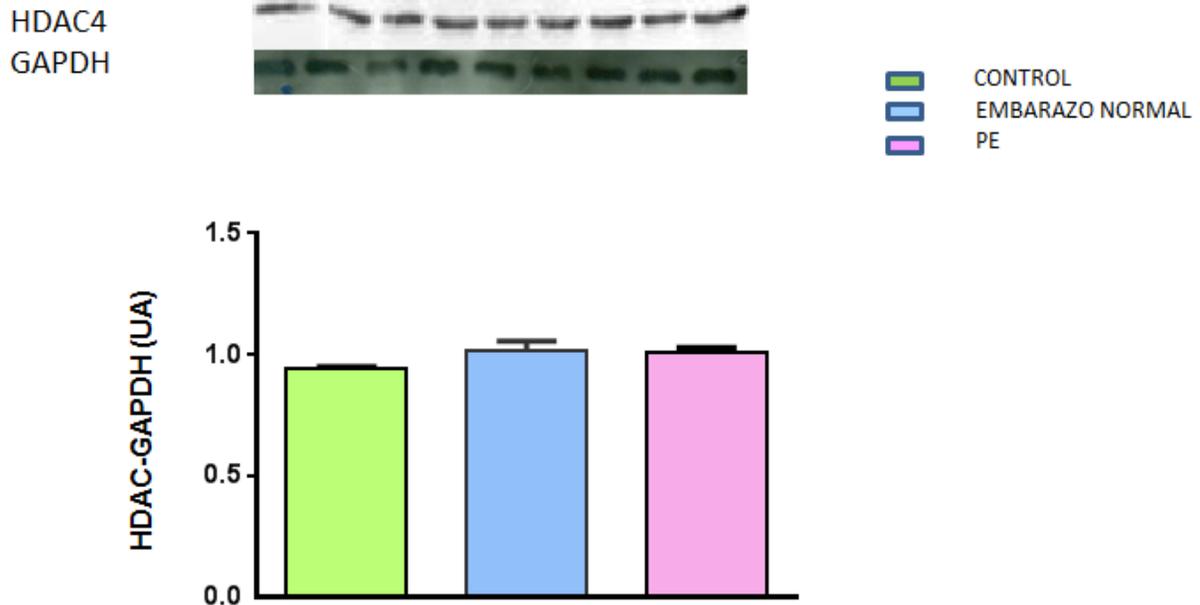


**Gráfica 16.** Densidad relativa de la proteína  $\beta$  - catenina y DVL en Placenta cara fetal de los grupos experimentales E. SHAM y CASR. (\*) p < 0.05

En la gráfica 16 del lado izquierdo, se observa un experimento típico de  $\beta$  - catenina y su control interno GAPDH en tejido de Placenta cara fetal, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de  $\beta$  - catenina normalizado con GAPDH en UA, donde podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.2 UA aproximadamente y el grupo de embarazo con PE no muestra cambios significativos de la expresión de la proteína  $\beta$  - catenina comparados con embarazo normal

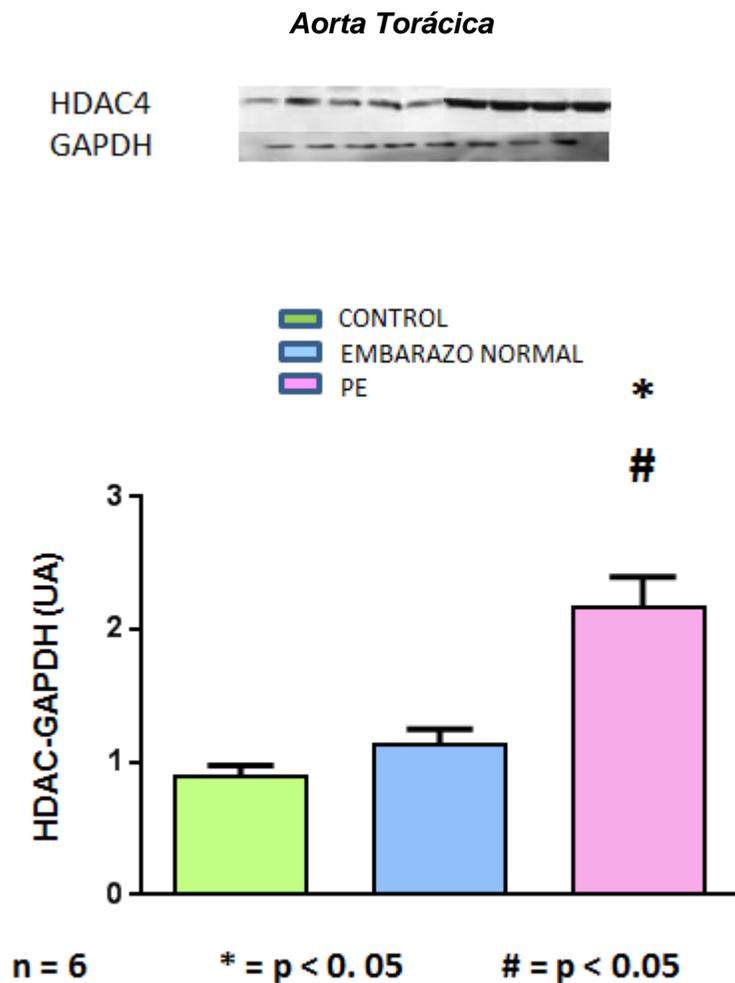
Del lado derecho, se muestra un experimento típico de DVL - 1 y su control interno GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de DVL - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, podemos observar que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.2 aproximadamente, el grupo con PE muestra disminución significativa en la expresión de la DVL - 1 comparados con el grupo control.

### Aorta Abdominal



**Gráfica 17.** Densidad relativa de la proteína HDAC4 en Aorta Abdominal en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

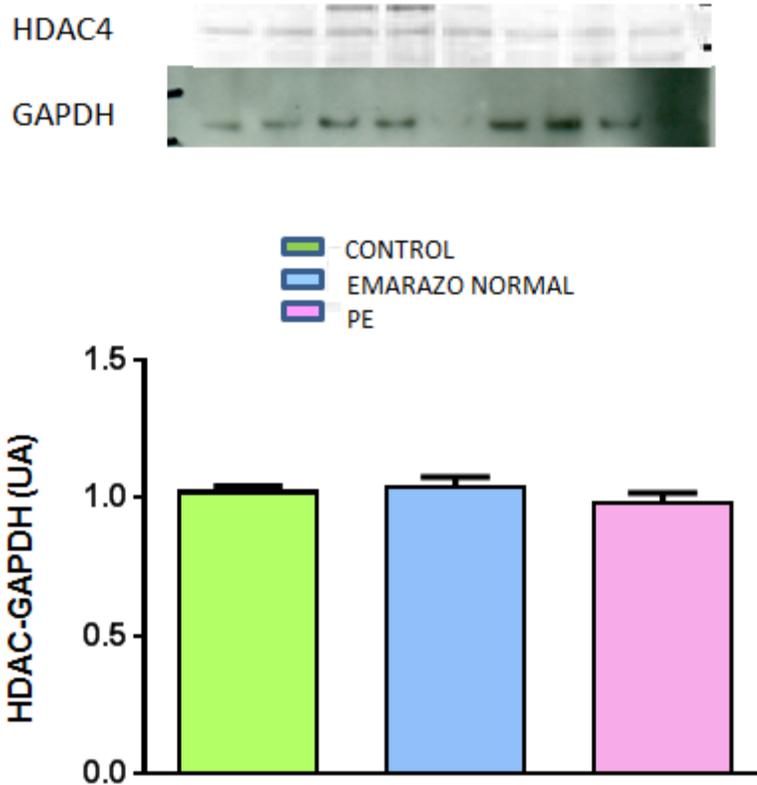
En la gráfica 17 tenemos un experimento típico de HDAC4 y su control interno GAPDH en tejido de Aorta Abdominal, en el eje de las ordenadas se observa el cociente de HDAC4 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1; el grupo de embarazo normal y el grupo con PE no muestran cambios significativos de la expresión de la proteína HDAC4 comparados con el grupo control.



**Gráfica 18.** Densidad relativa de la proteína de HDAC4 en Aorta Torácica en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*) p < 0.05

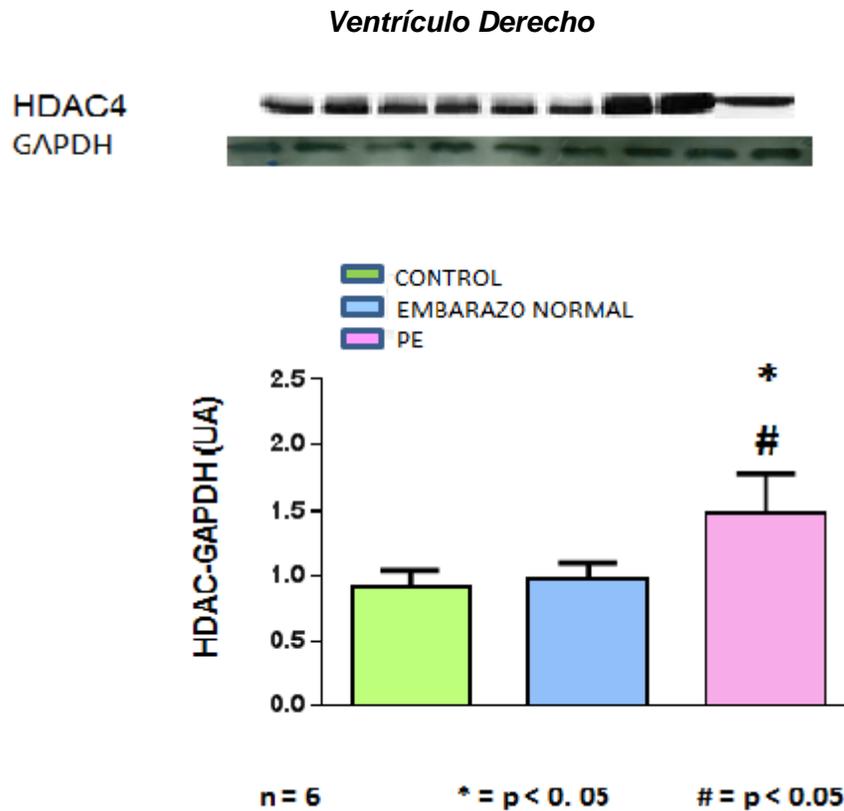
En la gráfica 18. Muestra un experimento típico de HDAC4 y su control interno GAPDH en tejido de Aorta Torácica, se muestra en el eje de las ordenadas el cociente de la proteína HDAC4 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 0.9 unidades arbitrarias aproximadamente, y el grupo de embarazo normal parece no modificarse mientras que el grupo con PE incrementa de forma significativa la expresión de la proteína HDAC4 comparados con el grupo control y de acuerdo con el análisis estadístico.

### Aurículas



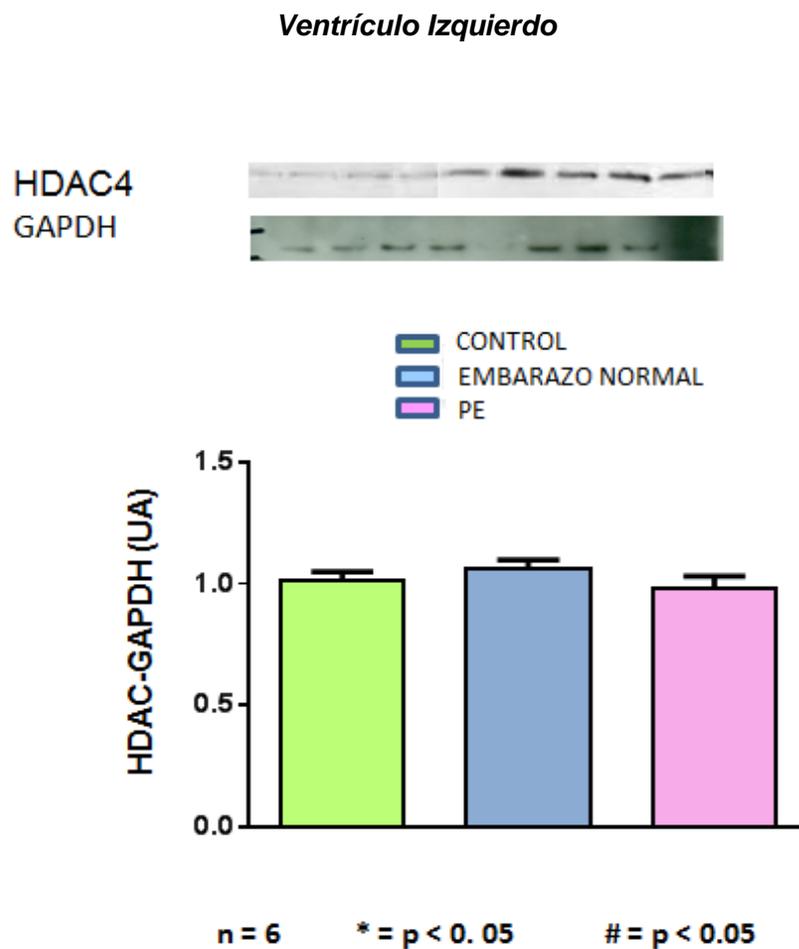
**Gráfica 19.** Densidad relativa de la proteína HDAC4 en Aurículas en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 19 se observa un experimento típico de HDAC4 con su control interno GAPDH en tejido de Aurículas, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de HDAC4 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1, mientras que el grupo de embarazo normal y el grupo con PE no muestra cambios significativos de la expresión de la proteína HDAC4 comparados con el grupo control.



**Gráfica 20.** Densidad relativa de la proteína HDAC4 en Ventrículo Derecho en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

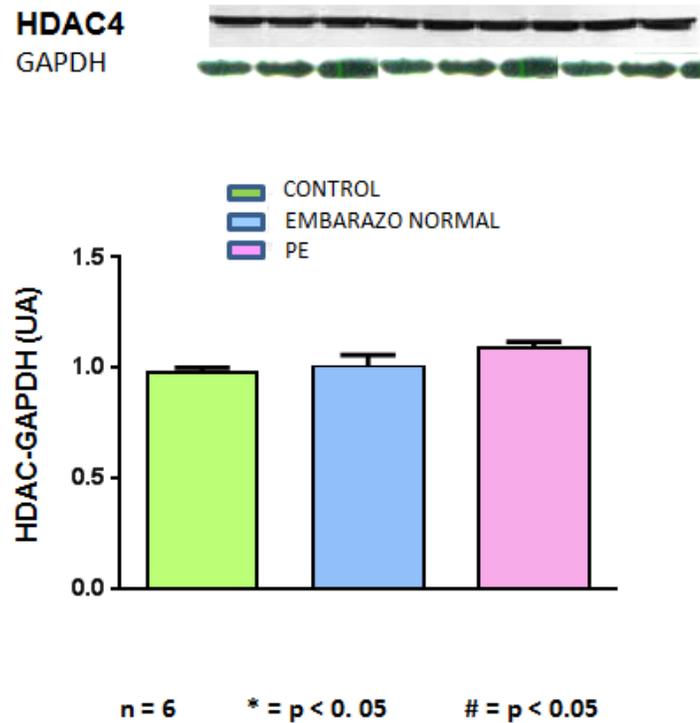
En la gráfica 20 observamos un experimento típico de HDAC4 y su control interno GAPDH en tejido de Ventrículo Derecho, en el eje de las ordenadas de la gráfica se muestra el cociente de HDAC4 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 0.9 unidades arbitrarias aproximadamente, y el grupo de embarazo normal parece no modificarse, mientras que el grupo con PE incrementa de forma significativa la expresión de la proteína HDAC4 comparados con el grupo control.



**Gráfica 21.** Densidad relativa de la proteína HDAC4 en Ventrículo Izquierdo en los grupos experimentales No E SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

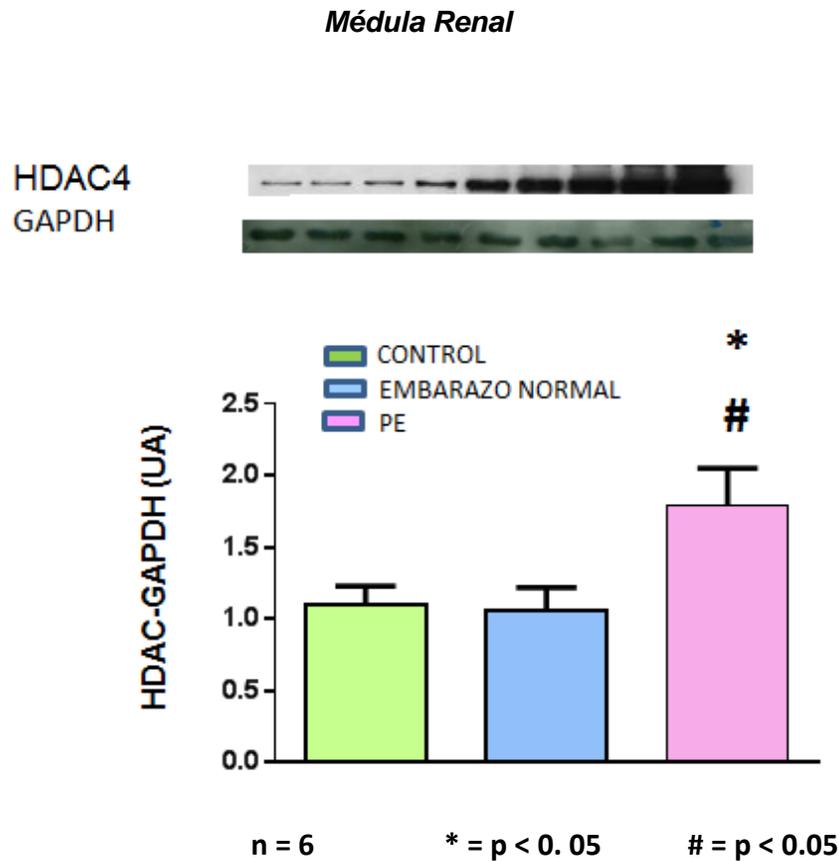
La gráfica 21 muestra un experimento típico de HDAC4 y su control interno GAPDH en tejido de Ventrículo Izquierdo, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de HDAC4 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.0 UA y tanto en el grupo de embarazo normal como en el grupo de PE parece no modificarse la expresión de la proteína HDAC4 comparados con el grupo control.

### Corteza Renal



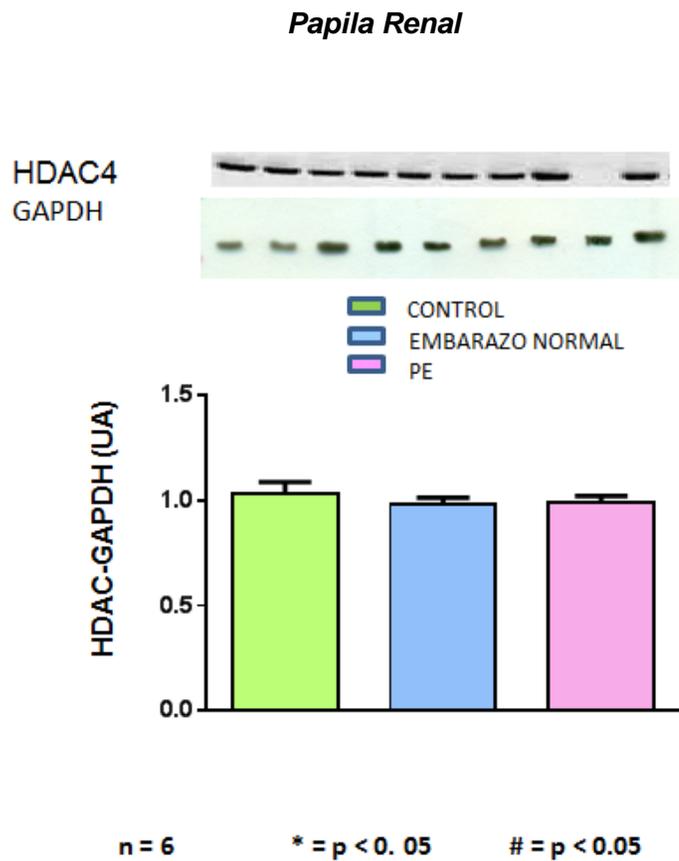
**Gráfica 22.** Densidad relativa de la proteína HDAC4 en Corteza Renal en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 22. Se muestra un experimento típico de HDAC4 y su control interno GAPDH en tejido de Corteza Renal, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de HDAC4 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.0 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo normal y embarazo con PE parece no modificar la expresión de la proteína HDAC4 comparados con el grupo control.



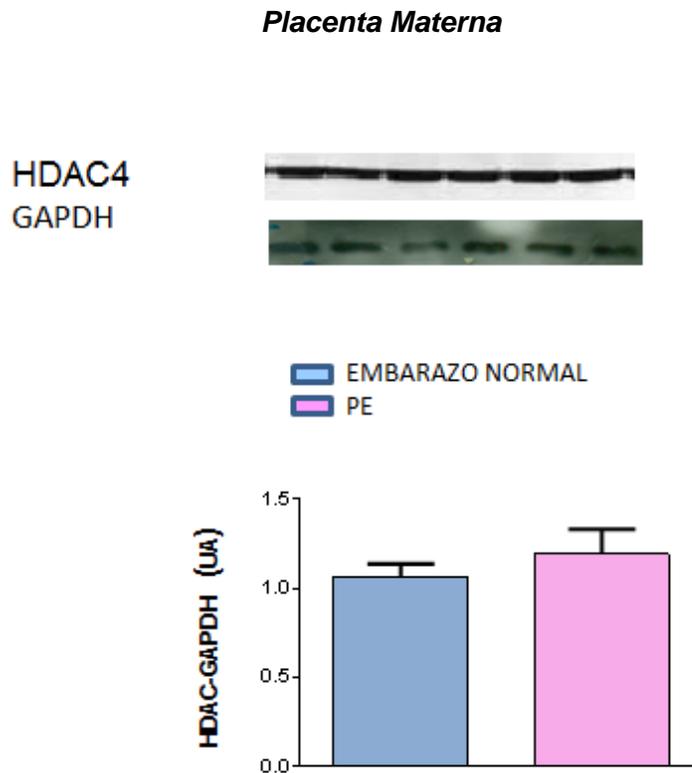
**Gráfica 23** Densidad relativa de la proteína HDAC4 en Médula Renal en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 23. Se muestra un experimento típico de HDAC4 y su control interno GAPDH en tejido de Médula Renal, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de HDAC4 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde observamos que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.2 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo normal parece no modificarse la expresión mientras que en el embarazo con PE la expresión de la proteína HDAC4 se observa con un incremento significativo en su expresión comparados con el grupo control.



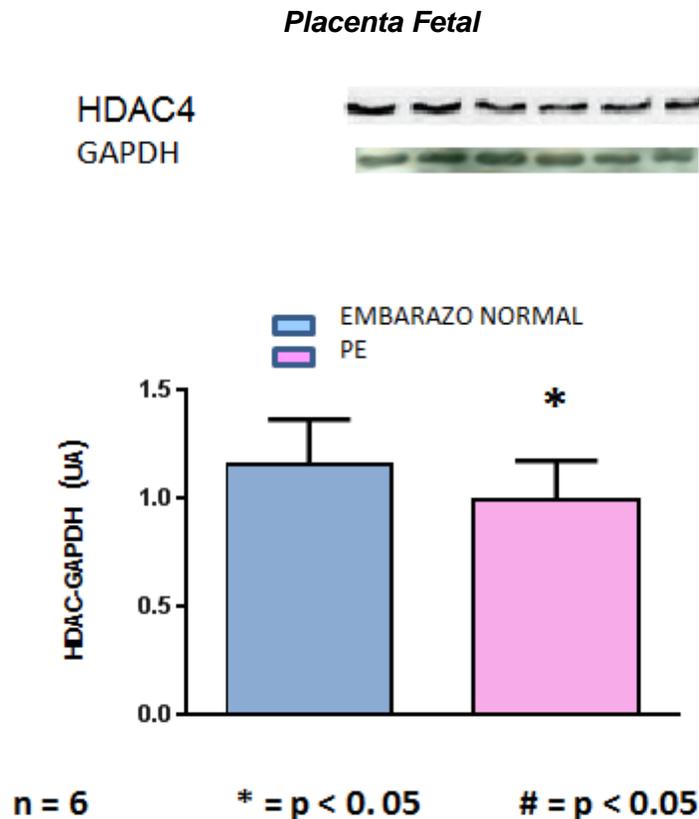
**Gráfica 24** Densidad relativa de la proteína HDAC4 en Papila Renal en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 24. Se muestra un experimento típico de HDAC4 y su control interno GAPDH en tejido de Papila Renal, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de HDAC4 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1.1 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo normal y embarazo con PE parece no modificarse la expresión de la proteína HDAC4 respecto al grupo control.



**Gráfica 25.** Densidad relativa de la proteína HDAC4 en Placenta cara materna de los grupos experimentales E. SHAM y CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 25 se observa un experimento típico de HDAC4 y su control interno GAPDH en tejido de placenta cara materna, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de HDAC4 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1.1 UA aproximadamente; el grupo de embarazo complicado con PE no presenta modificación en la expresión de la proteína HDAC4.



**Gráfica 26.** Densidad relativa de la proteína HDAC4 en Placenta cara fetal de los grupos experimentales E. SHAM y CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 26 se observa un experimento típico de HDAC4 y su control interno GAPDH en tejido de Placenta cara fetal, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de HDAC4 normalizado con GAPDH en UA, donde podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.2 UA aproximadamente y el grupo de embarazo con PE no muestra cambios significativos de la expresión de la proteína HDAC4 comparados con embarazo normal

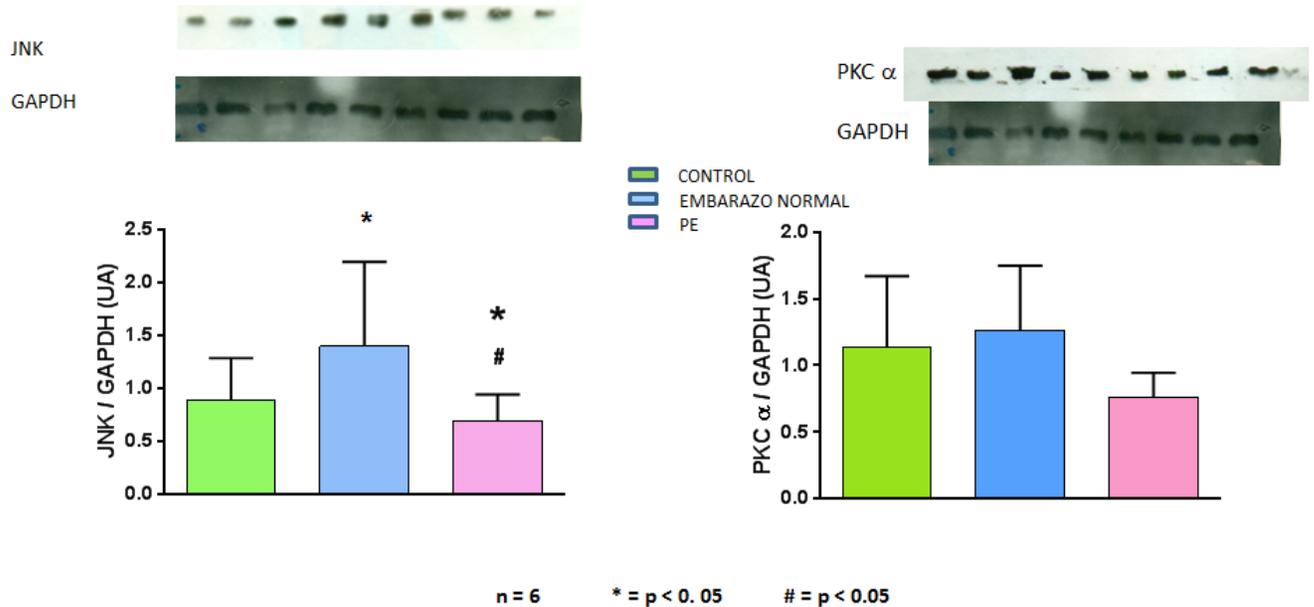
### **Vía Wnt no canónica:**

Se evaluó la expresión proteica de JNK 1 y PKC  $\alpha$ , normalizadas con GAPDH, en aorta (abdominal, torácica), corazón (aurículas, ventrículo derecho, ventrículo izquierdo), riñón (corteza, médula, papila), placenta (cara fetal, cara materna).

Se determinó la expresión proteica de JNK y PKC  $\alpha$ , en aorta, corazón, riñón y placenta de los grupo experimentales de ratas SHAM, E. SHAM, CASR respectivamente.

La proteína JNK 1 se expresó de manera basal en todos los grupos anteriormente descritos, mostrando un aumento significativo de la expresión de la proteína en tejido cardiaco (aurículas, ventrículo derecho, ventrículo izquierdo) y aórtico (aorta abdominal, aorta torácica) del grupo de ratas con embarazo normal, mientras que la expresión disminuye significativamente en tejido cardiaco (aurículas, ventrículo derecho, ventrículo izquierdo), aórtico (aorta abdominal, aorta torácica) y de placenta cara fetal del grupo de embarazo complicado con preclampsia. La proteína PKC  $\alpha$  se expresó de manera basal en todos los grupos anteriormente descritos, existiendo una disminución significativa de la expresión de la proteína en ventrículo izquierdo y placenta cara fetal del grupo de ratas preclámpticas

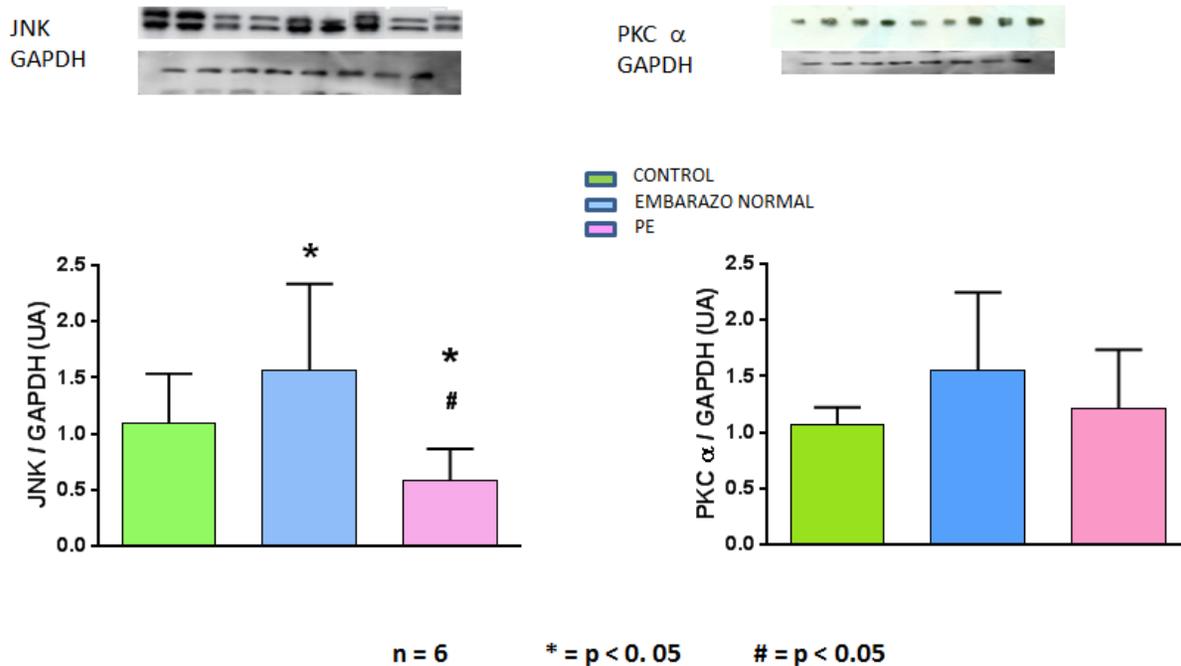
**AORTA ABDOMINAL**



**Gráfica 27.** Densidad relativa de la proteína JNK y PKC  $\alpha$  en Aorta Abdominal en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*) p < 0.05

En la gráfica 27. Se muestra del lado izquierdo un experimento típico de la proteína JNK - 1 y su control interno GAPDH en tejido de Aorta Abdominal, en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de JNK - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 0.9 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo normal, incrementa la expresión, mientras que el grupo con PE disminuye de forma significativa la expresión de la proteína JNK - 1 comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de PKC  $\alpha$  y GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de PKC  $\alpha$  normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.2 aproximadamente, y aunque en el grupo de embarazo normal parece aumentar la expresión de la proteína y disminuir en el grupo con PE no es de forma significativa.

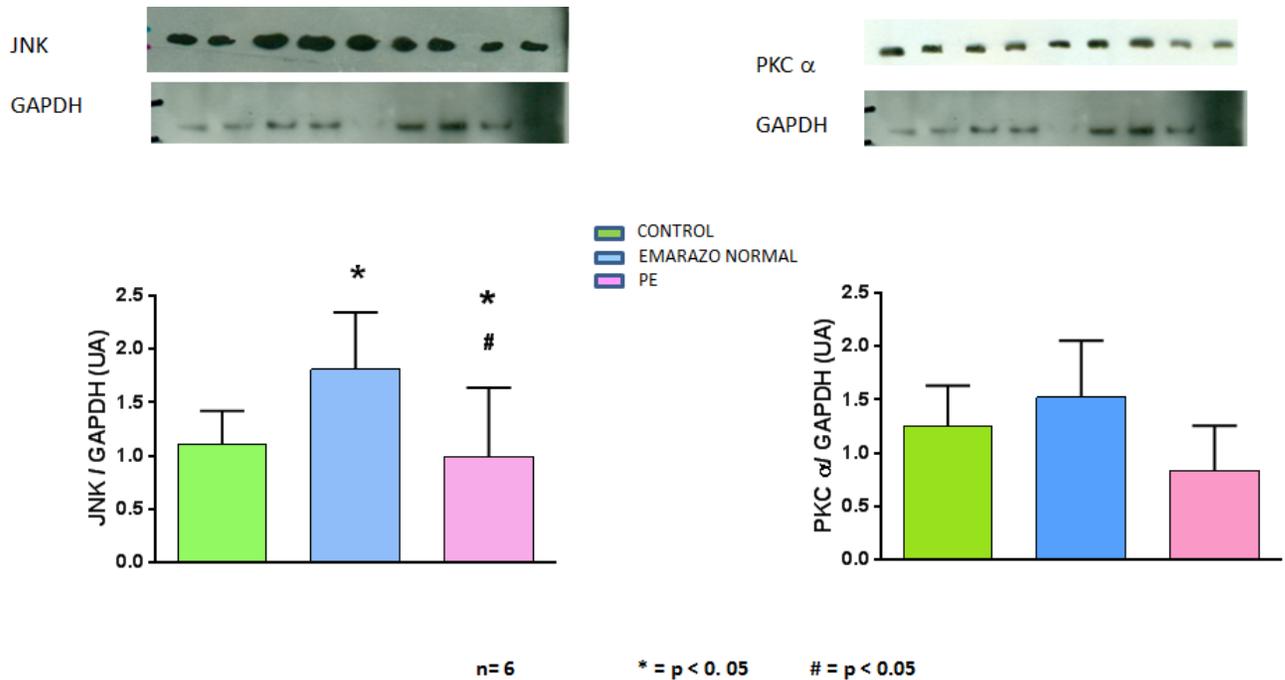
**AORTA TORACICA**


**Gráfica 28.** Densidad relativa de la proteína JNK y PKC  $\alpha$  en Aorta Torácica en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 28. Se muestra del lado izquierdo un experimento típico de la proteína JNK - 1 y su control interno GAPDH en tejido de Aorta Torácica; en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de JNK - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1.2 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo normal, incrementa la expresión de JNK - 1, mientras que en el grupo con PE disminuye, en ambos de forma significativa comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de PKC  $\alpha$  y GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de PKC  $\alpha$  normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.1 aproximadamente, y aunque en el grupo de embarazo normal parece aumentar la expresión de la proteína y disminuir en el grupo con PE los cambios no son de forma significativa de acuerdo con el análisis estadístico.

## AURICULAS

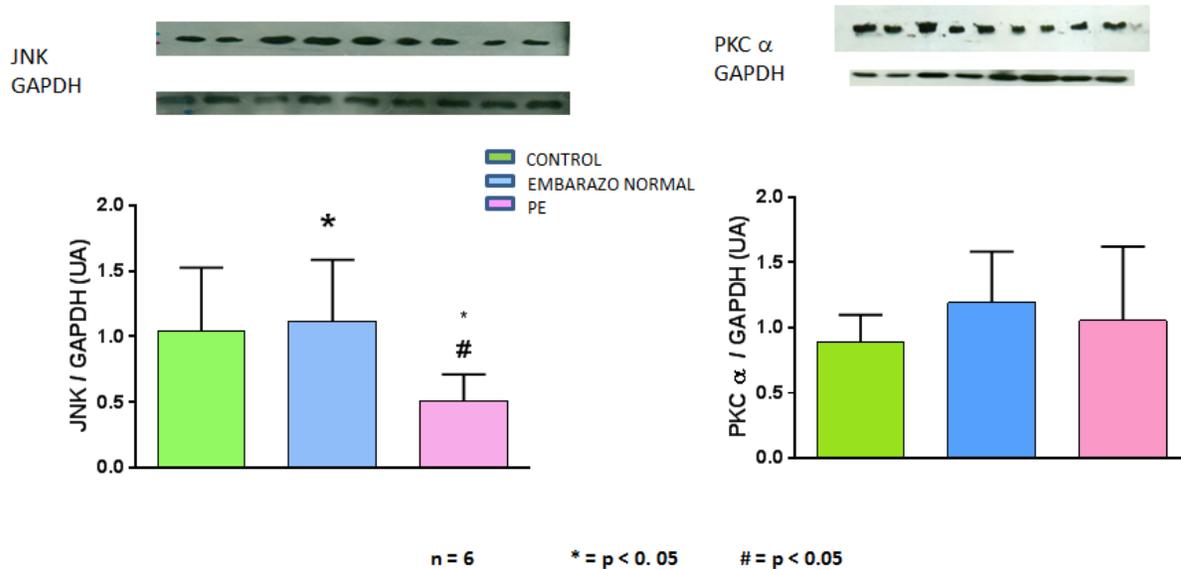


**Gráfica 29.** Densidad relativa de la proteína JNK y PKC  $\alpha$  en Aurículas en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 29. Del lado izquierdo tenemos un experimento típico de la proteína JNK - 1 y su control interno GAPDH en tejido de Aurículas; en el eje de las ordenadas se observa el cociente de JNK - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1.1 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo normal, incrementa la expresión de JNK - 1, mientras que en el grupo con PE disminuye, en ambos de forma significativa comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de PKC  $\alpha$  y GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de PKC  $\alpha$  normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1.3 aproximadamente, en el grupo de embarazo normal parece aumentar la expresión de la proteína y disminuir en el grupo con PE sin embargo los cambios no son significativos de acuerdo con el análisis estadístico realizado.

## VENTRICULO DERECHO

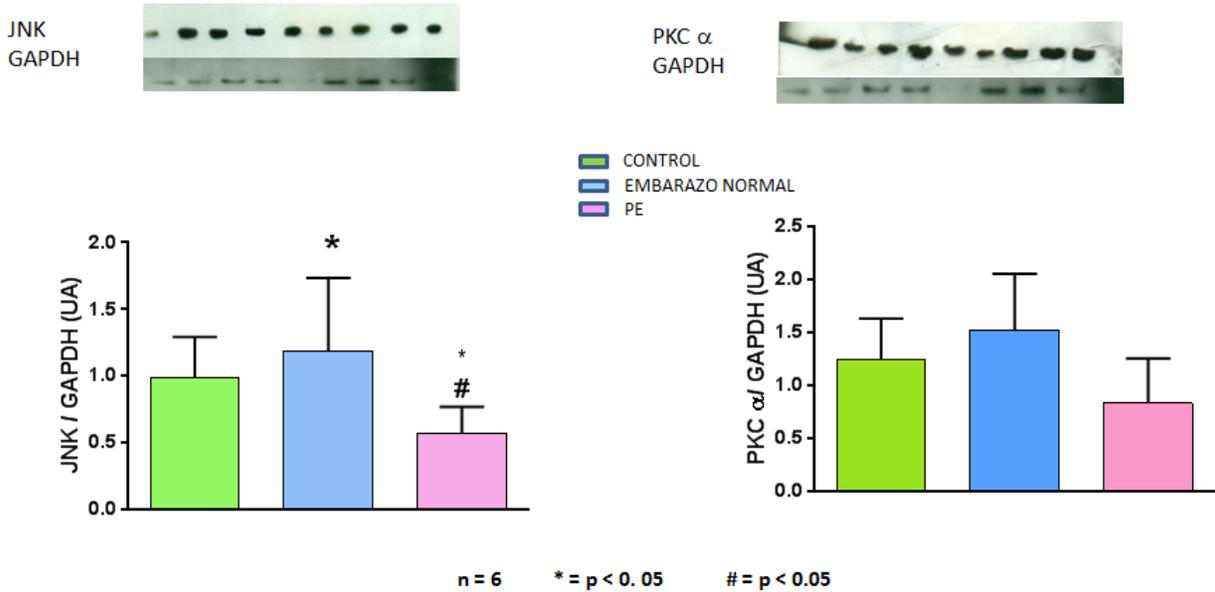


**Gráfica 30.** Densidad relativa de la proteína JNK y PKC  $\alpha$  en Ventrículo Derecho en los grupos experimentales SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 30. Se muestra del lado izquierdo un experimento típico de la proteína JNK - 1 y su control interno GAPDH en tejido Ventrículo Derecho; en el eje de las ordenadas se ve el cociente de JNK - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1.0 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo normal no se modifica la expresión de JNK - 1, mientras que en el grupo con PE disminuye de forma significativa comparados con el grupo control.

Del lado derecho tenemos un experimento típico de PKC  $\alpha$  y GAPDH, en el eje de las ordenadas se observa el cociente de PKC  $\alpha$  normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 0.8 aproximadamente, y aunque en el grupo de embarazo normal parece aumentar la expresión de la proteína al igual que en el grupo con PE, los cambios no son de forma significativa de acuerdo con el análisis estadístico.

**VENTRICULO IZQUIERDO**

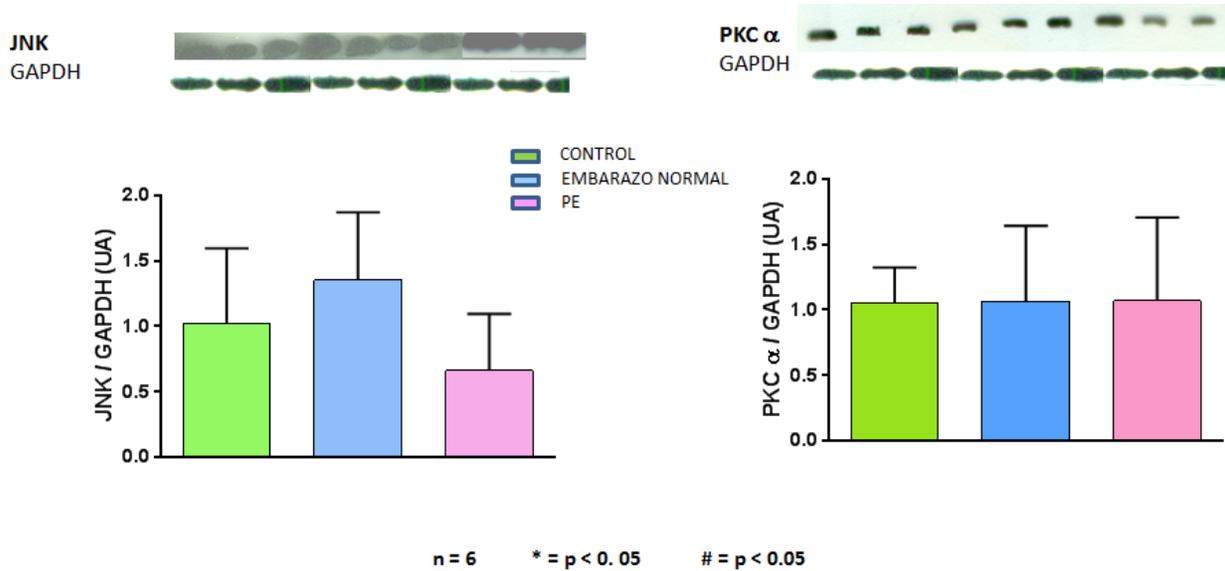


**Gráfica 31.** Densidad relativa de la proteína JNK y PKC  $\alpha$  en Ventrículo Izquierdo en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*) p < 0.05

En la gráfica 31. Se muestra del lado izquierdo un experimento típico de la proteína JNK - 1 y su control interno GAPDH en tejido de Ventrículo Izquierdo; en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de JNK - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 0.9 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo normal, incrementa la expresión de JNK - 1, mientras que en el grupo con PE disminuye, en ambos de forma significativa comparados con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de PKC  $\alpha$  y GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de PKC  $\alpha$  normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1.2 UA aproximadamente, y aunque en el grupo de embarazo normal parece aumentar la expresión de la proteína y disminuir en el grupo con PE los cambios no son de forma significativa de acuerdo con el análisis estadístico.

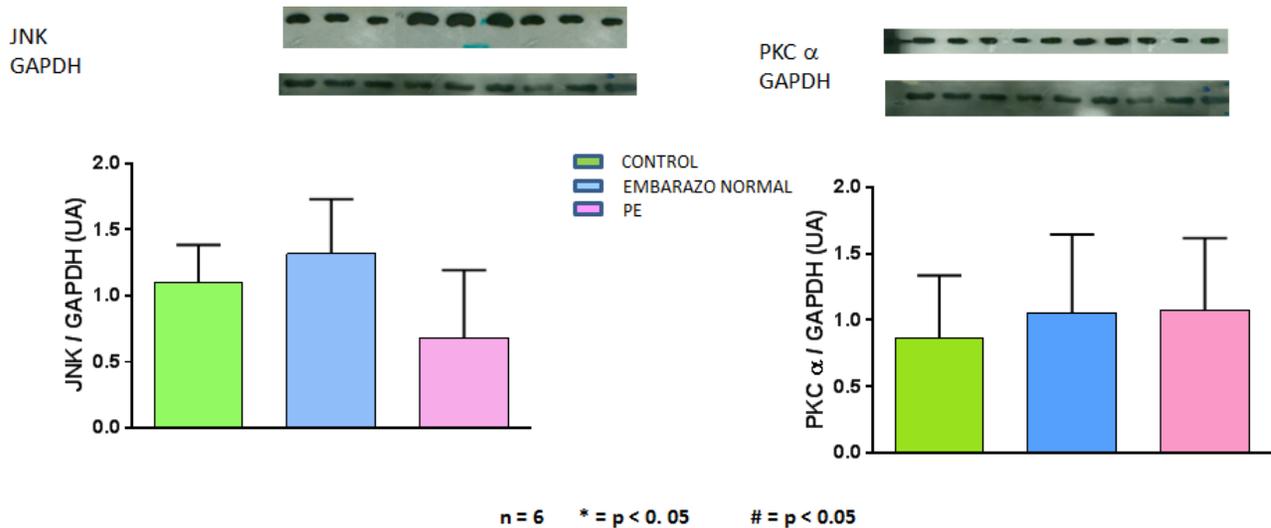
**CORTEZA RENAL**



**Gráfica 32.** Densidad relativa de la proteína JNK y PKC  $\alpha$  en Corteza Renal en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*) p < 0.05

En la gráfica 32. Se muestra del lado izquierdo un experimento típico de la proteína JNK - 1 y su control interno GAPDH en tejido de Corteza Renal; en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de JNK - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1.0 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo normal, incrementa la expresión de JNK - 1, mientras que en el grupo con PE disminuye comparados con el grupo control, sin embargo no de forma significativa.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de PKC  $\alpha$  y GAPDH, en el eje de las ordenadas se observa el cociente de PKC  $\alpha$  normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; mientras el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1.0 UA aproximadamente, en el grupo de embarazo normal y en el grupo con PE no existen cambios significativos de la expresión comparados con el grupo control.

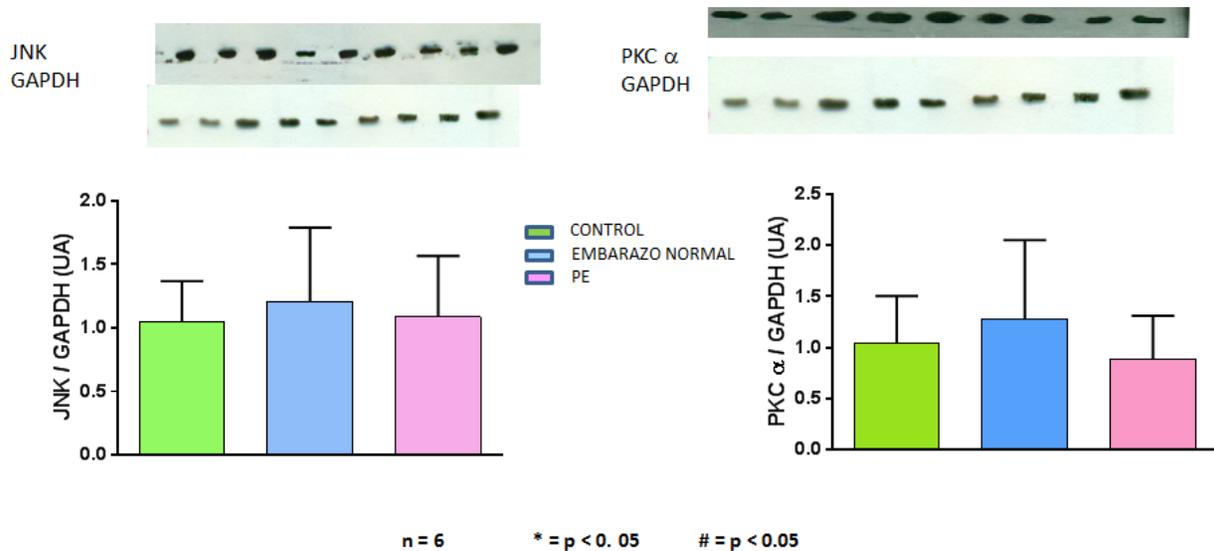
**MEDULA RENAL**


**Gráfica 33.** Densidad relativa de la proteína JNK y PKC  $\alpha$  en Médula Renal en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*) p < 0.05

En la gráfica 33. Se muestra del lado izquierdo un experimento típico de la proteína JNK - 1 y su control interno GAPDH en tejido de Médula Renal; en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de JNK - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos ver que el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1.1 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo normal, incrementa la expresión de JNK - 1, mientras que en el grupo con PE disminuye, aunque no de forma significativa de acuerdo con el análisis estadístico.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de PKC  $\alpha$  y GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de PKC  $\alpha$  normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 0.8 aproximadamente, el grupo de embarazo normal y el grupo con PE no existen cambios en la expresión de la proteína.

## PAPILA RENAL

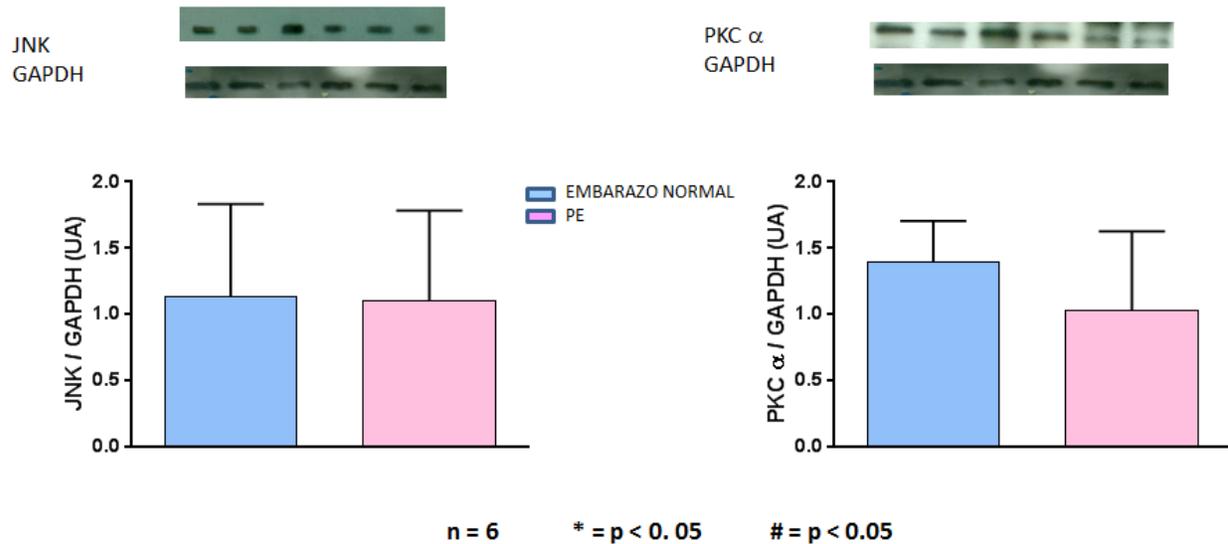


**Gráfica 34.** Densidad relativa de la proteína JNK y PKC  $\alpha$  en Papila Renal en los grupos experimentales No E. SHAM, E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 34. Se muestra del lado izquierdo un experimento típico de la proteína JNK - 1 y su control interno GAPDH en tejido de Papila Renal; en el eje de las ordenadas tenemos el cociente de JNK - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos notar que el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1.0 UA aproximadamente, y el grupo de embarazo normal al igual que el grupo con PE sin cambios en la expresión proteica.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de PKC  $\alpha$  y GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de PKC  $\alpha$  normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.1 aproximadamente, y aunque en el grupo de embarazo normal parece aumentar la expresión de la proteína y disminuir en el grupo con PE los cambios no son significativos de acuerdo con el análisis estadístico.

## PLACENTA CARA MATERNA

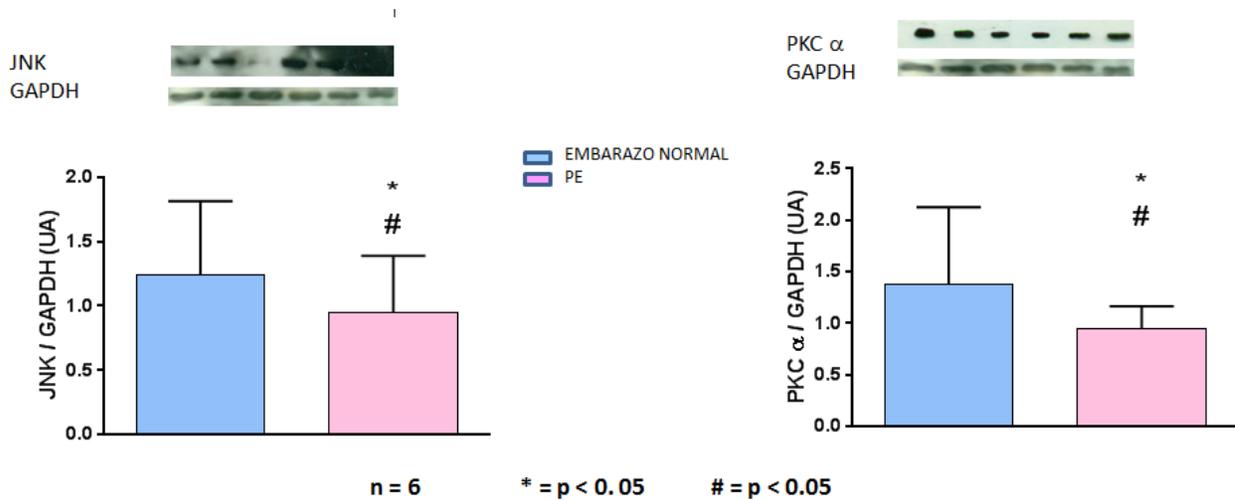


**Gráfica 35.** Densidad relativa de la proteína JNK y PKC  $\alpha$  en Placenta cara materna en los grupos experimentales E. SHAM, CASR. (\*) p < 0.05

En la gráfica 35. Observamos del lado izquierdo un experimento típico de la proteína JNK - 1 y su control interno GAPDH en tejido de Placenta Cara Materna; en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de JNK - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; podemos ver que el grupo de ratas control (Embarazo normal) tiene una expresión basal de 1.1 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo con PE, no se modifica la expresión de JNK - 1, comparado con el grupo de embarazo normal.

Del lado derecho, tenemos un experimento típico de PKC  $\alpha$  y GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de PKC  $\alpha$  normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.1 aproximadamente, y aunque en el grupo con PE parece disminuir la expresión proteica, los cambios no son de forma significativa de acuerdo con el análisis estadístico.

**PLACENTA CARA FETAL**



**Gráfica 36.** Densidad relativa de la proteína JNK y PKC  $\alpha$  en Placenta Cara Fetal en los grupos experimentales E. SHAM, CASR. (\*)  $p < 0.05$

En la gráfica 36. Se muestra del lado izquierdo un experimento típico de la proteína JNK - 1 y su control interno GAPDH en tejido de Placenta Cara Fetal; en el eje de las ordenadas se muestra el cociente de JNK - 1 normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias, donde podemos observar que el grupo de ratas control tiene una expresión basal de 1.3 UA aproximadamente, y en el grupo de embarazo con PE, disminuye la expresión de JNK - 1, de forma significativa comparado con el grupo control.

Del lado derecho, se muestra un experimento típico de PKC  $\alpha$  y GAPDH y en el eje de las ordenadas de la gráfica se observa el cociente de PKC  $\alpha$  normalizado con GAPDH en unidades arbitrarias; observamos que mientras el grupo de ratas control tiene una expresión normalizada de 1.4 aproximadamente, en el grupo de embarazo con PE la expresión de dicha proteína disminuye de forma significativa de acuerdo con el análisis estadístico.

## Discusión de Resultados:

La preclampsia es una de las complicaciones más comunes y peligrosas que ocurren durante un embarazo, ésta surge a consecuencia de una mala adaptación ante los cambios cardiovasculares que tienen como fin resolver necesidades básicas para mantener la integridad de la madre y el buen desarrollo del feto durante el embarazo normal. A pesar de ser un problema epidemiológico importante, hasta hoy no se tiene una teoría concluyente acerca de su causa. Tomando en cuenta que un papel importantes relacionado con su aparición, se atribuye al RAS y conociendo de la diferencia existente en la expresión de su nuevo componente (PRR) durante el embarazo normal y el embarazo complicado con PE, y que además este mismo componente es una proteína capaz de activar diferentes vías de señalización independientes de la formación de Angiotensina II, como es el caso de la vía de señalización Wnt, la cual puede ser encendida al interactuar el PRR con sus ligandos (renina y prorenina); y con el fin de contribuir con el esclarecimiento de la etiología de la PE, en el actual estudio se analizó tejido aórtico, cardíaco, renal y placentario de rata Wistar, estudiando la expresión de las proteínas representativas de cada una de las vías Wnt canónica ( $\beta$  – catenina, DVL – 1 HDAC4) y no canónica (JNK – 1 y PKC  $\alpha$ ), para determinar si alguna de ellas o ambas podría estar participando en los cambios de la presión arterial durante un embarazo normal y un embarazo complicado con preclampsia.

### Vía canónica

En los hallazgos que obtuvimos al estudiar las proteínas de la vía canónica, observamos un aumento de la expresión de  $\beta$  – catenina, DVL – 1 e HDAC4, tanto en tejido de aorta torácica, como en ventrículo derecho y médula renal; al ser proteínas que se activan en serie, podemos suponer que la vía de señalización Wnt canónica en estos tejidos, se encuentra activada



durante el embarazo complicado con preclampsia, mientras que en el resto de los tejidos no existe activación de ninguna de las proteínas analizadas de la vía canónica. Esto puede sugerir que el PRR tiene funciones órgano – específicas durante el embarazo, y por ello no se comporta de la misma manera en todos los tejidos, lo cual no es difícil de pensar ya que existen evidencias de un efecto local del RAS en diversos tejidos.(Andrew JR White 2014).

De acuerdo con estudios previos, en tejido cardiaco, la expresión del PRR se encuentra aumentada (Moctezuma Emilio), al igual que nuestras proteínas de estudio de la vía Wnt canónica (DVL -1,  $\beta$  – catenina, HDAC4) incrementaron en ventrículo derecho, , lo que nos hace suponer que el PRR está formando parte del complejo receptor Wnt, y actuando como un adaptador específico entre LRP6 y V – ATPasa, este complejo receptor podría ser endocitado y cruzar la membrana vesicular V – ATPasa generando un gradiente de protones esencial para la fosforilación de LPR6 y en consecuencia activar la vía Wnt Canónica (Cristina – María Cruciat, 2010), y de alguna manera estar participando en la regulación de la presión arterial. Aunque también podemos deducir que si las proteínas de la vía Wnt canónica se elevan únicamente en ciertos tejidos como el ventrículo derecho, el PRR podría tener una función específica en este tejido, quizá como activador de la vía Wnt canónica en respuesta a la necesidad de hacer frente a la precarga de la preclampsia, evitando así, futuros daños y complicaciones en éste tejido como podría ser una hipertrofia patológica. Así pues el ventrículo derecho al ser afectado por la precarga sería víctima de una fatiga mecánica que de no tener un mecanismo compensatorio desenlazaría en un daño a largo plazo, por lo que en respuesta a esta fatiga quizá la vía Wnt canónica se activa participando en el aumento de tamaño de los cardiomiocitos que corresponde a una forma de hipertrofia fisiológica (Mariela Nolly 2012), tal como ya se ha mencionado en algunos estudios de corazón que describen que  $\beta$  – cateniana y DVL- 1 participan en el aumento de tamaño de cardiomiocitos y en la

formación de adherencias junctions de éstos con el fin de mantener la integridad de la pared ventricular (Mariele 2001).

En Aorta Torácica el incremento de las proteínas que forman parte de la cascada de señalización Wnt canónica durante la preclampsia (inverso a la disminución del PRR descrito en algunos estudios) (Rocio 2013) podría deberse a que basta una cantidad pequeña de PRR para la activación de la vía y de ésta forma estar participando en los cambios de presión arterial. Debido a que PRR es un componente del RAS, distribuído de forma local en los ciertos tejidos, podríamos pensar que el PRR al igual que en ventrículo derecho, tiene una función específica en aorta torácica, lo cual se debería quizá a que la aorta torácica posee mayor cantidad de placas laminares lo que le da mayor elasticidad y la hace responsable de la mayor contracción vascular, esto podría significar que el tejido de aorta sería afectado con mayor facilidad en la porción torácica que en la porción abdominal, y en respuesta a esta carga de trabajo, la vía Wnt canónica se active para reparar el tejido endotelial y evitar daños crónicos (Shao S. 2015)

En Médula Renal el incremento de las proteínas de la vía Wnt canónica podría no depender del número de receptores de renina prorenina (cuya expresión en médula renal se encuentra disminuída en PE como lo menciona Moctezuma Emilio en su trabajo de Tesis y podría ser suficiente una pequeña cantidad de ésta proteína para que la vía Wnt sea encendida (tal como podría suceder en la aorta torácica), por lo que no se descarta del todo la idea de que el PRR estuviera participando en los cambios de presión arteria; la activación de la vía en este tejido podría deberse a que la médula es la responsable de la acidificación de la orina y la homeostasis, ya es conocido que la médula renal se caracteriza por un hipertonicidad fisiológica, por lo que la combinación de cualquier tiene un efecto aditivo lo que podría ocasionar que las células murieran a una velocidad muy acelerada o por el contrario están

proliferando a una velocidad menor que la normal, o existe alguna combinación de estas alternativas, esta adición de tonicidad podría deberse a la cantidad de proteína en orina durante un proceso de preclampsia por lo que la vía Wnt quizá se activa en respuesta al daño causado por la inflamación medular ocasionada por las proteínas, y como proceso compensatorio ante la muerte celular o insuficiente proliferación celular.

No se descarta la idea de que esta vía Wnt canónica al menos en aorta torácica y médula renal pudiera ser encendida por otro estímulo que no provenga del PRR, ya que la expresión del PRR es inversa a la expresión de las proteínas de la vía Wnt, por lo que la vía podría ser activada por otros estímulos como es el caso de inflamación y estrés oxidativo características de la PE (Babbette 2013), que encienden vías alternas como la cascada PG's o la vía ROS que entre su gran red de comunicación cruzada son capaces de activar a la Vía Wnt canónica que en adultos está relacionada con procesos celulares regenerativos seguidos de daño (Brandenburg 2015).

#### Vía no canónica

Al realizar el estudio de las proteínas representativas de la vía Wnt no Canónica, observamos que durante un embarazo normal la expresión de la proteínas JNK – 1 se encuentra incrementada en tejido cardíaco (aurículas y ambos ventrículos) y aórtico (torácica y abdominal), mientras que en la preclampsia se encuentra disminuída en los mismos tejidos.

La disminución de la expresión de la proteína JNK – 1 en tejido de aorta (abdominal y torácica) durante la preclampsia coincide con la disminución en la expresión del PRR (Rocio 2013), esto nos hace pensar que el PRR podría estar participando como activador de la vía Wnt no canónica y quizá de esta forma contribuir en la regulación de la presión arterial.



Mientras que en tejido cardíaco (aurículas y ventrículos) podemos pensar que una cantidad elevada de receptores de renina prorenina no siempre trae consigo la activación de la vía Wnt ya que el PRR se encuentra aumentado en corazón (Moctezuma Emilio), pero las proteínas de la vía canónica no. Esto podría deberse a que éste receptor tiene funciones alternas e independientes a la unión con su ligandos ya que por su homología puede actuar como proteína accesoria de VTPasa (Manne et. al. 2013) y de esta forma el receptor tendría la alternativa de actuar como bomba de  $H^+$  ATPasa. De esta forma PRR estaría actuando en la homeostasis del pH celular, importante para la sobrevivencia de los organismos. (K. W. Beyenbach, et. al. 2006).

En tejido aórtico (abdominal y cardíaco) el el PRR está disminuido (Rocio 2013) y las proteínas no canónicas se encuentran también disminuidas, lo que nos hace pensar que la inactivación de la vía canónica se debe a la baja expresión del receptor. Quizá esta inactivación que causa la baja expresión de de JNK – 1 está relacionado con un mal funcionamiento del tejido endotelial

Durante un embarazo normal la expresión de las proteínas JNK – 1 y PKC  $\alpha$  se encuentra incrementadas en tejido de ventrículo izquierdo, mientras que en la preclampsia se encuentra disminuída en este tejido. Lo que debemos valorar de acuerdo a nuestros hallazgos es si la trasducción de la señal vía Wnt no canónica mediante JNK y PKC  $\alpha$  es a causa del PRR, ya que éste receptor contrariamente a estas proteínas, se encuentra aumentado en corazón durante el embarazo con PE; lo cual nos hace suponer nuevamente que durante la PE el PRR no esté fungiendo como un activador de la cascada trasduccional Wnt, y que está ejerciendo en alguna otra de sus funciones (Cristina – María Cruciat, 2010). Y quizá en el embarazo normal JNK – 1 y PKC  $\alpha$ , se encuentren sobreexpresados ya que durante un embarazo normal se existen cardiovasculares cuyo fin es cubrir las necesidades tanto de la



madre como del feto, por lo que situaciones como el aumento del gasto cardíaco y volúmen sanguíneo implican un mayor trabajo por parte del corazón, por lo que serían necesarios eventos de remodelamiento celular y profibróticos para procurar un embarazo normoevolutivo, lo contrario ocurriría si estos eventos no surgen, lo cual podría suceder durante la PE, que coincide con la baja expresión de JNK – 1 y PKC  $\alpha$  en ventrículo izquierdo, proteínas implicadas en la proliferación celular y procesos de angiogénesis (Andrey Voronkov 2013).

Es complejo el estudio de las vías de señalización debido a que las moléculas involucradas en esta respuesta no operan en forma aislada, sino por el contrario participan en una compleja red de señalización con frecuentes puntos de entrecruzamiento.

## Conclusiones:

### Vía Canónica

- Durante el embarazo normal la vía canónica parece no modificarse
- Durante la gestación complicada con preclampsia la expresión de  $\beta$  – catenina, DVL 1 e HDAC4 aumenta con respecto al grupo control y al grupo con embarazo normal en los tejidos de ventrículo derecho, aorta torácica y médula renal
- Estos hallazgos podrían deberse a que la activación de la vía Wnt no depende del número de receptores o que la señalización Wnt podría estar activada por otra vía

### Vía No Canónica

Durante el embarazo normal:

- La expresión de JNK en tejido cardíaco aumenta, mientras que el PRR disminuye
- La expresión de JNK en aorta abdominal y torácica al igual que el PRR aumenta

Durante la Preclampsia:

- La expresión de JNK disminuye en tejido cardíaco, mientras que PRR aumenta
- La expresión de JNK y PRR disminuye en tejido aórtico y placenta cara fetal
- La expresión de PKC a disminuye en ventrículo izquierdo mientras el PRR aumenta
- La expresión de PKC a y PRR disminuye en placenta cara fetal
- Estos resultados sugieren que la activación de la vía Wnt en tejido cardíaco no depende del número de receptores ó que el PRR en tejido cardíaco tiene otra función y la activación de la vía Wnt se debe a otro estímulo.
- En tejido aórtico el PRR actúa en la activación o inhibición de la vía Wnt
- El PRR durante la PE, inhibe la vía Wnt en placenta cara fetal

---

**Bibliografía:**

- \*Abbas AE, Lester SJ, (2005). ***Pregnancy and the cardiovascular system***. 98 (2): 179 – 89.
- \*Albert E. (2007)
- \*Asturo Ishihara (2011). ***(Pro)renin Receptor and Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase***. Department of Medicine II, Endocrinology and Hypertension, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan
- \*Andrew JR White, Sarat (2014)
- \*Andrey Voronkov and Stefan Krauss. (2013) ***Wnt/beta Catenin Signaling and small Molecule Inhibitors***. Biomedical Innovation Center, Unit for Cell Signaling, Oslo University Hospital, 0349, Oslo Norway. 2013, 19, 634 – 664.
- \*ACOG (2014). ***American College of Obstetricians and Gynecologists practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia***. Int. J. Gynaecol. Obstet. 77, 67–75.
- \*Babette La Marca, Denise Cornelius, and Kedra Wallace. (2013) ***Elucidating Immune Mechanisms Causing Hypertension During Pregnancy***. Departments of Pharmacology and Obstetrics and Gynecology, University of Mississippi Medical Center, Jackson, Mississippi bblamarca. Physiology. Volume 28. July.
- \*Bamfo JE, Odibo AO J Pregnancy. (2011) ***Review Diagnosis and management of fetal growth restriction.***; 2011():640715.
- \*Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ. ***Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis***. British Medical Journal. 2007; 335(2); 213-219



\*Bernhard SM, Seidel K, Schmitz J,(2012). ***The Prorenin receptor PRR can act as a repressor of Wnt signaling.*** Center for Cardiovascular Research (CCR)/Institute of Pharmacology

\*Bo Gao, Yingzi Yang (2013) ***Planar cell polarity in vertebrate limb morphogenesis.*** National Human Genome Research Institute, Bethesda, MD 20892. 23 (4): 438 – 444.

\*Brandenburg 2015

\*Brown, M., North, R. A., McCowan, L and Baker, P. N. (1992). ***Robust early pregnancy prediction of later preeclampsia using metabolomic biomarkers.*** *Hypertension* 56, 741–749.

\*Buechling T. Bartscherer K, Ohkawara. (2010) ***Wnt/Frizzled signaling requires dPRR, the Dorsophila homolog of the prorenin receptor.*** 20(14):1263-8

\*Burckle C, Bader M. ***Prorenin and its ancient receptor.*** *Hypertension.* (2006); 48: 549 – 51

\*Campbell DJ. (2008). ***Critical review of prorenin and (Pro)renin receptor research.*** *Hypertension.* 51:1-2.

\*Carbillon L, Uzan M, Uzan S. ***Pregnancy, vascular tone, and maternal hemodynamics: a crucial adaptation.*** *Obstet Gynecol Surv.* 55 (9): 574 – 581

\*Cárdenaz Vega Rocio (2013). ***Influencia de las prostaglandinas en la expresión del receptor a prorenina/renina en un modelo de hipertensión inducida por el embarazo.***

\*Chapman A. B, Abraham WT, Zamudio S, et. al.(1998) ***Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early pregnancy.*** Kidney Int. 54 (6): 2056 -2063.

\*Charnock Jones D.S (2015). ***Placental hypoxia, endoplasmic reticulum stress and maternal endothelial sensitisation by sFLT1 in pre-eclampsia.*** pii: S0165-0378(15)30006-1. doi: 10.1016/j.jri.2015.07.004

\*Craici, I. Wagner, S. and Garovic, V.D. (2008). ***Preeclampsia and future cardiovascular risk: formal risk factor or failed stress test?*** Ther Adv Cardiovasc Dis. 2(4): 249–259.

\*Cristine T Wong, Eizaaz Ahmad, Hongyan Li and Dorota A Crawford. 2012. ***Prostaglandin E2 alters Wnt – dependent migration and proliferation in neuroectodermal stem cells: implications for autism spectrum disorders.*** Cell communication and signaling. 12: 19.

\*Cristina-María Crucciat, Bisei Ohkawara, Sergio P. Acebron, Emil Karaulanov, (2010), ***Requirement of Prorenin Receptor and Vacuolar H<sup>+</sup> - ATPase-Mediated Acidification for Wnt Signaling.***

\*Danser J. (2009) ***(Pro)renin receptors: are they biologically relevant?; Current Opinion in Nephrology and Hypertension,*** 18:74–78

\*Danser AHJ, Derkx FHM, Schalekamp MADH, (1998) et al. ***Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans.*** J Hypertens 1998; 16:853–862

\*Danser, J. Batenburg, W. W. and Van Esch, J. H. M, J. (2007). ***Prorenin and the (Pro) renin Receptor – an Update.*** Nephrol Dial Transplant. 22. pp 1288 – 1292

- \*Danser, J.; Batenburg, W.; van Esch, J.; Krop, M. (2008). ***Prorenin anno*** 2008. J. Mol. Med. 86. pp 655 – 658.
- \*Dekker G, Robillard PY, J Reprod Immunol. (2007). ***Pre-eclampsia: Is the immune maladaptation hypothesis still standing? An epidemiological update.*** Dec; 76(1-2):8-16
- \*Denicol AC, Block J, Kelley DE, Pohler KG. Dobbs KB (2014), ***The Wnt signalling antagonist Dickkopf – 1 directs lineage commitment and promotes survival of the perimplantation embryo.*** 28: 3975 – 3986
- \*Djurisic S, Hviid TVz (2014). ***HLA Class Ib Molecules and Immune Cells in Pregnancy and Preeclampsia.*** doi: 10.3389/fimmu.2014.00652. eCollection 2014.
- \*Dongxin Zhang, Duyun Ye, and Hongxiang Chen. (2013). ***Review Article. Placental Vacuolar ATPase Functional Is a Key Link between Multiple Causes of Preeclampsia.*** Obstetrics and Gynecology Volume 2013. Article ID 504173, 9 pages.
- \*E. LLurva Cabrillo Rodríguez, D. Saldivar Rodríguez, L. Cabrero (2007) Roura. ***Obstericia y medicina materno-fetal.*** Buenos Aires; Madrid. Médica Panamericana . 1390 p. pp 657 – 659
- \*E. A. Trifonova, T. V. Gabidulina, N. I. Ershov, (2013). ***Analysis of the Placental Tissue Transcriptome of Normal and Preeclampsia Complicated pregnancies.*** Research Institute of Medicinal Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Medical }Sciences, Nab. Ushayk 10, 634050, Tomsk Russia
- \*Frey N, Katus HA, Olson, Hill JA (2004). ***Hypertrophy of the heart a new therapeutic target?*** Circulation 2004; 109 (13): 1580 - 1589

- \*Genevieve Nguyen, Francoise Delaure, Céline Burcklé, Latifa Bouzahir. (2002), ***Pivotal Role of the renin / prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin.***..Volume 109, number 11. The Journal of Clinical Investigation
- \*Grigoryan T, Wend P, Klaus A, Birchmeier W (2008). ***Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice.*** Genes & development 22: 2308–2341
- \*Hi M. (2004) The WNT/calcium pathway: ***Biochemical mediators, tools and future requirements.***Front. Biosci.;9:967–974.
- \*Hunter S, Robson SC. ***Adaptation of the maternal heart in pregnancy.*** Br Heart J.1992; 68:540–3.
- \*Huppertz.B (2014) ***Maternal and fetal factors and placentation: implications for pre-eclampsia.*** Jul;4(3):244
- \*Ichihara A. Suzuki F, Nakagawa T, Kaneshiro Y et. al.***Pro renin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis, in diabetic angiotensin II type 1 receptor deficient mice.*** J Am Soc Nephrol 2006; 17: 1950 – 1961.
- \*Jacqueline Heger and Klaus – Dieter Schluter. (2013). ***Review Article. Renin and the IGFII/M6P Receptor System in Cardiac Biology.*** Hindawi. Physiologisches Institut, Justus – Liebig – Universität Gießen, 35392 Gießen Germany.10 pages.
- \*Juan Tamargo, Ricardo Gómez, Irene Amorós, et. al., (2009).***Fisiopatología de la prorenina y la renina. Cincuenta años en busca de los inhibidores directos de la renina. Sus ventajas y sus limitaciones.*** Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España.pp 24 A



- \*Jun Zhang, Mark Masciocchi, David Lewis (2008). ***Placental anti-oxidant gene polymorphisms, enzyme activity, and oxidative stress in preeclampsia.*** 29(5):439-43. doi: 10.1016/j.placenta.2008.02
- \*Jungmook Lyu, Eek – hoon Jho, Wange Lu (2011). ***Smek promotes histone deacetylation to suppress transcription of Wnt target gene brachyury in pluripotent embryonic stem cells.*** Cell research. Nature
- \*Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu T, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, Hayashi M, Inagami T. (2006) ***Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats.*** *Kidney Int.* Aug;70(4):641-6
- \*Kaufmann, P., Black, S. and Huppertz, B. (2003). ***Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth***
- \*Kerstin – Spirchn (2010). ***Drosophila Ras/MAPK signalling regulates innate immune responses in immune and intestinal stem cells*** 16;30(6):1123-36
- \*Kiewisz J, Kaczmarek MM, Andronoeska,(2011) ***Gene expression of Wnts,  $\beta$  – catenin and E – cadherin during the placentation period of pregnancy in pigs – involvement of steroid hormones.*** 76(4):687-99
- \*Kim YJ, Park HS, Park MH, Suh SH (2005). ***Oxidative stress-related gene polymorphism and the risk of preeclampsia,*** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* Mar 1; 119(1):42-6.

\*Koffel BL. (1999) ***Physiologic adaptation to pregnancy..The healthy parturient.***  
***En: Norris MC, editor. Obstetric Anesthesia.*** 2<sup>a</sup> edición. Filadelfia: Lippincott  
Williams & Wilkins.p.3-2.

\*Kraibi. AA, Solhaug MJ et. al. mayo (2002). ***Renal Interstitial hydrostatic pressure  
and natriuretic responses to volumen expansión in pregnant rats.*** Am J Physiol  
Renal Physiol. 282 (5): F821 - 825

\*Kirsty G Pringle, Tamas Zakar, Della Yates, Carolyn M Mitchell, Jonathan J. (2011),  
***Molecular evidence of a (pro) renin receptor system in human intrauterine  
tissues in pregnancy and its association with PGHS – 2).*** Journal of Renin  
Angiotensin Aldosterone System, 12: 304 originally published online 11 August 2010.

\*Kuame Adu (2015). ***Nitric oxide dysregulation in the pathogenesis of  
preeclampsia among Ghanaian women.*** Integr Blood Press Control. 2015; 8: 1–6.

\*K. W. Beyenbach, H. Wiecek, J. Exp Biol. 209, 577 (2006)

\*Lindheimer, MD; Katz, AK. (1985). ***Hypertension in Pregnancy.*** N. Engl. J. Med.,  
313: 675-680

\*Lu W, Tu Z, Wang S, Lu J, Wang Q.(2013) ***Patiotemporal expression of Wnt  
signaling pathway components during bovine placental development.*** 25 (4):  
778 - 85

\*Luca Grumolato, Guizhong Liu, Tomomi Harema, ***β-Catenin-Independent  
Activation of TCF1/LEF1 in Human Hematopoietic Tumor Cells through  
Interaction with ATF2 Transcription Factors.*** H. Leighton Grimes, Editor

\*Ludwing J, Kerscher S, Brandt U, Pfeiffer K, Getlawi F, AppsDK, et. Al. ***Identification  
and caracterización of a novel 9.2 – Kda membrane sector – associated protein***

*of vacuolar proton ATPase from chromaffin granules.* J Biol Chem 1998; 273: 10939 – 47.

\*Manuela Velásquez Berrio, Aura María Gil Villa, ***El plasma de mujeres con preclampsia induce una respuesta inflamatoria y oxidativa, que puede ser modulada por la aspirina.***

\* Manne Krop, Xifeng Lu, A.H. Jan Danser, and Marcel E. Meima (2013). ***The (pro)renin receptor. A decade of research: what have we learned?*** Pflugers Arch. 2013 Jan; 465(1): 87–97. Published online 2012 Apr 28. doi: 10.1007/s00424-012-1105-zPMCID: PMC3553411

\*Mariele E. Van Gijn (2001). ***Cascada Wnt Frizled en enfermedad cardiovascular.*** Elsevier

\*Mark L. Johnson and department of Oral Biology. (2006). ***Diseases of Wnt signaling.*** Northwestern University Feinberg, Scholl of Medicine, Chicago, IL, USA. 41 – 49. Doi: 10 . 1007 / s 11154

\*Moctezuma López Calderón Emilio. ***Análisis de la expresión del receptor a prorenina en el corazón de rata durante el embarazo normal y con preclampsia.***

\*Nabi AH, Kageshima A, Uddin MN, Nakagawa T, Park EY, Suzuki F. (2006). ***Binding properties of rat prorenin and renin to the recombinant rat renin/prorenin receptor prepared by a baculovirus expression system.*** Int J Mol Med. 18:483-8.

\*Nabi and Fumiaki Suzuki Hypertension REVIEW ***Biochemical properties of renin and prorenin binding to the (pro)renin receptor*** Research (2010) 33, 91–97 & 2010 The Japanese Society of Hypertension



\*Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. (2002) ***Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin.*** Clin Invest.109:1417-27

\*Nguyen G. and Danser (2008), ***J. Prorenin and pro (renin) Receptor a Review of Available Data From in Vitro Studies and Experimental Model in Rodents.*** Experimental Physiology. 557 - 563

\*Nicolás Roberto Robles, PhD, MD, Isis Cerezo, MD, and Roman Hernandez - Gallego, MD. (2013) ***Renin Angiotensin System Blocking Drugs.*** Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics. Vol 9 (1) 14 – 33gan,

\*Nielsen AH, Shauser KH, Poulsen K.(2000) ***Current Topic: The uteroplacental renin – angiotensin system.*** 21 (5 – 6): 468 – 77

\*Norikazu Ueki (2015). ***The Relevance of the Renin-Angiotensin System in the Development of Drugs to Combat Preeclampsia.*** Volume 2015, Article ID 572713, 12 pages

\*Patrick G. H Lin Chen, Julie Nardone, et al. (2003). ***Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT.*** Genes Dev 2003 17: 2205 – 2232

\*Ramkumar N, Stuart D. Calquin M.,(2012) ***Nephron specific deletion of the prorenin receptor causes a urine concentration of defect.*** 84 (12):1643 - 50

\*Reece Albert E. John C. Hobbins. 3a edición. ***Obstetricia clínica.*** Buenos Aires Argentina. Editorial medica panamericana. 2007. Pp 633, 683, 684.

\*Renaud Morales, Yves Watier and Zsolt Böcskei ***Journal of Molecular Biology Human Prorenin Structure Sheds Light on a Novel Mechanism of Its Auto inhibition and on Its Non-Proteolytic Activation by the (Pro)renin Receptor***



- \*Robson SC, Hunter S, Boys RJ, Dunlop W. (1989) ***Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy.*** Am J Physiol. April. 256 (4): H 1060 - 1065
- \*Robson, A. S. Santos, Anderson J. Ferreira and Ana Cristina Simoes e Silva. (2008) ***Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2 – angiotensin (1-7)-Mas axis.*** Experimental Physiology. 93 (5). pp 519 – 527
- \*Roura (2007) ***Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits..*** 26(1):89-100
- \*Saris JJ, Van den Eijnden MMED, Lamers JMJ, Saxena PR, Schalekamp MADH, Danser AHJ. (2002). ***Prorenin-induced myocyte proliferation: no role for intracellular angiotensin II.*** Hypertension. 39:573-7
- \*Satomi Takeo, Selene K. Swanson, Kavyasree (2012). ***Shaggy/ glycogen synthase kinase 3  $\beta$  and phosphorylation of Sarah/regulator of calcineurin are essential for completion of Dorsophila female meiosis.*** Stowers Institute for Medical Research, Kansas City, Mo 64110
- \*Shefe JM. Menk M, Reinemund J, Effertz K, Hobbs RM, Pandolfi PP, et. Al.(2006) ***A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin / prorrenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein.*** 2006. 99
- \*Shingo Satofuka.(2009) ***(Pro)renin Receptor–Mediated Signal Transduction and Tissue Renin-Angiotensin System Contribute to Diabetes-Induced Retinal Inflammation.*** Diabetes Vol 68

- \*S. Sonderegger, J. Pollheimer, M. Knofler. (2010). ***Wnt Signalling in Implantation, Decidualization*** – Review. Europe PCM Funders Group. 31 (10): 839 – 847.
- \*Susuky, Sakoda Marinyo, Ichihara Atsihiro, Tomoko (2007). ***(Pro) renin receptor – mediated activation of mitogen – activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells***. Hypertension Res, 30: 1139 – 1146; 2007
- \*Tymothy L. (2010-) ***Reudelhuber. Prorenin, Renin, and Their Receptor*** (Moving Targets). Hypertension American Heart Association Learn and Live. 55: 1071 – 1074
- Varun Chaudhary Kerstin Spirohn (2010). ***Wnt/Frizzled Signaling Requires PRR, the Drosophila Homolog of the Prorenin Receptor***.
- \*Walsh, P. C. Retik, A. B. Vaughan, E. D. and Wein, A. J. (2005) Cap. 7. ***Hipertensión Renovascular y Nefropatía Isquémica***. Urología de Campbell. Tomo I. Panamericana, 8a edición. Argentina
- \*Wang Y.(2001) ***Signal transduction in cardiac hypertrophy – dissecting compensatory versus pathological pathways utilizing a transgenic approach***. Current Opinion Pharmacology; 1(2): 134 – 140.
- \*Yoichi Oshima, Satoshi Marimoto, Atsuhiro Ichihara. ***Roles of the (Pro) renin receptor in the kidney***. World J Nephrol 2014 November 6; 3 (4): 302 – 307
- \*Zalba G., José G. S., Moreno M. U., et al. (2001) ***Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase***. Hypertension, ;38(6):1395–1399. doi: 10.1161/hy1201.099611.
- \*Zhang Y, Peng S, Kuang H. ***Expression and regulation of Dickkopf2 during preimplantation in mice***
- \*Zhao Z.(2014) ***TGFβ and Wnt in Cardiac Outflow Tract Defects in Offspring of Diabetic Pregnancies***. 101(5):364-70.

