

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez"

División de estudios de posgrado



**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD**



**DETERMINACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES  
 $\alpha_1$ - ADRENÉRGICOS EN ARTERIAS CORIONICAS DE MUJERES  
EMBARAZADAS CON PROCESOS HIPERTENSIVOS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA**

**Q.F.B. JESSICA VILLA AMBRIZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**M en C. VÍCTOR MANUEL FARÍAS RODRÍGUEZ**

Agosto del 2013

## ÍNDICE GENERAL

Índice general	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iii
Lista de abreviaturas	iv
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Embarazo.	2
1.2 Adaptaciones fisiológicas.	2
2. Trastornos hipertensivos del embarazo.	3
3. Preeclampsia.	4
3.1 Epidemiología de la Preeclampsia.	4
3.2 Diagnostico de la Preeclampsia.	5
3.3 Fisiopatología de la Preeclampsia.	6
4. La Placenta.	6
4.1 Papel de la placenta en la Preeclampsia.	8
5. Receptores adrenérgicos.	9
<b>II. JUSTIFICACIÓN.</b>	<b>11</b>
<b>III. HIPOTESIS.</b>	<b>12</b>
<b>IV. OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>13</b>
<b>V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	<b>13</b>
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>14</b>
1. Obtención de las placentas.	14
1.1 Obtención de las arterias coriónicas.	15
2. Estudio funcional.	15
3. Estudio Molecular.	16

4. Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.	16
5. Análisis por western blot de los receptores $\alpha_1$ - Adrenérgicos en arterias coriónicas.	17
5.1 Electroforesis.	17
5.2 Transferencia.	17
5.3 Tinción con rojo de Ponceau.	17
5.4 Bloqueo de membranas.	18
5.5 Reacción quimioluminiscente.	18
6. Análisis de resultados.	18
<b>VII. RESULTADOS.</b>	19
1. Reactividad vascular.	19
2. Determinación funcional de los receptores $\alpha_1$ -Adrenérgicos	20
3. Determinación de los niveles proteicos de los subtipos de receptores $\alpha_1$ -Adrenérgicos ( $\alpha_{1A}$ , $\alpha_{1B}$ , $\alpha_{1D}$ ).	21
3.1 Niveles proteicos del receptor $\alpha_{1A}$ en arterias de coriónicas.	21
3.2 Niveles proteicos del receptor $\alpha_{1B}$ en arterias de coriónicas.	22
3.3 Niveles proteicos del receptor $\alpha_{1D}$ en arterias de coriónicas.	23
<b>VIII. DISCUSIÓN.</b>	24
<b>IX. CONCLUSIONES.</b>	27
<b>X. BIBLIOGRAFÍA.</b>	28
<b>XI. ANEXOS.</b>	31
1. Consentimiento informado.	31
2. Ficha clínica	32
3. Soluciones	33
4. Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.	33
5. Soluciones para Western Blot.	34

**ÍNDICE DE TABLAS**

- |   |   |
|---|---|
| 1. Factores de riesgo asociados con Preeclampsia. | 5 |
|---|---|

**ÍNDICE DE FIGURAS**

- |   |    |
|---|----|
| 1. Tensión inducida por segmentos arteriales.                           | 19 |
| 2. Registro típico (Curva a concentraciones crecientes de Fenilefrina). | 20 |
| 3. Niveles proteicos del receptor adrenérgico $\alpha_{1A}$ .           | 21 |
| 4. Niveles proteicos del receptor adrenérgico $\alpha_{1B}$ .           | 22 |
| 5. Niveles proteicos del receptor adrenérgico $\alpha_{1D}$ .           | 23 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ARs</b>	Adrenoreceptores.
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina.
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de calcio.
<b>CCR</b>	Curvas concentración respuesta.
<b>cm</b>	Centímetros.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono.
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b>	Dextrosa.
<b>EDTA</b>	ácido tetraacético.
<b>EE</b>	Error estándar.
<b>g</b>	Gramos.
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial.
<b>HTG</b>	Hipertensión gestacional.
<b>Kg</b>	Kilogramo.
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio.
<b>KDa</b>	Kilodalton.
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato monobásico de potasio.
<b>M</b>	Molar.
<b>mg</b>	miligramo.
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnesio.
<b>ml</b>	mililitro.

<b>mm</b>	milímetro.
<b>mM</b>	milimolar.
<b>mmHg</b>	milímetros de mercurio.
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio.
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sodio.
<b>NaOH</b>	Hidroxido de sodio.
<b>NO</b>	Óxido nítrico.
<b>nm</b>	nanómetro.
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica.
<b>PE</b>	Preeclampsia.
<b>PSA</b>	Presión arterial sistólica.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>SDG</b>	Semanas de gestación.
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato.
<b>SNA</b>	Sistema nervioso autónomo.
<b>U.A</b>	Unidades arbitrarias.
<b>µg</b>	microgramos.
<b>µl</b>	microlitros.

## I. INTRODUCCIÓN

El embarazo se caracteriza por profundos cambios hemodinámicos, tales como aumento del gasto cardiaco, disminución de la resistencia vascular y cambios en la regulación de la presión arterial, los cuales proceden a un aumento en el flujo sanguíneo uterino que permanece hasta el parto, con el fin de asegurar el desarrollo normal del feto (Brook L, 2010; Zhang H, 2008). Estas adaptaciones requieren de cambios en la estructura y reactividad que ayudan a la tolerancia de un aumento significativo del volumen plasmático, del mismo modo el hecho de establecer completamente la adaptación cardiovascular a la expansión del volumen plasmático, puede tener profundas implicaciones para el desarrollo del embarazo (Jones W, 2009).

Una proporción importante de los embarazos se complica por una o más enfermedades que interfieren con las adaptaciones fisiológicas del embarazo, incrementando el riesgo de fracaso, un ejemplo de este tipo son las enfermedades hipertensivas del embarazo, se presentan con una frecuencia del 6-10% de todas las gestaciones, las cuales se clasifican en: Preeclampsia, Hipertensión crónica aislada o con Preeclampsia sobreagregada e Hipertensión Gestacional, donde la Preeclampsia es la principal causa de morbimortalidad materna y perinatal, los mecanismos responsables de ésta patología aún no están claros, sin embargo, se caracteriza por un aumento en la resistencia vascular sistémica, alta sensibilidad a los agentes vasoconstrictores y una disminución en la formación de los agentes vasodilatadores, este desequilibrio provoca disfunción endotelial, la cual participa en la patogénesis de la hipertensión arterial materna.

Múltiples mecanismos están implicados en la adaptación de la contractilidad arterial uterina durante el embarazo, por lo que nos resulta importante identificar la actividad funcional de los receptores alfa-1 adrenérgicos como mecanismo en la regulación del flujo sanguíneo y la oxigenación placentaria.

## **1.1 EMBARAZO.**

Se conoce como embarazo, al periodo de gestación o proceso de crecimiento y desarrollo de un nuevo individuo en el útero materno, este abarca desde la fecundación del óvulo por el espermatozoide hasta el momento del parto. En el embarazo se presentan procesos de crecimiento y desarrollo del feto en el útero, al mismo tiempo que la madre experimenta una serie de modificaciones fisiológicas y anatómicas.

## **1.2 Adaptaciones fisiológicas.**

El embarazo es un estado fisiológico en donde ocurren cambios a nivel anatómico, bioquímico y endocrino, asociado a significativos cambios hemodinámicos, cardiovasculares, en la alimentación y las necesidades metabólicas necesarias para cubrir las necesidades del feto y la madre (Raouf A, 2002).

Durante el embarazo, el gasto cardiaco incrementa hasta un 50% en comparación con la mujer no gestante, atribuyéndose estas modificaciones a una elevación de la frecuencia cardiaca (15 a 20% mayor que en la mujer no embarazada), los valores de presión arterial media disminuyen temporalmente siendo por la mitad del mismo 10 a 15 mmHg más bajos en el posparto, existen incrementos en el flujo sanguíneo, del consumo de oxígeno y nutrientes necesarios para el desarrollo fetal, por lo cual las arterias uterinas mantienen una baja resistencia, lo anterior esta favorecido por la remodelación vascular ( Purizaca M, 2010; Zhang H, 2008). Estos cambios también están asociados al incremento en el flujo sanguíneo renal y a la disminución de la resistencia vascular renal, así como a la disminución de la respuesta presora y reactividad vascular a los vasoconstrictores tales como los agonistas alfa adrenérgicos y la angiotensina II (Raouf A, 2002).

## 2. TRASTORNOS HIPERTENSIVOS DEL EMBARAZO.

La hipertensión arterial (HTA) es la complicación médica más frecuente durante el embarazo. Se presenta en un 8 a 10 % de todas las gestaciones y es la principal causa de mortalidad materna en el mundo (Marín IR, 2011). La prevalencia de Hipertensión arterial sistémica en México es de 30% según la Encuesta Nacional de salud en el año 2000; siendo esta baja en el grupo de mujeres entre 20 y 34 años de edad. Sin embargo, a pesar de ser sanas en su gran mayoría, ellas pueden presentar enfermedad hipertensiva durante el embarazo en cualquiera de sus formas, por lo que resulta importante la prevención primaria de la hipertensión arterial para disminuir la mortalidad materna, la cual es de 62.6 muertes maternas por cien mil nacidos vivos en el año 2004 (Urquiza JP, 2010).

Las diferentes patologías hipertensivas que ocurren durante el embarazo tienen diversas causas y expresiones, y se agrupan bajo el nombre de síndromes hipertensivos del embarazo. El diagnóstico de hipertensión arterial durante el embarazo se define con una presión arterial sistólica (PAS)  $\geq$  de 140 mmHg y/o presión arterial diastólica (PAD)  $\geq$  de 90 mmHg, durante el embarazo también se establece el diagnóstico de hipertensión arterial cuando existe un aumento de PAS de 30 mmHg o de 15 mmHg de PAD, con relación a un control previo. Es fundamental la confirmación de dos o más registros de cifras de tensión arterial elevada por lo menos en dos oportunidades separadas por un intervalo de cuatro a seis horas (Marín IR, 2011; Quintana NP, 2003).

Los procesos hipertensivos del embarazo se clasifican de acuerdo a la (NHBPEP por sus siglas en inglés National High Blood Pressure Education Program Working Groups on High Blood Pressure in Pregnancy) es la siguiente:

1. **Hipertensión crónica.** Hipertensión previa al embarazo que se descubre antes de las 20 SDG, persiste 12 semanas después del parto.
2. **Preeclampsia.** Hipertensión que se presenta después de las 20 SDG y se acompaña de proteinuria  $\geq 0.3g/24$  horas.
3. **Preeclampsia sobreagregada en hipertensión arterial crónica.** Preeclampsia que aparece en gestantes previamente hipertensas.

4. **Hipertensión arterial gestacional.** Aparece después de las 20 SDG y no se acompaña de proteinuria.

### **3. PREECLAMPSIA.**

La Preeclampsia (PE) es un trastorno multisistémico, de presentación progresiva, causa aún desconocida y que conlleva con frecuencia a graves complicaciones maternas y perinatales. Se caracteriza por vasoespasmo y activación endotelial y se define por la presencia de hipertensión y proteinuria, después de la semana 20 de gestación (Curiel-Balsera, 2011), el cual puede incluir anormalidades multisistémicas, síndrome de HELLP (hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y plaquetopenia), coagulación intravascular diseminada, insuficiencia renal aguda, convulsiones y edema pulmonar. El síndrome fetal incluye la restricción del crecimiento fetal, tamaño pequeño para edad gestacional, reducción del líquido amniótico, insuficiencia placentaria que conduce a hipoxia fetal y a hipertensión (Uzan J, 2011).

#### **3.1 Epidemiología de la Preeclampsia.**

La PE forma parte de los desórdenes hipertensivos del embarazo, siendo el más frecuente de todos ellos. Representa una de las causas más importantes de morbilidad materna y perinatal, afectando del 2 al 7 % de los embarazos en todo el mundo. Aunque esta puede ser mayor en entornos socioeconómicos más desfavorecidos y también en países donde hay más prevalencia de enfermedades cardiovasculares, con estimaciones de más de 60,000 muertes maternas al año (Wang A, 2009; Egan LA, 2007; Curiel-Balsera E, 2011). En México, la PE es una de las complicaciones más frecuentes del embarazo, que afecta a un 15 % de las mujeres embarazadas según la secretaria de salud del 2009 (Uzan J, 2011). Se han implicado múltiples factores de riesgo en el desarrollo de la PE (tabla 1).

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON PREECLAMPSIA	
PE o HTA en embarazo previo.	Enfermedad autoinmune.
Gestación múltiple.	Obesidad.
Edades maternas extremas.	Dislipidemia previa.
Historia familiar de PE o HTA (madre o hermana).	
Enfermedad renal.	
Diabetes mellitus pregestacional.	
Nuliparidad.	

**Tabla 1.** Modificada de Marín-Iranzo R, 2011

### 3.2 Diagnóstico de la Preeclampsia

La PE es un síndrome que se presenta después de las 20 semanas de gestación (SDG) y se diagnostica por hipertensión y proteinuria. La PE puede ser leve o severa, la preeclampsia leve se caracteriza por una presión arterial sistólica de al menos 140 mmHg y una presión diastólica de 90mmHg, por lo menos en dos ocasiones y por lo menos de 4 a 6 horas después de la semana 20 de gestación en mujeres sin hipertensión antes del embarazo, con proteinuria (concentración proteica  $\geq 300$  mg en una muestra de orina de 24 horas). La preeclampsia severa se caracteriza por una presión sistólica de al menos 160 a 170 mmHg y 110 mmHg de la presión arterial diastólica, acompañadas por una concentración proteica  $\geq 500$  mg por día, cuando los síntomas tales como cefalea, alteraciones visuales, dolor epigástrico, vomito, afectaciones multiorgánicas del sistema, la morbilidad o mortalidad fetal, el inicio de las 34 o 35 semanas o eclampsia, están presentes también se puede clasificar como severa (Bushnell Ch, 2011).

### **3.3 Fisiopatología de la Preeclampsia.**

Aún no se conoce la causa primaria que desencadena la Pe, por lo que esta patología sigue siendo “la enfermedad de las teorías”. Estas teorías indican que las causas puede ser los factores genéticos, alimentarios, vasculares o neurológicos, etc, pero ninguna de ellas ha llegado a confirmarse. Hasta la fecha los hallazgos reportados a nivel vascular, desde una perspectiva fisiopatológica, en la preeclampsia se caracterizan por una invasión anormalmente superficial del citotrofoblasto en las arterias espirales durante la placentación, lo que da como resultado la conservación del tejido del musculo liso vascular en estas arterias y ello modifica su capacidad de respuesta a diferentes agentes vasoactivos. Otro reporte central en este síndrome es la disfunción endotelial, que involucra un estado de estrés oxidativo, la disminución en la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial, un aumento en las concentraciones de homocisteína circulante, dislipidemia, una amplificación de la actividad simpática. Existe además, elevación de las resistencias vasculares sistémicas, activación de la cascada de la coagulación e incremento de la agregación plaquetaria, también se considera a la preeclampsia como un síndrome inflamatorio sistémico (Egan V, 2007).

## **4. LA PLACENTA**

La placenta es un órgano en forma discoidal que tienen un diámetro aproximado de 15-20 cm y un espesor de 1.5-2.4 cm, con un peso medio aproximado de 500g, la cual se extiende sobre la cuarta parte de la cavidad uterina. Este es un órgano fundamental en el embarazo, ya que constituye la conexión vital del feto con la madre. A través de la placenta es posible comprender el desarrollo del ser humano desde su etapa de mayor cambio, mayor crecimiento y mayor especialización. El crecimiento fetal normal puede definirse como el resultado de la expresión de su potencial genético para tal efecto, sin que se vea excesivamente limitado o favorecido por factores internos o externos y, no se puede hablar de crecimiento fetal sin vincular directamente la función placentaria en este hecho (Gallegos S, 2008).

En los seres humanos, la placenta completamente desarrollada se compone de 3 capas principales, la capa externa de la madre que incluye células deciduales del útero, así como la vasculatura materna que lleva la sangre hacia/desde el sitio de implantación. Un sitio de unión medio que conecta la placenta fetal al útero y contiene células fetoplacentarias (trofoblastos), los cuales invaden la pared del útero y los vasos maternos, esta invasión es un mecanismo crucial para el desarrollo de la vascularización fetoplacentaria y finalmente una capa interna, compuesta de un gran número de microvellosidades, las cuales se encargan del eficiente intercambio de gases y nutrientes para el feto (Tsatsaris V, 2006; Watson D, 2005)

Después de la fecundación la captura de los nutrientes se realiza por medio de difusión de los mismos, procedentes del entorno conformado por un medio líquido acuoso. A medida que el embrión aumenta de tamaño, la captura de nutrientes del entorno se torna insuficiente de no desarrollarse el mecanismo de transferencia directa de nutrientes de la circulación materna al feto. Un crecimiento fetal adecuado solo es posible si desde la circulación materna se transfiere al feto, a lo largo de la gestación, una cantidad suficiente de gases, nutrientes, agua y electrolitos, ya que el feto es completamente dependiente de su madre en lo que se refiere a nutrición respiración y excreción (Gallegos S, 2008).

La placenta humana presenta una organización progresiva y funcional, que de manera sincrónica se adapta a las necesidades del desarrollo de los compartimientos embrionario/fetal y maternos. Los patrones tiempo-espacio de adaptación están controlados por diversos factores como la capacidad invasora de las células del trofoblasto y la proliferación y diferenciación celular en la adquisición de capacidades de transferencia placentaria, así como la capacidad de adaptación a procesos patológicos que pueden interferir con su fisiología (Sherer DM, 2001).

La placenta se encuentra conectada al feto a través de 50-60 cm de cordón umbilical, el cual guarda una resistencia vascular excepcionalmente baja para no disminuir de manera importante la fuerza ejercida por el corazón sobre la sangre que tiene que llegar a la zona de intercambio. A medida que el embarazo progresa, se desarrolla la arborización de las

vellosidades y el lecho vascular aumenta, lo que da como resultado un flujo fetal umbilical de aproximadamente 115ml/min/kg (Kelly B, 1999).

El aumento en el flujo sanguíneo placentario, es parte del proceso de maduración funcional de la placenta y es una condición para incrementar la perfusión necesaria para el aporte de nutrientes y oxígeno al feto en constante crecimiento. Este incremento en el flujo sanguíneo es más del necesario para la subsistencia del feto y le da margen de seguridad ante descensos transitorios en el flujo sanguíneo. Otro factor importante en el incremento del flujo sanguíneo uterino, es la serie de cambios originados en el sistema cardiovascular materno, cuya alteración da lugar a importantes alteraciones en el aporte. A través de notables cambios adaptativos el feto asegura su aporte nutricional y de oxígeno. Esto sucede gracias al incremento de la poscarga cardíaca materna, el aumento en el volumen sanguíneo y la disminución de las resistencias vasculares (Kelly B, 1999).

### **4.1 Papel de la placenta en la Preeclampsia.**

La placenta juega un papel central en la patogenia de la PE, ya que este síndrome solo ocurre en presencia de la placenta y una vez que esta se retira la enfermedad se revierte (Wang A, 2009). La vascularización coordinada de la placenta es esencial para su desarrollo e involucra procesos de vasculogénesis (Formación de nuevos vasos sanguíneos). La placentación normal implica un proceso de dos etapas incluyendo la formación de una red de ramificación de los vasos dentro de las vellosidades coriónicas de origen fetal, seguido por la modificación de la red vascular de alta resistencia relativamente hipóxico en un circuito de baja resistencia con el aumento de la tensión de Oxígeno. Durante etapas tempranas del embarazo el desarrollo normal de la placenta, citotrofoblastos originarios del feto invaden las arterias espirales uterinas y progresivamente reemplazan las células endoteliales y del musculo liso vascular. Al final del segundo trimestre las arterias espirales se han convertido en tubos de mayor calibre, esta remodelación resulta en la formación de un sistema de arterias de baja resistencia el cual asegura suficiente sangre para la nutrición y crecimiento del feto. Una invasión inadecuada da como resultado la

conservación de tejido del musculo liso vascular de las arterias espirales y su capacidad de respuesta a diferentes agentes vasopresores, así como una persistente hipoxia placentaria que conlleva a isquemia placentaria, disfunción endotelial materna y finalmente el cuadro clínico de la PE (Wang A, 2009; Walter P, 2008).

## 5. RECEPTORES ADRENÉRGICOS

La homeostasis del aparato cardiovascular es controlada por el Sistema Nervioso Autónomo (SNA), a través del sistema nervioso simpático (adrenérgico) y del sistema nervioso parasimpáticos (colinérgico) (Tacchi H, 2008). El sistema nervioso autónomo, también conocido como sistema nervioso simpático o adrenérgico es responsable de la respuesta involuntaria, este se encarga del control de los órganos viscerales, incluyendo el corazón y los vasos sanguíneos, las fibras simpáticas liberan norepinefrina, la cual se une a los receptores adrenérgicos para ejercer su acción, este tipo receptores tiene un papel clave en la modulación de la actividad del sistema nervioso simpático (Gail D, 2011).

Para control simpático del sistema cardiovascular, la norepinefrina actúa sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el corazón para modular la función cardiaca y los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en los vasos sanguíneos para modular la resistencia arterial y la capacitancia venosa. Los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  están implicados en la vasoconstricción simpática, los subtipos de receptores específicos que están implicados varían entre los lechos vasculares, entre los grandes y pequeños vasos, entre las arterias y las venas, e incluso entre especies. En general los subtipos de receptores  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1D}$  han sido implicados con mayor frecuencia en la regulación del musculo liso vascular (Gail D, 2011).

Los receptores adrenérgicos (ARs), son estructuras moleculares que en las células del organismo reciben selectivamente la señal de la adrenalina y la norepinefrina, y responden transformándola en una respuesta celular específica. En 1948 Ahlquist postuló la existencia de dos tipos de ARs,  $\alpha$ -ARs y  $\beta$ -ARs (Flores J, 2005). Actualmente los receptores adrenérgicos han sido clasificados en 9 subtipos ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\beta_1$ ,

$\beta_2$ ,  $\beta_3$ ), forman parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G de membrana, los cuales median la acción de las catecolaminas endógenas como la norepinefrina y adrenalina (Piascik, 2001., Woodcok, 2008).

Este tipo de receptores se encuentran diseminados por todo el organismo, los receptores  $\alpha_1$  se encuentran principalmente en: vasos arteriales del territorio abdominal (riñón, mesenterio, intestino), en los vasos de la piel y las mucosas, en la cápsula esplénica, en el musculo dilatador del iris y en los músculos pilomotores etc., mientras que los receptores  $\beta$  se encuentran principalmente en las arteriolas de los músculos esqueléticos, en algunas porciones del mesenterio, en el árbol bronquial, en el hígado y en el miocardio (Barroso H, 1970).

Los  $\alpha_1$ ARs ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ) son los principales mediadores de la contracción muscular (Piascik, 2001), la activación de los receptores  $\alpha_1$  desencadena:

Vasoconstricción abdominal (riñón, mesenterio, intestino).

Inhibición del peristaltismo.

Vasoconstricción de la piel y de las mucosas.

Elevación de la presión arterial.

Contracción pilomotor (piel de gallina)

Útero (en el embarazo).

## II. JUSTIFICACIÓN

La Preeclampsia es un proceso hipertensivo específico del embarazo que representa la principal causa de muerte materno fetal.

Se desconoce la causa de la Preeclampsia, hasta el momento la teoría más aceptada está relacionada con una inadecuada invasión trofoblástica en arterias espirales uterinas así como mecanismos fisiopatológicos relacionados con el nivel de óxido nítrico.

La presión arterial está regulada por el sistema adrenérgico en condiciones normales y de embarazo, sin embargo, se desconoce si este opera a nivel de vasos placentarios.

Por lo anterior es de nuestro interés evaluar las respuestas vasomotoras inducidas por los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y la presencia de estos a nivel de vasos placentarios en la Preeclampsia.

### III. HIPOTESIS

Los receptores  $\alpha_1$ -Adrenergicos participan en la respuesta vascular de mujeres embarazadas que cursan por un proceso hipertensivo.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la respuesta y la presencia de los receptores  $\alpha_1$ - adrenérgicos en arterias coriónicas de placentas, obtenidas de mujeres embarazadas afectadas por algún proceso hipertensivo.

#### **V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar la respuesta funcional de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ , en arterias coriónicas de placenta humana.

Determinar los niveles proteicos de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ , en arterias coriónicas.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. OBTENCIÓN DE LAS PLACENTAS

Con la aprobación de los comités de ética del Hospital de la Mujer de la ciudad de Morelia Michoacán, se obtuvieron placentas de mujeres embarazadas que acudieron al servicio de Ginecología y Obstetricia durante el periodo de Enero del 2012 a Diciembre del 2012, el tejido se obtuvo inmediatamente después del parto vía vaginal o por cesárea, tomando en consideración los siguientes criterios.

#### **Criterios de inclusión:**

Placenta de mujeres gestantes con diagnóstico de Preeclampsia.

Placenta de mujeres gestantes con diagnóstico de Hipertensión Gestacional (HTG).

Consentimiento informado.

#### **Criterios de exclusión:**

Placenta de mujeres con obesidad mórbida.

Diabetes mellitus.

Uso de drogas de abuso.

Postmaturia (> 41 SDG).

Anormalidades fetales.

Desordenes cardiovasculares.

Daño renal.

Corioamnionitis.

#### **Criterios de eliminación:**

Tejido no funcional.

## 1.1. Obtención de las arterias coriónicas.

Las placentas se obtuvieron inmediatamente después del parto vía cesárea y se colocaron en solución KREBS fría (116mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8mM MgSO<sub>4</sub>, 19mMNaHCO<sub>3</sub>, 5.5mM glucosa y 0.026mM EDTA). Se transportaron al laboratorio de acuerdo a los criterios de la Norma oficial mexicana *NOM-087-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico infecciosos-Clasificación y especificación de manejo*. Las placentas fueron utilizadas en la experimentación en menos de 6horas después del alumbramiento, se tomo una primera muestra para el estudio funcional, así como otra porción de tejido se conservo a -40°C para estudios moleculares posteriores. Las arterias estudiadas fueron ramas de 2° y 3° orden pertenecientes a la placa coriónica placentaria.

## 2. ESTUDIO FUNCIONAL

Para no deteriorar el tejido, se separo en primer lugar el amnios y se aislaron por disección fina las arterias coriónicas superficiales, de aproximadamente 1mm de diámetro.

Las arterias fueron inmediatamente introducidas en solución nutritiva KREBS y se eliminaron los restos de sangre y tejidos adyacentes, se cortaron los vasos para la obtención de anillos de aproximadamente 3-5mm de longitud, posteriormente los anillos se colocaron en el fondo de la cámara de órgano aislado, suspendidos entre dos ganchos uno de los cuales se sujeta a la base de la cámara, de tal forma que la arteria queda en posición horizontal y el otro extremo del gancho se conecta a un transductor de tensión isométrica, el cual a su vez se acopla a un amplificador de señal para registrar la variación de la tensión ejercida por los segmentos de arteria como resultado de su contracción o relajación.

Se aplicó una tensión óptima de reposo de 3g, el proceso anterior se realizo en un baño de 10mL de solución KREBS a 37°C (pH 7.4) y continuamente burbujeado con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>). Se estabiliza el tejido durante un periodo de 60-90 min con lavados cada 20 min, posteriormente se bloqueo farmacológicamente la producción de agentes vasodilatadores (NO y Prostacilinas), y con el fin de analizar la viabilidad del tejido, los segmentos arteriales fueron sometidos a un estímulo despolarizante (KCl 80 mM), los segmentos arteriales que desarrollaron una contracción frente a este estímulo menor a 0.5g fueron descartados.

Una vez que se observó la respuesta funcional, mediante lavados se retiró el KCl 80mM, y el tejido permaneció en reposo durante 60 min con lavados cada 20 min hasta alcanzar nuevamente la tensión basal. Posteriormente se realizaron curvas concentración respuesta (CCR) a Fenilefrina adicionando al baño de órganos concentraciones acumulativas del fármaco ( $10^{-9}$ M hasta  $10^{-5}$  M), cada concentración se añadió cuando la inmediata anterior desarrolló su efecto máximo. Las CCR fueron llevadas a cabo en presencia de Propranolol (bloqueador de receptores  $\beta$  Adrenérgicos), Rauwolscina (bloqueador de receptores  $\alpha_2$ -Adrenérgicos), L-NAME (inhibidor de Óxido Nítrico), e Indometacina (bloqueador de prostaciclina).

La tensión fue registrada mediante un transductor de tensión isométrica FT03 Grass el cual es acoplado a un equipo MP100 BIOPAC<sup>®</sup> Santa Barbara, Ca., y este a su vez a una computadora para la adquisición, almacenamiento y manejo de datos a través del software Acqknowledge 3.0.

### **3. ESTUDIO MOLECULAR**

Se tomaron 100mg, aproximadamente, de las arterias coriónicas previamente aisladas y se trituraron en 2ml de solución fría compuesta por (tris 0.1M a pH 7.4, tritón al 0.1% e inhibidor de proteasas), al término el homogenado se dejó reposar por 5min hasta que la espuma disminuyó, posteriormente la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm/15 min a 4°C, se desechó la pastilla y se recuperó el sobrenadante el cual nuevamente se centrifugó a 12,000rpm/20min a 4°C; se recuperó el sobrenadante el cual fue separado en alícuotas y se almacenó a -80°C.

### **4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD.**

Se construyó una curva patrón a partir de una serie de soluciones de concentración conocida de albúmina sérica bovina (BSA) contra la absorbancia correspondiente. Estos valores fueron graficados, se utilizó el programa de Microsoft Office Excel, se ajustó la curva por regresión lineal y se calculó su coeficiente de correlación, a partir de esta gráfica y por extrapolación se determinó la cantidad de proteínas totales presentes en la muestra.

Posteriormente se tomó una alícuota de 10 $\mu$ l de proteína de cada una de las muestras y se desnaturalizó en una solución 1:1 con NaOH 0.2M. Se obtuvo la concentración de proteína total presente en cada una de las muestras por el método de Bradford, con el

empleo de la curva de calibración (BSA), las muestras así como los puntos que conformaron la curva de calibración fueron leídas a una longitud de onda de 595nm.

## **5. ANALISIS POR WESTERN BLOT DE LOS RECEPTORES $\alpha_1$ -ADRENÉRGICOS EN ARTERIAS CORIÓNICAS.**

### **5.1. Electroforesis.**

Se tomaron 40 $\mu$ g de proteína de cada una de las muestras con un volumen de 8 $\mu$ L de buffer de carga (Laemlli 4X), se calentaron en termoblock durante 5 minutos a 95°C.

Se prepararon los geles SDS-PAGE al 10% y se montaron en el equipo de electroforesis (BIORAD), con ayuda de una jeringa Hamilton se cargo una cantidad constante de proteína (40 $\mu$ g) de muestra, en otro pozo se cargó 10 $\mu$ L de marcador de peso (Biorad). Para separar las proteínas la electroforesis se llevo a cabo durante 2:30 horas a 130 voltios.

### **5.2. Transferencia.**

Una vez concluida la electroforesis, las proteínas separadas presentes en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales fueron previamente humectadas en buffer de transferencia, posteriormente fueron colocadas entre capas de papel filtro humectado con buffer de transferencia, se armo un sándwich y se colocó sobre un trans-blot Semi-Dry (Biorad) durante 45 minutos a 15 voltios.

### **5.3. Tinción con rojo de ponceau.**

Finalizada la transferencia, las membranas se lavaron con TBS-Tween durante 10 minutos en agitación constante. Posteriormente sobre la membrana se realizó la tinción con rojo de Ponceau durante 1 minuto para observar que la transferencia se haya llevado a cabo de manera adecuada y en seguida se lavaron las membranas con TBS-Tween hasta eliminar el color rojo.

#### **5.4. Bloqueo de membranas**

Las membranas se bloquearon con una solución de TBS-Tween-Leche al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante. Una vez que se llevo a cabo el bloqueo, las membranas se incubaron con el Anticuerpo primario policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology) contra los receptores  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  (~ 50 KDa) y anticuerpo primario policlonal de ratón (SIGMA-ALDRICH) contra GAPDH (~ 45 KDa), a una dilución 1:500 y 1:10,00 respectivamente, en TBS-Tween-Leche al 0.1%, durante toda la noche a 4°C y agitación constante.

Se recupero el anticuerpo primario y se lavaron las membranas 3 veces con TBS-Tween durante 10 minutos cada lavado, posterior a los lavados las membranas se incubaron con anticuerpo secundario anti-cabra y anti-conejo respectivamente, el cual tienen acoplada la enzima peroxidasa de rábano, se utilizo una dilución 1:1000 en TBS-Tween-Leche al 0.1% por 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante.

Por último se recupero el Anticuerpo secundario y se lavaron las membranas 3 veces con TBS-Tween durante 10 minutos cada lavado.

#### **5.5. Reacción quimioluminiscente.**

Las membranas se impregnaron con sustrato quimioluminiscente (Wester blotting luminol) hasta observar fluorescencia, se colocan en un cassette de radiografía y se expusieron a una placa radiográfica durante 2 minutos. Las placas fueron reveladas y digitalizadas en un scanner HP photosmart Premium. Posteriormente la intensidad de las bandas se determino con un software de análisis de imágenes (ImageJ) y se normalizaron con la intensidad de las bandas de GAPDH.

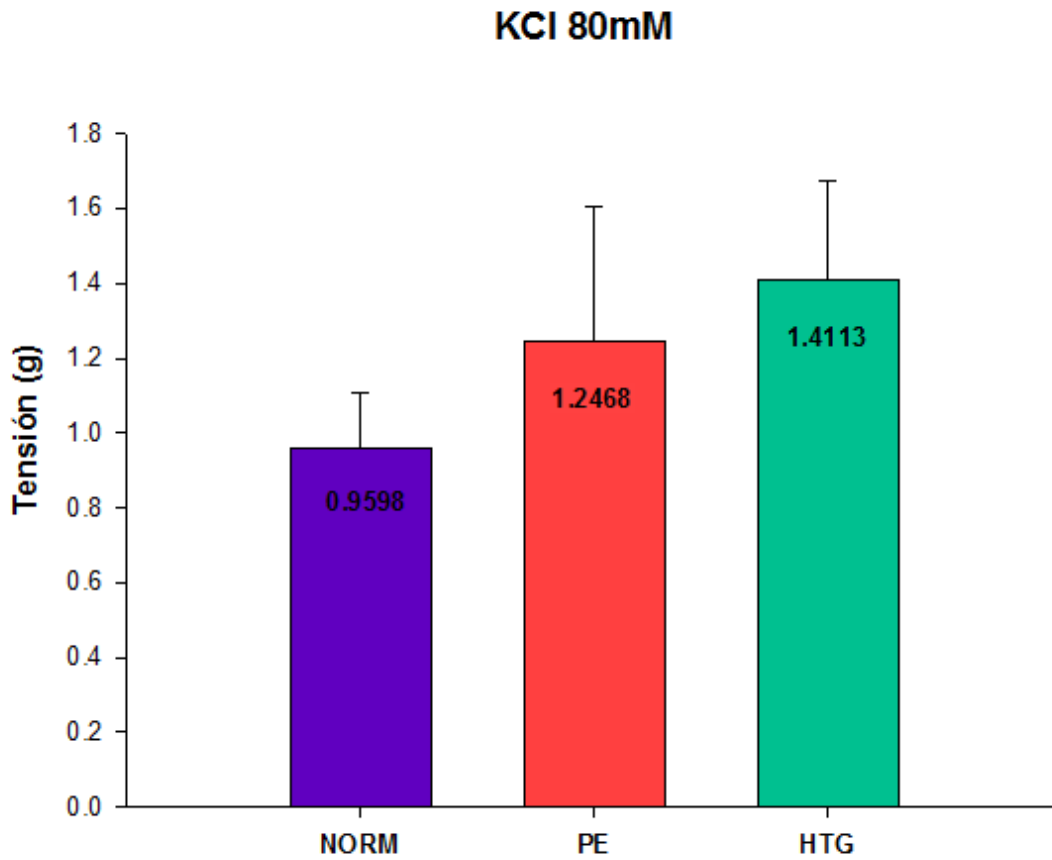
### **6. ANALISIS DE RESULTADOS**

Para determinar diferencias entre grupos, se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguidos de una prueba de contraste. Se considero una diferencia significativa cuando  $p \leq 0.05$ . Los gráficos se realizaron en sigma plot versión 10.0

## VII. RESULTADOS

### 1. REACTIVIDAD VASCULAR

Los resultados obtenidos muestran una respuesta contráctil de los segmentos arteriales al ser expuestos a KCl 80mM en todos los grupos. Se observó una tendencia al aumento de la respuesta contráctil en el grupo de preeclámpticas (PE) e hipertensión gestacional (HTG) con respecto al control sin tener una diferencia estadísticamente significativa (Figura 1).



**FIGURA 1. Tensión en (g) inducida por los segmentos arteriales.** Comparación intergrupar. Segmentos provenientes de placentas de pacientes Normotensas (n= 5), preeclámpticas PE (n= 4) e hipertensión gestacional HTG (n= 4). Los valores representan el promedio  $\pm$  EE.

## 2. DETERMINACIÓN FUNCIONAL DE LOS RECEPTORES $\alpha_1$ -ADRENÉRGICOS

Por otro lado, no se observo respuesta vasoconstrictora mediada por los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos ante el estímulo a concentraciones crecientes de Fenilefrina ( $10^{-9}$  hasta  $10^{-5}$ ) en ninguno de los grupos propuestos (Figura. 2).

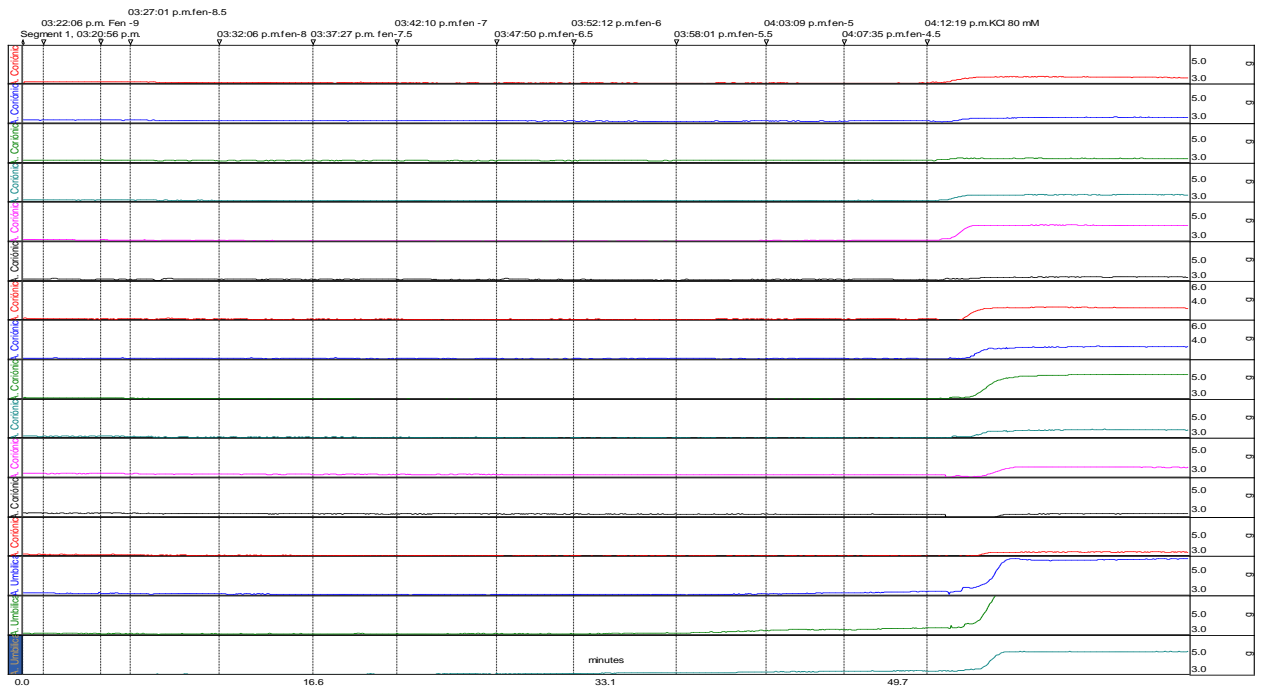
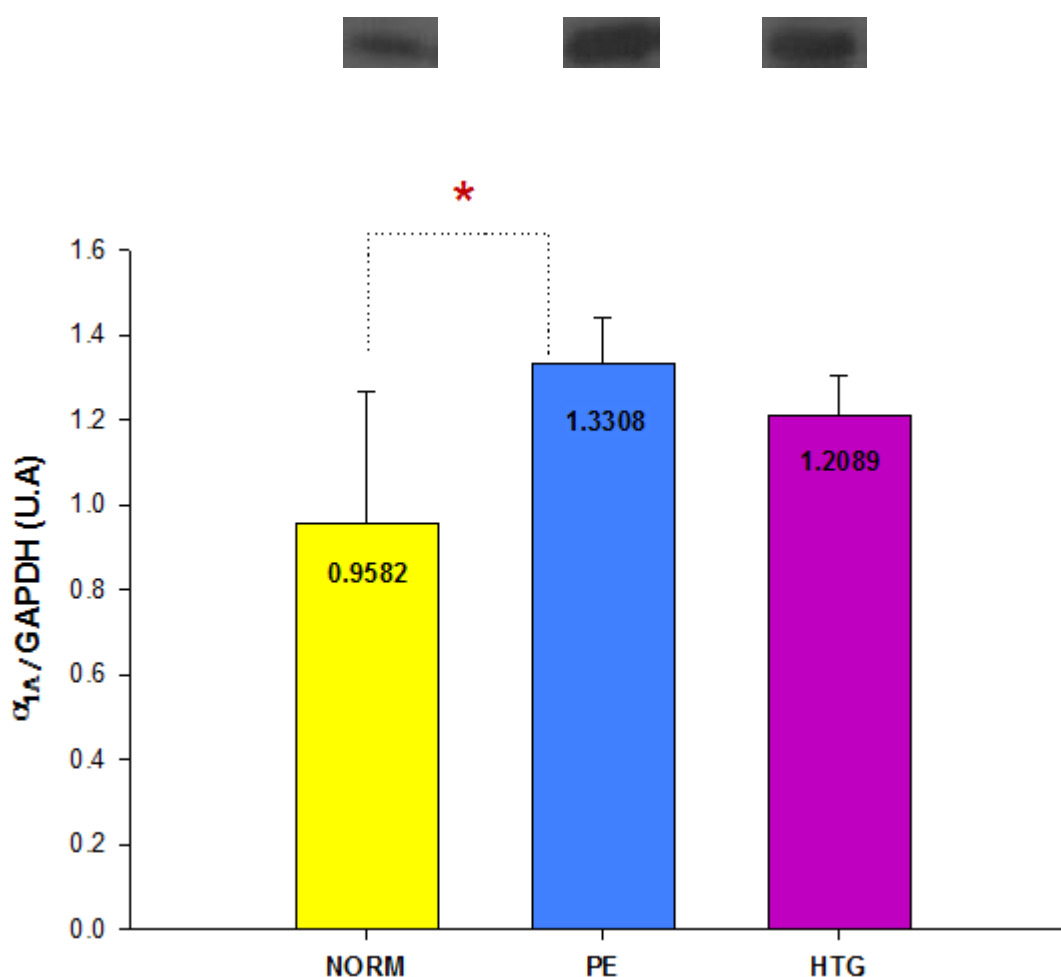


Figura 2. Registro típico. Curva a concentraciones crecientes de Fenilefrina.

### 3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PROTEÍCOS DE LOS RECEPTORES $\alpha_1$ -ADRENÉRGICOS ( $\alpha_{1A}$ , $\alpha_{1B}$ , $\alpha_{1D}$ )

#### 4.1 NIVELES PROTEÍCOS DEL RECEPTOR $\alpha_{1A}$ EN ARTERIAS CORIÓNICAS.

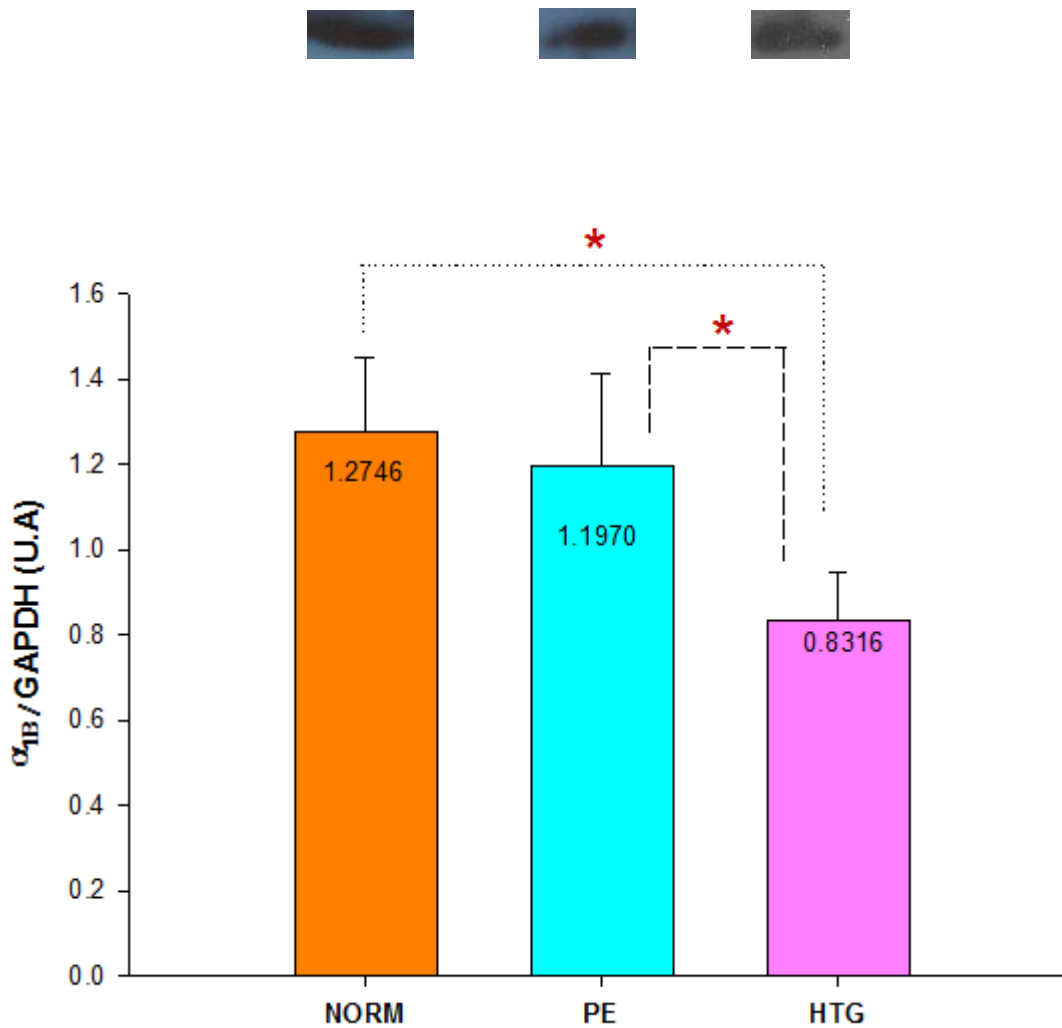
Los resultados mostraron que el receptor  $\alpha_{1A}$  se detectó en los tres grupos de estudio (NORM, PE, HTG). El nivel proteico promedio en arterias coriónicas provenientes del grupo de PE fue de 1.33 U.A, el cual fue significativamente mayor respecto al grupo control (NORM, 0.95 U.A, \*P<0.05). Sin embargo, no se observaron cambios estadísticamente significativos al comparar el grupo control con HTG.



**FIGURA 3.** Niveles proteicos del receptor adrenérgico  $\alpha_{1A}$ . Segmentos arteriales provenientes de placentas de pacientes Normotensas Norm (n= 3), Preeclampsia PE (n= 3) e hipertension gestacional HTG (n= 3). Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control (GAPDH). En la parte superior se muestran las bandas representativas de un experimento típico. Cada valor representa el promedio  $\pm$  EE y son expresados en unidades arbitrarias (U.A). \*P<0.05.

**3.2. NIVELES PROTEICOS DEL RECEPTOR  $\alpha_{1B}$  EN ARTERIAS CORIÓNICAS.**

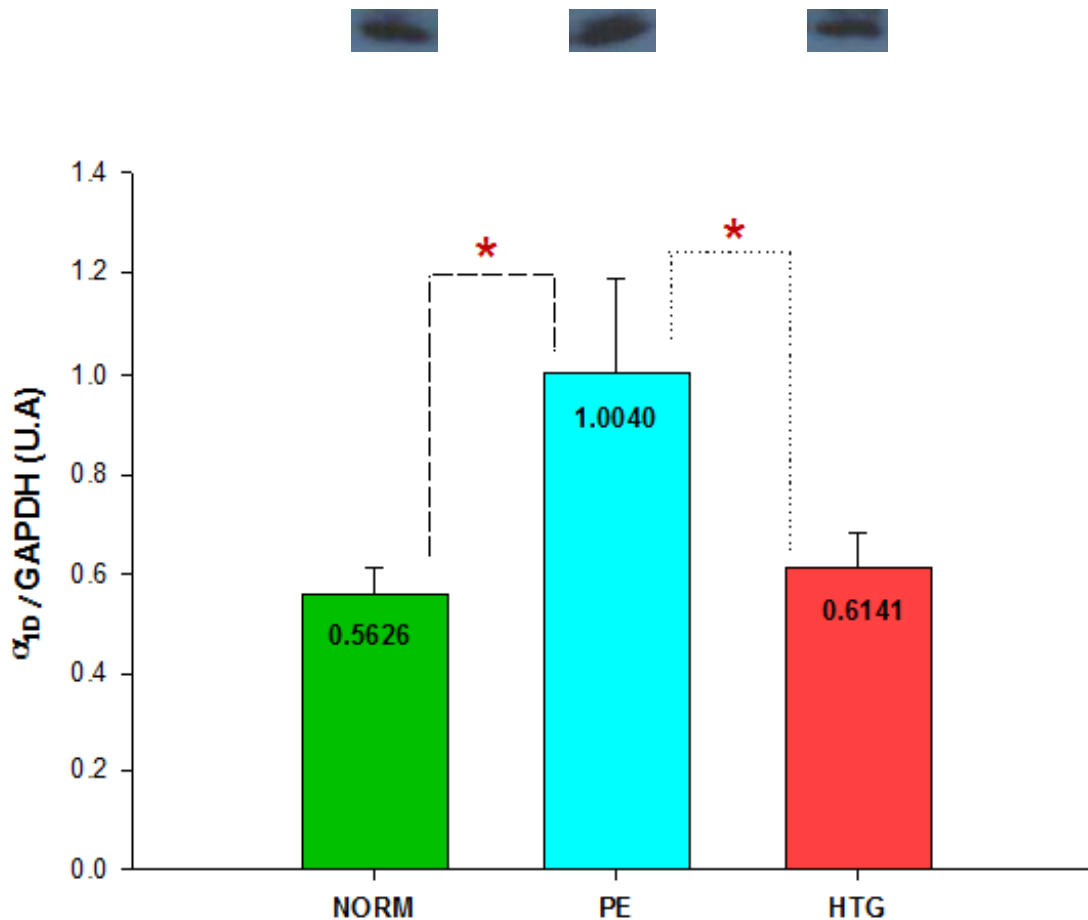
Los resultados mostraron que el receptor  $\alpha_{1B}$  se detecto en los 3 grupos de estudio (NORM, PE, HTG). El nivel proteico de  $\alpha_{1B}$  tiende a disminuir en los grupos de proceso hipertensivo, la disminución que se observa en el grupo de HTG es estadísticamente significativa respecto con el grupo control y de PE ( $P < 0.05$ ).



**FIGURA 4. Niveles proteicos del receptor adrenérgico  $\alpha_{1B}$ .** Segmentos arteriales provenientes de placentas de pacientes Normotensas (n= 3), Preeclampsia (n= 3) e Hipertensión gestacional (n= 3). Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control (GAPDH). En la parte superior se muestran las bandas representativas de un experimento típico. Cada valor representa el promedio  $\pm$  EE y son expresados en unidades arbitrarias (U.A). \* $P < 0.05$ .

**3.3. NIVELES PROTEICOS DEL RECEPTOR  $\alpha_{1D}$  EN ARTERIAS CORIÓNICAS.**

Los resultados mostraron que el receptor  $\alpha_{1D}$  se detectó en los 3 grupos de estudio (NORM, PE, HTG). Los niveles proteicos del receptor  $\alpha_{1D}$  en el grupo de mujeres Preeclámpticas fue significativamente mayor con respecto al grupo control y de HTG ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, no se observaron cambios estadísticamente significativos al comparar el grupo control con HTG.



**FIGURA 5. Niveles proteicos del receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$ .** Segmentos arteriales provenientes de placentas de pacientes Normotensas (n= 3), Preeclampsia (n= 3) e HTG (n= 3). Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control (GAPDH). En la parte superior se muestran las bandas representativas de un experimento típico. Cada valor representa el promedio  $\pm$  EE y son expresados en unidades arbitrarias (U.A). \* $P < 0.05$ .

## VIII. DISCUSIÓN

Las respuestas de la vasculatura feto-placentaria a diferentes agentes vasoactivos se han investigado generalmente *in vitro*. Por lo que este trabajo se llevo a cabo utilizando vasos coriónicos debido a que éstos son vasos de pequeño calibre en los que se registra de manera adecuada la tensión isométrica y son representativos de la circulación vellositaria de los vasos umbilicales (Abad A, 2000).

Los vasos placentarios humanos carecen de inervación autónoma. Por lo tanto, la resistencia vascular debe ser controlada por factores humorales y mecanismos autocrinos o paracrinos. Se han detectado diversas sustancias originadas durante el embarazo que pueden afectar el tono vascular feto-placentario de forma directa o indirecta (Abad A, 2000). Durante los embarazos normales hay un incremento de las sustancias vasodilatadoras, en contraste con algunos procesos patológicos como la Preeclampsia que se caracteriza por una vasoconstricción generalizada y un incremento de la respuesta presora a los agentes vasoconstrictores tales como la Angiotensina II (Gant F, 1973).

Abad et al. Encuentran que la respuesta contráctil a KCl de arterias coriónicas procedentes de embarazos afectados por Preeclampsia, es significativamente mayor que la de arterias coriónicas provenientes de los embarazos normales. Esto concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio, en el cual al exponer los segmentos arteriales a KCl 80mM se observó una tendencia al aumento de la respuesta contráctil de los segmentos arteriales provenientes de procesos hipertensivos del embarazo, específicamente PE e HTG. El incremento de la reactividad vascular a los agentes vasoconstrictores durante los procesos hipertensivos del embarazo podría ser debido a una disminución en los mecanismos vasodilatadores o a un aumento de los mecanismos vasoconstrictores (khalil RA, 2002).

El embarazo normal se caracteriza por una disminución de la respuesta vasopresora y un incremento en la respuesta vasodilatadora, lo cual contribuye a un aumento del flujo sanguíneo uterino. La PE se caracteriza por la inversión de la disminución de la respuesta presora. La hipertensión es una enfermedad cardiovascular asociada al incremento de catecolaminas plasmáticas, las cuales inducen contracción del músculo liso vascular por activación de los receptores  $\alpha_1$ -Adrenergicos ( $\alpha_1$ -ARs) (Whiten MM, 1998; Lyssand SU, 2008; Tanoue A, 2001).

El periodo de gestación está asociado con alteraciones en la respuesta vascular adrenérgica. La regulación de los receptores alfa y beta adrenérgicos son mecanismos importantes en el control del flujo sanguíneo uterino y la oxigenación fetal. Estudios previos realizados en modelos animales han demostrado que durante el embarazo hay un incremento en la contracción de arterias uterinas de rata, la cual es regulada por los receptores adrenérgicos. Dichos resultados contrastan con el hecho de que la respuesta vasoconstrictora a la estimulación  $\alpha_1$ -Adrenergica esta disminuida durante el embarazo tanto en animales como en humanos (Wang Y, 2002). Esto fue confirmado en el presente estudio donde se mostró que la Fenilefrina (Agonista selectivo de los  $\alpha_1$ -ARs), no produjo contracción a nivel de arterias coriónicas de mujeres gestantes que cursaron por un embarazo sin complicaciones así como en gestaciones afectadas por un proceso hipertensivo del embarazo.

Por otra parte el embarazo normal está asociado a diferencias regionales en las respuestas vasculares de los  $\alpha_1$ -ARs, por lo que se sugiere que cambios en la respuesta vascular uterina ante la estimulación adrenérgica puede deberse a cambios en la densidad proteica de los  $\alpha_1$ -ARs (Wang Y, 2002).

Bracho-Valdés et al. Demostraron una disminución en la expresión de los  $\alpha_1$ -ARs en ratas gestantes, esta respuesta fue revertida en el modelo de ratas con hipertensión inducida por el embarazo observándose un incremento significativo en la expresión de los  $\alpha_1$ -ARs. El incremento más evidente fue en los segmentos de aorta abdominal en comparación con

los segmentos de aorta torácica, esta diferencia en la región abdominal se atribuye a su cercanía con la unidad fetoplacentaria.

De acuerdo con estos resultados en nuestro trabajo se detectó la proteína de los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -Adrenergicoa ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ) en arterias coriónicas provenientes de mujeres que cursaron un embarazo normal así como de mujeres gestantes que cursaron por un proceso hipertensivo del embarazo. En este sentido nuestros resultados muestran un incremento significativo en la densidad proteica del receptor  $\alpha_{1A}$  en mujeres preeclámpticas HTG, además se observó una disminución significativa de la densidad proteica del receptor  $\alpha_{1B}$  en el grupo de HTG y una tendencia a la disminución de la densidad proteica de este subtipo en el grupo de PE. Finalmente se observó un incremento significativo en la densidad proteica del receptor  $\alpha_{1D}$  en el grupo de mujeres preeclámpticas.

Kanashiro CA et al. Reportaron que la reactividad vascular a agonistas adrenérgicos como la Fenilefrina se reduce en estadios tardíos del embarazo en ratas gestantes y sugieren que esta disminución podría deberse a una desensibilización del receptor. De acuerdo con estos resultados en nuestro trabajo los receptores  $\alpha_1$ - Adrenérgicos no participan en la modulación de la respuesta contráctil a nivel de vasos coriónicos en embarazos con y sin complicaciones, a pesar de que se detectó la proteína de los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ - Adrenérgicos en los grupos de estudio. La no respuesta por parte de los receptores alfa 1 adrenérgicos puede deberse a inactivación del receptor o a una internalización del mismo.

## IX. CONCLUSIONES

Con los principales hallazgos obtenidos hasta el momento son los siguientes se puede concluir que:

Los receptores  $\alpha_1$ - Adrenérgicos no participan en la modulación de la respuesta contráctil a nivel de vasos coriónicos en embarazos con y sin complicaciones, a pesar de que se detectó la proteína de los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ - Adrenérgicos en los grupos de estudio.

**X. BIBLIOGRAFIA**

- Barroso HM.1970. Receptores adrenérgicos. *Rev.Mex.Anest*; 19(5):281-283.
- Bracho VI et al.2009.Increased alpha-1 adrenoceptor expression in pregnant rats with subrenal Aortic Coartation. *Hypertension in pregnancy*; 1:1-15.
- Brook LV., Dampney AL., Heesch MC.2010.Preganancy and the endocrine regulation of the baroreceptor reflex. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol*; 299:439-451.
- Bushnell Ch., Chireau M.2011.Preeclampsia and strokes:Risks during and after pregnancy. *Stroke Research and Treatment*; ID 858134: 1-9.
- Curiel-Balsera E., Prieto-Palomino MA., Muñoz-Bono J., Ruíz de Elvira MJ., Galeas JL., García Q.2011.Análisis de la morbimortalidad materna de las pacientes con preeclampsia grave, eclampsia y síndrome HELLP que ingresan en una unidad de cuidados intensivos gineco-obstétrica. *Med Intensiva*; 310:2-6.
- Egan VL., Peña C.2007.Conceptos actuales sobre la preeclampsia-eclampsia. *Rev Fac Med UNAM*; 50(2):57-61.
- Flórez J.2005. Receptores adrenérgicos. Farmacología humana. 4<sup>a</sup> ed. Editorial MASSON, Barcelona España. Pag 260.
- Gant FN et al.1973.A Study of Angiotensin II Pressor Response throughout primigravid pregnancy.*The Journal of Clinical Investigation*; 52:2682-2689.
- Gail DT.2011. Neural control of the circulation.*Adv Physiol Educ*; 35:28-32.
- Gallegos AS., Sosa ES., Gaona Gj., Torres VB., Marín CL., Huerta GM.2008. La placenta humana: Revision. *Perinatal Reprod Hum*; 22:230-245.
- Jones WC., Mandala M., Barron C., Bernstein I., Osol G.2009.Mechanism underlying maternal venous adaptation in pregnancy.*Reprod Sci*; 16(6):596-604.
- Kanashiro CA et al.2000.Pregnancy-associated reduction in vascular protein Kinase C activity rebound during inhibition of NO synthesis. *Am.J.Physiol.Regulatory Integrative Comp. Physiol*; 278:295-303.
- Kelly B., Stone S., PostonL.1999.Cardiovascular adaptation to pregnancy:the role of altered vascular structure.*Fet Mat Med Rev*; 11:105-116.
- Lyssand SJ et al.2008. Blood Pressure is Regulated by an  $\alpha_{1D}$ -Adrenergic Receptor/Dystrophin Signalosome. *The Journal of Biological Chemistry*; 283(27):18792-18800.

Marín IR., Gorostidi PM., Álvarez NR.2001.Hipertensión arterial y embarazo. *NefroPlus*; 4(2): 21-30.

Piascik MT., Perez OM.2001. $\alpha$ 1-adrenergic receptors:New insights and directions. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*; 298:403-410.

Purizaca M.2010.Modificaciones fisiológicas en el embarazo. *Rev Per Ginecol Obstet*; 56:57-69.

Quintana NP., Rey DF., Sis TG., Antonelli CA.2003."Preeclampsia".*Rev Posgrado Vía Cátedra Med*;133: 16-20.

Raouf A., Granger K., Granger JP.2002.Vascular mechanism of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am J Physiol Regul Intergr Comp Physiol*; 283:29-45.

Secretaría de salud 2009. Citado el 30/Agosto/2011  
[http://portal.salud.gob.mx/descargas/pdf/period\\_mexsano/mexicosano\\_nov09.pdf](http://portal.salud.gob.mx/descargas/pdf/period_mexsano/mexicosano_nov09.pdf)

Sherer DM., Abulafia O.2001. Angiogénesis during implantation and placental and early embryonic development.*Placenta*; 22:1-13.

Tacchi H. 2008. Receptores Beta adrenérgicos e insuficiencia cardíaca. *Rev Insuf Cardíaca*; 3(2):96-99.

Tanove A et al.2001. The  $\alpha_{1D}$ -Adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest*; 109:765-775.

Tsatsaris V., Malassiné A., Fournier T., Handschuch K., Schaaps JP., Fuidart Jm., Evaim-Brion D.2006. Placenta humana. *Ginecologia-obstetricia.*, 5-005-A-10.

Uzan J., Carbonnel M., Piconne O., Asmar R., Ayoubi JM. 2011.Preeclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management.*Vascular Health and Risk management*; 7:467-474.

Walter PM., Ananth K.2008.Molecular Mechanisms of Preeclampsia.*Microvasc Res*; 75(1):1-8.

Wang YS., Datta S., Segal S.2002.Pregnancy Alters Adrenergic Mechanisms in Uterine Arterioles of Rats. *Anesth Analg*; 94:1304-1309.

Wang A., Rana S., Karumanchi AS.2009.Preeclampsia: The Role of Angiogenic Factors in its pathogenesis.*PHYSIOLOGY*; 24:147-158.

Watson DE., Cross CJ. 2005. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology.*, 20:180-193.

White MM., McCullough ER., Dyckes R., Robertson Da., Moore GL.1998.Effects of Pregnancy and Chronic hypoxia on contractile responsiveness to  $\alpha$ 1-Adrenergic stimulation. *J Appl physiol*; 85:2322-2329.

Woodcock AE.,Xiao-Jun D., ReicheH ME., Graham R.2008.Cardiac  $\alpha$ 1-adrenergic drive in phathological remodeling. *Cardiovascular Research*; 77:452-462.

Zhang H., Zhang L.2008.Role of protein Kinase Isozymes in the regulation of alpha-1 adrenergic receptor-mediated contractions in ovine arteries.*Biol Reprod*; 78(1):35-42.

**XI. ANEXOS**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

Mediante este documento, las pacientes seleccionadas para el estudio serán informadas del procedimiento que se llevará a cabo, resaltando que dicho estudio no implica algún riesgo para la paciente ni para el recién nacido, ya que los procedimientos del mismo se realizaron en el tejido arterial de la placenta y se obtuvieron los datos clínicos de manera indirecta, a través del expediente clínicos y algunos de ellos, cuando fue posible, directamente de la paciente.

FECHA: \_\_\_\_\_

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

YO, \_\_\_\_\_, en pleno uso de mis facultades mentales, doy mi autorización total e informada para participar en el estudio denominado "DETERMINACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES  $\alpha_1$ -ADRENÉRGICOS EN ARTERIAS CORIÓNICAS DE MUJERES EMBARAZADAS CON PROCESOS HIPERTENSIVOS", bajo la responsabilidad del Dr. Víctor Manuel Farias Rodríguez y el Dr. Juan Tinajero Corona.

He recibido, además, información relativa a la finalidad del estudio. Por lo anterior, doy mi consentimiento para la utilización de mi placenta con fines de investigación, sabiendo que no corro ningún riesgo al participar en este estudio.

Nombre y firma de la paciente. \_\_\_\_\_

Nombre y firma de testigo \_\_\_\_\_

Nombre y firma de testigo \_\_\_\_\_

Lugar y fecha

**FICHA CLÍNICA**

FECHA: \_\_\_\_\_

NUM. DE EXPEDIENTE:

**DATOS GENERALES DE LA PACIENTE**

NOMBRE:

EDAD:

CESÁREAS:

TA:

FR:

FC:

SDG:

PESO DE LA MADRE:

PROTEINURIA:

PATOLOGÍAS:

GESTA:

ABORTOS:

TEMPERATURA:

EDEMA:

USO DE MEDICAMENTOS:

CONTROL PRENATAL NUMERO DE VISITAS AL MÉDICO:

COMPLICACIONES PREVIAS:

TRABAJO DE PARTO:

VÍA DE RESOLUCIÓN DEL EMBARAZO:

**NOTA POSTPARTUM**

PESO DEL PRODUCTO:

SEXO:

TALLA:

APGAR:

PC:

PT:

PA:

TEMPERATURA:

MALFORMACIONES:

COMPLICACIONES AL NACIMIENTO:

PESO DE LA PLACENTA:

ALTERACIONES DE CORDÓN UMBILICAL:

PRESENCIA DE INFARTOS PLACENTARIOS:

OTROS:

**SOLUCIONES**

Solución Krebs

- NaCl-----118 mM
  - C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>-----11.7 mM
  - KCl-----4.7 mM
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-----1.2 mM
  - MgSO<sub>4</sub>-----1.2 mM
  - NaHCO<sub>3</sub>-----25.0 mM
  - C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>-----0.026 mM
  - CaCl<sub>2</sub>-----2.5 mM
- (Ibarra et al, 2000)

**FÁRMACOS**

Se prepararon soluciones frescas para cada experimento: Fenilefrina, L-Name, Indometacina, Clotrimazol, Propanolol, Rauwolscina (obtenidas de Sigma-Aldrich). Los fármacos fueron disueltos en agua destilada (solución madre) y las diluciones fueron preparadas en solución Krebs.

**SOLUCIÓN PARA AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS DEL TEJIDO**

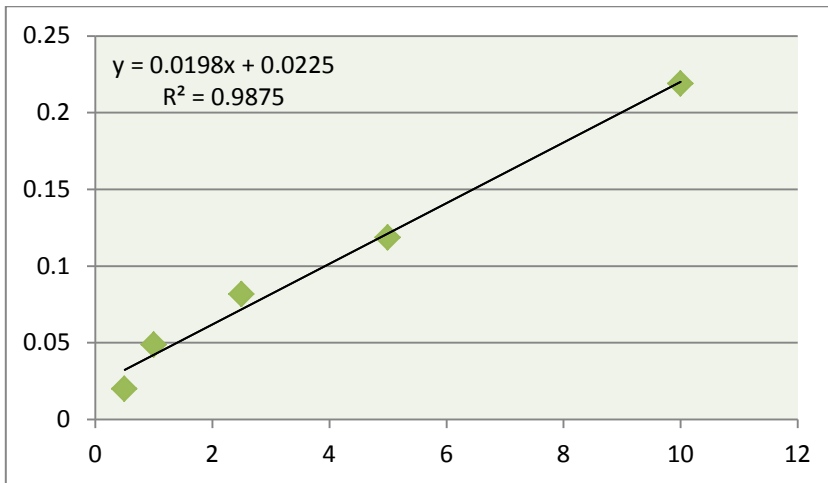
- Tris HCl 0.1M pH 7.4
- Triton al 0.1%
- Inhibidor de proteasas (1 pastilla en 10mL de solución de aislamiento de proteínas).

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD**

- Solución patrón de BSA: 0.5mg/ml.
- Reactivo Bradford 1:5

	Reactivo de Bradford	BSA	NaCl 0.15 M
<b>0</b>	900 µl	-----	100 µl
<b>1</b>	900 µl	1 µl	99 µl
<b>2</b>	900 µl	2 µl	98 µl
<b>3</b>	900 µl	5 µl	95 µl
<b>4</b>	900 µl	10 µl	90 µl
<b>5</b>	900 µl	20 µl	80 µl
<b>6</b>	900 µl	40 µl	60 µl

**10 µl de muestra problema + 900 µl reactivo de Bradford+ 90 µl NaCl 0.15M**  
 Leer a 595nm  
**Curva patrón de BSA**



**SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT**

**Acril/Bis acrilamida**

Acrilamida.....14.36g

Bisacrilamida.....0.145g

H<sub>2</sub>O..... cbp 50ml

Filtrar y desgasificar, guardar a 4°C protegido de la luz.

**Buffer tris 1.5M pH 8.8**

Tris base.....9.09g

H<sub>2</sub>O.....cbp 50ml

**Buffer tris 0.5M pH6.8**

Tris base.....1.5g

H<sub>2</sub>O.....cbp 25ml

**SDS 10% (50ml)**

Sodio dodecil sulfato 0.35 M 5.0g

H<sub>2</sub>O desionizada .....50ml

**Persulfato de amonio (APS) al 10% (1ml)**

APS.....0.1g

H<sub>2</sub>O desionizada.....1ml

**Buffer de carga**

TBS 5X lamelli Buffer

0.5 M tris-HCl pH 6.8..... 1.75 ml

Glicerol..... 4.5 ml

SDS (0.2 g disolver en 1ml tris-HCl) ..... 2ml

0.25 % Bromophenol blue..... 0.5 ml

β mercaptoetanol

**Gel SDS-PAGE**

	<b>Gel separador</b>		<b>Gel concentrador</b>	
	1 gel	2 geles	1 gel	2 geles
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	2.20 ml	4.40 ml	1.22 ml	2.44 ml
<b>acrilamida</b>	1.66 ml	3.32 ml	0.27 ml	0.54 ml
<b>Buffer-tris</b>	pH 8.8 1.26 ml	pH 8.8 2.52 ml	pH 6.8 0.5 ml	pH 6.8 1.0 ml
<b>SDS 10%</b>	50.4 µl	100.8 µl	19.8 µl	39.6 µl
<b>PSA 10%</b>	25.6 µl	51.2 µl	10.8 µl	20.64 µl
<b>TEMED</b>	4.5 µl	6.02 µl	2.7 µl	4.55 µl