



**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

Departamento de Toxicología

“Inducción de las interleucinas proinflamatorias *IL-6* e *IL-8* y presencia del *CYP1A1* en cultivos primarios de cordón umbilical obtenidas de embarazadas hipertensas”

Tesis que presenta:

Q.F.B. Sandra Stephanie Reyes Aguilar

**Para obtener el grado de Maestría en ciencia en la especialidad de
Toxicología**

Director:

Dr. Arnulfo Albores Medina

Ciudad de México;

Agosto 2018



Este trabajo se realizó en el departamento de Toxicología del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del Dr. Arnulfo Albores Medina.

Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca de maestría No. 613386



Resumen

Los desórdenes hipertensivos (DH) durante el embarazo se presentan en el 10% de las mujeres mexicanas y por distinta etiología, entre ellas: antecedentes clínicos, familiares o por exposición a tóxicos. Para el desarrollo de la hipertensión es necesario un estímulo, el cual puede ser un daño al endotelio venoso causado por el metabolismo de algún contaminante, por ejemplo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), que son biotransformados por el CYP1A1, pues generan compuestos reactivos de oxígeno y metabolitos activos. La regulación de este citocromo es empleada como marcador de efecto a la exposición a PAH. El endotelio, posteriormente liberará citocinas proinflamatorias como las interleucinas 6 y 8 (IL-6 e IL-8, respectivamente), las cuales activan el sistema inmune favoreciendo el mantenimiento y progresión de la hipertensión en las madres. Estos efectos en el organismo podrían estar relacionados y se desconoce si en tejido neonatal se presentan dichos efectos, por lo que nuestro objetivo fue evaluar la expresión del mRNA del *CYP1A1* y las *IL-6* e *IL-8* en cultivos primarios individuales de células de endotelio venoso de cordón umbilical (HUVEC) de mujeres normotensas e hipertensas, que fueron recolectados el día del parto. Por tanto, en los cultivos primarios, se realizó la evaluación de la expresión de los mRNA de los genes *CYP1A1*, *IL-6* e *IL-8* mediante RT-qPCR y los datos obtenidos se procesaron con el programa GenEx y posteriormente se evaluaron las relaciones entre la expresión de estos genes y los DH, empleando el programa STATA. En madres donadoras se observó una media de edad de 24.22 ± 6.16 años para las mujeres sanas y 25.25 ± 7.36 años para el grupo de mujeres con DH; y con respecto a la hipertensión se muestra una media de $110.5/71.15 \pm 7.19$ mm Hg y $146.16/94.25 \pm 16.64$ mm Hg, respectivamente. También se detectó proteína en orina de las mujeres que presentaron DH. Con respecto a la expresión de los genes de interés en células HUVEC, se encontró una asociación significativa entre la presencia del mRNA del *CYP1A1* y la hipertensión en la madre al momento del parto, así como una disminución estadísticamente significativa en los niveles de mRNA de *IL-6* e *IL-8* en HUVEC provenientes de mujeres hipertensas. La baja respuesta en los niveles de las interleucinas en el cordón umbilical con respecto a los resultados descritos para madres hipertensas sugiere la presencia de un efecto compensatorio en el endotelio neonatal, así como una relación entre la expresión del mRNA del *CYP1A1* con los DH durante el embarazo.

Abstract

Hypertensive disorders (HD) during pregnancy occur in 10% of Mexican women for different etiology, including: clinical, familiar or for toxic exposure. To development of hypertension is necessary a stimulus, which can be a damage to the venous endothelium caused by the metabolism of some contaminant, for example, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), which are biotransformed by the CYP1A1. This enzyme generate reactive oxygen compounds and active metabolites. The regulation of this cytochrome is used as an effect marker for exposure to PAH. The endothelium will later release pro-inflammatory cytokines such as Interleukins 6 and 8 (IL-6 and IL-8, respectively), which activate the immune system, favoring the maintenance and progression of hypertension in mothers. These effects on the organism could be related and it is unknown if in neonatal tissue these effects are presented, so our objective was to evaluate the mRNA expression of the *CYP1A1* and the *IL-6* and *IL-8* in individual primary cultures of umbilical cord venous endothelium (HUVEC) cells of normotensive and hypertensive women, which were collected on the day of delivery. Therefore, in the primary cultures, the evaluation of mRNA expression of genes was performed *CYP1A1*, *IL-6* And *IL-8* Using RT-qPCR and the data obtained were processed with the program GenEx and later evaluated the relationships between the expression of these genes and HD, using the program Stata. In donor mothers, an average age of 24.22 ± 6.16 years was observed for healthy women and 25.25 ± 7.36 years for the group of women with HD; and with respect to hypertension is shown an average of $110.5/71.15 \pm 7.19$ mm Hg and $146.16/94.25 \pm 16.64$ mm Hg, respectively. Urine protein was also detected for women who presented HD. About the expression of genes of interest in HUVEC cells, a significant association was found between the presence of mRNA of *CYP1A1* and hypertension in the mother at the time of delivery, as well as a statistically significant decrease in mRNA levels of *IL-6* and *IL-8* In HUVEC from hypertensive women. The low response in the levels of interleukins in the umbilical cord with respect to the outcomes described for hypertensive mothers suggests the presence of a compensatory effect in the neonatal endothelium, as well as a relationship between the mRNA expression of the CYP1A1 with HD during pregnancy.

Agradecimientos

Al Cinvestav y al CONACYT por abrirme las puertas a una nueva oportunidad académica, por el apoyo económico y por incentivar a que lograra una meta más.

A mi tutor académico Dr. Arnulfo Albores Medina Por abrirme las puertas del laboratorio y por la confianza, la paciencia y el apoyo brindado a pesar de que en algún momento todo parecía estar en contra nuestra.

A mi comité académico, la Dra. Esther López-Bayghen y el Dr. Efraín Garrido Guerrero por sus aportaciones y gran apoyo al proyecto.

A la Dra. Irais Poblete Naredo por sus enseñanzas y su ayuda para resolver los problemas que parecían no tener solución. Su ayuda dentro del laboratorio fue indispensable para realizar el proyecto.

A la técnico Q.F.B. Patricia Vázquez Vázquez por su apoyo técnico dentro del laboratorio y su apoyo moral fuera de este ya que su presencia genera un ambiente laboral bastante agradable.

A mis compañeras de laboratorio M. en C. Elvira Gómez Guerrero y Biol. Karla Karina Rojas quienes me brindaron su amistad y en general me apoyaron de manera incondicional tanto dentro del laboratorio como fuera de este.

A los Toxi-Chicos (Ana, Andrés, Christian, Lirio, Soledad) los cuales hacen que cualquier trabajo sea más agradable de realizar y además favorecen el ambiente de trabajo llenando una parte del día con risas y buenos momentos.

A mis compañeros de generación, porque juntos llegamos y juntos crecimos hasta llegar a hoy y porque aprendimos juntos que a pesar de no todas las personas vean talento en nosotros, si disfrutamos lo que hacemos y damos siempre lo mejor significa que estamos haciendo algo bueno.

A Jonathan Guerrero Arroyo, mi compañero de vida, por no dejarme caer cada vez que me sentí derrotada y por ayudarme a superarme a mí misma.

Finalmente, a mi familia por todo el apoyo incondicional, por promover en mí que hacer ciencia es bueno y por ayudarme a desarrollarme académica y socialmente. El agradecimiento es para mis hermanos Carlos y Claudia y la medalla de honor para mis padres Marcela y Salomón por enseñarme a soñar, a hacer que los sueños se vuelvan metas y a cumplir esas metas.

Abreviaturas

AA	Aminas aromáticas
AhR	Receptor a hidrocarburos aromáticos
CYP1A1	Enzima del citocromo perteneciente a la familia 1A, tipo 1
cDNA	Cadena de ácido desoxirribonucleico complementaria
DEPC	Diethyl pirocarbonato
DH	Desordenes hipertensivos
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Enzimas degradadoras de DNA
ECGF	Factor de crecimiento de células endoteliales
h	Horas
HUVEC	Células endoteliales de vena de cordón umbilical
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
min	Minutos
mm Hg	Milímetros de mercurio
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NOx	Compuestos de óxido nítrico
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PM 2.5	Material particulado de 2.5 nm de diámetro
PM 10	Material particulado de 10 nm de diámetro
RNasas	Enzimas degradadoras de RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
VOC	Compuestos orgánicos volátiles

Índice

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Abreviaturas.....	iv
1. Introducción.....	1
1.1 Desórdenes hipertensivos en el embarazo.....	1
1.1.1 Efectos adversos.....	2
1.1.2 Factores de riesgo.....	3
1.2 Inflamación.....	4
1.3 Sistema angiotensina-renina.....	5
1.3.1 Interleucina 6.....	5
1.3.2 Interleucina 8.....	6
1.4 Citocromo P50 1A1 (CYP1A1).....	7
1.5 Relación entre la madre y el feto.....	9
2. Justificación.....	10
3. Hipótesis.....	11
4. Objetivos.....	11
4.1 General.....	11
4.2 Particulares.....	11
5. Métodos.....	12
5.1 Población de estudio.....	12
5.2 Cultivo celular.....	12
5.3 Extracción de RNA por el método de TRIZOL.....	13
Principio.....	13
Procedimiento.....	13
5.4 Síntesis de cDNA mediante el sistema SuperScript®III.....	13
Principio.....	13
Procedimiento.....	14
5.5 Validación del método qPCR.....	14
5.6 Curva estándar de calibración.....	14
Principio.....	14
Procedimiento.....	15

5.7 Validación del método comparativo $\Delta\Delta Ct$	15
Procedimiento	15
5.8 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	16
Principio.....	16
Procedimiento	16
5.9 Ensayos de Presencia/Ausencia	17
Principio.....	17
Procedimiento	17
5.10 Análisis estadístico	17
6. Resultados	18
6.1 Población de estudio	18
6.2 Validación del método comparativo $\Delta\Delta Ct$	19
6.2.1 Curvas estándar	20
6.2.2 Validación del método	21
6.3 Expresión del mRNA de <i>IL-6</i> e <i>IL-8</i> en células HUVEC	23
6.4 Presencia del mRNA <i>CYP1A1</i> en células HUVEC.....	27
7. Discusión	29
7.1 Expresión de las interleucinas en células HUVEC.....	29
7.1.1 Disminución de la expresión del mRNA de <i>IL-6</i> e <i>IL-8</i>	29
7.1.2 Expresión del mRNA de <i>IL-6</i> y presencia del mRNA de <i>CYP1A1</i>	31
7.1.3 Correlación entre la expresión del mRNA de ambas interleucinas proinflamatorias	31
7.2 Presencia del mRNA del <i>CYP1A1</i>	32
7.3 Resumen final.....	33
8. Conclusiones.....	36
9. Perspectivas.	36
10. Referencias.....	38

Índice de tablas y figuras

Tabla 1.-Clave de identificación de ensayos TaqMan utilizados.	16
Tabla 2.-Características de la población en estudio.	19
Figura 1.- Efectos de desórdenes de hipertensión en el embarazo.	3
Figura 2.-Estructura en 3D del CYP1A1.	8
Figura 3.-Comparación de los Ct promedio en células HUVEC.	20
Figura 4.- Curvas estándar.	21
Figura 5. Gráficas de validación del método $\Delta\Delta Ct$.	22
Figura 6. Gráfica de validación del método $\Delta\Delta Ct$.	23
Figura 7. Expresión de interleucinas en células HUVEC provenientes de embarazadas normo- y con DH.	24
Figura 8.- Comparación de la expresión de IL-6 contra la presencia de CYP1A1 en cultivos primarios de células HUVEC donadas de mujeres sanas y con DH.	25
Figura 9.- Correlación entre la expresión de interleucinas pro-inflamatorias.	26
Figura 10.- Correlación entre la expresión de interleucinas proinflamatorias.	27
Figura 11.- Presencia del CYP1A1 en cultivos primarios de células HUVEC donadas de mujeres sanas y con DH.	28
Figura 12.- Comparación de los Ct promedio del mRNA de CYP1A1 en cultivo primario de células HUVEC.	29
Figura 13.-Resumen de datos bibliográficos de madre y placenta, y resultados de células HUVEC.	34

1. Introducción

La hipertensión es una enfermedad cardiovascular responsable de enfermedades crónico-degenerativas y fulminantes como aterosclerosis, enfermedades coronarias, así como infartos al corazón y cerebrovasculares. Por otra parte, también es causante de medio millón de muertes maternas anualmente y una morbilidad 12-25% de mujeres mundo. La OMS define la hipertensión como un trastorno donde los vasos sanguíneos presentan una tensión alta debido al flujo sanguíneo, cuanto más alta sea la tensión más esfuerzo representa para el corazón en su trabajo de bombear sangre a todo el organismo (Dinh *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2007).

La hipertensión es una manifestación secundaria a un daño al endotelio y por consecuencia una remodelación de los vasos sanguíneos. Estos procesos involucran un proceso inflamatorio el cual es un factor que favorece tanto en el desarrollo como en la progresión de la hipertensión, así como en las consecuencias que se presentan por la cronicidad de dicha enfermedad; tales consecuencias pueden desarrollar aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, ataques cerebrovasculares o ataques cardíacos. La presión sanguínea elevada puede inducir respuestas inflamatorias que, a su vez, favorecen la progresión de las enfermedades mencionadas (Marek-Trzonkowska *et al.*, 2015; Savoia *et al.*, 2006).

Según los datos del INEGI, hasta el 2014 la hipertensión es considerada como una enfermedad cuya incidencia ha aumentado en los últimos años, y que afecta a la población general, a todas las edades; asimismo, aumenta la mortalidad de personas de 60 años o mayores. La importancia de detectar a tiempo los desórdenes hipertensivos se basa en evitar un mal seguimiento de la enfermedad y que culmine en incapacidad o muerte del paciente.

1.1 Desórdenes hipertensivos en el embarazo

Los desórdenes hipertensivos en el embarazo se presentan en cerca del 10% de las mujeres embarazadas alrededor del mundo, mientras que en México del 5-10% de los embarazos culminan con algún tipo de desorden hipertensivo. Los desórdenes hipertensivos se clasifican de acuerdo con su gravedad en: hipertensión crónica o pre-

existente, hipertensión gestacional (con o sin proteinuria) y preeclampsia (Aronow, 2017; Toohar *et al.*, 2017).

La hipertensión crónica o pre-existente se define por una presión sistólica igual o mayor de 140 mm Hg y una diastólica igual o mayor de 90 mm Hg con menos de 20 semanas de gestación o diagnóstico antes del embarazo. Hipertensión leve durante el embarazo se diagnostica con una presión arterial sistólica de 140-149 mm Hg o una presión arterial diastólica de 90-99 mm Hg. Por su parte, la hipertensión severa durante el embarazo presenta una presión arterial sistólica igual o mayor de 160 mm Hg y una presión arterial diastólica igual o mayor a 110 mm Hg. Para diagnosticarse como hipertensión gestacional los signos y síntomas deberán ser aparentes después de las 20 semanas de gestación (Aronow, 2017; Toohar *et al.*, 2017).

El caso más grave de hipertensión en el embarazo es la preeclampsia/eclampsia, la cual se diagnostica cuando la gestante presenta hipertensión después de las 20 semanas de embarazo con proteinuria mayor a 300 mg/dl en una recolección de orina de 24 h, una proporción de proteína/creatinina ≥ 0.3 o cuando existe un órgano blanco en riesgo (Aronow, 2017).

1.1.1 Efectos adversos

Los daños que se presentan al sufrir algún desorden hipertensivo durante el embarazo pueden variar dependiendo de la intensidad de éste, y afectan tanto a la madre como al recién nacido. Durante el embarazo se presentan restricciones al crecimiento fetal, parto prematuro, bajo peso al nacer y muerte fetal o neonatal. Después del parto, en la madre, puede presentar trombocitopenia, edema pulmonar, insuficiencia renal, falla hepática y enfermedades cardiovasculares prematuras, por ejemplo, enfermedad cardíaca isquémica, infarto al miocardio, falla cardíaca, así como síntomas de daños visuales y cerebrales (Aronow, 2017; Butalia *et al.*, 2018). Por estas razones cualquier desorden hipertensivo durante el embarazo se maneja como embarazo de alto riesgo y en el momento del parto como emergencia médica (Butalia *et al.*, 2018).

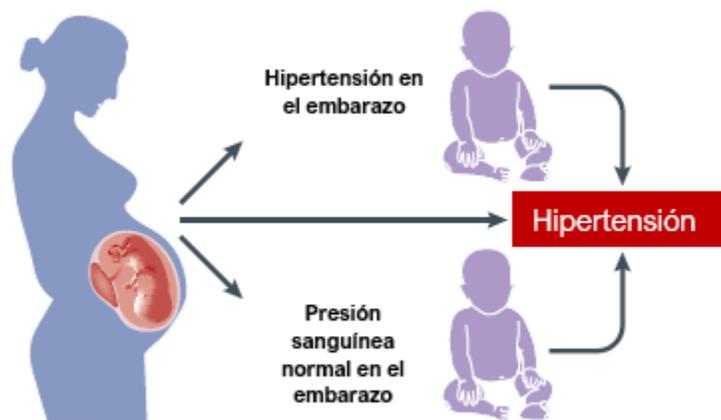


Figura 1.- Efectos de desórdenes de hipertensión en el embarazo.

Es probable que cuando se presenta algún desorden hipertensivo en el embarazo, esto tenga consecuencias futuras tanto para la madre como para el recién nacido. Modificado de (Yu *et al.*, 2017).

1.1.2 Factores de riesgo

Estudios anteriores muestran que un daño al endotelio o una disfunción en el mismo se asocia con una reacción intensificada del sistema inmune que acentúa los procesos de inflamación e inmunológicos (Arlie, 2017). Los factores de riesgo para desarrollar un síndrome hipertensivo durante el embarazo pueden dividirse en modificables y no modificables. Los factores modificables son un índice de masa corporal alto, anemia, exceso de sodio y deficiencia de ingestión de potasio en la dieta, y son más frecuentes cuando se presentan factores sociales como analfabetismo o ser ama de casa debido a las confianzas que la madre le otorga a los productos del hogar (Tebeu *et al.*, 2011).

Mientras que los factores no modificables son: edad de la madre, incidentes previos de desórdenes hipertensivos, así como una historia familiar o personal de problemas hipertensivos (Tebeu *et al.*, 2011). Existen otros factores que también son responsables de la hipertensión, como el hecho de que la madre se exponga a tóxicos como NO_x, PM_{2.5}, PM₁₀, SO₂, compuestos orgánicos volátiles (VOC) o hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) (Wang *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2017). La exposición a estos compuestos puede ser consciente o no, debido a que la madre no siempre conoce a que compuestos químicos está expuesta en su hogar, en el área de trabajo o en el medio en general. Como consecuencia la exposición a compuestos químicos como PAH o aminas aromáticas, el

organismo va a metabolizar estos compuestos para que puedan ser eliminados. El proceso lo realiza el sistema de monooxigenasas, principalmente el CYP1A1 el cual al metabolizar los diferentes sustratos genera ROS. Los ROS atacan al endotelio venoso aumentando el proceso de inflamación y favoreciendo la evolución de la hipertensión.

1.2 Inflamación

La principal manera en que el organismo se defiende ante un daño a tejidos y órganos es a través de procesos de inflamación. En este proceso se reclutan leucocitos y proteínas plasmáticas desde la sangre y se transportan al sitio del daño. La acumulación de esta variedad de compuestos biológicos en los tejidos propicia la activación del CYP1A1 para combatir y disminuir el estímulo que le ocasiona el daño. En estas reacciones intervienen citocinas e incluso células de respuesta inflamatoria como macrófagos. El proceso de inflamación tiene como fin la reparación del daño tisular o la eliminación del agente causante del daño. La respuesta del sistema inmune puede ser crónica o aguda dependiendo del estímulo que la provoque.

Para que las células y las moléculas moduladoras de la inflamación puedan acceder al sitio de la lesión se requiere que los vasos y el flujo sanguíneo se modifiquen para tener una mayor irrigación, la permeabilidad aumenta en los vasos, así como su adhesividad. Todos estos cambios son propiciados por citocinas, las cuales son moléculas señalizadoras de bajo peso molecular que pueden viajar por el torrente sanguíneo y mediar la comunicación intercelular y activar tejidos. Un tipo de estas moléculas son las interleucinas, las cuales tienen un rol muy importante pues son encargadas de regular la respuesta inmune, especialmente el proceso inflamatorio. En la patogénesis de los DH crónicos, el primer evento es la activación de neutrófilos, monocitos y las células NK o *natural killer* que inician un proceso de inflamación que conduce a un daño endotelial o a la destrucción del mismo, generando desordenes hipertensivos y que pueden culminar con un proceso de preeclampsia. El daño al endotelio favorece la producción y liberación de citocinas como: TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 (Abul K. Abbas *et al.*, 2012; Arango Duque *et al.*, 2014; Arlier, 2017).

Cada citocina activa un receptor en la membrana que desencadenará una cascada de señalización para activar genes que aumenten el número de receptores en membrana y así los diferentes tipos celulares puedan llevar a cabo su acción. Las diferentes citocinas presentes en el proceso de inflamación son producidas por macrófagos, linfocitos, células

polimorfonucleares, células endoteliales y epiteliales, también en adipocitos y tejido conectivo (Abul K. Abbas *et al.*, 2012).

1.3 Sistema angiotensina-renina

La activación de este sistema es el factor principal para favorecer el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, sin embargo, este sistema se encuentra altamente relacionado con el sistema inmune. Se ha descrito ampliamente el rol vasoconstrictor de la angiotensina II, esta molécula induce la producción de sustancias reactivas de oxígenos (ROS) en la vasculatura, aumentando a los mediadores que favorecen la inflamación de las paredes de los vasos sanguíneos (H. Y. Kim *et al.*, 2008). La angiotensina II induce mecanismos como la remodelación vascular, por ejemplo, la vasoconstricción, el crecimiento celular, la producción de estrés oxidante y la inflamación. En este sistema, la angiotensina II regula el proceso de inflamación al modular la liberación de citocinas. La angiotensina II induce a NF- κ B y AP-1, los cuales son receptores de endotelina-1, la cual es una mediadora en inflamaciones vasculares crónicas. En los humanos, la endotelina-1 induce la liberación de IL-6 por la activación de NF- κ B (Savoia *et al.*, 2006). Por otra parte, la angiotensina II también es capaz de inducir a la IL-8 mediada por la activación de la vía de las cinasas ERK1/2 MAP (H. Y. Kim *et al.*, 2008).

1.3.1 Interleucina 6

La IL-6 es una citocina pleiotrópica, esto es que tiene funciones tanto inflamatorias como antiinflamatorias afectando el proceso de reparación y metabolismo del tejido dañado. Sus efectos son locales y sistémicos, por ejemplo, la presencia de esta interleucina favorece la inducción de la síntesis hepática de mediadores de la inflamación, también la estimulación de neutrófilos en medula ósea y promueve la diferenciación de linfocitos B así como la activación de linfocitos T cooperadores. La IL-6 se sintetiza en el retículo endoplásmico sin necesidad de un precursor unido a la membrana. Las células capaces de sintetizarla son los fagocitos mononucleares, los fibroblastos y las células endoteliales, principalmente, mientras que el receptor a IL-6 es ubicuo, pues está presente en todas las células. Entre sus propiedades inflamatorias se encuentra el reclutamiento de monocitos en el sitio de

inflamación, lo que promueve el mantenimiento del proceso inflamatorio e inhibe la apoptosis en linfocitos T. Mientras que los efectos anti-inflamatorios presentan aumento de resistencia a la insulina entre otros efectos como inhibir la hepato-esteatosis (Abul K. Abbas *et al.*, 2012; Arango Duque *et al.*, 2014).

La IL-6, al igual que otras citocinas, tienen una alta participación en el desarrollo de las isquemias placentaria y cardiovascular, y también en la disfunción renal. La IL-6 induce cambios estructurales en las paredes de vasos sanguíneos y altera las células endoteliales provocando un daño irreversible. El daño endotelial es el detonante para el desarrollo de hipertensión y la liberación y mantenimiento de las citocinas proinflamatorias, que en etapas susceptibles como el embarazo conducen al desarrollo de desórdenes hipertensivos. También se han encontrado niveles elevados de IL-6 en el suero de mujeres con preeclampsia, sin embargo, los efectos sobre las fallas renales y cardíacas, así como la isquemia placentaria deben investigarse más ampliamente (Gadonski *et al.*, 2006; Hashmat *et al.*, 2016).

1.3.2 Interleucina 8

La IL-8 es una citocina que presenta alto potencial quimiotáctico para reclutar monocitos y neutrófilos. Este reclutamiento se presenta por un gradiente quimiotáctico, que es el movimiento de las células hacia el sitio con mayor concentración del quimio atrayente (en este caso IL-8) que logra que células de respuesta logren llegar al sitio de la inflamación y al mismo tiempo las retiene en el sitio de daño. También provoca cambios morfológicos que inducen la degranulación y la activación celular de monocitos y neutrófilos, lo cual provocará un daño endotelial que conducirá a patologías como la hipertensión. Se induce en muchos tipos celulares, sin embargo, los queratinocitos, las células endoteliales, los eosinófilos y los basófilos responden en mayor medida a esta interleucina. Algunas de las características de éstas son: resistencia a cambios de temperatura y proteólisis, resistencia a ambientes ácidos y la característica que vuelve única a esta interleucina es su permanencia, ya que sintetiza de manera rápida a partir de un estímulo de daño, sin embargo, su permanencia en el sitio puede prolongarse días o semanas, mientras que las otras citocinas tienen un tiempo de vida media de horas (Abul K. Abbas *et al.*, 2012; Apostolakis *et al.*, 2009; Arango Duque *et al.*, 2014; Medzhitov, 2008).

La IL-8 participa en la migración de monocitos al espacio subendotelial en las fases iniciales de la hipertensión y aterosclerosis, por ello se asocia al daño provocado en el endotelio que desencadena los desórdenes hipertensivos en el embarazo (H. Y. Kim *et al.*, 2008). La IL-8 es producida en la placenta humana durante el embarazo y sus niveles de IL-8 se asocian con la severidad del desorden hipertensivo durante la gestación. Esta interleucina es inducida de manera proporcional por angiotensina II (Arlie, 2017).

1.4 Citocromo P50 1A1 (CYP1A1)

La familia de las enzimas del citocromo P450 (CYP) están ampliamente implicadas en el metabolismo de fármacos y tóxicos. Por su parte el CYP de la familia 1A1 se expresa generalmente de manera extrahepática y es fácilmente inducible por compuestos exógenos y endógenos. Las moléculas endógenas que pueden inducirlo son ácido araquidónico y eicosapentaenoico, así también hormonas como el 17 β -estradiol y la melatonina. Sin embargo, también metaboliza compuestos exógenos que a su vez son inductores, por ejemplo, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y aminas heterocíclicas son metabolizados y a su vez inducen al CYP1A1. Esto se debe a la estructura de la enzima, el CYP1A1 la cual presenta un sitio activo grande y poco flexible, sin embargo, este citocromo presenta dos hélices cónicas denominadas F' y G' que se encuentran en la membrana y envuelven el sitio activo, por lo que permiten el paso solo de moléculas hidrofóbicas, como PAH, aminas aromáticas o dioxinas, al sitio activo (Walsh *et al.*, 2013).

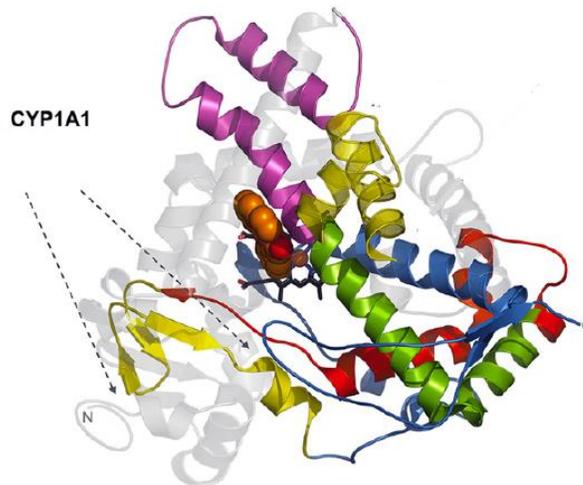


Figura 2.-Estructura en 3D del CYP1A1.

En la imagen se muestra la estructura molecular del CYP1A1 en color gris y en segundo plano se muestra la N terminal, en color azul y en primer plano la C terminal y en azul el grupo hemo. Imagen modificada de (Annalora *et al.*, 2017).

Esta enzima se puede encontrar en los tejidos que componen el sistema cardiaco como corazón, arterias pulmonares, ventrículo derecho, aorta, células musculares de la aorta, endotelio arterial y venoso. El CYP1A1, al metabolizar los compuestos genera metabolitos y estrés oxidante, que activan diferentes vías de señalización que pueden dañar al endotelio de los vasos sanguíneos favoreciendo el desarrollo de hipertensión, inflamación, aterosclerosis e incluso enfermedades coronarias (H. Y. Park *et al.*, 2015). Entonces las personas que están expuestas a alguna de las fuentes que contengan este tipo de moléculas planas e hidrofóbicas, las que incrementan el riesgo de presentar algún desorden hipertensivo durante el embarazo (Kopf *et al.*, 2010; Merhi *et al.*, 2015). En personas expuestas a bajas concentraciones de PAH, aminas aromáticas o dioxinas, los niveles que presentan son muy bajos o indetectables, mientras que, en personas expuestas a concentraciones mayores, cuentan con niveles altos de mRNA y proteína. Debe tenerse en cuenta que, en personas con hipertensión, el CYP1A1 y su receptor nuclear AhR están elevados en comparación con personas aparentemente sanas (Deng *et al.*, 2015; Y. J. Park *et al.*, 2008). Debido a estos hallazgos se ha sugerido que el mRNA del CYP1A1 puede emplearse como un marcador de efecto en humanos expuestos a contaminantes ambientales durante varios años (Heuvel *et al.*, 1993; J. H. Kim *et al.*, 2004).

1.5 Relación entre la madre y el feto

Durante muchos años se ha tratado de conocer la relación que guardan la madre y el feto durante el embarazo, sin embargo, esto ha resultado complicado debido a las complicaciones éticas al trabajar con humanos. Aun cuando existe una apreciable variación entre especies se ha logrado establecer que a través de la interfase materno-fetal se regulan diferentes procesos durante el embarazo, por ejemplo, el sistema inmune (Morelli *et al.*, 2015).

En la interfase materno-fetal las únicas células del feto que se encuentran en contacto directo con sangre de la madre son los trofoblastos, los cuales forman a la placenta. Esta estirpe celular toma los nutrientes y oxígeno de la madre y los hace llegar al feto, todo esto a través de la placenta y sin combinar ambos tipos sanguíneos. Esta barrera también funciona como protección para el feto, aunque es permeable a diferentes moléculas (Morelli *et al.*, 2015).

Se tiene la hipótesis de que la exposición *in útero* a citocinas que, provocada por una anomalía en la madre, puede ser el primer estímulo para iniciar el desarrollo del sistema inmune del feto, incluyendo la vida posnatal y adulta. Durante el embarazo la producción de citocinas es vital para lograr un correcto desarrollo en el feto, pero un exceso de estas puede conducir a una modificación en la programación del sistema inmune del mismo. Debido a esto se ha dado prioridad a estudiar las modificaciones del sistema inmune en las madres y así acercarse a posibles efectos en el neonato. Sin embargo, es posible que los efectos observados no sean totalmente extrapolables al producto, por lo que son necesarios más estudios que nos permitan conocer más íntimamente esta relación feto-madre, en este caso, sobre el sistema inmune (Cemgil Arikan *et al.*, 2012; Tosun *et al.*, 2010).

2. Justificación

Hasta el 2017, en el mundo y en México, los desórdenes hipertensivos (DH) durante el embarazo se presentaron en aproximadamente 10% de las mujeres. Los factores de riesgo para que se desarrollen estos DH son: su genética, historial clínico, así como la exposición a diferentes contaminantes, entre los cuales se encuentran los PAH. El metabolismo de este tipo de compuestos es realizado por el CYP1A1 que genera ROS, que tienen la capacidad de producir daño al endotelio venoso. Este daño es el detonante para que el proceso de hipertensión se desarrolle desencadenando la liberación de citocinas proinflamatorias al torrente sanguíneo, tales como IL-6 e IL-8, con el objetivo de reparar el daño, sin embargo, el proceso hipertensivo se mantiene.

Durante la gestación, la madre puede presentar hipertensión causando daño tanto a sí misma, al producto o a ambos, producto de una inflamación vascular excesiva que resulte en preeclampsia y eclampsia en la madre, y, en consecuencia el producto puede presentar bajo peso al nacer, estrés antes y durante el parto e incluso la muerte tanto del producto como de la madre. Cabe mencionar que las secuelas de esta condición pueden manifestarse posteriormente en la madre y durante la vida posnatal del producto.

Aunque se han investigado activamente los mecanismos por los cuales se desarrolla este tipo de desórdenes en la madre, a la fecha, no se conocen los efectos que esta condición clínica produzca en los tejidos del producto. Por ello, es relevante investigar si la expresión (mRNA) de las interleucinas, relacionadas con la hipertensión, *IL-6* e *IL-8*, se regulan de manera similar a la madre en las células endoteliales del producto; adicionalmente, evaluar; si algunas enzimas productoras de intermediarios reactivos, con capacidad de producir daño endotelial, como el CYP1A1, se encuentran presentes en el tejido neonatal sometido a la condición hipertensiva de la madre.

3. Hipótesis

Los cultivos primarios individuales de células de endotelio venoso del cordón umbilical (HUVEC), provenientes de mujeres hipertensas al momento del parto, presentarán alteraciones en los niveles de expresión del mRNA de las interleucinas proinflamatorias *IL-6* e *IL-8*, y en la presencia del mRNA de *CYP1A1*.

4. Objetivos

4.1 General

Evaluar la expresión del mRNA de las *IL-6* e *IL-8* y la presencia de *CYP1A1* en cultivos individuales de células HUVEC obtenidas de mujeres hipertensas y normotensas en labor de parto que se presentaron al Hospital General Ticomán.

4.2 Particulares

- Evaluar los niveles de expresión del mRNA de los genes *IL-6* e *IL-8* en cultivos primarios individuales de células HUVEC provenientes de las mujeres donadoras en trabajo de parto mediante RT-qPCR.
- Identificar la presencia del mRNA del gen *CYP1A1* en cultivo primario de células HUVEC provenientes de mujeres normotensas e hipertensas, mediante RT-qPCR.

5. Métodos

5.1 Población de estudio

Los cordones umbilicales se recolectaron de mujeres en labor de parto que recibieron atención en el Hospital General Ticomán de la Ciudad de México. Al momento de la admisión las pacientes fueron diagnosticadas y separadas en grupos según los siguientes criterios médicos. Los criterios de inclusión para el grupo DH según los lineamientos de la Secretaría de Salud (SSA, 2007) fueron los siguientes: presentar una presión sanguínea sistólica ≥ 140 mm Hg o una presión sanguínea diastólica ≥ 90 mm Hg. Algunas de las pacientes presentaron proteinuria ≥ 30 mg de albumina/dl en pruebas con tira reactivas, lo que correspondió a (1+) según las recomendaciones de la Secretaría de Salud (SSA, 2007). De los datos clínicos obtenidos se obtuvieron dos grupos. El grupo control (n = 53) y el grupo con DH (n = 36). El proyecto se realizó con la aprobación del comité de ética del Hospital Ticomán (número de referencia E1/230/2012) y con el consentimiento informado de cada paciente que entró al estudio.

5.2 Cultivo celular

De manera inicial, los cordones umbilicales se recolectaron y se transportaron al laboratorio en buffer HEPES estéril a temperatura ambiental. Los cordones se mantuvieron en HEPES por un tiempo máximo de 4 h. Al llegar al laboratorio, cada cordón umbilical se limpió con antisépticos y se aislaron las células endoteliales mediante una disociación con colagenasa II al 0.02% por 20 min a 37°C. Las células que se recolectaron de este proceso se mantienen en medio M199 complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, 1 mg/mL de heparina y 20 μ g/mL de factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF). Finalmente, las células se mantuvieron en un ambiente humidificado a 37°C con 5% de CO₂. Se prepararon cultivos individuales, es decir, se obtuvo un cultivo primario por cada cordón umbilical. Los cultivos primarios se cultivaron y evaluaron de manera independiente para diferenciar las pacientes normotensas de las que presentaban hipertensión.

5.3 Extracción de RNA por el método de TRIZOL

Principio

El TRIZOL es un reactivo que asegura la extracción de RNA, DNA y proteínas de buena calidad y de manera simultánea mediante un proceso mejorado al desarrollado por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski *et al.*, 1987). Este reactivo está compuesto por fenol e isotiocianato de guanidina y extrae selectivamente al RNA manteniendo su integridad e inhibiendo la actividad de las RNAsas durante el proceso de homogeneización y lisado de las células.

Procedimiento

El reactivo TRIZOL se agregó directamente a la caja de Petri para lisar las células en cultivo. Después este lisado se transfirió a un microtubo donde se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 100 μ L de cloroformo por cada 500 μ L de reactivo TRIZOL y se agitó arduamente por 15 s. La suspensión se incubó nuevamente por 23 min (15-30°C) y se centrifugó a 12 000 X g por 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo adicionándole 250 μ L de isopropanol y se incubó toda la noche a -70°C. El RNA se obtuvo por centrifugación a 12 000 X g por 10 min a 4°C y se lavó 2 veces con etanol al 70%. El RNA se secó al aire por 12 min, se disolvió en agua DEPC y se incubó a 58°C por 17 min. El RNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

5.4 Síntesis de cDNA mediante el sistema SuperScript®III

Principio

El SuperScript®First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher™) para RT-PCR es un método que mejora la síntesis de DNA de cadena simple a partir de una muestra de RNA purificado. Esta enzima proporciona mayor estabilidad al proceso de retrotranscripción así como mejores rendimientos y mayor longitud de cadena. La enzima SuperScript®III no se

inhibe por los RNA de transferencia o ribosomales, por lo que una muestra de RNA total puede ser perfectamente usada (Invitrogen®).

Procedimiento

Un microgramo de RNA total fue tratado con DNasa I (Invitrogen®) para eliminar el DNA contaminante en la muestra. El procedimiento de digestión con DNasa se realizó según lo especificado por el fabricante. Al término de esta técnica, se colocaron en un tubo de reacción los siguientes reactivos: 1 µl de Oligo dT 50 µM, 1 µl de dNTPs mix 10 mM y 0.8 µg de RNA tratado con DNasa. La mezcla se incubó a 65°C por 5 min y se colocó en hielo al menos 1 min. Posteriormente, se agregaron 2 µL de 10X RT buffer, 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de DTT 0.1 M, 1 µL de RNase OUT 40 U/µL y 1 µL de SuperScriptIII 200 U/µL. Se incubó a 50°C por 50 min, se inactivó calentando a 85°C por 5 min, y se agregó 1 µL de RNasa H (2 U/µL) para remover el RNA complementario calentando a 37°C por 20 min. Finalmente, el cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.5 Validación del método qPCR

El análisis de la expresión génica por qPCR generalmente se lleva a cabo por el método comparativo $\Delta\Delta C_t$, el cual implica la amplificación del gen problema junto con un gen de expresión constante denominado gen constitutivo. Para ello el método requiere ser validado mediante la elaboración de curvas estándar de calibración para ambos genes y corroborar que las eficiencias de reacción de ambos genes son similares.

5.6 Curva estándar de calibración

Principio

La curva estándar de calibración consiste en la amplificación de diluciones seriadas de cDNA o RNA. Cada curva debe presentar al menos cinco puntos logarítmicos de concentración, así como tres repeticiones por cada punto. Los valores de Ct (ciclo donde

los niveles de transcrito superan la línea basal) obtenidos se grafican contra la concentración de RNA obtenido expresado en manera logarítmica ($\log [RNA]$). Estas graficas nos darán los parámetros de regresión lineal, coeficiente de correlación (R^2), ecuación de la recta y finalmente el rango dinámico que es el que nos indicará las concentraciones en las cuales la qPCR es cuantitativa. Para calcular la eficiencia de reacción se obtiene de la ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

Donde m representa la pendiente de la recta la cual debe tener valores de $-3.32 \pm 10\%$, para que la eficiencia sea igual a $100 \pm 10\%$. La fórmula por la cual se puede calcular la eficiencia de reacción a partir de la pendiente de la curva es:

$$E = (10^{-1/m} - 1) \times 100$$

Procedimiento

La curva estándar se construyó con mínimo cinco diluciones seriadas (1:5) de RNA de concentración conocida. Esto para construir la gráfica que nos arrojará los parámetros de la regresión lineal como el coeficiente de correlación R^2 y la eficiencia de reacción.

5.7 Validación del método comparativo $\Delta\Delta Ct$

Procedimiento

Al ser obtenidas las curvas estándar de los genes de interés (blanco) y el gen de expresión constante (endógeno), los valores Ct se procesaron para obtener una nueva gráfica en donde se colocó el $\log [RNA]$ contra el ΔCt , el cual equivale al $Ct_{Blanco} - Ct_{endógeno}$ obtenido a la misma concentración de RNA. Después se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta. Para aprobar el método de validación la m debería tener valores de -0.1 a 0.1.

5.8 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Principio

La PCR en tiempo real es un método cuantitativo donde se observa la amplificación del gen de interés mientras que puede ser cuantificado de manera simultánea. Este método es ampliamente utilizado para evaluar y cuantificar secuencias específicas de DNA. La muestra se monitorea ciclo a ciclo observando los cambios en la señal fluorescente, en donde a mayor concentración de muestra se requieren menos ciclos para obtener una señal. Este es un método preciso, exacto y muy sensible.

Procedimiento

El método de PCR en tiempo real se realizó en el equipo StepOne Plus (Life Technologies™) y se emplearon sondas TaqMan® para la ampliación de los genes *GAPDH* (gen endógeno), *IL-6* e *IL-8*. El cDNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y se diluyó a una concentración de que quedó intermedia dentro de la curva estándar. Las condiciones de amplificación fueron: un pre-ciclo a 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s y 60°C por 1 min. La tabla 1 muestra el número de identificación de los ensayos TaqMan utilizados. Los resultados de ciclos de amplificación serán evaluados para hacer la expresión cuantitativa.

Tabla 1.-Clave de identificación de ensayos TaqMan utilizados.

<i>Gen</i>	<i>Identificación del ensayo</i>
GAPDH	Hs003929097_g1
CYP1A1	Hs00153120_m1
IL-6	Hs00985639_m1
IL-8	Hs00174103_m1

5.9 Ensayos de Presencia/Ausencia

Principio

Los ensayos de Presencia/Ausencia son ensayos de punto final, en estos se recolectan los datos obtenidos al final de la PCR y se cuantifica el producto final de la PCR el cual se normaliza por la intensidad del reportero (ROX) o el Rn (reportero normalizador). El objetivo de estos ensayos es evaluar la presencia de una sonda específica y principalmente se evalúan patógenos. El método se desarrolló debido a que en ocasiones secuencias insertadas en el DNA suelen estar muy cerca del límite de detección y no puede ser cuantificable. Con este método Applied Biosystems® (Life Technologies, Carlsbad, CA) favorece la detección cerca de estos límites. Para detectar la presencia o ausencia de un gen el equipo lee antes de iniciar la PCR, la amplificación y lee después de la PCR con esto calcula un $\Delta Rn = Rn \text{ antes de la lectura} - Rn \text{ después de la lectura}$. El resultado se compara con un control negativo concluyendo con una presencia o ausencia del gen.

Procedimiento

El método de para evaluar Presencia/Ausencia por PCR en tiempo real se realizó en el equipo StepOne Plus (Life Technologies™, California, EUA) y se emplearon sondas TaqMan® para la ampliación del gen CYP1A1. El cDNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y se diluyó a una concentración final de uso de 100 ng. Las condiciones de amplificación fueron: un pre-ciclo a 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s y 60°C por 1 min. La tabla 1 muestra el número de identificación del ensayo TaqMan utilizado.

5.10 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la PCR fueron procesados con el software GenEx versión 6 (Multi Analyses AB). El procesamiento de los datos incluyó en la corrección de la eficiencia por gen, la calibración entre replicados, la identificación y eliminación de atípicos y finalmente,

el promedio entre repeticiones de los resultados de PCR. Los niveles de expresión relativa se calcularon usando el método comparativo $\Delta\Delta C_t$ y se expresaron como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los datos estadísticos se analizaron con el programa STATA versión 14. El criterio de exclusión de los valores atípicos fue que la muestra excediera la media \pm cuatro desviaciones estándar.

6. Resultados

6.1 Población de estudio

La recolección de los cordones umbilicales se realizó en el periodo de agosto-septiembre del 2013. Los estudiantes a cargo del proyecto mantuvieron comunicación con el Hospital para recibir los cordones. Los cordones eran cortados y preparados por los médicos, también realizaban la clasificación de las muestras de acuerdo con los signos de la madre y finalmente se otorgaba el cordón umbilical. Se elaboró un formato sencillo que incluyó datos generales de la madre como: edad, presión sistólica, presión diastólica, proteína en orina, semanas de gestación y peso del recién nacido. Debe mencionarse que, debido a los procedimientos hospitalarios no fue posible obtener mayor información de las embarazadas.

La tasa de respuesta de las mujeres que decidieron entrar al estudio fue del 100%, ninguna embarazada se negó a donar el cordón umbilical ni a proporcionar la información solicitada el día del parto. Se descartaron del estudio aquellos cordones umbilicales de madres que presentaron infección vaginal, pues era posible que los cordones se contaminaran al momento de pasar por el canal vaginal; también se descartaron los cordones que provenían de neonatos que presentaron enfermedades infecciosas (virus o bacterias) o genéticas (síndromes o enfermedades congénitas).

Los datos obtenidos de estas encuestas se resumen en la tabla 1, en donde se aprecia una diferencia significativa en la presión arterial tanto sistólica como diastólica entre las mujeres con DH y las normotensas. En mujeres que presentaron presión arterial elevada se midieron las proteínas en orina con un *dipstick test* y mostraron valores desde 1 (+), 2 (++) y 3(+++) lo cual es equivalente a 30, 100 y 300 mg/dL, respectivamente.

Tabla 2.-Características de la población en estudio.

	<i>Normotensas</i>	<i>Desorden hipertensivo</i>
<i>n</i>	53	36
<i>Edad (años)</i>	24.22 ± 6.16	25.25 ± 7.36
<i>Presión sistólica (mm Hg)</i>	110.50 ± 7.19	146.16 ± 16.67 **
<i>Presión diastólica (mm Hg)</i>	71.15 ± 6.75	94.25 ± 12.37 **
<i>Proteinuria (dipstick test)</i>	NE	2 ± 1.21
<i>Semanas de gestación</i>	39.08 ± 1.38	39.41 ± 1.07
<i>Peso del recién nacido</i>	3024.62 ± 430.96	2842.917 ± 688.1545

Los datos muestran la desviación estándar. El análisis se realizó con la prueba de Wilcoxon con ** $p > 0.001$. NE (no evaluado).

6.2 Validación del método comparativo $\Delta\Delta Ct$

El cDNA obtenido de los cultivos primarios individuales se almacenó a -70°C hasta su uso. Posteriormente se realizaron las pruebas de RT-qPCR para comprobar el buen estado de las muestras y que su amplificación fuera adecuada. Enseguida se procedió a validar el método de PCR. Para ello, de manera inicial se determinó la eficiencia de amplificación de cada uno de los genes de estudio mediante la generación de curvas estándar, y posteriormente, se compararon las pendientes de las curvas de los genes de interés contra el gen endógeno y, finalmente, se analizó la expresión génica mediante el método comparativo $\Delta\Delta Ct$.

Como dato extra, se evaluaron los datos de amplificación del gen endógeno (GAPDH) en conjunto, así como por grupos separados (normo- e hipertensas) para descartar alguna diferencia en la amplificación del mRNA del gen endógeno; la figura 3 muestra que no se encontraron diferencias significativas en los valores de Ct promedio del gen endógeno obtenidos de los cultivos de células HUVEC recolectadas.

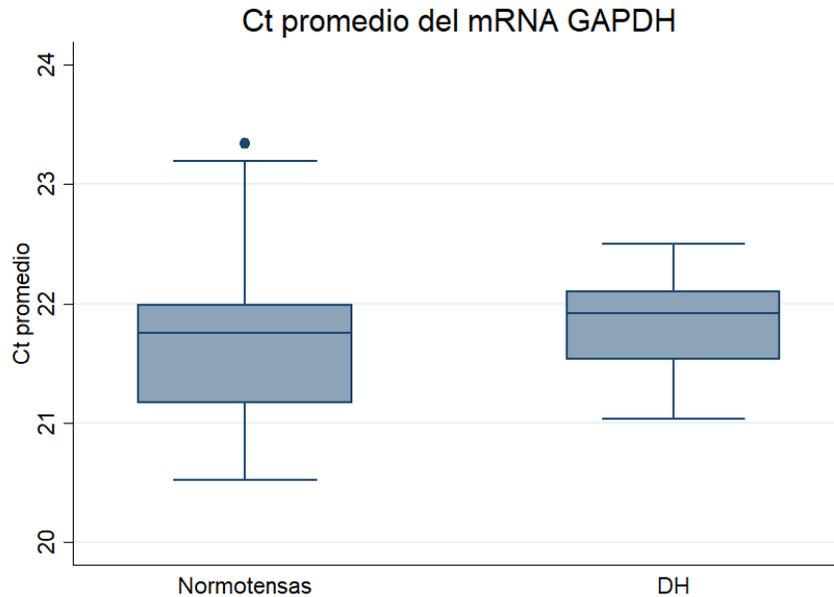


Figura 3.-Comparación de los Ct promedio en células HUVEC.

Se evaluaron los Ct promedios de la amplificación del mRNA del gen endógeno (*GAPDH*) y se compararon según si las células HUVEC provenían de una mujer normotensa o de una mujer que presentó hipertensión. No se encontraron diferencias significativas. *t* de Student * $p > 0.05$.

6.2.1 Curvas estándar

Se realizaron curvas estándar para la amplificación de los genes *GAPDH*, como gen endógeno e *IL-6* e *IL-8* y *CYP1A1* como genes de estudio. Para la realización de estas, se prepararon cinco diluciones seriadas de una concentración conocida de cDNA (1:2) y se sometieron a PCR en tiempo real (como se describió en el apartado de métodos). En la figura 4 se muestran las curvas estándar obtenidas y en ellas se indica la ecuación de la recta que es el producto de la regresión lineal del valor de Ct promedio de cada dilución contra el logaritmo de la concentración de cDNA utilizado. A partir de estas se obtienen los datos de eficiencia de reacción, que se calculan a partir de las pendientes de la recta, las cuales indican eficiencias de 95.779%, 104.58%, 96.74% y 78.42% para *GAPDH*, *IL-6*, *IL-8* y *CYP1A1*, respectivamente. También se muestra el coeficiente de correlación (R^2) que indica la precisión del ensayo.

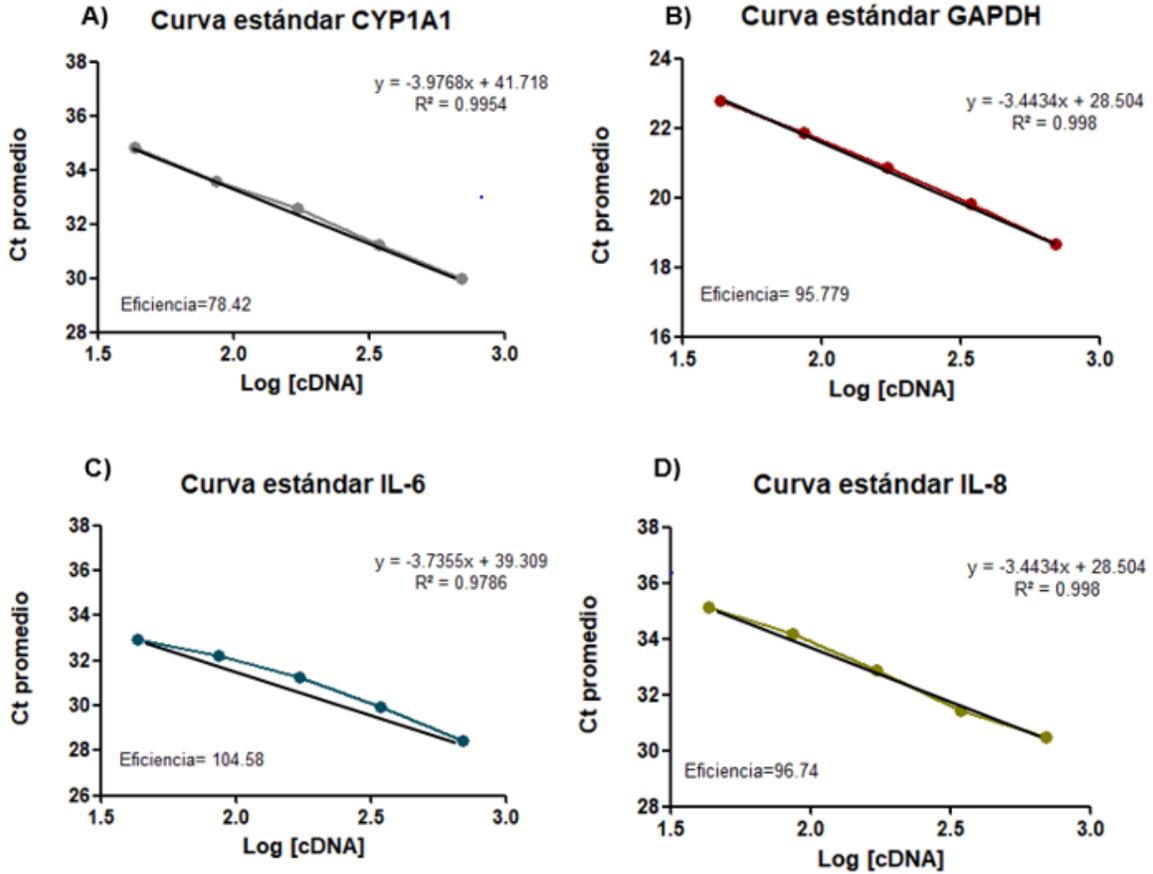


Figura 4.- Curvas estándar.

Se elaboraron curvas estándar de amplificación para los genes A) *CYP1A1*, B) *GAPDH*, C) *IL-6* y D) *IL-8* utilizando diluciones seriadas de una muestra de concentración conocida de cDNA contra el Ct promedio resultante de la amplificación de cada dilución. Se muestra la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación R^2 y la eficiencia de la reacción.

6.2.2 Validación del método

Para validar el método de Ct comparativo (Ct), se corroboró la eficiencia de amplificación entre el gen de interés y el gen endógeno sea similar, para que puedan ser comparables. Para ello se determinó el ΔCt , que equivale a la diferencia entre el Ct del gen blanco menos el Ct del gen endógeno ($\Delta Ct = Ct \text{ blanco} - Ct \text{ endógeno}$), y este valor se coloca en una gráfica para compararlo contra el log de la concentración de cDNA. En la figura 5 y 6 se

observa las gráficas de validación para los genes *IL-6*, *IL-8* y *CYP1A1* utilizando como gen endógeno a *GAPDH*. Se muestra que para *IL-6* e *IL-8* se encontraron valores de ambas pendientes ente 0.1 y -0.1, lo que indica que es factible utilizar el método comparativo $\Delta\Delta Ct$ para evaluar los niveles de expresión de ambos genes. Por otra parte, se puede observar que la pendiente de *CYP1A1* presenta valores superiores a 0.1 por lo cual este gen no aprueba la validación del método. Así mismo, se obtuvo el rango dinámico de trabajo, el que indica las concentraciones de cDNA entre las cuales los datos de amplificación obtenidos son confiables. Conforme a estos datos se estableció una concentración de trabajo de 100 ng de cDNA ($\log [cDNA] = 2$) para realizar los ensayos de qPCR.

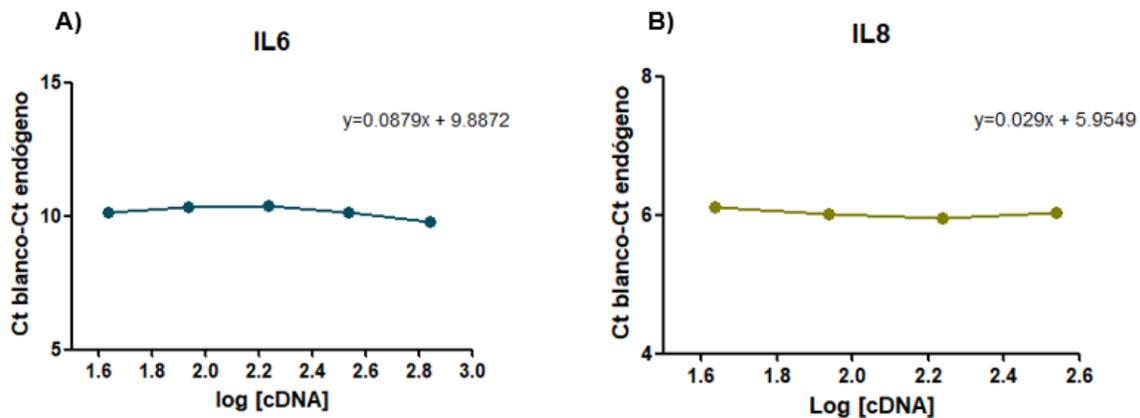


Figura 5. Gráficas de validación del método $\Delta\Delta Ct$.

Las gráficas muestran los resultados de la comparación de las curvas estándar del gen endógeno (*GAPDH*) y los genes de interés (*IL-6* e *IL-8*) el ΔCt contra el $\log [cDNA]$. A) Rango dinámico y validación para *IL-6* con una pendiente de 0.0879 B) Rango dinámico y validación de *IL-8* con una pendiente de 0.029. Ambas aprueban la validación.

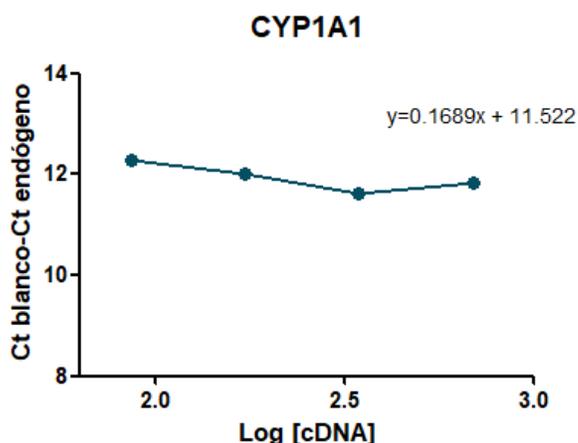


Figura 6. Gráfica de validación del método $\Delta\Delta C_t$.

La gráfica muestra los resultados de la comparación de las curvas estándar del gen endógeno (*GAPDH*) y el gen de interés (*CYP1A1*). Rango dinámico y validación para *CYP1A1* con una pendiente de 0.1689. El *CYP1A1* no aprueba la validación.

6.3 Expresión del mRNA de *IL-6* e *IL-8* en células HUVEC

Conforme a lo que se ha descrito en años anteriores (Cemgil Arikan *et al.*, 2012; Reyna *et al.*, 2012), en las madres con DH las interleucinas proinflamatorias como la *IL-6* e *IL-8* se encuentran elevadas; este aumento se relaciona con la severidad de la afección, por ello el interés de evaluar el mRNA de los genes de dichas interleucinas para observar si los efectos que se reporta en la madre se presentan en el tejido neonatal. En la figura 8, podemos observar que el mRNA de *IL-6* e *IL-8* se encuentra disminuido en las células HUVEC provenientes de mujeres que presentaron DH durante el parto en comparación con los mRNA de dichos genes en células HUVEC que provenían de mujeres normotensas. Esta disminución en la expresión relativa de las interleucinas es estadísticamente significativa para ambas, *IL-6* e *IL-8*.

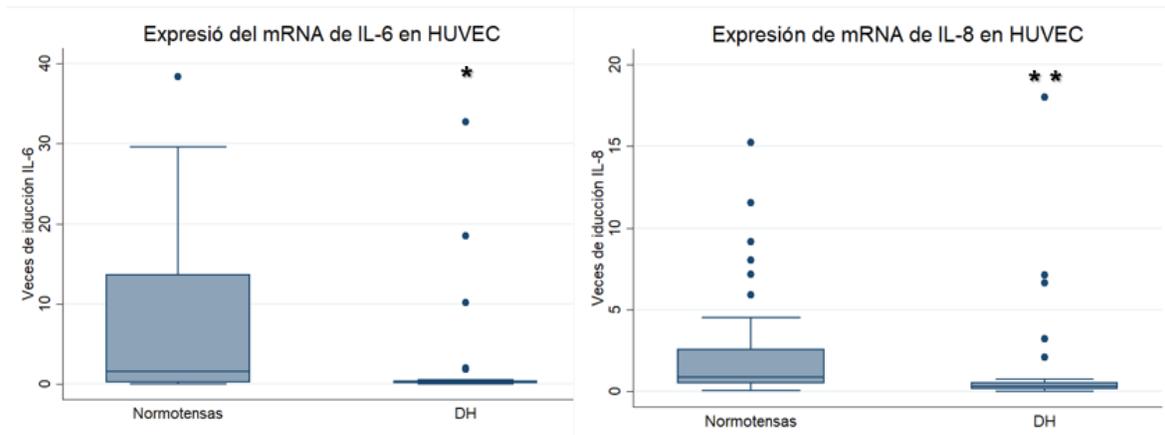


Figura 7. Expresión de interleucinas en células HUVEC provenientes de embarazadas normo- y con DH

Expresión relativa del mRNA de los genes IL-6 e IL-8 en cultivos primarios de células HUVEC aisladas de mujeres con un embarazo normal y mujeres que presentaron un desorden hipertensivo. Las gráficas de caja representan la mediana y el rango de datos. Prueba de Wilcoxon. * $p > 0.05$; ** $p > 0.005$

Con los datos obtenidos se formó una base de datos donde además de los resultados ya mostrados se encontró una relación entre el aumento de la expresión del mRNA de *IL-6* y la presencia del mRNA del gen del *CYP1A1*, pero interesadamente, pues esta relación se observó únicamente en células HUVEC que provenían de mujeres que habían presentado un embarazo normal (figura 9). Esta relación es estadísticamente significativa.

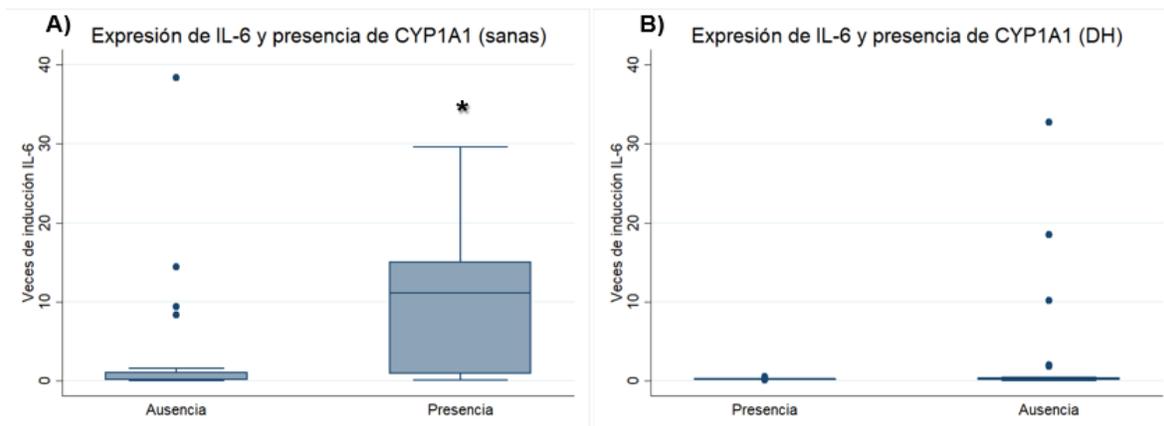


Figura 8.- Comparación de la expresión de *IL-6* contra la presencia de *CYP1A1* en cultivos primarios de células HUVEC donadas de mujeres sanas y con DH.

Las gráficas muestran la expresión relativa del mRNA del gen *IL-6* en cultivos primarios de células HUVEC aisladas de A) mujeres con DH y B) las que presentaron un embarazo normal. Las gráficas de caja representan la mediana y el rango de datos. Prueba de Wilcoxon. * $p > 0.05$

Otro resultado encontrado fue la correlación positiva y estadísticamente significativa entre la inducción del mRNA de ambas interleucinas proinflamatorias. Como se muestran en la figura 10 la correlación de la expresión de *IL-6* e *IL-8* en las células HUVEC es fuerte, con un valor de correlación de Spearman (r) igual a 0.7118 y $p \geq 0.0001$. Sin embargo, el grupo de las muestras provenientes de madres con DH se aglomeran debido a la baja expresión. En la figura 11 se observa la correlación entre estas interleucinas, pero agrupando de acuerdo a que, las células HUVEC provenían de madres con DH o normotensas. Observamos que, aunque ambas correlaciones resultan significativas ($p \geq 0.0001$) es más fuerte la correlación en las células HUVEC que provienen de mujeres con DH ($r = 0.7664$ y un $R^2 = 0.4314$) que la correlación de las HUVEC que donadas de mujeres normotensas ($r = 0.6107$ y un $R^2 = 0.0599$). La correlación positiva nos indica que la expresión de estos transcritos será proporcional, lo que quiere decir que, si el mRNA de una interleucina aumenta, el mRNA de la otra lo hará y si alguna disminuye, el mRNA de la otra interleucina también disminuirá. Y, la diferencia en el valor de R^2 indica en primer lugar que las pendientes de la correlación de las interleucinas proinflamatorias son diferentes dependiendo si las células HUVEC provienen de madres normotensas o hipertensas. En segundo lugar nos dice que tan explicativo resulta este modelo para los efectos que

estamos observando. Para el grupo de las células HUVEC que provienen de madres normotensas, la correlación solo nos explica el 5.99% de los efectos observados en estas interleucinas, por su parte la correlación de las células HUVEC provenientes de mujeres que presentaron hipertensión nos explica un 43.14% de los efectos observados. Esto nos lleva nuevamente a encontrar diferencias entre los grupos de HUVEC evaluados.

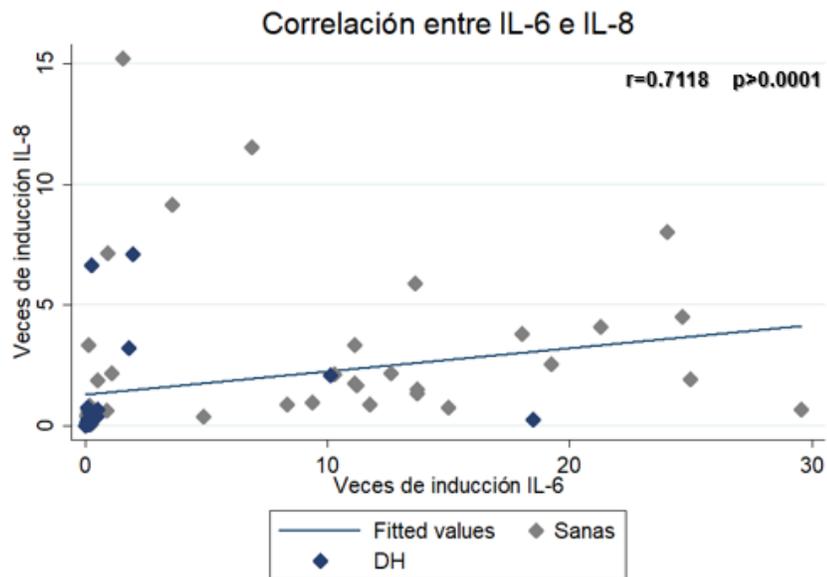


Figura 9.- Correlación entre la expresión de interleucinas pro-inflamatorias.

Se muestra la correlación de la expresión de los genes *IL-6* e *IL-8* en cultivos primarios de células HUVEC tanto de mujeres sanas mujeres como de mujeres con desorden hipertensivo (DH). El coeficiente de correlación Spearman (ρ) al igual que el valor de p se muestran en la esquina superior derecha.

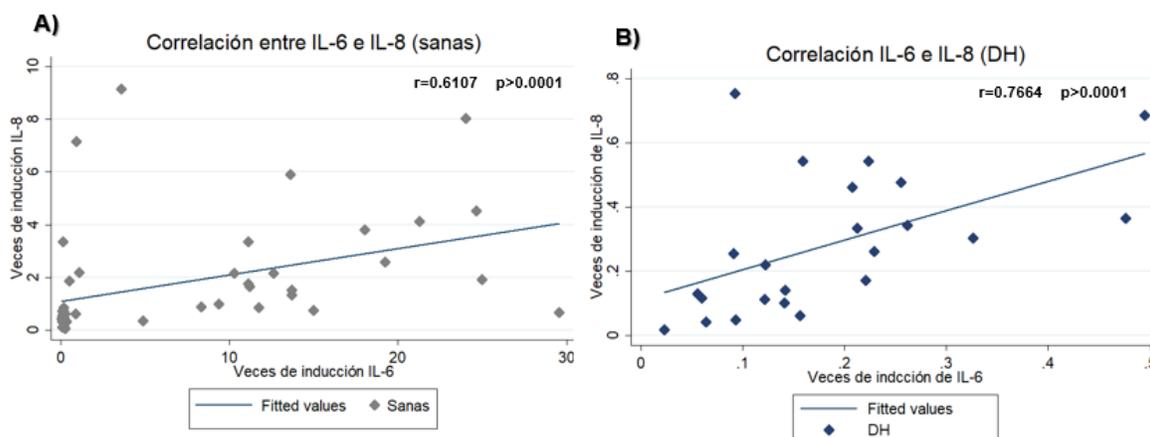


Figura 10.- Correlación entre la expresión de interleucinas proinflamatorias.

Se muestra la correlación de la expresión de los genes *IL-6* e *IL-8* en cultivo de células HUVEC provenientes de A) mujeres sanas y B) mujeres con desorden hipertensivo (DH). El coeficiente de correlación Spearman (ρ) al igual que el valor de p se muestran en la esquina superior derecha de cada gráfico.

6.4 Presencia del mRNA *CYP1A1* en células HUVEC

El *CYP1A1* es una de las principales enzimas encargada de metabolizar xenobioticos, las características estructurares de sus sustratos planares, p. ej., PAH y AA, y por ello se utiliza como marcador de efecto (Heuvel *et al.*, 1993; J. H. Kim *et al.*, 2004), y como tal fue considerado en este trabajo. Al realizar la validación del método concluimos que este gen no obtuvo la eficiencia esperada, por lo tanto, los datos no fueron utilizados para calcular los $\Delta\Delta Ct$ correspondientes, aunque si era aptos para realizar análisis de Presencia/Ausencia del mRNA del *CYP1A1* en las células HUVEC donadas. El 55.36% de los cultivos HUVEC provenían de embarazadas normotensas, y de ellas 31 de 53

presentaron este gen; respecto a las madres DH, 81.48% de esos cultivos HUVEC, 25 de 30 presentaron el gen (Figura 7). El análisis nos presenta un valor para $\chi^2 = 5.39$, que es estadísticamente significativa ($p = 0.02$), estos resultados nos indican que la presencia del mRNA del *CYP1A1* en cultivos HUVEC está relacionada con el DH de la madre.

mRNA del CYP1A1	Diagnostico del paciente		Total
	Normotensa	DH	
Ausencia	22	5	27
Presencia	31	25	56
	53	30	80

Chi² = 5.39 p = 0.020

Figura 11.- Presencia del CYP1A1 en cultivos primarios de células HUVEC donadas de mujeres sanas y con DH.

Se observó la relación entre la presencia del gen mRNA del *CYP1A1* en HUVEC y el desarrollo de DH en madres. Se muestra la tala de contingencia con la prueba de χ^2 . * $p > 0.05$

Para corroborar que existiera una diferencia en la amplificación del mRNA del *CYP1A1* se realizó la comparación del promedio de los datos de amplificación (Ct) separado si las muestras provienen de embarazos normo o hipertensos y observamos que, a pesar de la amplia dispersión de los datos, los valores de Ct promedio del *CYP1A1* son menores en las células HUVEC provenientes de madres que presentaron DH comparado con las HUVEC provenientes de madres normotensas, como se muestra en la figura 8. La diferencia entre las medianas de estos datos es estadísticamente significativa.

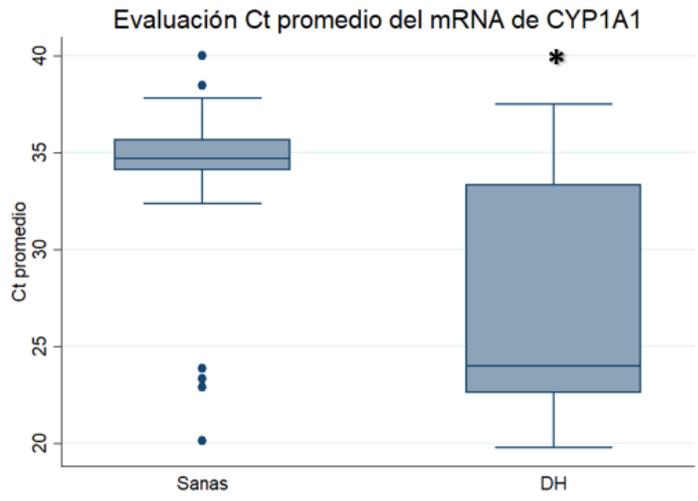


Figura 12.- Comparación de los Ct promedio del mRNA de *CYP1A1* en cultivo primario de células HUVEC.

Las gráficas de caja y bigotes muestran el valor de Ct promedio en cultivos primarios de células HUVEC obtenidas de madres normotensas y de madres que presentaron DH. En la gráfica se muestra la mediana y el rango de datos. Prueba de Wilcoxon * $p < 0.05$.

7. Discusión

7.1 Expresión de las interleucinas en células HUVEC

De manera inicial sabemos que las células HUVEC pueden expresar interleucinas proinflamatorias como la IL-6 e IL-8 cuando se presenta un estímulo específico (Allam *et al.*, 2013). Sin embargo, no se tiene conocimiento de que se haya evaluado como resultado de un embarazo que curse con algún desorden hipertensivo.

7.1.1 Disminución de la expresión del mRNA de IL-6 e IL-8

Por los antecedentes, habría que tener en cuenta que las interleucinas proinflamatorias, tanto en el suero materno como en el suero del cordón umbilical pueden aumentar debido

a la presencia de DH durante el embarazo (Cemgil Arikan *et al.*, 2012; Tosun *et al.*, 2010). Sin embargo, en células HUVEC se observó que los valores de mRNA de las interleucinas disminuyen significativamente cuando estas provienen del cordón umbilical de un embarazo que curso con DH. Estos resultados en tejido del neonato muestran un contraste con los efectos que se han reportado en las madres, y son relevantes debido a que ambos se encuentran recibiendo el mismo estímulo.

En este estudio se evaluó la transcripción de las interleucinas proinflamatoria *IL-6* e *IL-8* en tejido neonatal (células HUVEC) y se comparó con datos obtenidos en el suero de las madres. Olusi, *et al* (2000) evaluaron las interleucinas proinflamatorias y antiinflamatorias en suero de madres con preeclampsia y madres con un embarazo normal, encontrando que las madres preeclámpsicas tienen menores concentraciones de interleucinas proinflamatorias en suero respecto a las madres normotensas. Estos resultados, al igual que los nuestros contrastan con los que otros autores han obtenido. Sin embargo, comentan que las interleucinas proinflamatorias también pueden ser inducidas por otras razones, por lo que puntualizan que las mujeres evaluadas no presentaron infecciones (Olushi *et al.*, 2000). Este resultado, aunque evalúan proteína en suero de las embarazadas y no mRNA, muestra datos semejantes a los descritos en este estudio.

Por otra parte, las infecciones del neonato pueden inducir las interleucinas proinflamatorias, entre ellas *IL-6* e *IL-8*, presentes en la sangre de cordón umbilical, y la concentración de estas, está asociada a su gravedad. Cuando la madre presenta una infección muy avanzada, incluyendo necrosis al momento del parto, las concentraciones de estas interleucinas en suero sanguíneo del cordón umbilical y en líquido amniótico eran muy elevadas (Andrrys *et al.*, 2010; Berner *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2002).

Finalmente, puede observarse que las células HUVEC obtenidas de embarazadas cursando con DH regulan la expresión de *IL-6* e *IL-8* de manera diferente a las madres normotensas y, posiblemente, responden de manera diferente al mismo estímulo. En este proyecto se evaluó la expresión del mRNA de interleucinas proinflamatorias, sin embargo, es posible que además de los genes de la *IL-6* e *IL-8*, la expresión de otros genes, puede que también se afecte dependiendo de las condiciones de salud de la madre y del feto.

7.1.2 Expresión del mRNA de IL-6 y presencia del mRNA de CYP1A1

La IL-6 es una interleucina que puede ser inducible cuando el sistema lo requiera, por su parte, el CYP1A1, es una enzima que además de ser inducible por xenobióticos, su actividad genera metabolitos activos y ROS. Los resultados obtenidos muestran que existe una relación entre el aumento del mRNA de la *IL-6* observado y la presencia del mRNA del *CYP1A1*, pero únicamente en las células HUVEC provenientes de madres normotensas.

DiNatale *et al.*, (2010), evaluaron la actividad del receptor a hidrocarburos aromáticos (AhR) y la inducción de CYP1A1; como consecuencia observaron que la transcripción de esta enzima y la de *IL-6* están relacionadas, ya que cuando las células son estimuladas con un activador del AhR, y por lo tanto de CYP1A1 (como TCDD o PAH), incrementan los niveles del mRNA del *CYP1A1* a la vez que aumenta el transcrito de *IL-6*. Por el contrario, si se agrega como estímulo un inhibidor del AhR, no solo se inhibe la expresión del *CYP1A1*, también lo hace la transcripción de la *IL-6*; estas observaciones podrían explicar, en cierta medida, la relación entre el aumento del mRNA de la *IL-6* y la presencia del mRNA del *CYP1A1*. Sin embargo, no explican porque el efecto sólo se observa en cultivos HUVEC que provienen de mujeres sanas y no en las obtenidas a partir de pacientes con DH. (DiNatale, Murray, *et al.*, 2010; DiNatale, Schroeder, *et al.*, 2010; DiNatale *et al.*, 2011).

Aunque posiblemente son los ROS y los metabolitos activos, producto de la actividad del CYP1A1, los responsables del daño al endotelio y favorecen la activación del sistema inmune aumentando la concentración sanguínea de citocinas e interleucinas (Henriquez-Olguin *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). Sin embargo, el hecho de que la respuesta no se observe en cultivos HUVEC provenientes de madres con DH, persiste, aunque al igual que los ROS y los metabolitos activos, también debería afectar a la *IL-8*.

7.1.3 Correlación entre la expresión del mRNA de ambas interleucinas proinflamatorias

Finalmente, se obtuvo una correlación positiva entre la expresión de los mRNA de *IL-6* y de *IL-8*, que sugiere que el sistema inmune se activa; ambas interleucinas se inducen simultáneamente como respuesta a una situación de riesgo (Turner *et al.*, 2014). La correlación entre la expresión del mRNA de las interleucinas proinflamatorias observada en

este estudio fue positiva y estadísticamente significativa, esto a su vez muestra y que la inducción del mRNA de ambas interleucinas, *IL-6* e *IL-8*, será proporcional.

Al separar la correlación de estas interleucinas según el origen de las células HUVEC, de madres normotensas o que cursan con DH, mostraron pendientes diferentes, que quedó de manifiesto al realizar una regresión lineal robusta, y comparar los coeficientes de correlación (R^2) respectivos: madres con DH ($R^2=0.43$) vs normotensas ($R^2=0.05$). Este dato nos muestra que en las células provenientes de embarazos que presentaron DH, se observaron una activación del sistema inmune, mientras que en las HUVEC que provienen de embarazos sanos el sistema inmune se encuentra muy poco activado.

7.2 Presencia del mRNA del CYP1A1

El CYP1A1 es una de las principales enzimas metabolizadoras de xenobióticos; sus sustratos son planares, AA y PAH son prototipos. Cuando hay exposición a estos compuestos, antes de la concepción y durante el primer trimestre de embarazo, la probabilidad de desarrollar hipertensión durante el embarazo se incrementa (Zhu *et al.*, 2017), lo que despierta el interés de conocer si el mRNA del *CYP1A1* se expresa en células HUVEC, particularmente entre las embarazadas que cursan con DH.

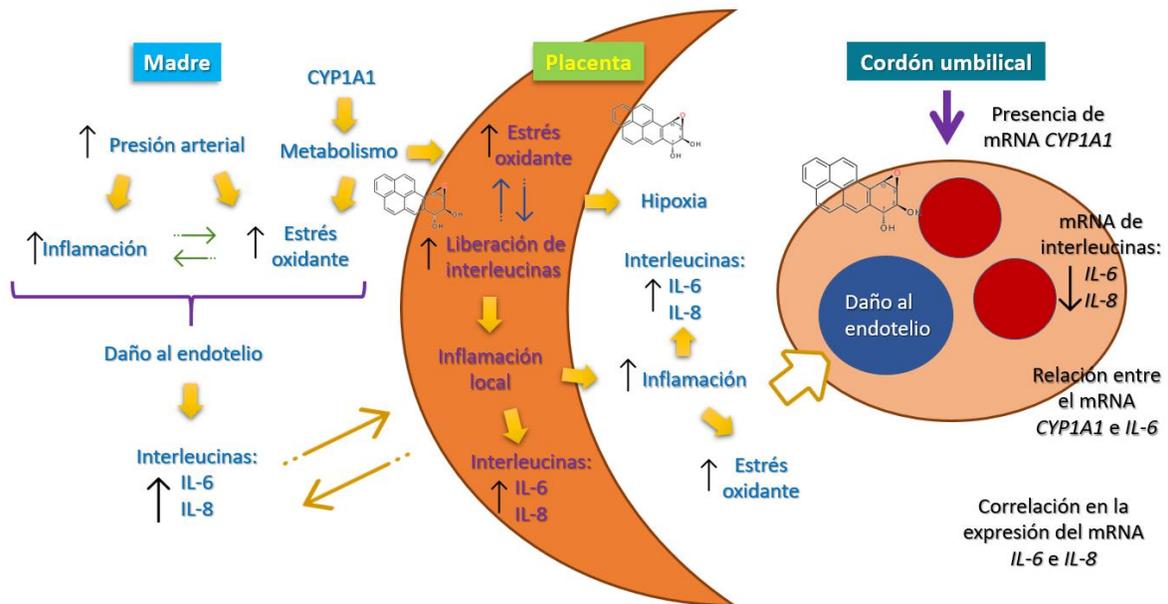
Los ensayos de Presencia/Ausencia fueron desarrollados principalmente para la detección de secuencias de patógenos en un DNA de interés (B. W. Johnson *et al.*, 2005; G. Johnson *et al.*, 2013). Pero al paso del tiempo se popularizaron, ya que el uso de este tipo de ensayos, Presencia/Ausencia de la expresión de un gen, permite identificar secuencias de baja expresión. El método principalmente puede detectar una secuencia insertada en el DNA de interés (que generalmente es de origen humano) ya que algunas secuencias pueden presentarse muy cerca del límite de detección en una amplificación de PCR. En la mayoría de los casos donde se utiliza este método, existe poca concentración del transcrito de la secuencia o gen que se desea observar y un resultado positivo nos puede ayudar a su detección, sin embargo, no nos puede decir si la secuencia, o gen, se encuentra activa o no.

En este caso, los valores de amplificación del mRNA del gen del *CYP1A1* de las muestras control, se encontraron muy cercanos a los límites de detección, lo que impidió que se aplicara el método comparativo $\Delta\Delta C_t$ para evaluar la inducción relativa en términos del

número de veces con respecto al control. Sin embargo, la aplicación del ensayo Presencia/Ausencia del gen confirmó la presencia del mRNA del *CYP1A1* en las células HUVEC provenientes de las madres donadoras tanto normotensas o con algún tipo de DH. La presencia de *CYP1A1* se confirmó para ambos casos, aunque, el porcentaje de presencia es mayor en las HUVEC provenientes de mujeres con DH. Este proceso tiene limitaciones pues solamente confirma la expresión del gen, pero no lo cuantifica, tampoco demuestra si se tradujo a la proteína correspondiente o su funcionalidad. Sin embargo, es conocido que la presencia del transcrito no necesariamente se refleja en proteína (Kendrick, 2014). Idealmente lo adecuado sería evaluar el mRNA y la proteína para luego compararles directamente. Finalmente, debe tomarse en cuenta que tanto la presencia como el nivel de expresión de un gen, no es la única respuesta que se puede modificar en las células en condiciones de estrés cuando la madre presenta un DH.

7.3 Resumen final

De una manera amplia la comparación de los datos obtenidos en este estudio con aquellos disponibles en la literatura sugiere que una madre con DH es propensa a desarrollar procesos inflamatorios e incrementar el estrés oxidante. Éste último puede provenir del metabolismo de xenobióticos por *CYP1A1* además de intermediarios metabólicos reactivos. Por la cual, la madre estará recibiendo estímulos de inflamación y de estrés oxidante que pueden dar lugar a un daño al endotelio venoso favoreciendo el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión, ya que las interleucinas involucradas en sus fases iniciales (IL-6 e IL-8), están presentes en altas concentraciones en el suero materno.



37

Figura 13.-Resumen de datos bibliográficos de madre y placenta, y resultados de células HUVEC.

La imagen se divide en los datos observados en la madre, en la placenta y en células HUVEC cuando se presenta hipertensión durante el embarazo. Los datos presentados con letras en color negro fueron obtenidos en este trabajo, aquellos con letras en color azul y morados, provienen de la literatura revisada.

El medio de comunicación entre la madre y el feto, así como el mayor soporte metabólico de este último, es la placenta por lo que la madre y el producto son receptivos a los cambios que están presentes. Por lo tanto, si en la madre encontramos una concentración elevada de interleucinas proinflamatorias, éstas pueden favorecer una inflamación placentaria. Esta inflamación en la placenta puede provenir del metabolismo de xenobióticos por CYP1A1, que genera compuestos intermediarios reactivos y ROS favoreciendo aún más la liberación de interleucinas que conllevan a procesos inflamatorios locales o generalizados.

La placenta es una barrera que protege al feto, y que funciona como membrana selectiva. Muchos compuestos no pueden atravesar la barrera placentaria, sin embargo, los PAH o sus metabolitos pueden llegar a hacerlo. Respecto a las interleucinas, solamente la IL-6 puede atravesar la placenta; al menos eso se ha observado en placentas de madres sanas; sin embargo, en placentas de madres con DH puede presentar alteraciones, y probablemente afecte su permeabilidad (Dahlgren *et al.*, 2006).

Todos estos cambios pueden provocar daños al endotelio venoso de cordón umbilical, provocando los efectos que se describen en este trabajo, por ejemplo: la presencia del mRNA del *CYP1A1*, la disminución del mRNA de las *IL-6* e *IL-8*, la relación entre la expresión del mRNA de la *IL-6* y la presencia del mRNA del *CYP1A1* y, finalmente, la correlación en la expresión de las interleucinas proinflamatorias.

Resultados también contrastantes como los aquí descritos, han sido mencionados por otros autores, entre ellos, Braekke *et al.*, (2005) quienes evaluaron proteínas de inflamación (calprotectina y CRP) en las madres que presentaban preeclampsia, encontrándolas elevadas, mientras que en sangre del cordón umbilical de los recién nacidos se encontraban disminuidas. Sobrevia *et al.* (2015) observaron que en diabéticas gestantes las vías metabólicas en donde participan MAPK y PI3K/Akt, lograban recuperarse cuando los niveles de glucosa en sangre se regularizaban al someterse a una dieta adecuada, mientras que los neonatos siguen presentando aumentos en MAPK y cAMP, y disminuciones de PI3K/Akt. Finalmente, Poblete-Naredo, (2018) evaluó genes de la fibrinólisis en células HUVEC que provienen de mujeres con DH y preeclampsia comparándolas con HUVEC de madres normotensas y mencionan que en contraste con lo observado en las madres que cursan con DH, quienes muestran un incremento de PAI1, una disminución de PAI2, ningún efecto sobre uPA; en las células HUVEC de embarazos con DH, los tres genes descritos disminuyeron.

Es posible que los niveles de *IL-6* y de *IL-8* descritas en la literatura, sean responsables de la regulación de la transcripción de estos genes en el producto, o simplemente, el feto trata de compensar la sobreproducción materna de estas proteínas disminuyendo su transcripción para llevar el embarazo a término. Aunque también es posible que las interleucinas se expresen de manera diferente durante la vida intrauterina, pues hay ejemplos de este comportamiento en algunas proteínas, como es el caso de enzimas de fase I del metabolismo de xenobióticos y de la hemoglobina (Sankaran *et al.*, 2013). Los resultados presentados sugieren que es intrigante y atractivo investigar la posible existencia de ciclos ultradianos para las interleucinas, y posiblemente de otros genes.

El presente estudio fue exploratorio, y que ofrece información útil para planear estudios más ambiciosos con una población más grande y de la cual se disponga de datos clínicos y poblacionales más amplios, y de número y tamaño de muestras biológicas suficientes para obtener una mejor caracterización del sistema materno-fetal.

Es revelador encontrar que tanto el producto, la placenta y la madre constituyen un sistema interdependiente en donde sus condiciones de salud posiblemente influyan en la regulación de genes en cada una de las partes. Tomado esto en cuenta pueden preverse consecuencias de situaciones adversas en la vida posparto de las madres y de los productos.

8. Conclusiones

El mRNA de las *IL-6* e *IL-8* disminuye en células HUVEC que provienen de madres que presentaron DH.

Existe una correlación positiva y significativa en la expresión del mRNA de ambas interleucinas proinflamatorias.

Se observó una relación significativa entre la inducción del mRNA de la *IL-6* y la presencia del mRNA del *CYP1A1*, solo en HUVEC provenientes de madres con un embarazo normal.

El mRNA del *CYP1A1* se encuentra presente en células HUVEC provenientes de madres normotensas y que cursan con hipertensión. Se presentan en una mayor proporción en las HUVEC que provienen de mujeres con DH.

9. Perspectivas.

De manera general este estudio deja una gran inquietud para seguir investigado que otros genes y proteínas podrían estar modificadas por procesos patológicos, y establecer a que nivel de este sistema interdependiente afectan. Por ello la principal perspectiva es llevar a cabo un proyecto más completo en donde se cuente con:

- Apoyo suficiente del Sector Salud para realizar el estudio
- Una población más grande, con una *n* mayor para todos los grupos y tener un número suficiente de embarazadas normotensas, con DH y preeclampsia
- Contar con datos de la población obtenidos mediante una encuesta validada

- Tener muestras de cada una de las partes del sistema en gestación: Madre, placenta y producto
- Evaluar los mismos genes y/o proteínas en cada muestra biológica para lograr hacer un comparativo directo y observar en donde se presentan daños

10. Referencias

- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, & Pillai, S. (2012). *Celular and Molecular Immunology* (J. o. e. mdicine Ed. 7ma ed.). Barcelona, España: ELSEVIER.
- Allam, E., Delacruz, K., Ghoneima, A., Sun, J., & Windsor, L. J. (2013). Effects of tobacco on cytokine expression from human endothelial cells. *Oral Dis*, *19*(7), 660-665. doi:10.1111/odi.12050
- Andrys, C., Drahosova, M., Hornychova, H., Tambor, V., Musilova, I., Tosner, J., . . . Kacerovsky, M. (2010). Umbilical cord blood concentrations of IL-6, IL-8, and MMP-8 in pregnancy complicated by preterm premature rupture of the membranes and histological chorioamnionitis. *Neuro Endocrinol Lett*, *31*(6), 857-863.
- Annalora, A. J., Marcus, C. B., & Iversen, P. L. (2017). Alternative Splicing in the Cytochrome P450 Superfamily Expands Protein Diversity to Augment Gene Function and Redirect Human Drug Metabolism. *Drug Metab Dispos*, *45*(4), 375-389. doi:10.1124/dmd.116.073254
- Apostolakis, S., Vogiatzi, K., Amanatidou, V., & Spandidos, D. A. (2009). Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, *84*(3), 353-360. doi:10.1093/cvr/cvp241
- Arango Duque, G., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*, *5*, 491. doi:10.3389/fimmu.2014.00491
- Arlier, S. (2017). Endothelial cell leptin receptors, leptin and interleukin-8 in the pathogenesis of preeclampsia: An in-vitro study. *Turk J Obstet Gynecol*, *14*(4), 220-227. doi:10.4274/tjod.78545
- Aronow, W. S. (2017). Hypertensive disorders in pregnancy. *Ann Transl Med*, *5*(12), 266. doi:10.21037/atm.2017.03.104
- Berner, R., Tuxen, B., Clad, A., Forster, J., & Brandis, M. (2000). Elevated gene expression of interleukin-8 in cord blood is a sensitive marker for neonatal infection. *Eur J Pediatr*, *159*(3), 205-210.
- Butalia, S., Audibert, F., Cote, A. M., Firoz, T., Logan, A. G., Magee, L. A., . . . Hypertension, C. (2018). Hypertension Canada's 2018 Guidelines for the Management of Hypertension in Pregnancy. *Can J Cardiol*, *34*(5), 526-531. doi:10.1016/j.cjca.2018.02.021
- Cemgil Arikan, D., Aral, M., Coskun, A., & Ozer, A. (2012). Plasma IL-4, IL-8, IL-12, interferon-gamma and CRP levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease and fetal birth weight. *J Matern Fetal Neonatal Med*, *25*(9), 1569-1573. doi:10.3109/14767058.2011.648233
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156-159. doi:Doi 10.1016/0003-2697(87)90021-2
- Dahlgren, J., Samuelsson, A. M., Jansson, T., & Holmang, A. (2006). Interleukin-6 in the maternal circulation reaches the rat fetus in mid-gestation. *Pediatr Res*, *60*(2), 147-151. doi:10.1203/01.pdr.0000230026.74139.18
- Deng, B., Fang, F., Yang, T., Yu, Z., Zhang, B., & Xie, X. (2015). Ghrelin inhibits AngII -induced expression of TNF-alpha, IL-8, MCP-1 in human umbilical vein endothelial cells. *Int J Clin Exp Med*, *8*(1), 579-588.
- DiNatale, B. C., Murray, I. A., Schroeder, J. C., Flaveny, C. A., Lahoti, T. S., Laurenzana, E. M., . . . Perdew, G. H. (2010). Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol Sci*, *115*(1), 89-97. doi:10.1093/toxsci/kfq024
- DiNatale, B. C., Schroeder, J. C., Francey, L. J., Kusnadi, A., & Perdew, G. H. (2010). Mechanistic insights into the events that lead to synergistic induction of interleukin 6 transcription upon

- activation of the aryl hydrocarbon receptor and inflammatory signaling. *J Biol Chem*, 285(32), 24388-24397. doi:10.1074/jbc.M110.118570
- DiNatale, B. C., Schroeder, J. C., & Perdew, G. H. (2011). Ah receptor antagonism inhibits constitutive and cytokine inducible IL6 production in head and neck tumor cell lines. *Mol Carcinog*, 50(3), 173-183. doi:10.1002/mc.20702
- Dinh, Q. N., Drummond, G. R., Sobey, C. G., & Chrissobolis, S. (2014). Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *Biomed Res Int*, 2014, 406960. doi:10.1155/2014/406960
- Gadonski, G., LaMarca, B. B., Sullivan, E., Bennett, W., Chandler, D., & Granger, J. P. (2006). Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of interleukin 6. *Hypertension*, 48(4), 711-716. doi:10.1161/01.HYP.0000238442.33463.94
- Hashmat, S., Rudemiller, N., Lund, H., Abais-Battad, J. M., Van Why, S., & Mattson, D. L. (2016). Interleukin-6 inhibition attenuates hypertension and associated renal damage in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 311(3), F555-561. doi:10.1152/ajprenal.00594.2015
- Henriquez-Olguin, C., Altamirano, F., Valladares, D., Lopez, J. R., Allen, P. D., & Jaimovich, E. (2015). Altered ROS production, NF-kappaB activation and interleukin-6 gene expression induced by electrical stimulation in dystrophic mdx skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1852(7), 1410-1419. doi:10.1016/j.bbadis.2015.03.012
- Heuvel, J. P. V., Clark, G. C., Thompson, C. L., McCoy, Z., Miller, C. R., Lucier, G. W., & Bell, D. A. (1993). CYP1A1 mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure CYP1A1 expression in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis*, 14(10), 2003-2006.
- Hill, K., Thomas, K., AbouZahr, C., Walker, N., Say, L., Inoue, M., . . . Maternal Mortality Working, G. (2007). Estimates of maternal mortality worldwide between 1990 and 2005: an assessment of available data. *Lancet*, 370(9595), 1311-1319. doi:10.1016/S0140-6736(07)61572-4
- Johnson, B. W., Russell, B. J., & Lanciotti, R. S. (2005). Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol*, 43(10), 4977-4983. doi:10.1128/JCM.43.10.4977-4983.2005
- Johnson, G., Nolan, T., & Bustin, S. A. (2013). Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. *Methods Mol Biol*, 943, 1-16. doi:10.1007/978-1-60327-353-4_1
- Kendrick, N. (2014). A gene's mRNA level does not usually predict its protein level 1, 1-8. Retrieved from www.kendricklabs.com website:
- Kim, H. Y., Kang, Y. J., Song, I. H., Choi, H. C., & Kim, H. S. (2008). Upregulation of interleukin-8/CXCL8 in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*, 31(3), 515-523. doi:10.1291/hypres.31.515
- Kim, J. H., Leem, J. H., & Yang, M. (2004). Expression of CYP1A1 and CYP1B1 as exposure biomarkers for EDCs. *Cancer Research*, 64(7 Supplement), 456-456.
- Kopf, P. G., Scott, J. A., Agbor, L. N., Boberg, J. R., Elased, K. M., Huwe, J. K., & Walker, M. K. (2010). Cytochrome P4501A1 is required for vascular dysfunction and hypertension induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Sci*, 117(2), 537-546. doi:10.1093/toxsci/kfq218
- Liu, J., Liu, Y., Chen, J., Hu, C., Teng, M., Jiao, K., . . . Li, Y. (2017). The ROS-mediated activation of IL-6/STAT3 signaling pathway is involved in the 27-hydroxycholesterol-induced cellular senescence in nerve cells. *Toxicol In Vitro*, 45(Pt 1), 10-18. doi:10.1016/j.tiv.2017.07.013
- Marek-Trzonkowska, N., Kwieczynska, A., Reiwer-Gostomska, M., Kolinski, T., Molisz, A., & Siebert, J. (2015). Arterial Hypertension Is Characterized by Imbalance of Pro-Angiogenic versus Anti-Angiogenic Factors. *PLoS One*, 10(5), e0126190. doi:10.1371/journal.pone.0126190

- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, *454*(7203), 428-435. doi:10.1038/nature07201
- Merhi, M., Demirdjian, S., Hariri, E., Sabbah, N., Youhanna, S., Ghassibe-Sabbagh, M., . . . Khazen, G. (2015). Impact of inflammation, gene variants, and cigarette smoking on coronary artery disease risk. *Inflamm Res*, *64*(6), 415-422. doi:10.1007/s00011-015-0821-1
- Morelli, S. S., Mandal, M., Goldsmith, L. T., Kashani, B. N., & Ponzio, N. M. (2015). The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. *Research and Reports in Biology*, 171-189. doi:https://doi.org/doi:10.7282/T30C4XRF
- Olusi, S. O., Diejomaoh, M., Omu, A., Abdulaziz, A., Prabha, K., & George, S. (2000). Interleukins in preeclampsia. *Ann Saudi Med*, *20*(1), 4-7.
- Park, H. Y., Kim, J. H., Bae, S., Choi, Y. Y., Park, J. Y., & Hong, Y. C. (2015). Interaction effect of serum 25-hydroxyvitamin D levels and CYP1A1, CYP1B1 polymorphisms on blood pressure in an elderly population. *J Hypertens*, *33*(1), 69-76. doi:10.1097/HJH.0000000000000381
- Park, Y. J., Lee, T., Ha, J., Jung, I. M., Chung, J. K., & Kim, S. J. (2008). Effect of nicotine on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) migration and angiogenesis. *Vascul Pharmacol*, *49*(1), 32-36. doi:10.1016/j.vph.2008.05.001
- Reyna, E., Mejia, J., Reyna, N., Torres, D., Santos, J., & Perozo, J. (2012). Concentraciones de interleucina-6 en preeclámpticas y embarazadas normotensas sanas. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia*, *39*(4), 159-163. doi:10.1016/j.gine.2009.12.010
- Rogers, B. B., Alexander, J. M., Head, J., McIntire, D., & Leveno, K. J. (2002). Umbilical vein interleukin-6 levels correlate with the severity of placental inflammation and gestational age. *Hum Pathol*, *33*(3), 335-340.
- Sankaran, V. G., & Orkin, S. H. (2013). The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *3*(1), a011643. doi:10.1101/cshperspect.a011643
- Savoia, C., & Schiffrin, E. L. (2006). Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, *15*(2), 152-158. doi:10.1097/01.mnh.0000203189.57513.76
- SSA. (2007). Prevención, diagnóstico y manejo de la preeclampsia/eclampsia, 1-60. Retrieved from <http://www.salud.gob.mx> website:
- Tebeu, P. M., Foumane, P., Mbu, R., Fosso, G., Biyaga, P. T., & Fomulu, J. N. (2011). Risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: a report from the maroua regional hospital, cameroon. *J Reprod Infertil*, *12*(3), 227-234.
- Tooher, J., Thornton, C., Makris, A., Ogle, R., Korda, A., & Hennessy, A. (2017). All Hypertensive Disorders of Pregnancy Increase the Risk of Future Cardiovascular Disease. *Hypertension*, *70*(4), 798-803. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09246
- Tosun, M., Celik, H., Avci, B., Yavuz, E., Alper, T., & Malatyalioglu, E. (2010). Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*, *23*(8), 880-886. doi:10.3109/14767051003774942
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(11), 2563-2582. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014
- Walsh, A. A., Szklarz, G. D., & Scott, E. E. (2013). Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *J Biol Chem*, *288*(18), 12932-12943. doi:10.1074/jbc.M113.452953
- Wang, B., Li, Z., Ma, Y., Qiu, X., & Ren, A. (2016). Association of polycyclic aromatic hydrocarbons in housewives' hair with hypertension. *Chemosphere*, *153*, 315-321. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.03.067

- Yu, G. Z., & Leeson, P. (2017). Hypertension: Hypertension in pregnancy: a risk factor for the whole family? *Nat Rev Nephrol*, *13*(6), 326-327. doi:10.1038/nrneph.2017.54
- Zhu, Y., Zhang, C., Liu, D., Ha, S., Kim, S. S., Pollack, A., & Mendola, P. (2017). Ambient Air Pollution and Risk of Gestational Hypertension. *Am J Epidemiol*, *186*(3), 334-343. doi:10.1093/aje/kwx097