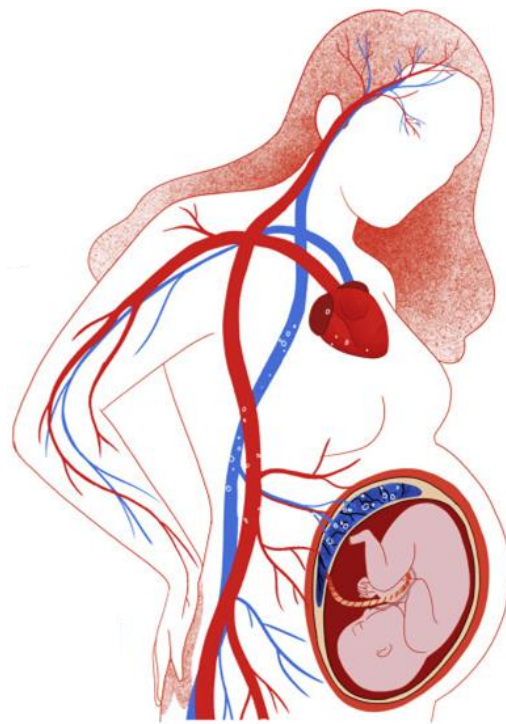




ESTUDIO DEL DAÑO OXIDATIVO RENAL EN MODELO DE RATA CON PREECLAMPSIA TARDÍA



Trabajo Fin de Grado

Facultad de Biología – Grado en Bioquímica

Grupo de investigación: Fisiopatología Cardiovascular

Autora: Ana María Sevilla Jiménez

Sevilla, junio 2023

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
GRADO EN BIOQUÍMICA



TRABAJO FIN DE GRADO

Estudio del daño oxidativo renal en modelo de rata con preeclampsia tardía

Autora: Ana María Sevilla Jiménez

Tutora: Dra. Carmen María Vázquez Cueto

Cotutora: Dra. Claudia Reyes Goya

Departamento: Fisiología

Grupo de investigación: Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Farmacia
5ª planta

Sevilla, junio 2023

*A mi madre y mi hermana, quienes me impulsan a seguir
avanzando sin saber que con ellas yo ya lo tengo todo.*

ÍNDICE

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	3
3. Introducción	4
4. Objetivos	9
5. Materiales y métodos	9
5.1 Lista de reactivos	9
5.2 Preparación de reactivos y tampones	10
5.3 Animales de experimentación y tratamientos	11
5.3.1 Modelo animal de preeclampsia	11
5.4 Características generales de los animales y medida de la presión arterial.....	12
5.4.1 Recogida de muestras de orina y determinación de proteinuria	12
5.4.2 Sacrificio de los animales	13
5.4.3 Expresión génica de sFlt-1	13
- 5.4.3.1 Extracción de ARN	13
- 5.4.3.2 Control de calidad de la extracción de ARN	14
- 5.4.3.3 Retrotranscripción (RT)	14
- 5.4.3.4 RT-PCR	15
5.5 Histología	16
5.5.1 Fijación y deshidratación de muestras	16
5.5.2 Inclusión en parafina y formación de los bloques	16
5.5.3 Obtención de cortes histológicos	16
5.5.4 Desparafinado	17
5.5.5 Tinción morfológica con hematoxilina – eosina	17
5.5.6 Determinación de la producción de ERO <i>in situ</i>	17
5.5.7 Obtención de imágenes en el microscopio	18
5.6 Análisis estadístico	18
6. Resultados y discusión	18
6.1 Características de los animales de estudio	18
6.2 Demostración del modelo de preeclampsia tardía en ratas	19
6.3 Análisis histomorfológico	22
6.4 Análisis de la producción de ERO <i>in situ</i>	23
7. Conclusión	25
8. Bibliografía	25

1. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ang II	Angiotensina II
ARN	Ácido ribonucleico
Art.	Artículo
Ct	<i>Cycle threshold</i> (umbral de ciclo)
DG	Día de gestación
DHE	Dihidroetidio
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DPX	Dibutil-ftalato poliestireno xileno
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FGR	<i>Fetal growth restriction</i> , restricción del crecimiento fetal
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GKT136901	Inhibidor de NOX1 y NOX4
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HELLP	<i>Haemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count</i>
H&E	Hematoxilina-eosina
LOPE	<i>Late-onset preeclampsia</i> , preeclampsia de fase tardía
ML171	Inhibidor específico de NOX1
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NOX	NADPH oxidasa

NP	<i>Normal pregnant</i> , embarazo normal (condición control)
O₂⁻	Anión superóxido
PAD	Presión arterial sistólica
PAS	Presión arterial diastólica
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Preeclampsia
PEG-SOD	SOD conjugada con polietinglicol
PFA	Paraformaldehído
PIGF	<i>Placental growth factor</i> , factor de crecimiento placentario
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
RD	Real Decreto
RFU	Unidades relativas de fluorescencia
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	<i>Real-time PCR</i> , PCR en tiempo real
SEM	<i>Standard error of mean</i> , error estándar de la media
sEng	<i>Soluble endoglin</i> , endoglina soluble
sFlt-1	<i>Soluble fms-like tyrosine kinase-1</i> , tirosina quinasa soluble tipo 1
SOD	Superóxido dismutasa
TAE	Tampón tris-acetato-EDTA
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
VAS2870	Pan-inhibidor de las isoformas NOX
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , factor de crecimiento del endotelio vascular

2. RESUMEN

La preeclampsia (PE) es una enfermedad multisistémica que afecta en torno al 4 % de las embarazadas cada año, produciendo daños en órganos vitales tanto en la madre como en el feto y siendo una de las principales causas de mortalidad para ambos. Según la aparición de los primeros síntomas, la PE se clasifica en fase temprana (*early-onset*, antes de las 34 semanas de gestación) o fase tardía (*late-onset*, después de las 34 semanas de gestación). Entre los órganos dañados tiene una alta relevancia el daño renal observado en la madre, consecuencia de su alta relación con el sistema cardiovascular. Dado a que la hipoxia provocada por la enfermedad desemboca en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), el objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado es determinar el daño oxidativo a nivel renal, centrándonos en el papel de la enzima NADPH oxidasa (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidasa), principal productora de anión superóxido, en un modelo de preeclampsia tardía mediante la infusión del factor antiangiogénico sFlt-1 (tirosina quinasa soluble tipo 1) en ratas Wistar. Los resultados destacan la contribución de la enzima NADPH oxidasa, en su isoforma NOX1, en la producción de ERO en el glomérulo renal. Estos resultados, junto con el aumento del tamaño de los glomérulos, indican una relación entre el desarrollo de la preeclampsia tardía, daño renal y estrés oxidativo.

Palabras clave: Preeclampsia tardía, riñón, estrés oxidativo, NADPH oxidasa, NOX1, ERO

3. INTRODUCCIÓN

La preeclampsia (PE) es una complicación en el embarazo que aparece a partir de las 20 semanas de gestación y que afecta entre el 2 y el 5% de las mujeres, siendo la principal causa de mortalidad y morbilidad tanto para la madre como el feto (Poon et al., 2019). Se trata de una enfermedad de origen multisistémico que comienza con la aparición de un cuadro hipertensivo, seguido de al menos uno de los siguientes síntomas: proteinuria o alguna disfunción de los órganos maternos, como por ejemplo la disfunción uteroplacentaria que puede afectar al crecimiento fetal y a la proporción de factores angiogénicos, o el daño renal el cual tiene una relación directa con la regulación del sistema cardiovascular. También se ha observado la presencia de afecciones en otros órganos, tales como en los ojos, donde pueden aparecer escotomas (presencia de manchas oscuras en la visión) y en ocasiones ceguera cortical. Otro órgano afectado es el hígado, el cual presenta una alta irrigación, lo que resulta una diana importante de daño vascular consecuencia de la disfunción uteroplacentaria presente en la PE, dando lugar a una isquemia local que deriva en inflamación y desarrollo del síndrome HELLP (*Haemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelet count*) (Dimitriadis et al., 2023).

Según el momento en el que se manifiestan los primeros signos de la enfermedad, podemos hablar de fase temprana (cuya aparición se da antes de las 34 semanas de gestación) o tardía (si ocurre pasadas las 34 semanas de gestación). Se cree que la fase temprana está más relacionada con fallos en la invasión del trofoblasto y la remodelación de las arterias espirales, mientras que la fase tardía tiene como causa la disfunción endotelial materna, así como patologías previas de la madre que puedan comprometer la integridad endotelial (Dimitriadis et al., 2023). A pesar de que la fase tardía presenta una sintomatología más leve, se trata de la forma de la enfermedad más prevalente, con hasta un 80% de casos entre todas las embarazadas con PE (Hu & Zhang, 2022).

Existen múltiples factores de riesgo que fomentan la aparición de la PE. Con respecto al cuadro médico de la madre, son considerados factores de riesgo alto el padecer: enfermedad renal crónica, diabetes tipo 1 o 2, obesidad o enfermedades autoinmunes. También se consideran factores de riesgo de nivel moderado los antecedentes familiares de PE, embarazo múltiple, edad gestacional extrema (< 25 años o > 45 años) y otros factores de carácter socioeconómico y étnico (Chang et al., 2023).

La patogenia de esta enfermedad sigue sin tener una definición clara. No obstante, el modelo de dos fases con el comienzo de la invasión del trofoblasto es considerado el más adecuado con la información que tenemos de esta enfermedad. Recientemente, la revista *International Journal of Enviromental Research and Public Health*, ha descrito que el desarrollo de la PE se produce en dos fases: una primera fase subclínica, seguida de una segunda fase clínica que dura hasta el final del embarazo (Chang et al., 2023). A pesar de coincidir en el orden de sucesos de cada fase, aún no hay consenso en cuanto a la duración exacta de cada una de las fases.

El comienzo de la primera fase se cree que es debido a una mala invasión del trofoblasto. Durante la invasión normal del trofoblasto, se da la remodelación de las arterias espirales que irrigan la placenta, con el fin de proporcionar un mayor riego sanguíneo y así garantizar la llegada de nutrientes al feto. Sin embargo, los factores de riesgo anteriormente mencionados pueden provocar un fallo en este paso de remodelación vascular, de modo que se produce un menor riego sanguíneo, la aparición de hipoxia y un ambiente oxidativo (Hu & Zhang, 2022). Esta situación causa un desequilibrio de factores angiogénicos y antiangiogénicos: aumenta la producción de los factores antiangiogénicos, como la tirosina quinasa soluble tipo 1 (sFlt-1; *soluble fms-like tyrosine kinase-1*) y la endoglina soluble (sEng; *soluble endoglin*); y disminuye la expresión de los factores angiogénicos, como el factor de crecimiento placentario (PIGF; *placental growth factor*) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; *vascular endothelial growth factor*), provocando disfunción endotelial acompañada de un ambiente proinflamatorio (Hernandez et al., 2021) **(Figura 1)**.

La segunda fase es considerada como la fase clínica, ya que las alteraciones producidas en la fase anterior comienzan a manifestarse como daños en diversos órganos, lo que deriva en un fallo multisistémico en la madre y problemas en el desarrollo del feto. Algunos de esos efectos presentes en la madre se dan a nivel hepático, como el síndrome HELLP, aparición de edemas pulmonares, y disfunción renal, que desemboca en proteinuria. Con respecto a las consecuencias negativas que puede sufrir el feto, se incluyen la disminución en el crecimiento durante la gestación (FGR; *Fetal Growth Restriction*), propensión al parto prematuro y otros efectos consecuencia de la hipoxia placentaria e incluso en ocasiones puede ocurrir la muerte perinatal (Ngene & Moodley, 2018; Raia-Barjat et al., 2022) **(Figura 1)**.

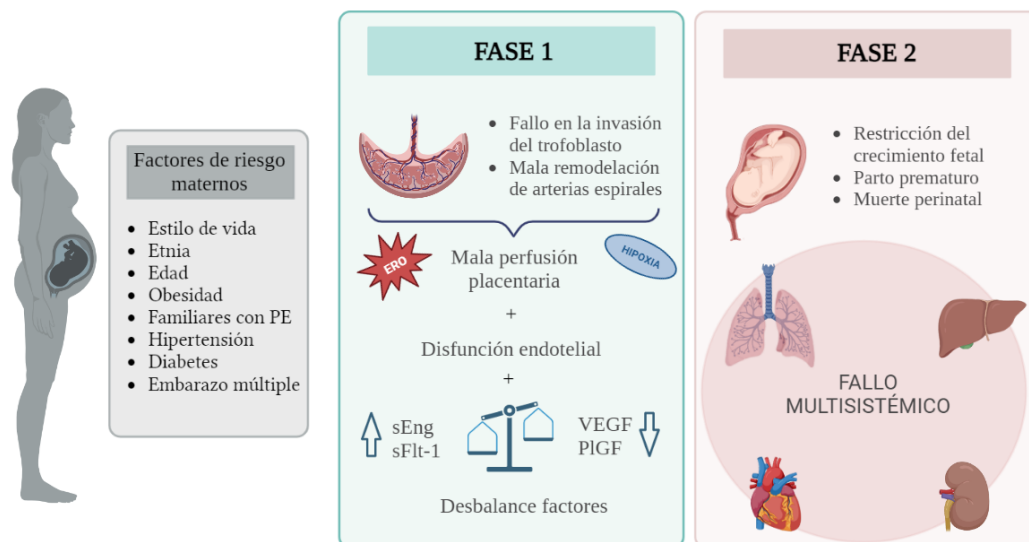


Figura 1. Resumen gráfico de la patogenia de la preeclampsia (PE). ERO (especies reactivas de oxígeno), sEng (endoglina soluble), sFlt-1 (tirosina quinasa soluble de tipo 1), VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), PIGF (factor de crecimiento placentario).

Como se observa en la **Figura 1**, los problemas vasculares que comienzan en la placenta durante la primera fase acaban provocando, en la segunda fase de la enfermedad, un fallo en el resto de los órganos, como es el caso del sistema renal. Se ha detectado relación entre el desarrollo de la PE y el fallo renal crónico, ya que se ha visto que padecer enfermedades de carácter hipertensivo, tales como PE, aumentan en torno a 4,9 veces el riesgo de padecer una enfermedad renal crónica en el futuro (Metoki et al., 2022). Los riñones son los órganos encargados de filtrar la sangre del cuerpo y, por tanto, están muy ligados al sistema cardiovascular. Diversos estudios relacionan los problemas renales como factor de riesgo o bien efecto de la propia enfermedad, donde uno de los puntos a destacar es la desregulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). Las células de la mácula densa detectan cambios en el volumen y concentración de orina que pasa por el tubo contorneado distal. Cuando la concentración de iones es baja, se estimula la liberación de renina y, tras varias reacciones enzimáticas, se acaba produciendo angiotensina II (Ang II) y aldosterona, las cuales tienen como respuesta, en el primer caso, el aumento de la presión arterial, y en el segundo caso, el aumento de reabsorción de sodio y potasio acompañado de agua por el efecto de ósmosis, aumentando en última instancia igualmente la presión arterial. Por tanto, se ha visto que problemas en la regulación del sistema RAAS puede fomentar un perfil hipertensivo. En el caso de la PE, se ha observado una sobreexpresión Ang II (Morgan et al., 2023). Además, se ha visto

que el sistema RAAS juega un papel fundamental en la remodelación de las arterias espirales (Artemieva et al., 2022).

Por otro lado, se ha observado que la PE también puede ser el causante de futuros problemas renales. Esto es debido a que la hipoxia provocada por la mala perfusión placentaria, como se ha mencionado anteriormente, aumenta la producción de vasopresina y Ang II que, a su vez, puede incidir en la activación del sistema Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) oxidasa, generando una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y su consecuente daño en el tejido renal (Lee & Jose, 2021).

El sistema NADPH oxidasa (NOX) es un complejo multienzimático que se encuentra en la membrana de diversos órganos. Su estructura (**Figura 2**) está compuesta por una subunidad catalítica con 6/7 hélices transmembrana. A esta subunidad se une dos cofactores hemo los cuales se encargan de oxidar la NADPH que se encuentra unida a FAD (Flavín Adenín Dinucleótido) en el extremo C-terminal. Existen 7 isoformas de la NADPH oxidasa (NOX): NOX1-5, Duox1 y Duox2; todas ellas con diversas implicaciones fisiológicas y localización variable. NOX1 se encuentra predominantemente en el colon, aunque también se encuentra en el útero, placenta y endotelio vascular. NOX2 fue la primera isoforma caracterizada y se descubrió en la membrana de los fagocitos (Rossi & Zatti, 1964; Segal & Jones, 1978). A pesar de que se exprese mayoritariamente en fagocitos para la producción de ERO en presencia de patógenos, la isoforma NOX2 también se encuentra en cardiomiocitos, hepatocitos, neuronas y células musculares y endoteliales. NOX3 se localiza en el oído interno. NOX4 se expresa mayoritariamente en el tejido renal, neuronal y endotelial. NOX5, la cual no se expresa en roedores, es la menos estudiada, pero se puede encontrar en células endoteliales. Por último, las isoformas Duox1 y Duox2 se localizan en la glándula tiroides (Elbatreek et al., 2021).

La activación del complejo multienzimático da lugar a la producción de ERO: anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y/o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Lee & Jose, 2021). En condiciones fisiológicas, estas ERO producidas por NOX se encuentran en equilibrio homeostático con agentes antioxidantes, regulando la vasodilatación y la proliferación de las células endoteliales. Sin embargo, cuando los niveles de ERO son elevados, estos contribuyen a patologías vasculares, tales como la disfunción endotelial, fibrosis e hipertensión arterial.

Del mismo modo, el ambiente oxidativo en la PE se debe al fallo en la perfusión placentaria, la cual fomenta la sobreactivación de la enzima NADPH oxidasa, dando lugar a una respuesta proinflamatoria intravascular, disfunción endotelial y la consecuente hipertensión (San Juan-Reyes et al., 2020; Sylvester et al., 2022). Además, en otro estudio de la PE de fase temprana con un modelo de ratas las cuales presentaban una infusión continua del factor sFlt-1, se observó que la sobreexpresión de factores antiangiogénicos como sFlt-1 también pueden causar la exacerbada producción de ERO por parte de la NADPH oxidasa (Santana-Garrido et al., 2022).

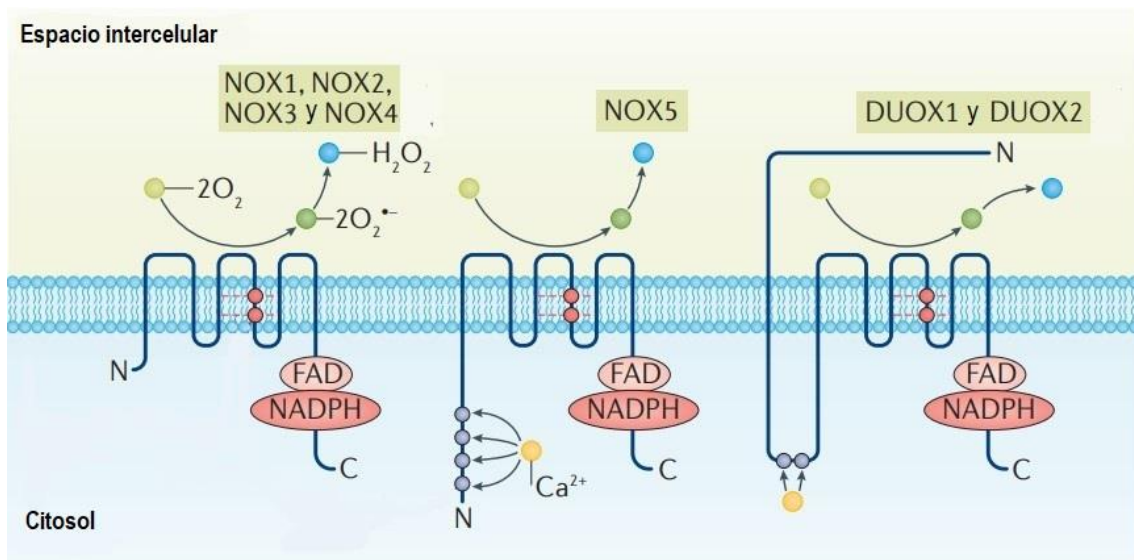


Figura 2. Isoformas de la enzima NADPH oxidasa (NOX). Imagen obtenida y modificada de Ameziane-El-Hassani et al., 2016.

Actualmente, no se conoce una cura para esta enfermedad, siendo la única alternativa la inducción del parto prematuro. Las mujeres que sobreviven a la PE presentan una menor esperanza de vida y un mayor riesgo de padecer otras enfermedades de carácter cardiovascular, ictus o diabetes. Con respecto a los bebés nacidos, aquellos que sobreviven al parto prematuro son propensos a desarrollar problemas neurológicos, cardiovasculares y metabólicos a lo largo de su vida (Dimitriadis et al., 2023).

A pesar de la alta prevalencia que presenta entre embarazadas, la PE sigue siendo una patología muy poco estudiada. En los últimos años se ha dado una mayor importancia a la PE de fase temprana ya que presenta síntomas más claros y resulta ser de mayor riesgo. Sin embargo, esto ha ocasionado que se deje a un lado el estudio de la PE de fase tardía que, a pesar de manifestar unos síntomas más leves, presenta una mayor prevalencia en

mujeres embarazadas, con el agravante de que no sólo afecta a la madre, sino que también puede repercutir en la salud del hijo en el futuro.

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es determinar el posible daño oxidativo, a nivel renal, que pueden presentar las ratas embarazadas con preeclampsia tardía, centrándonos en la contribución del sistema NADPH oxidasa (NOX), con el fin de ahondar en el mecanismo por el cual se desarrolla la enfermedad. En este estudio, se ha utilizado un modelo de ratas preñadas sometidas a infusión continua de sFlt-1 (3,7 µg/kg/día) para la inducción de PE. Los animales con fenotipo inducido de PE se comparan con un grupo paralelo de ratas con embarazo normal (grupo NP, *normal pregnant rats*). En todos los grupos experimentales estudiaremos el riñón, realizando un análisis histomorfológico y el estatus oxidativo, este último mediante la evaluación de la producción ERO y el papel de la enzima NADPH oxidasa (NOX), principal responsable de la formación de radicales libres en el contexto hipertensivo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lista de reactivos

- 2-propanol (isopropanol), Sigma-Aldrich. Art. I9516
- Ácido acético glacial, PanReac AppliChem. Art. 141008
- Ácido clorhídrico, PanReac AppliChem. Art. 141019
- Agarosa estándar baja EEO (electroendósmosis), Ecogen. Art. AG0120
- Agua DEPC (H₂O_{DEPC}), Thermo Fischer Scientific. Art. AM9906
- Azul de bromofenol, Sigma-Aldrich. Art. B8026
- Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories. Art. 500-0006
- cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fischer Scientific. Art. 4368814
- Cloroformo, Sigma-Aldrich, Art. C2432
- Dimetil Sulfóxido, PanReac AppliChem. Art. 131954.1611
- Dihidroetidio (DHE), MedChemExpress. Art. HYD0079
- DPX mounting medium, PanReac AppliChem. Art. 255254.1608
- EDTA · Na₂, Sigma-Aldrich. Art. E1644
- Eosina, Panreac AppliChem. Art. 251299
- Etanol absoluto, Merck. Art. 1.00983.1000

- Formaldehído, Panreac AppliChem. Art.131328.1211
- Gammaglobulina bovina, Bio-Rad Laboratories. Art. 500-0005
- GKT136901 (inhibidor de NOX1 y NOX4), Sigma-Aldrich. Art. 5340320001
- Glicerol, Sigma-Aldrich. Art. G5516
- Hematoxilina de Gill N° 3, Sigma-Aldrich. Art. GHS3
- iTaq Universal SYBR® Green Supermix. Bio-Rad Laboratories. Art. 1725121
- ML171 (inhibidor específico de NOX1), Sigma-Aldrich. Art. 175226
- Neo-Clear®. Sigma-Aldrich. Art. 1098435000
- Parafina, Paraplast Plus. Sigma-Aldrich. Art. P3683
- PBS (Phosphate-buffered saline), Sigma-Aldrich. Art. P4417
- PEG-SOD, Sigma-Aldrich. Art. S9549
- Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder, BioLabs. Art. N0550G
- Red-Safe nucleic acid staining solution, Intron Biotechnology. Art. 21141
- RNaseZap™. Thermo Fischer Scientific. Art. AM9780
- Tris for molecular biology, PanReac AppliChem. Art A2264.1000
- TRIzol® Reagent, Ambion. Art. 15596026
- VAS2870 (pan-inhibidor isoformas de NOX), Merk Millipore. Art.492000-M

5.2 Preparación de reactivos y tampones

- Eosina 1%

Eosina	1 g
Etanol 95%	80 mL
Agua destilada	20 mL
- Gel de agarosa 1,5%

Agarosa	3 g
TAE 1X	200 mL
RedSafe	10 µL
- Master Mix (*cDNA Reverse Transcription Kit*)

10X RT Buffer	12 µL
25X dNTP	4,8 µL
10X Random Primers	12 µL
MultiScribe RT	6 µL
H ₂ O _{DEPC}	hasta 60 µL

- PBS 1X
 - PBS 1 tableta
 - Agua bidestilada 200 mL
- Tampón mixto 10X
 - Azul de bromofenol 3,6 mM
 - Tris/HCl (pH 8) 50 mM
 - Glicerol 6 % (v/v)
- Tampón TAE 20X
 - Tris 96,8 g
 - Ácido acético glacial 22,84 mL
 - EDTA 0,5 M 40 mL
 - H₂O_{mQ} hasta 1 L

5.3 Animales de experimentación y tratamientos

Se seleccionaron ratas hembra gestantes de la cepa Wistar con una edad de 11-12 semanas y peso aproximado de 300 g. Las ratas proceden del Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla y estuvieron en el animalario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, a temperatura y luz estandarizados (23 ± 1 °C, y ciclos de 12 horas alternando luz y oscuridad), con libre acceso de agua y alimento durante el transcurso de los experimentos.

Todos los procedimientos realizados en los animales siguen el reglamento de la Unión Europea (UE) 2010/63/UE y las Directrices Nacionales (RD 53/2013) para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y fue aprobado a nivel autonómico por la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera de la Junta de Andalucía (referencia # 31/05/2021/090).

5.3.1 Modelo animal de preeclampsia

El inicio de la gestación (DG0) se determinó por la presencia de un tapón mucoso en la zona vaginal. A partir del día 15 de gestación (DG15) los animales se separaron aleatoriamente en dos grupos: la condición control (NP = *normal pregnant*, n = 11) y el modelo de preeclampsia tardía (LOPE = *late-onset preeclampsia*, n = 10). Para la inducción de la enfermedad, se operaron las ratas LOPE en DG15 introduciendo una bomba osmótica con liberación continua del factor sFlt-1, una cantidad de 3,7 µg/kg/día, hasta el día 19 de gestación (DG19). La operación para introducir la bomba se realizó en

la zona intraperitoneal, anestesiando previamente las ratas mediante la inhalación controlada de isoflurano al 3 %.

5.4 Características generales de los animales y medida de la presión arterial

Se llevó a cabo un control durante el tratamiento de los valores correspondientes al peso de las ratas y de la presión arterial sistólica y diastólica, esto último para comprobar la eficacia del tratamiento. Por un lado, se pesaron las ratas antes de la operación (DG15) y el último día de gestación (DG19). Por otro lado, la determinación de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) se realizó los días DG15 y DG19 mediante el método indirecto por oclusión de la cola a través del medidor de presión NIPREM 645 versión 1.5 (CIBERTEC S.A). Para ello, primero se inmovilizan las ratas en un cepo y se colocan las colas bajo una lámpara de infrarrojos durante 5 minutos a 37 °C, con la finalidad de favorecer la vasodilatación de la cola del animal. A continuación, se coloca el manguito presurizador en la cola, el cual comienza a presionar para atenuar el pulso de la arteria caudal. Cuando cesa el pulso de la cola, el manguito comienza a desinflarse para poder registrar el pulso real del animal. Los datos son recogidos por un transductor de señales, acoplado a un software que representa los valores gráficamente.

5.4.1 Recogida de muestras de orina y determinación de proteinuria

Para obtener muestras de orina, los animales se colocaron 24 horas antes del sacrificio en distintas jaulas metabólicas, con libre acceso de agua y comida. En primer lugar, se midió la cantidad total de orina excretada de todos los animales. Luego, se centrifugaron las muestras a 2500 g durante 7 minutos a 20 °C y el sobrenadante obtenido se recogió y se almacenó a -80 °C hasta el momento de su utilización. La concentración de proteínas en orina se determinó por el método colorimétrico descrito por Bradford (Bradford, 1976). En la placa, se realizó una curva patrón con diluciones seriadas de gammaglobulina. En la placa se cargaron 5 µL de las muestras, con una previa dilución de 1/40, por cada pocillo y 250 µL de reactivo Bradford, previamente diluido 1/5. La placa se mantuvo en agitación a velocidad baja-moderada durante 10 minutos y, a continuación, se leyó a 595 nm en el lector de placas (ASYS UVM 340) y el software MicroWin versión 4.36.

5.4.2 Sacrificio de los animales

El sacrificio de los animales se realiza en DG19 mediante sobredosis de anestésico (isofluorano 5%) hasta confirmar parada cardiorrespiratoria, seguido de exanguinación y neumotórax. Se realiza una disección del abdomen y se extirpan los riñones, objeto de este estudio. Seguidamente, los órganos se colocan en una placa de Petri con suero fisiológico frío y se limpian eliminando los restos de sangre y de tejido graso. Los riñones se decapsulan, eliminando la capa fibrosa externa con la ayuda de dos pinzas quirúrgicas, se secan en papel de filtro y se pesan en la balanza analítica.

Tras el pesaje, los riñones se cortan longitudinalmente con ayuda de un bisturí, dividiéndolos simétricamente. Por otra parte, se procede a determinar los pesos de los fetos, clasificados por cuerno uterino. Parte de la muestra de riñón se destina para estudios histológicos, mientras la otra parte se destina para experimentos de biología molecular.

5.4.3 Expresión génica de sFlt-1

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar regiones específicas del genoma para determinar el grado de expresión de distintos genes. La PCR en tiempo real (RT-PCR) permite cuantificar a tiempo real la cantidad de producto amplificado, mediante la adición de fluoróforos específicos que son detectados en el termociclador. Para la realización de los siguientes experimentos se preparó previamente la zona de trabajo, aplicando un inhibidor de ARNasa (RNaseZAP) y limpiando todo el material necesario con etanol al 70 %.

- 5.4.3.1 Extracción de ARN

El primer paso es la extracción de ARN del tejido renal, para ello, se pesaron 50 mg del tejido de 3 ratas NP y 3 ratas LOPE y se añadieron 500 µL de TRIzol Reagent. Para la homogeneización de las muestras se realizaron 3 intervalos de 10 segundos en el Polytron (Heidolph DIAX 900). Una vez homogeneizadas las muestras, se añadieron 100 µL de cloroformo a cada una y se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a velocidad 12000 g.

Tras centrifugar se observaron 3 fases, siendo el sobrenadante la fracción correspondiente al ARN. La fase intermedia y el pellet son las fracciones correspondientes al ADN y resto de proteínas, respectivamente. El sobrenadante se recogió en un eppendorf libre de ARNasas, junto con 250 µL de isopropanol en cada muestra para precipitar el ARN. Tras

dejarlo reposar 10 minutos a temperatura ambiente, se volvió a centrifugar siguiendo las mismas condiciones anteriormente mencionadas.

A continuación, se retiró el sobrenadante y se añadió 500 μL de etanol al 75 % al pellet, para purificar la muestra. Luego, se volvió a centrifugar a 4 °C durante 5 minutos a velocidad 8000 g. El sobrenadante se desechó y las muestras se mantuvieron durante 15 minutos a temperatura ambiente para garantizar la completa evaporación del etanol. Por último, se añadieron 30 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$, se incubaron 10 minutos más a temperatura ambiente. Las muestras se mantuvieron en hielo para los pasos posteriores.

- 5.4.3.2 Control de calidad de la extracción de ARN

Para comprobar la integridad del ARN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1,5%). En cada pocillo se cargó un volumen final de 10 μL por muestra (5 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$, 4 μL de ARN y 1 μL de Tampón mixto 10X). Las condiciones del gel fueron 20 minutos a 190 V. Transcurrido este tiempo, la integridad del ARN se observó mediante la presencia de dos bandas nítidas correspondientes a las subunidades de ARN ribosómico 18 S y 28 S bajo una lámpara UV.

Otro método que se utiliza para medir la pureza de las muestras es la cuantificación de ARN mediante Nanodrop (Software ND100). Se trata de un espectrofotómetro de barrido que mide la variación de la absorbancia de 1 μL de muestra a distintas longitudes de onda. Existen dos parámetros que determinan la pureza del material genético, los ratios 260/280 y 260/230. Ambos representan la relación entre la medida de absorbancia del material genético (260 nm) y la presencia de contaminantes (280 nm y 230 nm). Valores cercanos a 2 son considerados puros (Loughrey & Matlock, 2016). Además, esta técnica también nos permite determinar la concentración de ARN de cada muestra.

- 5.4.3.3 Retrotranscripción (RT)

La retrotranscripción sirve para obtener muestras de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN para poder realizar una posterior RT-PCR. Con la concentración calculada en Nanodrop, se añade en un volumen final de 10 μL , 2 μg de ARN ya que es la cantidad permitida por el kit utilizado (*cDNA Reverse Transcription kit*). Para cada muestra de 10 μL se preparan 10 μL de Master Mix.

A continuación, se puso en marcha el protocolo de RT en el termociclador (Biometra® Tgradient), cuyos pasos están descritos en la **Tabla 1**. Las muestras de ARN se introducen

en el paso 3 y tras el paso 4 se sacan del termociclador y se mantienen en hielo. Mientras se ejecutan los pasos 5 y 6 se añaden los 10 μL de Master Mix previamente preparada. Una vez terminado el paso 6 se introducen de nuevo las muestras en el termociclador y se ejecutan los pasos restantes. Una vez terminado el programa se miden las muestras de ADN monocatenario en el Nanodrop (tal y como se explica en el punto 5.4.3.2) para evaluar su pureza. Las muestras se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el siguiente paso.

Paso 1: 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min	Paso 5: 25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	Paso 9: 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
Paso 2: 25 $^{\circ}\text{C}$ Pausa	Paso 6: 25 $^{\circ}\text{C}$ Pausa	Paso 10: 4 $^{\circ}\text{C}$ 1 min
Paso 3: 65 $^{\circ}\text{C}$ 10 min	Paso 7: 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min	Paso 11: 4 $^{\circ}\text{C}$ Pausa
Paso 4: 65 $^{\circ}\text{C}$ Pausa	Paso 8: 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h	

Tabla 1. Flujo de trabajo del programa de retrotranscripción en el termociclador.

- 5.4.3.4 RT-PCR

Por último, las muestras de ADNc se incubaron con cebadores específicos, (dilución 1/10, previa eficiencia) para nuestro gen de interés (sFlt-1) y para un gen de referencia, el de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que sirve para normalizar los valores de expresión. Las secuencias de los cebadores correspondientes a cada gen se encuentran en la **Tabla 2**.

Gen	Cebador sentido (5'→3')	Cebador antisentido (3'→5')	Referencia
sFlt-1	CAAGGGACTCTACACTTGTC	CCGAATAGCGAGCAGATTTC	AF157595.1
GAPDH	GCCAAAAGGGTCATCATCTCCGC	GGATGACCTTGCCACAGCCTTG	NM_017008.4

Tabla 2. Lista de cebadores utilizados para la PCR. sFlt-1 (tirosina quinasa soluble de tipo 1), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Para cada gen de interés hay que realizar una dilución “stock”: 7,8 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$, 0,6 μL de cada cebador (sentido y antisentido) con dilución 1/10 y 10 μL SYBR Green Supermix. Estos volúmenes se multiplicaron por el número de muestras que se añadieron en la placa. En cada pocillo, se añadieron 1 μL de ADNc y 19 μL de “stock”. La placa se selló con una lámina adhesiva y se llevó al termociclador (MiniOpticon™, BioRad) donde siguió el siguiente protocolo: un primer ciclo de activación del fluoróforo y desnaturalización inicial del ADN a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos donde las muestras seguían un paso de desnaturalización (95 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos) y otro de hibridación y elongación de las cadenas (60 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto).

Los resultados son recogidos y analizados en el programa BioRad CFX Manager 3.1. La aparición de un único pico en las curvas de disociación (*melting curve*) de las muestras indicó una correcta amplificación. Para confirmar que el producto de PCR obtenido es el deseado se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1,5 %), donde se cargaron 20 μ L del producto de PCR con 1 μ L de Tampón mixto 10X, además de 3 μ L de marcador de peso molecular (Quick-Load[®] Purple) en un pocillo separado para poder confirmar el tamaño de las bandas. La cuantificación de la expresión de sFlt-1 se relativizó a partir del nivel de expresión del gen GAPDH, a través de la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde Ct indica el ciclo en el cual la amplificación cruza el umbral de ruido de fondo y se asume que la cantidad medida es proporcional al ADNc (Livak & Schmittgen, 2001).

5.5 Histología

5.5.1 Fijación y deshidratación de las muestras

Para preservar la estructura original de los órganos, el tejido obtenido en el apartado 5.4.2 se sumerge en paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 24 horas en rotación. Para retirar todo el contenido en agua en el tejido, se sumerge el tejido en etanol. Primero se sumerge en etanol al 70 % durante 12 horas. Transcurrido el tiempo, se sumerge en concentraciones crecientes de etanol (80, 85, 90, 95 y 100 %) durante 1 hora en cada uno.

5.5.2 Inclusión en parafina y formación de los bloques

Una vez completado el protocolo de deshidratación, se introducen las muestras en una solución de xilol: etanol (1:1) y luego en xilol puro, 1 hora en cada uno. A continuación, en una estufa a 60 °C se sumerge el tejido en una solución xilol: parafina (1:1) durante 1 hora. Por último, se deja durante toda la noche el tejido sumergido en parafina dentro de la estufa a 60 °C. Al día siguiente, el tejido está listo para formar los bloques de parafina. Para ello, se coloca en un molde metálico cuadrado el tejido en la orientación adecuada, de forma que la zona donde se realizó el corte se vea en la superficie del bloque. Tras esto se vierte parafina líquida sobre los moldes y se colocan los cassettes. Estos se guardan posteriormente en el frigorífico a 4 °C hasta su completa solidificación.

5.5.3 Obtención de cortes histológicos

Las secciones deben ser de un grosor muy fino para que se puedan ver correctamente al microscopio. Para ello, se usa un microtomo (MR-2258, Histo-lineLaboratories), ajustado para realizar cortes de 5 μ m. Los cortes realizados se depositan en un baño de agua a

45 °C para favorecer que la sección se estire correctamente en el porta. El porta utilizado para colocar los cortes presenta un tratamiento con polilisina (Polysine™ Adhesion Microscope Slides, EpreDia), el cual garantiza que no haya pérdida del tejido en tratamientos posteriores. Por último, los portas con las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

5.5.4 Desparafinado

El primer paso previo a la tinción es el desparafinado de la muestra para favorecer la entrada de los distintos colorantes en el interior celular. Para ello, se introducen las muestras en xilol puro dos veces durante 6 minutos cada vez. A continuación, se sumergen en etanol: xilol (1:1) y en distintas cubetas a concentraciones decrecientes de etanol (100, 90, 80 y 70 %), seguido de una última cubeta en agua corriente, 5 minutos en cada una de las cubetas.

5.5.5 Tinción morfológica con hematoxilina - eosina

La hematoxilina es un compuesto de color púrpura que se une a las zonas ácidas del tejido, como por ejemplo los núcleos celulares. Por otro lado, la eosina aporta una coloración rosada en las zonas básicas, como el citoplasma. Tras el protocolo de desparafinado, las muestras se incubaron durante 1 minuto y 30 segundos en hematoxilina (Gill N° 3), seguido de un lavado de 15 minutos en agua corriente. A continuación, se tiñeron con eosina 1 % durante 15 minutos y transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados de 5 minutos en etanol puro y otros dos lavados de la misma duración en xilol puro. Por último, se montaron las muestras con medio de montaje DPX.

5.5.6 Determinación de la producción de ERO *in situ*

Con el fin de observar la producción de ERO, las muestras se trataron con dihidroetidio (DHE). Se trata de un compuesto fluorescente azul que se oxida principalmente por radicales O_2^- , dando lugar a 2-hidroetidio. Además, también puede interaccionar de forma inespecífica en el núcleo con otras especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que provoca la oxidación del DHE en etidio. Ambos productos tienen la capacidad de emitir una coloración fluorescente roja, cuyas longitudes de onda de excitación y emisión son 535 nm y 635 nm, respectivamente.

Tras el protocolo de desparafinado se secan los portas y se dibuja un pocillo alrededor de cada sección con un rotulador hidrófobo. Los portas con DHE a concentración 10 μ M se

introducen en una cámara húmeda y se incuban a 37 °C durante 10 minutos. Tras esto, se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS. Para garantizar que la señal de DHE es específica de ERO, se realizó un ensayo paralelo con superóxido dismutasa a concentración $2,7 \times 10^4$ U/mL (PEG-SOD). Por otro lado, para determinar la participación de cada isoforma de la enzima NADPH oxidasa en la producción de ERO, se preincubaron 30 minutos a 37 °C con los inhibidores específicos de las NOX, como ML171 (inhibidor de NOX1, concentración final = 10 μ M), GKT136901 (inhibidor de NOX1 y NOX4, concentración final = 0,1 μ M) y VAS2870 (inhibidor de NOX1, NOX2 y NOX4 concentración final = 10 μ M) del tratamiento con DHE.

Las intensidades y áreas de las muestras se midieron en la zona del glomérulo, utilizando el programa de análisis de imagen ImageJ (versión 1.54d), siendo los valores de fluorescencia los correspondientes al comando “IntDen”. Los valores representados gráficamente fueron normalizados por el área de los glomérulos.

5.5.7 Obtención de imágenes en el microscopio

Las imágenes para la determinación de ERO *in situ* fueron tomadas a través del microscopio de fluorescencia Axioskop 40 y utilizando el programa ZEN 3.3. Por otro lado, para las muestras teñidas con hematoxilina–eosina se utilizó el microscopio Olympus BX41 y el programa OLYMPUS cellSens 1.18.

5.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se representaron como media \pm S.E.M y se analizaron en el programa GraphPad Prism versión 8.0.2 (263). Para demostrar la significancia estadística de los datos se realizó un análisis t de Student para datos no emparejados, asumiendo una distribución Gaussiana y desviación estándar iguales. Los datos se consideraban significativamente distintos a valores inferiores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Características de los animales del estudio

En la **Tabla 3** se recogen los datos correspondientes a las características de los animales tras su sacrificio, el día 19 de gestación (DG19). Los pesos finales de los animales, así como de los riñones, no mostraron diferencias significativas. Estos datos coinciden con los encontrados en un estudio realizado en el mismo grupo de investigación, pero en ratas

con PE de fase temprana, donde tampoco se observaron diferencias significativas con respecto a las ratas NP (Santana-Garrido et al., 2022).

Con respecto a las características de las crías, diversos estudios indican la reducción del crecimiento fetal como uno de los síntomas más notables (Ngene & Moodley, 2018; Raia-Barjat et al., 2022). Sin embargo, en este estudio no se observaron variaciones entre el tamaño fetal de los grupos, por lo que no explicaría la restricción en el crecimiento que suele aparecer en la PE. Esto podría deberse a las diferencias de cómo se desarrolla la enfermedad, puesto que al desarrollarse la PE después de la semana 34 de gestación (fase tardía), no se ha producido una mala placentación como sucede en el fase temprana, y, por tanto, el feto ha pasado gran parte de la gestación sin sufrir los efectos negativos de ello (Gyselaers & Thilaganathan, 2019). Si bien es cierto que la restricción en el crecimiento fetal es un síntoma claro que aparece en los embarazos con PE, la mayoría de los estudios se han realizado en embarazadas con PE temprana, como se observó en un estudio previo del grupo utilizando ratas preeclámpticas (Santana-Garrido et al., 2022). Sin embargo, en aquellos estudios que también incluían PE tardía concluían que existe una menor incidencia de este síntoma (Wójtowicz et al., 2019). No obstante, existen otros estudios clínicos que sí observan restricción del crecimiento fetal en la PE tardía (Teka et al., 2023), lo que podría respaldar la idea de la heterogeneidad en la sintomatología de esta enfermedad.

Parámetro	NP	LOPE
Peso del animal (g)	327,30 ± 30,48	338,40 ± 28,88
Peso de riñones (g)	0,83 ± 0,09	0,89 ± 0,05
g riñón/100 g peso animal	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,02
Media nº crías	10,83 ± 3,92	11,30 ± 2,63
Peso crías cuerno derecho (g)	2,15 ± 0,43	2,52 ± 0,48
Peso crías cuerno izquierdo (g)	2,15 ± 0,40	2,50 ± 0,57

Tabla 3. Características de los animales al final del experimento. Pesos de los animales, riñones, y crías en el día 19 de gestación (DG19). Los resultados representan la media ± S.E.M, de al menos 6 animales por grupo. NP: *normal pregnant*, LOPE: *late-onset preeclampsia*.

6.2 Demostración del modelo de preeclampsia tardía en ratas

La PE, como se ha mencionado anteriormente, se diagnostica como una enfermedad de carácter hipertensivo junto con, al menos, uno de los siguientes síntomas: proteinuria, aumento de factores antiangiogénicos, disminución de factores angiogénicos o disfunción endotelial, entre otros.

En primer lugar, al medir los valores de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) al inicio del tratamiento (DG15) no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de animales. Sin embargo, al finalizar el tratamiento (DG19), el grupo LOPE presentaba un incremento significativo de PAS y PAD, con respecto al grupo NP. Esto demuestra que el modelo de rata utilizado en este estudio presenta una condición hipertensiva, tal y como se aprecia en la **Figura 3**. La presencia de hipertensión en modelo de ratas con PE tardía ya se ha confirmado en otros estudios (Kasture et al., 2019).

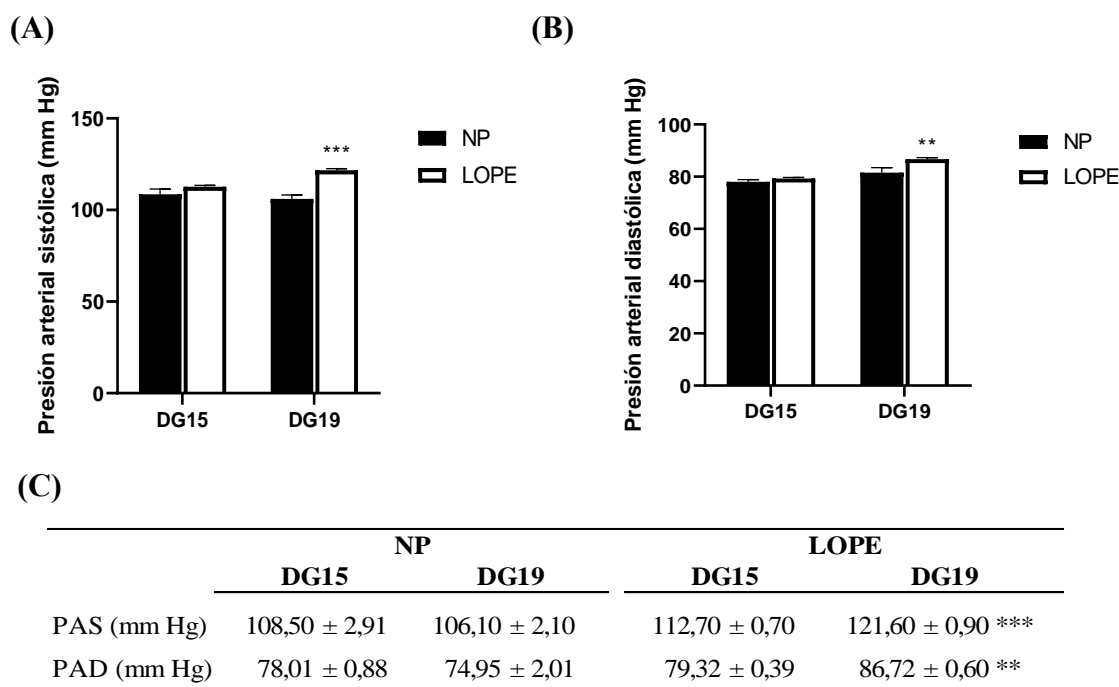


Figura 3. Medidas de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD). Representación gráfica de la determinación de la presión arterial sistólica (A) y diastólica (B) de ambos grupos de experimentación, los días 15 (DG15) y 19 (DG19) de gestación. (C) Datos recogidos tabla tras la determinación de la presión. Los resultados representan la media ± SEM, de al menos 4 animales por grupo. Significación estadística: ** p < 0,01 y *** p < 0,001 vs NP en DG19. NP: *normal pregnant*, LOPE: *late-onset preeclampsia*.

En cuanto a la determinación de la proteinuria, no se observaron diferencias significativas entre los animales del estudio (**Figura 4**). A pesar de ser uno de los biomarcadores más utilizados en el diagnóstico de la PE, en otros estudios se ha visto que la proteinuria puede ser el último síntoma que aparece y, por tanto, la PE se puede dar sin signos de proteinuria (Irwanto et al., 2021). Estudios con el mismo modelo de inducción de la PE de fase temprana muestran claras diferencias entre el grupo enfermo y el sano. Sin embargo, en nuestro trabajo dichas diferencias no se han observado. Esto se puede deber a las diferencias en el abordaje experimental, donde el comienzo de la infusión del factor sFlt-1 en las ratas se produce a partir del día 7 de gestación (DG7), originando una PE temprana, y en nuestro caso fue a partir del día 15 de gestación (DG15). Por ello, al tener

más días de tratamiento las ratas pudieron desarrollar síntomas de forma más notable, entre los cuales se encuentra la proteinuria (Santana-Garrido et al., 2022). El hecho de que el mismo modelo de ratas, pero con cambios en la duración del tratamiento, afecte al desarrollo de la proteinuria se explica a través del propio factor sFlt-1, pues se ha encontrado una fuerte correlación entre los niveles de sFlt-1 y el desarrollo de proteinuria (Tataru-Copos et al., 2022).

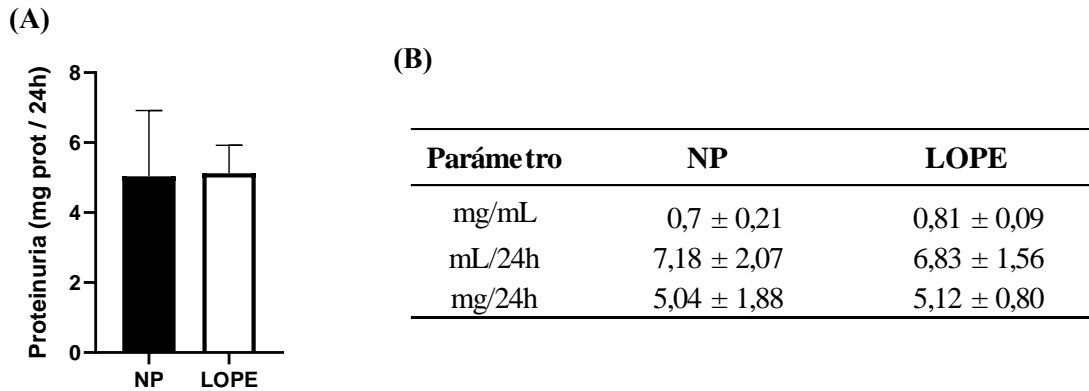


Figura 4. Determinación de proteinuria. (A) Representación gráfica de cantidad de proteína en orina de 24 horas, (B) Datos recogidos tras la extracción de orina y determinación de proteinuria en ratas. Los resultados representan la media ± SEM, de al menos 4 animales por grupo. NP: *normal pregnant*, LOPE: *late-onset preeclampsia*.

En el diagnóstico clínico de la PE de fase tardía, la sobreexpresión del factor antiangiogénico sFlt-1 es considerado como otro biomarcador importante (Cim et al., 2017). En la **Figura 5** se muestran los cambios en la expresión de este factor en tejido renal, donde observamos una expresión significativamente mayor en el grupo LOPE con respecto al grupo NP. En otro estudio con un modelo de PE temprana en ratas cuya inducción de la enfermedad se realizó bajo el mismo procedimiento, también observaron una sobreexpresión de sFlt-1 en los riñones (Santana-Garrido et al., 2022), por tanto, este análisis confirma que el método de inducción de la PE ha funcionado correctamente.

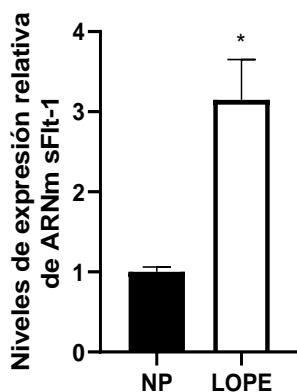


Figura 5. Expresión relativa de sFlt-1 en tejido renal. Los resultados se representaron en tanto por uno con respecto a la expresión génica de sFlt-1 en NP, de al menos 3 animales por cada grupo. Significación estadística: * $p < 0,05$ vs. NP. NP = *normal pregnant*, LOPE: *late-onset preeclampsia*.

6.3 Análisis histomorfológico

Los resultados anteriormente mostrados parecen indicar un fenotipo de PE tardía (incremento de presión arterial y expresión génica de sFlt-1), de modo que mediante la tinción H&E se pudo realizar un análisis a nivel morfológico para determinar si había diferencias a nivel estructural del tejido renal. A simple vista se observó un engrosamiento de los glomérulos de las ratas LOPE con respecto a las ratas NP (**Figura 6A**).

Curiosamente, tras realizar un análisis morfométrico del tamaño de los glomérulos se confirmó que hay un aumento significativo en el grupo LOPE con respecto al grupo NP (**Figura 6B**). Un estudio reciente ha mostrado una relación entre la presencia de glomerulonefritis y PE. Este estudio demuestra que los pacientes con PE temprana padecen una mayor inflamación de glomérulos debido a la falta de factor VEGF, cuya ausencia compromete la estructura de los podocitos y con ello la tasa de filtración glomerular (Wiles et al., 2021). Con respecto a la PE tardía, varios estudios corroboran que la manifestación de los síntomas renales es similar a los presentes en la PE temprana (Vázquez-Rodríguez et al., 2020; Wójtowicz et al., 2019). Como resultado de la inflamación, los glomérulos dañados aumentan de tamaño. Por tanto, es posible que el aumento del tamaño de glomérulos que aparece el grupo LOPE se podría relacionar con la presencia de glomerulonefritis, lo que respaldaría la idea de aparición de daño renal.

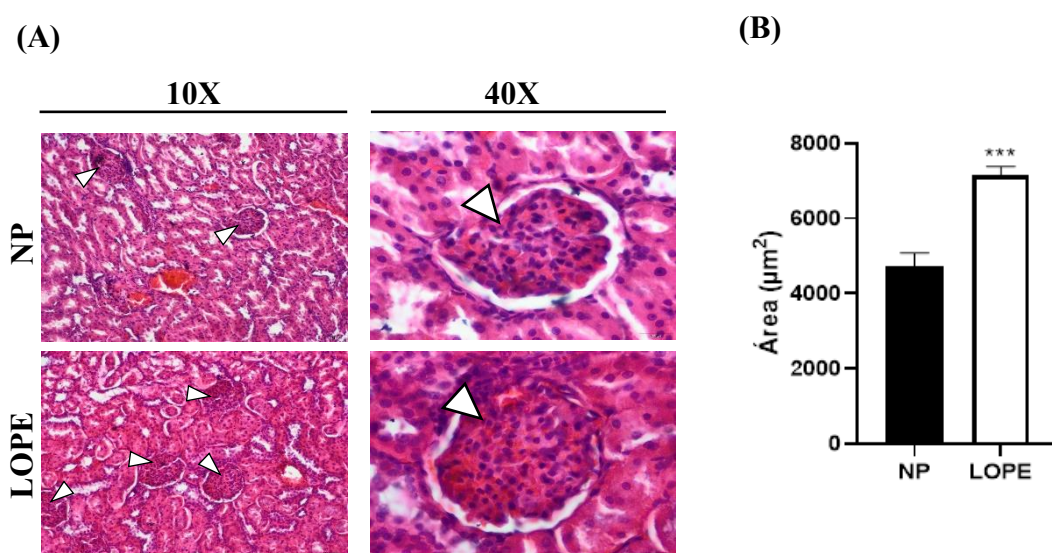


Figura 6. Estudio de cambios morfológicos en el riñón de ratas preeclámpticas. (A) Imágenes tomadas al microscopio a 10 X y 40 X de cortes histológicos de ambos grupos. Las flechas blancas indican la posición de los glomérulos en la imagen. (B) Área de los glomérulos. Las unidades de área son micras cuadradas (µm²). Los resultados representan la media ± SEM, de al menos 3 animales por grupo. Significación estadística: *** p < 0,001 vs. NP. NP: *normal pregnant*, LOPE: *late-onset preeclampsia*.

6.4 Análisis de la producción de ERO *in situ*

Para confirmar la presencia de daño renal se midió la cantidad de señal producida por la aparición de ERO. En la **Figura 7A** observamos la presencia de una señal intensa de color rojo que aumenta de forma significativa en el grupo LOPE con respecto al grupo NP (**Figura 7C**). La ausencia de la señal intensa roja tras el tratamiento con PEG-SOD confirma la presencia de ERO en el tejido renal (**Figura 7B**). Cuando las secciones de tejido fueron preincubadas con los inhibidores específicos de las distintas isoformas de las NOX, una disminución significativa de la producción de ERO se observó en el grupo LOPE (**Figura 7C**).

Estos hallazgos demostrarían la contribución de la enzima NADPH oxidasa en la producción de las ERO en el tejido renal, siendo esta contribución mayor en las LOPE, sugiriendo un daño oxidativo renal en estas ratas LOPE. Por otra parte, la disminución de la producción de ERO cuando se utiliza los diferentes inhibidores de las NOX nos indica que la isoforma NOX1 es la principal contribuyente en el aumento de la producción de ERO en el grupo LOPE. Estos resultados van en consonancia con los obtenidos por Cui et al. en 2006, donde en dicho estudio se describió por primera vez que la isoforma NOX1 se encuentra sobreexpresada en la placenta de pacientes con PE (Cui et al., 2006).

En un estudio reciente, se ha descrito que existe un daño oxidativo renal en pacientes con obesidad, donde se ha observado que isoforma NOX1 también está involucrada en el daño oxidativo, relacionándose incluso con la disfunción endotelial y la inflamación renal (Muñoz et al., 2020). Dado que la obesidad es un importante factor de riesgo en pacientes con PE tardía (Chang et al., 2023), estos resultados son de alta relevancia para conocer aún mejor la sintomatología de esta enfermedad. Además, la inhibición específica de la isoforma NOX1 mediante ML171 se ha utilizado como estrategia terapéutica en modelos murinos con disfunción renal (Jung et al., 2020). Debido a la retroalimentación existente entre las complicaciones renales y la aparición de PE, sería de gran interés realizar más ensayos con el fin de encontrar nuevas terapias para esta enfermedad.

Por otro lado, la función principal de NOX4 es la producción de peróxido de hidrógeno para fomentar una vasodilatación en el tejido renal y así proteger al órgano de la disfunción endotelial mediada por ERO (Muñoz et al., 2020). Sin embargo, no queda clara su contribución en enfermedades renales ya que se ha observado que una expresión exacerbada de esta isoforma puede también ser la causante de daños renales como

inflamación y apoptosis celular (Yang et al., 2018). En este sentido, una producción excesiva de O_2^- se encontró en el riñón de ratas con PE temprana donde dicha alteración parece estar mediada principalmente por NOX4 (Santana-Garrido et al., 2022).

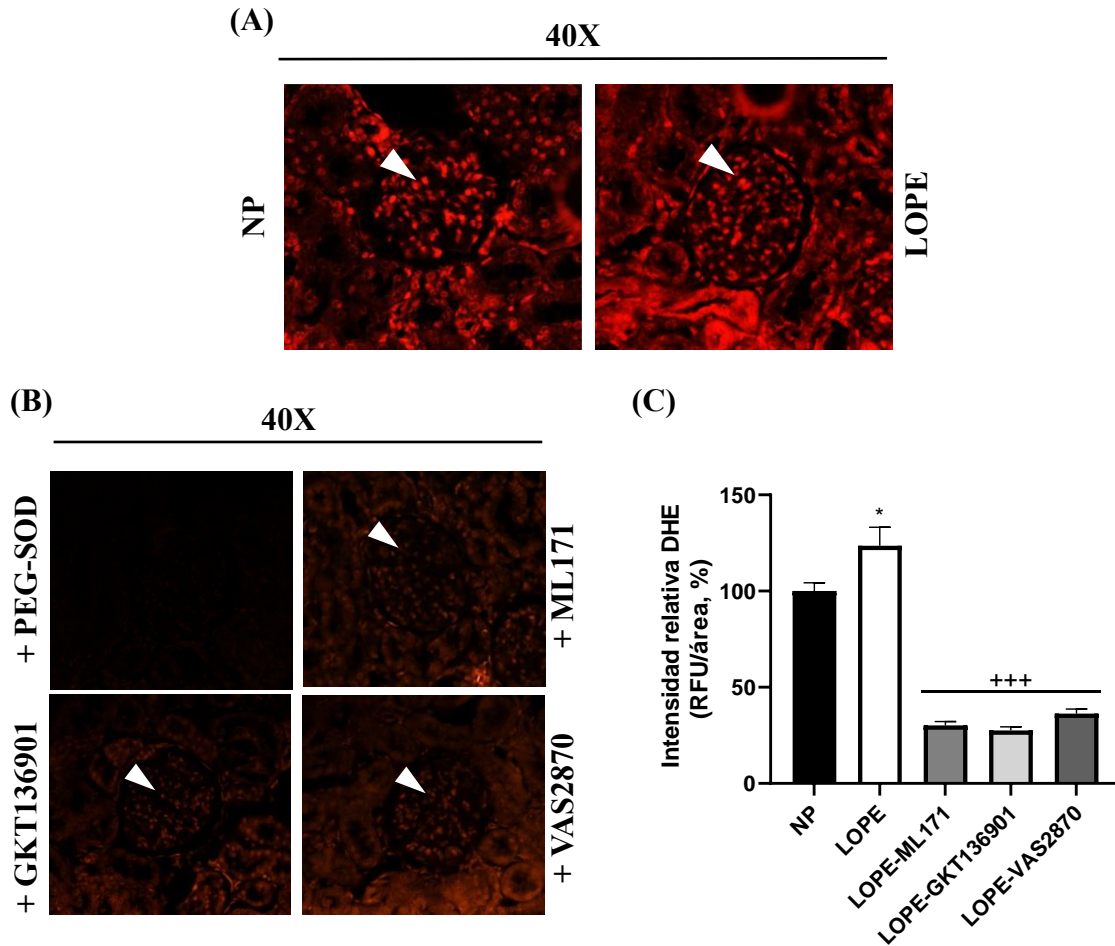


Figura 7. Detección in situ de ERO en glomérulos renales. (A) Imágenes tomadas en microscopio de fluorescencia a 40X de cortes histológicos renales tratados con DHE. (B) Imágenes tomadas en microscopio de fluorescencia a 40X de cortes histológicos renales, del grupo LOPE, tratados con DHE e inhibidores específicos de las isoformas de NOX: ML171 (inhibidor NOX1), GKT136901 (inhibidor NOX1/4), VAS2870 (inhibidor NOX1/2/4) y PEG-SOD. Las flechas blancas indican la posición de los glomérulos en la imagen. (C) Intensidad relativa de DHE. Los resultados representan el % RFU/área (unidades relativas de fluorescencia por área), de al menos 3 animales por grupo. Significación estadística: * p < 0,05 vs. NP y +++ p < 0,001 vs. LOPE. NP: *normal pregnant*, LOPE: *late-onset preeclampsia*.

7. CONCLUSIÓN

De este presente trabajo se puede concluir que la enzima **NADPH oxidasa** juega un papel muy importante en la generación de las ERO en el daño renal que acompaña a la enfermedad de la preeclampsia tardía. En este estudio, hemos querido caracterizar la implicación de esta enzima en el tejido renal, siendo la isoforma **NOX1** la más involucrada en el proceso de producción de las ERO en tejido renal de ratas tratadas con sFlt-1. Además, también se ha observado la presencia de glomérulos engrosados que podrían indicar el **daño renal** provocado por el ambiente altamente oxidativo. Sin embargo, se requerirá la realización de nuevos experimentos para determinar si este cambio es debido a un proceso fibrótico o inflamatorio.

En su conjunto, cabe destacar las características del modelo animal utilizado para representar la **fase tardía** de la enfermedad. Teniendo en cuenta las limitaciones que conlleva utilizar un modelo animal, se han conseguido resultados significativos que serían interesantes reproducirlos con un mayor número de muestras, así como ahondar en determinar la actividad y expresión de las distintas isoformas de la enzima NADPH oxidasa.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ameziane-El-Hassani, R., Schlumberger, M., & Dupuy, C. (2016). NADPH oxidases: New actors in thyroid cancer? In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 12, Issue 8, pp. 485–494). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.64>
- Artemieva, K. A., Nizyaeva, N. V., Baev, O. R., Romanov, A. Y., Khlestova, G. V., Boltovskaya, M. N., Shchegolev, A. I., & Kakturskiy, L. V. (2022). Regulation of the Placental Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Early- and Late-Onset Preeclampsia. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1134/S1607672922060011>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chang, K. J., Seow, K. M., & Chen, K. H. (2023). Preeclampsia: Recent Advances in Predicting, Preventing, and Managing the Maternal and Fetal Life-Threatening Condition. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 20, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph20042994>
- Cim, N., Kurdoglu, M., Ege, S., Yoruk, I., Yaman, G., & Yildizhan, R. (2017). An analysis on the roles of angiogenesis-related factors including serum vitamin D, soluble endoglin (sEng), soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1), and

- vascular endothelial growth factor (VEGF) in the diagnosis and severity of late-onset preeclampsia. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 30(13), 1602–1607. <https://doi.org/10.1080/14767058.2016.1219986>
- Cui, X. L., Brockman, D., Campos, B., & Myatt, L. (2006). Expression of NADPH Oxidase Isoform 1 (Nox1) in Human Placenta: Involvement in Preeclampsia. *Placenta*, 27(4–5), 422–431. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2005.04.004>
- Dimitriadis, E., Rolnik, D. L., Zhou, W., Estrada-Gutierrez, G., Koga, K., Francisco, R. P. V., Whitehead, C., Hyett, J., da Silva Costa, F., Nicolaides, K., & Menkhorst, E. (2023). Pre-eclampsia. In *Nature reviews. Disease primers* (Vol. 9, Issue 1, p. 8). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00417-6>
- Elbatreek, M. H., Mucke, H., & Schmidt, H. H. H. W. (2021). NOX Inhibitors: From Bench to Naxibs to Bedside. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 264). https://doi.org/10.1007/164_2020_387
- Gyselaers, W., & Thilaganathan, B. (2019). Preeclampsia: a gestational cardiorenal syndrome. In *Journal of Physiology* (Vol. 597, Issue 18, pp. 4695–4714). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1113/JP274893>
- Hernandez, I., Chissey, A., Guibourdenche, J., Atasoy, R., Coumoul, X., Fournier, T., Beaudoux, J. L., & Zerrad-saadi, A. (2021). Human placental nadph oxidase mediates sflt-1 and plgf secretion in early pregnancy: Exploration of the tgfb-β1/p38 mapk pathways. *Antioxidants*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antiox10020281>
- Hu, X. Q., & Zhang, L. (2022). Mitochondrial Dysfunction in the Pathogenesis of Preeclampsia. In *Current Hypertension Reports* (Vol. 24, Issue 6, pp. 157–172). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11906-022-01184-7>
- Irwanto, E. L., Darwin, E., Donel, S., & Tjong, D. H. (2021). Determination of urine protein levels and analysis of differences in vascular endothelial growth factor levels between early onset and late onset preeclampsia. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9(B), 552–556. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.6222>
- Jung, E., Romero, R., Yeo, L., Gomez-Lopez, N., Chaemsaitong, P., Jaovisidha, A., Gotsch, F., & Erez, O. (2022). The etiology of preeclampsia. In *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 226, Issue 2, pp. S844–S866). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.11.1356>
- Jung, H. Y., Oh, S. H., Ahn, J. S., Oh, E. J., Kim, Y. J., Kim, C. D., Park, S. H., Kim, Y. L., & Cho, J. H. (2020). Nox1 inhibition attenuates kidney ischemia-reperfusion injury via inhibition of ros-mediated erk signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21186911>
- Kasture, V., Kale, A., Randhir, K., Sundrani, D., & Joshi, S. (2019). Effect of maternal omega-3 fatty acids and vitamin E supplementation on placental apoptotic markers in rat model of early and late onset preeclampsia. *Life Sciences*, 239, 117038. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.117038>

- Lee, H., & Jose, P. A. (2021). Coordinated Contribution of NADPH Oxidase- and Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species in Metabolic Syndrome and Its Implication in Renal Dysfunction. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.670076>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Loughrey, S., & Matlock, B. (2016). *Acclaro Protein Contaminant ID Detection of Protein in Nucleic Acid Samples Using the NanoDrop One Spectrophotometer*. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/acclaro-protein-contaminant-id-detection-nucleic-acid-samples-TN52853.pdf>
- Metoki, H., Iwama, N., Hamada, H., Satoh, M., Murakami, T., Ishikuro, M., & Obara, T. (2022). Hypertensive disorders of pregnancy: definition, management, and out-of-office blood pressure measurement. In *Hypertension Research* (Vol. 45, Issue 8, pp. 1298–1309). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41440-022-00965-6>
- Morgan, H. A., Sallam, M. Y., El-Gowell, H. M., El-Gowilly, S. M., & El-Mas, M. M. (2023). The renin-angiotensin system modulates endotoxic postconditioning of exacerbated renal vasoconstriction in preeclamptic offspring. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27923-7>
- Muñoz, M., López-Oliva, M. E., Rodríguez, C., Martínez, M. P., Sáenz-Medina, J., Sánchez, A., Climent, B., Benedito, S., García-Sacristán, A., Rivera, L., Hernández, M., & Prieto, D. (2020). Differential contribution of Nox1, Nox2 and Nox4 to kidney vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in obesity. *Redox Biology*, 28, 101330. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2019.101330>
- Ngene, N. C., & Moodley, J. (2018). Role of angiogenic factors in the pathogenesis and management of pre-eclampsia. In *International Journal of Gynecology and Obstetrics* (Vol. 141, Issue 1, pp. 5–13). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12424>
- Poon, L. C., Shennan, A., Hyett, J. A., Kapur, A., Hadar, E., Divakar, H., McAuliffe, F., da Silva Costa, F., von Dadelszen, P., McIntyre, H. D., Kihara, A. B., Di Renzo, G. C., Romero, R., D'Alton, M., Berghella, V., Nicolaides, K. H., & Hod, M. (2019). The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 145(S1), 1–33. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12802>
- Raia-Barjat, T., Edebiri, O., & Ni Ainle, F. (2022). Preeclampsia and Venous Thromboembolism: Pathophysiology and Potential Therapy. In *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.856923>
- Rossi, F., & Zatti, M. (1964). Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of

- resting and phagocytizing cells. *Experientia*, 20(1), 21–23. <https://doi.org/10.1007/BF02146019/METRICS>
- San Juan-Reyes, S., Gómez-Oliván, L. M., Islas-Flores, H., & Dublán-García, O. (2020). Oxidative stress in pregnancy complicated by preeclampsia. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 681). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108255>
- Santana-Garrido, Á., Reyes-Goya, C., Espinosa-Martín, P., Sobrevia, L., Beltrán, L. M., Vázquez, C. M., & Mate, A. (2022). Oxidative and Inflammatory Imbalance in Placenta and Kidney of sFlt1-Induced Early-Onset Preeclampsia Rat Model. *Antioxidants*, 11(8), 1608. <https://doi.org/10.3390/antiox11081608>
- Segal, A. W., & Jones, O. T. G. (1978). Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 1978 276:5687, 276(5687), 515–517. <https://doi.org/10.1038/276515a0>
- Sylvester, A. L., Zhang, D. X., Ran, S., & Zinkevich, N. S. (2022). Inhibiting NADPH Oxidases to Target Vascular and Other Pathologies: An Update on Recent Experimental and Clinical Studies. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12060823>
- Tataru-Copos, A.-F., Popescu, M. I., Murvai, R., & El Kharoubi, A. (2022). Efficiency of sFlt-1/PlGF Ratio in Preeclampsia Diagnosis. *Medicina*, 58(9), 1196. <https://doi.org/10.3390/medicina58091196>
- Teka, H., Yemane, A., Abraha, H. E., Berhe, E., Tadesse, H., Gebru, F., Yahya, M., Tadesse, Y., Gebre, D., Abrha, M., Tesfay, B., Tekle, A., Gebremariam, T., Amare, B., Ebrahim, M. M., Zelelow, Y. B., & Mulugeta, A. (2023). Clinical presentation, maternal-fetal, and neonatal outcomes of early-onset versus late onset preeclampsia-eclampsia syndrome in a teaching hospital in a low-resource setting: A retrospective cohort study. *PloS One*, 18(2), e0281952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281952>
- Vázquez-Rodríguez, J. G., García-Hernández, I. I., Vázquez-Rodríguez, J. G., & García-Hernández, I. I. (2020). Lesión renal aguda en la preeclampsia severa de inicio temprano y tardío. *Ginecología y Obstetricia de México*, 88(12), 844–852. <https://doi.org/10.24245/gom.v88i12.4422>
- Wiles, K., Stillman, I. E., & Conrad, K. P. (2021). The Kidney in Normal Pregnancy and Preeclampsia. In *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy* (pp. 289–334). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818417-2.00009-9>
- Wójtowicz, A., Zembala-Szczerba, M., Babczyk, D., Kołodziejczyk-Pietruszka, M., Lewaczyńska, O., & Huras, H. (2019). Early-and Late-Onset Preeclampsia: A Comprehensive Cohort Study of Laboratory and Clinical Findings according to the New ISHHP Criteria. *International Journal of Hypertension*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4108271>
- Yang, Q., Wu, F. rong, Wang, J. nan, Gao, L., Jiang, L., Li, H. Di, Ma, Q., Liu, X. qi, Wei, B., Zhou, L., Wen, J., Ma, T. tao, Li, J., & Meng, X. ming. (2018). Nox4 in renal diseases: An update. *Free Radical Biology and Medicine*, 124, 466–472. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.06.042>