



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

***PAPEL DE ENDOGLINA SOLUBLE EN
LOS SÍNTOMAS DE LA PREECLAMPSIA.
ESTUDIO EN MODELOS ANIMALES***

Memoria presentada por **LUIS GAMELLA POZUELO**
para optar al Grado de Doctor
por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 15 de enero de 2018



Fdo.: Luis Gamella Pozuelo

D^a. ROCÍO I. RODRÍGUEZ MACÍAS, PROFESORA TITULAR DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA Y COORDINADORA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "**PAPEL DE ENDOGLINA SOLUBLE EN LOS SÍNTOMAS DE LA PREECLAMPSIA. ESTUDIO EN MODELOS ANIMALES**" presentada por D. **Luis Gamella Pozuelo**, para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Miguel López-Novoa, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, el Dr. D. Miguel Pericacho Bustos, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca y el Dr. D. Carmelo Bernabeu Quirante, Profesor de Investigación del Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca a DÍA 15 de enero de 2018.

Fdo. Rocío I. Rodríguez Macías

D^a. M^a JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "**PAPEL DE ENDOGLINA SOLUBLE EN LOS SÍNTOMAS DE LA PREECLAMPSIA. ESTUDIO EN MODELOS ANIMALES**" presentada por D. **Luis Gamella Pozuelo**, para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Miguel López-Novoa, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, el Dr. D. Miguel Pericacho Bustos, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca y el Dr. D. Carmelo Bernabeu Quirante, Profesor de Investigación del Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 15 de Enero de 2018.

Fdo. M^a Jesús Monte Río

LOS DOCTORES D. JOSÉ MIGUEL LÓPEZ NOVOA, CATEDRÁTICO DE FISIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, EL DR. D. MIGUEL PERICACHO BUSTOS, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y EL DR. D. CARMELO BERNABEU QUIRANTE, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado **“PAPEL DE ENDOGLINA SOLUBLE EN LOS SÍNTOMAS DE LA PREECLAMPSIA. ESTUDIO EN MODELOS ANIMALES”**, presentado por D. Luis Gamella Pozuelo para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Área de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, consideran que cumple las condiciones necesarias y autorizan su presentación con el fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Salamanca, a 15 de Enero de 2018.

Fdo.: Dr. D. José M. López Novoa

Fdo.: Dr. D. Miguel Pericacho Bustos

Fdo.: Dr. D. Carmelo Bernabeu Quirante

Este trabajo ha sido realizado con cargo a los siguientes proyectos de investigación:

SAF2013-43421-R del Ministerio de Economía Industria y Competitividad. (Programa estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación). (2014-2018). "*Análisis de un nuevo rol de endoglina en adhesión celular y su relevancia en la biología vascular*". INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Carmelo Bernabéu Quirante.

ISCIII-CB06/07/0038. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. (2006-2017). Unidad 707 del CIBERER. Investigador principal: Dr. Carmelo Bernabéu Quirante.

SAF2013-45784-R del Ministerio de Economía Industria y Competitividad. (Programa estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación). (2014-2017). "*Nuevos papeles fisiológicos y patológicos de las isoformas de endoglina. Función del dominio extracelular*". INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. José Miguel López Novoa.

RETIC RD12/0021/0032. Red de Investigación Renal (REDinREN), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. (2015-2016). Investigador principal: Dr. José Miguel López Novoa.

FUNDACIÓN RENAL IÑIGO ÁLVAREZ DE TOLEDO (FRIAT).

Índice

"Tenemos hombres de principios, lástima que nunca los dejen pasar del principio"

"Paren al mundo, que me quiero bajar"

Mafalda

Índice	XI
Abreviaturas.....	XI
Introducción	1
1. Preeclampsia	3
2. Adaptaciones fisiológicas del embarazo.....	8
2.1. Sistema cardiovascular	8
2.1.a. Sangre	8
2.1.b. Gasto cardiaco	9
2.1.c. Resistencias vasculares y presión arterial	10
2.1.d. Presión arterial	13
2.2. Hemostasia	14
2.2.a. Plaquetas	15
2.2.b. Sistema de coagulación	18
2.2.c. Sistema fibrinolítico	20
2.3. Función renal.....	21
2.3.a. Cambios anatómicos.....	21
2.3.b. Cambios funcionales	22
3. Alteraciones fisiológicas en la preeclampsia	25
3.1. Placenta	25
3.2. Sistema cardiovascular	25
3.2.a. Sangre	25
3.2.b. Gasto cardiaco	27
3.2.c. Resistencias vasculares	28
3.2.d. Presión arterial	34
3.3. Hemostasia	35
3.3.a. Plaquetas	35
3.3.b. Sistema de coagulación y fibrinólisis	37
3.4. Función renal.....	38
3.4.a. Podocituria.....	40
4. Endoglina	42
4.1. Función de endoglina.....	43
4.2. Endoglina soluble.....	45
4.2.a. Regulación de la liberación de sEng.....	47
4.3. Mecanismo de acción.....	50

4.4. Biomarcador.....	51
4.5. Síntomas clínicos de la preeclampsia y su relación con endoglina soluble	51
4.5.a. Hipertensión	51
4.5.b. Proteinuria.....	52
4.5.c. Hemostasia	53
Objetivos.....	55
Materiales y Métodos.....	58
1. Generación de ratones modificados genéticamente	61
1.1. Establecimiento de las colonias de ratones transgénicos.....	62
1.2. Mantenimiento de los animales.....	63
1.3. Manejo de los animales y aspectos legales.....	63
1.4. Genotipado de los ratones	64
2. Extracción de muestras	65
2.1. Anestesia y procedimientos quirúrgicos	65
2.2. Extracción de sangre y obtención de plasma.....	66
2.3. Extracción y procesamiento de órganos.....	67
2.4. Extracción de orina (podocituria/proteinuria inducida)	67
2.5. Cultivos celulares.....	69
3. Análisis de las muestras.....	69
3.1. ELISA.....	69
3.2. Hemograma	70
3.3. Inmunohistoquímica.....	71
3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	72
3.4.a. PCR semicuantitativa.....	72
3.4.b. PCR cuantitativa de mRNA (qRT-PCR)	73
3.5. Proteinuria.....	74
4. Estudios <i>ex vivo</i>	74
4.1. Anillos de aorta	74
5. Estudios <i>in vivo</i>	77
5.1. Medida de presión arterial en la cola	77
5.2. Tiempo de sangrado.....	79
5.3. Tiempo de protrombina	80
5.4. Trombocitopenia inducida por colágeno/adrenalina.....	80
5.5. Oclusión de la carótida producida por cloruro férrico.....	81

5.6. Perfusión continua de noggin: bomba osmótica.....	82
5.7. Análisis de la permeabilidad de la vasculatura de la retina	83
5.8. Tratamiento de los datos y análisis estadístico.....	85
<i>Resultados</i>	64
1. Descripción general de la línea de ratones	95
2. Síntomas de la preeclampsia y el papel de endoglina soluble.....	97
2.1. Efecto de la endoglina soluble sobre la proteinuria y podocituria.....	97
2.2. Efecto de la Endoglina soluble sobre la permeabilidad.....	100
2.3. Hemostasia	105
2.3.a. Tiempo de sangrado.....	105
2.3.b. Recuento plaquetario.....	108
2.3.c. Tiempo de protrombina e INR.....	110
2.3.d. Agregación plaquetaria	111
2.3.e. Formación y estabilización de trombo	112
2.4. Presión arterial y endoglina soluble.....	118
2.4.a. Presión arterial basal y en gestación	118
2.4.b. Efecto vasomotor de endoglina soluble.....	120
2.4.c. Papel de BMP-4 en la hipertensión asociada a altos niveles de endoglina soluble.....	122
<i>Discusión</i>	136
1. Papel de la endoglina en proteinuria y podocituria.	136
2. Endoglina soluble y permeabilidad vascular.....	139
3. Efecto de endoglina soluble sobre la hemostasia.....	141
4. Efecto de endoglina soluble sobre el incremento de la presión arterial.	149
5. Discusión final	158
<i>Conclusiones</i>	134
<i>Bibliografía</i>	165

Índice de figuras

Figura 1. Vías de coagulación y fibrinólisis.....	19
Figura 2. Disfunción endotelial en relación con la preeclampsia.....	32
Figura 3. Construcción utilizada para la generación de los ratones sEng.....	61
Figura 4. Genotipado de los ratones utilizados en el estudio	64
Figura 5. Proceso de inoculación de sEng y extracción de orina.....	68
Figura 6. Esquema general del sistema de inmunodetección de proteínas mediante ELISA.....	70
Figura 7. Miógrafo de alambre y Sistema de Multi Miografía 620 M (DMT).....	75
Figura 8. Estudio de vasomotricidad con anillos aórticos.....	76
Figura 9. Equipo NIPREM 1.5. y ratón en el cepo de medida.....	78
Figura 10. Imagen de la pantalla de registro de presión medida en cola.....	79
Figura 11. Equipo utilizado para la medición del flujo.....	81
Figura 12. Progresión de la formación del trombo inducido por cloruro férrico.....	82
Figura 13. Proceso de implantación de la bomba osmótica con noggin.....	83
Figura 14. Modelo animal utilizado en el trabajo	95
Figura 15. Fenotipado de los ratones utilizados en el estudio.....	95
Figura 16. Caracterización general de los ratones utilizados en este estudio.....	97
Figura 17. Proteinuria inducida por endoglina soluble	98
Figura 18. Podocituria inducida por endoglina soluble	99
Figura 19. Retina tipo de ratón con genotipo WT.....	101
Figura 20. Retina tipo de ratón con genotipo sEng.....	101
Figura 21. Procedimiento de análisis de las retinas.....	103
Figura 22. Efecto de la endoglina soluble sobre la permeabilidad.....	104
Figura 23. Tiempo y cuantificación del sangrado.....	106
Figura 24. Tiempo y cuantificación de los resangrados.....	107

Figura 25. Estado de los animales al final del experimento.....	108
Figura 26. Recuento plaquetario.....	109
Figura 27. Tiempo de protrombina e INR.....	111
Figura 28. Trombocitopenia intravascular inducida por colágeno y adrenalina.....	112
Figura 29. Medición de flujo y formación de trombo por medio de cloruro férico.....	114
Figura 30. Análisis cuantitativo de la curva descrita por el flujo de la carótida.....	115
Figura 31. Curva modelo de cierre parcial en la medición de flujo y formación de trombo.....	116
Figura 32. Análisis de las aperturas tras cierre parcial y flujo sanguíneo inicial.....	117
Figura 33. Presión arterial sistólica basal y en gestación.....	119
Figura 34. Estudio del efecto vasomotor de la endoglina.....	122
Figura 35. Expresión de BMP-4 en células.....	124
Figura 36. Niveles plasmáticos y de expresión genética de BMP-4.....	126
Figura 37. Inmunohistoquímica BMP-4 en pulmón, intestino y estómago.....	128
Figura 38. Presión arterial basal y con administración de noggin o vehículo.....	130
Figura 39. Niveles plasmáticos de BMP-4 y sEng tras tratamiento con noggin.....	131
Figura 40. Modelo hipotético del papel de sEng en preeclampsia.....	159

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios básicos para el diagnóstico de la Preeclampsia.....	3
Tabla 2. Clasificación de la preeclampsia.	4
Tabla 3. Causas principales de trombocitopenia durante la gestación	17
Tabla 4. Clasificación de preeclampsia según los cambios en el gasto cardiaco y resistencias vasculares periféricas.....	28
Tabla 5. Secuencias de los cebadores utilizados.....	72
Tabla 6. Relación de productos y reactivos utilizados	87
Tabla 7. Relación de aparatos utilizados.....	90

Abreviaturas

"Largo es el camino de la enseñanza por medio de teorías; breve y eficaz por medio de ejemplos."

Lucio Anneo Séneca

AA-AT1	Anticuerpo agonista del receptor tipo 1 de la angiotensina.
Ach	Acetilcolina.
ADMA	Dimetilarginina asimétrica.
BH4	Tetrahidrobiopterina.
BMP-4	Proteína morfogenética ósea 4 (<i>Bone Morphogenetic Protein-4</i>).
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>).
cDNA	DNA complementario.
CID	Coagulación intravascular diseminada.
Cox	Ciclooxigenasa.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
EBM2	Medio básico endotelial (<i>Endothelial Basic Medium</i>).
EC50	Concentración efectiva 50 (<i>Effective Concentration 50</i>).
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGM2	Medio de crecimiento endotelial (<i>Endothelial Growth Medium</i>).
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción enzimática (<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>).
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial (<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>).
FBS	Suero bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>).
FITC-dextrano	Isotiocianato de fluoresceína unido a dextrano.
FT	Factor Tisular.
HELLP	<i>Hemolysis Elevated Liver enzymes, Low Platelet</i> .
HHT-1	Telangiectasia hemorrágica hereditaria 1 (<i>Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia-1</i>).
HIF-1	Factor inducido por hipoxia-1 (<i>Hypoxia Induced Factor-1</i>).
HO-1	Hemooxigenasa-1.
HRP	Enzima peroxidasa de rábano (<i>Horseradish peroxidase</i>).
HUVEC	Células endoteliales derivadas de vena de cordón umbilical humana (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>).
IHC	Inmunohistoquímica.

INR	Ratio normalizada del tiempo de protrombina (<i>International Normalized Ratio</i>).
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>).
LXR	<i>Liver X Receptors</i> .
MMP-14	Metaloproteasa de membrana-14 (<i>Matrix Metalloproteinase-14</i>).
NO	Óxido nítrico.
NTP	Nitroprusiato.
PA	Presión arterial.
PAD	Presión arterial diastólica.
PAI-1	Inhibidor de la activación del plasminógeno (<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>).
PAI-2	Inhibidor de la activación del plasminógeno (<i>Plasminogen Activator Inhibitor-2</i>).
PAS	Presión arterial sistólica.
pb	Pares de bases.
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
PE	Fenilefrina.
PFA	Paraformaldehido.
PIGF	Factor de crecimiento derivado de la placenta (<i>Placental Growth Factor</i>).
qRT-PCR	Retrotranscripción cuantitativa del mRNA a cDNA seguida de reacción en cadena de la polimerasa del cDNA (<i>quantitative Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction</i>).
RAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.
RGD	Secuencia de unión a integrinas (Arg-Gly-Asp).
RNA	Ácido ribonucleico.
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>).
RXR	Receptor del ácido retinoico.
RUPP	<i>Reduced Uterine Perfusion Pressure</i> .
sEng	Forma soluble de la endoglina.

sFLT-1	Receptor 1 de VEGF soluble (<i>soluble Fms-Like Tyrosine kinase-1</i>).
SOD	Superóxido dismutasa.
TGF- β	Factor de crecimiento tisular- β (<i>Tisular Growth Factor-β</i>).
TFG	Tasa de filtrado glomerular.
TMB	Tetrametilbencidina.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α (<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>).
TP	Tiempo de protrombina.
TPT	Tiempo parcial de tromboplastina.
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>).

Introducción

"Todos somos muy ignorantes, lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas".

Albert Einstein

1. Preeclampsia

La preeclampsia es una patología específica del embarazo que se caracteriza por la aparición *de novo* de hipertensión y proteinuria a partir de la semana 20 de gestación (Rana y cols. 2013). Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad tanto materna como fetal y perinatal en los países desarrollados.

Criterios básicos para el diagnóstico	
Síntoma	Valores
Presión arterial	<ul style="list-style-type: none"> ○ ≥ 140 mm Hg de sistólica o ≥ 90 mm Hg de diastólica, en dos medidas tomadas con al menos 4 horas de diferencia, en mujeres previamente normotensas y después de la 20ª semana de gestación. ○ ≥ 160 mm Hg de sistólica o ≥ 110 mm Hg de diastólica, en medidas tomadas en periodos cortos de tiempo.
Proteinuria	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mayor de 300 mg/24 horas. ○ Ratio proteína/creatinina mayor de 0,3
En ausencia de proteinuria, pero con hipertensión y alguno de los siguientes síntomas <i>de novo</i> .	
Síntoma	Valores
Trombocitopenia	<ul style="list-style-type: none"> ○ Contaje de plaquetas inferior a 100.000/μL
Insuficiencia renal	<ul style="list-style-type: none"> ○ Concentración de creatinina sérica superior a 1.1 mg/dL.
Disminución de la función hepática	<ul style="list-style-type: none"> ○ Niveles de transaminasas en plasma superiores al doble de lo normal.
Edema pulmonar	
Síntomas cerebrales o visuales.	

Tabla 1. Criterios básicos para el diagnóstico de la Preeclampsia: Se recogen los criterios básicos para el diagnóstico de la preeclampsia propuesto por la *The American College of Obstetricians and Gynaecologists, Task, Force on Hypertension in Pregnancy*, 2013.

Se estima que entre el 2 y el 8% de las mujeres embarazadas desarrollaran preeclampsia (Duley 2009; Eiland y cols. 2012). Cada año, y a nivel mundial, diez millones de mujeres padecen esta enfermedad, de la cuales entre 76.000 y 300.000 mueren debido a esta

patología o a los trastornos cardiovasculares que de ella se derivan, mientras que el número de bebés que mueren se cifra en unos 500.000 al año (Kuklina y cols. 2009; Konieczny y cols. 2013; Ahmed y cols. 2017).

Según el momento de aparición	
Tipo	Características
Temprana	Aparición antes de la 34ª semana de gestación. Mayor riesgo
Intermedia	Aparición entre la semana 34ª y 37ª de gestación
Tardía	Aparición después de la 37ª semana de gestación. Mejor pronóstico
Según la gravedad	
Tipo	Manifestaciones clínicas
Leve	<ul style="list-style-type: none"> PA \geq140/90 mmHg, proteinuria \geq 0,3 g/24h
Grave	<ul style="list-style-type: none"> PA \geq160/110 mmHg, proteinuria \geq 5 g/24h
HELLP	<ul style="list-style-type: none"> PA \geq140/90 mmHg, proteinuria \geq 0,3 g/24h Eritrocitos fragmentados, LDH > 600 UI/L, haptoglobina < 1 g/L Trombopenia: Clasificación Mississippi: Severa (<50x10³/dL), moderada (50-100·10³/dL) o leve (100-150x10³/dL) Elevación de la AST y ALT. Pueden presentar elevación de fosfatasa alcalina y GGT
Eclampsia	<ul style="list-style-type: none"> PA \geq185/115 mmHg, proteinuria \geq 10 g/24h Convulsiones y/o estado de coma Hiperreflexia generalizada Pérdida parcial o total de la visión Dolor en el epigastrio

Tabla 2. Clasificación de la preeclampsia. Tabla generada a partir de las clasificaciones expuestas en *Subclassification of preeclampsia (von Dadelszen y cols. 2003)* y *Revisiting HELLP syndrome (Dusse y cols. 2015)*

Según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la preeclampsia se diagnostica cuando se presenta una presión arterial (PA) elevada (\geq 140/90 mmHg) acompañada por una proteinuria considerable (\geq 300 mg/24 h) a partir de la segunda mitad del embarazo. Además de estos síntomas, la preeclampsia suele ir acompañada de disfunción endotelial, crecimiento fetal retardado, aparición de edemas, etc. Por todo ello, la preeclampsia es considerada un trastorno complejo y multisistémico

(Pennington y cols. 2012). Por todo esto, y ante el incremento de evidencias que ponen en duda la idoneidad de la proteinuria y el crecimiento fetal retardado para el diagnóstico correcto de la preeclampsia, el *American College of Obstetricians and Gynecologists* ha propuesto una serie de criterios para un mejor diagnóstico, los cuales son recogidos en la Tabla 1 (The American College of Obstetricians and Gynecologists y cols. 2013).

Generalmente, la preeclampsia se clasifica en función del grado de hipertensión, proteinuria o disfunción orgánica materna, en estadio leve o grave, aunque también existe una clasificación en función del momento de la gestación en el que aparecen las manifestaciones clínicas (von Dadelszen y cols. 2003) (Tabla 2). La progresión de la patología desde los estadios más leves a otros más graves puede ser rápida, inesperada y, a veces, fulminante. Las formas más lesivas de la enfermedad, como pueden ser HELLP (del inglés, *hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count*) y eclampsia, se asocian con una mayor tasa de mortalidad materna y fetal, tanto en la gestación como en el periodo neonatal (Pennington y cols. 2012; Sibai y Coppage 2004; Sibai y cols. 2005; Barnhart 2015; Dusse y cols. 2015)(Tabla 2).

Se han descrito diferentes factores de riesgo relacionados con la aparición de la preeclampsia. La obesidad, la hipertensión crónica y la diabetes son algunos de estos factores. También se incluyen las primigrávidas, el embarazo adolescente o a edad avanzada, la exposición limitada a esperma, los estados de hiperplacentación (como en el caso de embarazo gemelar), así como alteraciones inmunológicas (lupus eritematoso). Además, debido a la variabilidad en la incidencia entre los diversos grupos (es mayor en mujeres afro-americanas y asiáticas que en mujeres caucásicas), y a que la preeclampsia materna se asocia, en un 70%, a preeclampsia en las hijas; se ha sugerido la implicación de factores genéticos en el desarrollo de esta patología (Nilsson y cols. 2004; Sibai y cols. 2005; Rao y cols. 2006; Eiland y cols. 2012; Emanuel y Butt 2015; Ali y Khalil 2015).

A pesar de los numerosos estudios realizados sobre los diferentes factores de riesgo y sobre el desarrollo de la enfermedad, su patogenia no ha sido aún dilucidada. Lo que está comúnmente aceptado es que la placenta es el órgano imprescindible en la preeclampsia, ya que juega un papel esencial tanto en el establecimiento como en el desarrollo de la patología (De Maria y See 1966; Piering y cols. 1993). Esto queda patente ante la rápida mejoría de los síntomas maternos que tienen lugar tras un aborto o el alumbramiento, pero los síntomas persisten mientras no sea extraída la placenta (Piering y cols. 1993). Por otro

lado, el papel del feto ha sido descartado, ya que se ha observado preeclampsia en embarazos extrauterinos y en embarazos molares, en los cuales no hay un embrión viable implantado, pero si se desarrolla la placenta (Chun y cols. 1964; Roberts y Escudero 2012).

Hasta la fecha, el único tratamiento efectivo para el tratamiento de la preeclampsia ha sido la finalización del embarazo, ya sea por una interrupción voluntaria o a través de la inducción del parto y expulsión de la placenta. Aunque el parto pre-término reduce los efectos lesivos de la preeclampsia sobre el bebé, el nacimiento prematuro puede producir otra serie de complicaciones secundarias, tales como problemas respiratorios, visuales, etc., derivadas de una gestación interrumpida. Estos problemas pueden llegar a poner en un grave riesgo la vida del bebé o, incluso, derivar en patologías que lo acompañarán toda su vida (Lopez-Rodriguez y cols. 2017; Leung y cols. 2018; Guyton y Hall 2008b). Todo esto pone de relieve la necesidad de tratamientos efectivos que permitan tratar la enfermedad sin poner fin al embarazo.

Por otro lado, la prevención primaria de la preeclampsia en aquellas mujeres consideradas "de riesgo" es un tema de debate y objeto de investigación activa. Entre los tratamientos utilizados se incluyen suplementos de calcio y vitamina D, administración de magnesio o zinc, aspirina a bajas dosis o la administración de suplementos de vitaminas C y E, y otros antioxidantes (Poston y cols. 2006; Sasan y cols. 2009; Bujold y cols. 2010; Hofmeyr y cols. 2014). Sin embargo, ninguno de estos tratamientos ha demostrado ser lo suficientemente efectivo en la prevención del desarrollo de la preeclampsia (Eiland y cols. 2012). En los últimos años, se están llevando a cabo diversas líneas de investigación para intentar elucidar los mecanismos implicados en el establecimiento y el desarrollo de la enfermedad, con el fin de poder desarrollar nuevos tratamientos efectivos, así como un mejor y precoz diagnóstico. Recientemente, se ha propuesto el empleo de moléculas solubles presentes en el plasma de las mujeres con preeclampsia como potentes biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. En esta línea, se han descrito incrementos de factores pro-angiogénicos, disminución de factores anti-angiogénicos, o una desregulación de los estrógenos como posibles biomarcadores. Entre los factores pro-angiogénicos destacan la forma soluble del receptor de membrana endoglina (sEng), así como la forma soluble del receptor de membrana Flt-1 (sFlt-1), que están presentes en altas concentraciones en el plasma de estas pacientes, y cuya elevación de sus niveles se asocia estrechamente con el desarrollo de la enfermedad. La elevación de la concentración en plasma de sFlt-1 se observa a partir de la semana 5-6 de gestación, mientras que sEng

aumenta entre el mes 2 y 3 de gestación. Es decir, que estos marcadores aparecen elevados semanas antes de la aparición de las manifestaciones clínicas, lo que los convierte en marcadores tempranos. Además, niveles elevados sEng y sFlt-1 se han correlacionado con una mayor gravedad y peor pronóstico de la patología (Levine y cols. 2006; López-Novoa 2007; Dechend y Luft 2008; Farina y cols. 2008; Grill y cols. 2009; Hod y cols. 2015; Troisi y cols. 2008; Schrey-Petersen y Stepan 2017; Berkane y cols. 2017; Sahai y cols. 2017). A pesar de la manifiesta relación de estos factores solubles con la preeclampsia, sus orígenes y sus mecanismos de liberación no han sido completamente dilucidados.

Tal como se ha mencionado anteriormente, en la actualidad se considera que la placenta puede ser el órgano central de la preeclampsia (De Maria y See 1966; J. Roberts y Escudero 2012). En concreto, se señala la posible alteración en la remodelación de las arterias espirales (Browne y Veall 1953; I Brosens 1964). Generalmente, la causa de los defectos en la remodelación arterial se asocia con una alteración de la invasión de los trofoblastos endovasculares (Kaufmann y cols. 2003; Pijnenborg y cols. 2006). Esto hace que no se produzca el reemplazo de células del endotelio por los trofoblastos, y como consecuencia, los vasos se mantienen en un estado de baja capacitancia (Cnossen y cols. 2008; Meler y cols. 2010). Además, se ha observado que el calibre de las arterias uterinas de las mujeres con preeclampsia son mucho menores que en mujeres con embarazo normal, siendo más similares a los valores de las mujeres no gestantes (Brosens y cols. 1972). Todo esto genera hipoperfusión placentaria, y por lo tanto una restricción en el aporte de nutrientes y oxígeno. Esta hipoperfusión puede originar otros cambios patológicos en el resto de la placenta, tales como depósitos de fibrina entre la capa de sincitiotrofoblastos, daños en la vasculatura intrínseca de la placenta, reducción de la superficie de contacto de las vellosidades coriónicas y liberación de restos celulares a la circulación sistémica, procedentes de la necrosis trofoblástica (Fisher 2015). Todas estas alteraciones contribuirían a la generación del daño placentario, que culminaría el desarrollo de la patología.

Esta relación entre la isquemia placentaria y la preeclampsia ya fue demostrada en diversos modelos animales, donde se observó que tras la reducción de flujo placentario mediante la obstrucción de la arteria uterina (modelo RUPP, del inglés *Reduction Uterine Perfusion Pressure*) aparecían los síntomas característicos de la preeclampsia (hipertensión y proteinuria), además de observarse un incremento en la liberación de sEng y sFlt-1 al plasma materno (Abitbol y cols. 1976a; Abitbol y cols. 1976b; Combs y cols. 1993; Lang y cols. 2000; Gilbert y cols. 2007; Gilbert y cols. 2009; Li y cols. 2012). La hipoperfusión placentaria es

también responsable de un incremento de los niveles de radicales libres de oxígeno (ROS) y un incremento del estrés oxidativo, lo cual es característico de la preeclampsia y acentúa los daños anteriormente descritos (Redman y Sargent 2009; Burton y Jauniaux 2011).

Para entender el impacto que tiene la preeclampsia sobre la fisiología materna, a continuación, se describen las adaptaciones fisiológicas normales que sufre el organismo materno durante la gestación para poder comprender y abordar las alteraciones que tienen lugar en caso de preeclampsia.

2. Adaptaciones fisiológicas del embarazo

Durante el desarrollo normal del embarazo, el organismo materno sufre una serie de modificaciones en las condiciones fisiológicas respecto a los valores previos a la gestación. Estos cambios en la homeostasis preparan al cuerpo materno para hacer frente a las necesidades básicas para el correcto desarrollo del feto, así como el preservar la integridad de la propia madre. Estos cambios homeostáticos afectan a la mayoría de órganos y sistemas maternos.

2.1. Sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular es un sistema clave en la gestación, y es el sistema materno el que sufre las alteraciones más importantes respecto a las condiciones previas a la gestación. Estos cambios tienen como objetivo hacer frente a la aparición de un nuevo lecho vascular, la placenta, y adaptar el flujo sanguíneo a las necesidades propias de cada etapa de la gestación. Dicho flujo debe garantizar el aporte de nutrientes y oxígeno necesario para el óptimo desarrollo, tanto del feto como de la placenta. Así, el flujo sanguíneo uteroplacentario necesita verse incrementado a medida que la placenta y el feto se van desarrollando, alcanzándose valores constantes de flujo de 500-1.000 mL/min en el momento del parto (Tresguerres y cols. 2010).

2.1.a. Sangre

La sangre es otro de los tejidos que se ve alterado durante el embarazo. El volumen sanguíneo comienza a aumentar sobre la semana 6 y continúa aumentando hasta el final de la gestación, donde el incremento ronda los 1.000-1.600 mL de sangre extra (Ouzounian y Elkayam 2012; de Haas y cols. 2017). Este incremento del volumen sanguíneo tiene unas fuertes implicaciones clínicas, ya que tanto el crecimiento fetal como el peso del bebé en el

momento del nacimiento están directamente correlacionados con el grado de incremento del volumen sanguíneo materno (Hytten y Paintin 1963; Pirani y cols. 1973).

Los cambios en el volumen sanguíneo son debidos a un incremento del volumen plasmático. Este incremento se debe, principalmente, al efecto de la aldosterona y de los estrógenos, cuyos niveles aumentan durante el embarazo, elevando la reabsorción de sodio, cloro y agua a nivel renal (Guyton y Hall 2008a).

Además del volumen plasmático, durante el embarazo se produce un incremento en el número de eritrocitos, entre 17-40% respecto a las condiciones de no embarazo. Este aumento de la masa de glóbulos rojos se debe a un aumento de la función eritropoyética de la médula ósea, producida como respuesta a la progesterona, a la somatotropina coriónica y a la eritropoyetina, todas ellas aumentadas durante el embarazo (Pritchard 1965; Jepson 1968; Tresguerres y cols. 2010; Ouzounian y Elkayam 2012).

El aumento en el número de hematíes es porcentualmente inferior al aumento del volumen de plasma, lo que se traduce en una reducción de hasta el 30% en el hematocrito y de la concentración de hemoglobina plasmática, lo que conlleva a una anemia fisiológica gestacional (Pritchard 1965; Rigol 2004a). Además, la disminución del hematocrito reduce la viscosidad de la sangre, lo que reduce las resistencias al paso del fluido, y disminuye las resistencias vasculares periféricas (Duvekot y cols. 1993).

Estas variaciones en el volumen sanguíneo son de gran importancia, ya que el incremento de sangre permite rellenar los nuevos lechos vasculares que se generan durante el embarazo y asegura el retorno venoso en posición supina y erguida. Además, durante el parto se pierde entre un tercio y la mitad del volumen sanguíneo extra, lo que protege a la madre frente a las hemorragias postparto (Guyton y Hall 2008a).

2.1.b. Gasto cardiaco

El gasto cardiaco es la cantidad de sangre que bombea el corazón por minuto a través de la aorta, y puede ser considerado como una medida de la capacidad funcional del propio corazón. Se calcula como el producto del volumen de eyección y la frecuencia cardiaca, y su valor es igual a la suma de todos los flujos del organismo (Guyton y Hall 2008a; Ouzounian y Elkayam 2012).

Durante el embarazo, se hace indispensable un aumento del gasto cardiaco materno, que permita mantener las condiciones hemodinámicas óptimas para el desarrollo y evolución de la gestación. Este aumento se produce ya desde las primeras semanas de la gestación, y se va incrementando a medida que la gestación se desarrolla, hasta alcanzar un incremento del 50% aproximadamente, aunque al final de la gestación decae ligeramente (Lees y cols. 1967; Hennessy y cols. 1996).

Para producir el incremento necesario del gasto cardiaco, el organismo materno incrementa la frecuencia cardíaca (de 70 a 85 lat/min) y el volumen sistólico (de 64 a 71 mL), aumentando el gasto cardiaco total en 1,5 L/minuto (Tresguerres y cols. 2010). Este incremento en el flujo responde a las necesidades uteroplacentarias, pero también se ve incrementado el flujo en diferentes órganos, como los riñones, las mamas, las extremidades superiores o la piel, mientras que otros órganos, como hígado y cerebro, se mantienen estables (Ouzounian y Elkayam 2012).

Por otro lado, el gasto cardiaco es muy sensible a la posición corporal materna. Este hecho se debe a que el volumen sistólico eyectado depende de la precarga, y ésta, a su vez, del retorno venoso. Esto supone un problema durante la gestación, ya que la posición y tamaño del útero y del feto pueden presionar las venas iliacas y la vena cava ascendente, dependiendo de la posición materna, comprometiendo el retorno venoso, y con ello al gasto cardiaco (Kerr 1965; Bieniarz y cols. 1966; Rigol 2004c). El incremento del volumen plasmático, que se ha descrito anteriormente, ayuda a mitigar estas alteraciones en el gasto cardiaco.

2.1.c. Resistencias vasculares y presión arterial

La resistencia vascular es la oposición que ejercen los diferentes vasos al paso de la sangre a través de ellos. Se ha descrito que durante un embarazo normal se produce una reducción de estas resistencias vasculares periféricas. Estos cambios comienzan ya a producirse en torno a la quinta semana de gestación, asociándose al efecto de diferentes factores presentes en la sangre, tales como los estrógenos, la progesterona y las prostaglandinas, así como la contribución de la baja resistencia al flujo uteroplacental (Ouzounian y Elkayam 2012). La reducción de las resistencias vasculares periféricas llega a ser del 35% hacia la semana 20, manteniéndose estable hasta la semana 32, a partir de la cual se incrementa ligeramente hasta el momento del parto (Clark y cols. 1989). Los cambios en las resistencias vasculares vienen definidos por varios factores. Uno de los principales

factores es el diámetro de la luz de los vasos, de tal manera que, a un menor diámetro de paso, la resistencia al flujo se ve incrementada. La variación de la luz del vaso depende del grado de contracción o relajación que presentan las células musculares lisas que forman parte de la pared de los vasos. Aunque estas células son las que realizan el trabajo mecánico que modifica la luz vascular, el endotelio vascular también tiene un papel fundamental en el control y coordinación de la vasomotricidad.

El endotelio es una monocapa de células que tapizan la luz del vaso, estando en contacto directo con la sangre. Esta localización estratégica permite que el endotelio actúe como un receptor y transmisor de señales. Así, las células endoteliales son capaces de registrar cambios hemodinámicos, como la presión o las fuerzas de rozamiento y cizallamiento, establecer y modificar la interacción con plaquetas y glóbulos blancos, además de responder ante mediadores químicos circulantes o de células vecinas (Tresguerres y cols. 2010).

Las células del endotelio son capaces de producir diferentes moléculas o factores con actividad biológica, como respuesta a los diferentes tipos de señales que reciben. Entre estas moléculas destacan el óxido nítrico (NO), prostaciclina, endotelina, prostaglandinas, tromboxanos, factor de crecimiento transformante β (TGF- β ; *Transforming growth factor* β), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; *Vascular endothelial growth factor*), moléculas de adhesión, etc., todas ellas moduladoras del tono vascular o del crecimiento del músculo liso vascular, así como de la hemostasia (Tresguerres y cols. 2010).

Aparte de los factores sanguíneos mencionados con anterioridad, se ha descrito que durante el embarazo se produce una resistencia al efecto contráctil de la angiotensina II (Ang II) y de la noradrenalina, lo que contribuye también a disminuir las resistencias periféricas (Paller 1984; Schrier y Briner 1991; Ahokas y Sibai 1992).

Parte de la insensibilización del endotelio a la Ang II es debido al efecto de la prostaciclina, que es otro de los factores muy importantes en la vasorrelajación que se observa durante el embarazo, debido a que es un potente vasodilatador (Ahokas y Sibai 1992; Ouzounian y Elkayam 2012).

2.1.c.i. Óxido nítrico

El factor clave para el mantenimiento del tono vascular en el embarazo es el NO (Podjarny y cols. 1994). La producción de NO está significativamente elevada durante el

embarazo normal, lo que sugiere que el NO juega un importante papel en la adaptación fisiológica al embarazo, principalmente promoviendo la relajación vascular necesaria para el descenso de las resistencias vasculares (LaMarca 2012). El NO es una pequeña molécula de vida media corta, capaz de difundirse desde las células endoteliales hacia las células musculares, donde activa la guanilato ciclasa, lo que produce un aumento de GMPc, y con ello la vasorrelajación (Vedernikov y cols. 1999). Estas funciones demuestran que el NO es un potente vasodilatador.

La enzima clave en la producción del NO por el endotelio es la *eNOS* (del inglés, *Endothelial Nitric Oxide Synthase*). Esta enzima cataliza la producción de NO y L-citrulina a partir de L-arginina y O_2 , para lo que necesita diversos cofactores, como NADPH y BH4 (tetrahidrobiopterina), que es esencial para el proceso (Rafikov y cols. 2011). Además, para que la eNOS pueda catalizar la reacción de producción de NO, necesita la dimerización de la enzima (Zhao y cols. 2015). Es en esta dimerización de la eNOS donde BH4 juega un papel esencial, ya que cuando los niveles de BH4 son inadecuados, la eNOS es inestable y se desacopla, conduciendo a una menor producción de NO e incrementando la producción de peroxinitritos, que a su vez oxida BH4 y, por lo tanto, reduce los niveles disponibles de BH4 (Kietadisorn y cols. 2012)

La actividad de la eNOS está regulada por diferentes estímulos extracelulares, como el estrés por cizalladura (mediado por integrinas), hipoxia, estrógenos, factores de crecimiento y VEGF (Förstermann y Sessa 2012). Entre estos estímulos se encuentra TGF- β , que es capaz de promover la expresión de eNOS (Santibanez y cols. 2007). TGF- β es una citoquina que pertenece a una familia de factores de crecimiento, la cual recibe su propio nombre, que incluye 3 isoformas del propio TGF- β , además de otros factores, como proteínas morfogenéticas óseas (BMP, por sus siglas en inglés) y otras moléculas (Santibañez y cols. 2011). Estas citoquinas de la familia TGF- β están involucradas en multitud de procesos celulares relacionados con angiogénesis, proliferación y diferenciación celular, migración, apoptosis y hematopoyesis, por lo que juegan un papel fundamental durante el desarrollo y el embarazo (Liu y cols. 2012; Gonzalo-Gil y Galindo-Izquierdo 2014).

Los miembros de la familia de TGF- β se unen a un complejo de receptores específicos en la membrana celular que incluye endogлина, la cual es capaz de modular la señalización del ligando (Lastres y cols. 1996; Letamendía y cols. 1998; Barbara y cols. 1999). En el contexto de preeclampsia, la interacción de los ligandos TGF- β con su complejo receptor y con

endogлина activa una serie de cascadas, como las vías de las Smads y MAPK, entre otras (Liu y cols. 2012). Es a través de la activación de estas rutas de señalización, principalmente la ruta de la Smad2, como TGF- β es capaz de activar y promover la expresión de eNOS, produciendo un incremento de NO y el consiguiente aumento de la vasodilatación (Santibanez y cols. 2007; Liu y cols. 2012).

2.1.c.ii. Reología

El otro factor muy importante que determina la resistencia vascular es la reología sanguínea. Así, las resistencias vasculares dependen directamente de la viscosidad de la sangre, de tal manera que cuanto mayor es el hematocrito, mayor es la viscosidad de la sangre y, por lo tanto, mayor es la resistencia a través de los vasos. Como ya se ha mencionado anteriormente, durante el embarazo se produce una reducción del hematocrito materno, situándose en valores de 30-38% (Heilmann 1987). Esta reducción de los valores de hematocrito respecto a las condiciones de no embarazo, se deben a un efecto de hemodilución. Esta reducción del hematocrito, y por lo tanto de la viscosidad sanguínea, lleva aparejada una reducción de las resistencias vasculares periféricas (Duvekot y cols. 1993; Pries y cols. 1998). Esta regulación suele ser a largo plazo, ya que depende de la hematopoyesis, producida por la médula ósea roja, y del control del volumen plasmático, llevado a cabo por el riñón (Tresguerres y cols. 2010).

La reducción de las resistencias vasculares periféricas tiene importantes connotaciones fisiológicas. Así, este descenso de las resistencias lleva aparejado una reducción de la presión arterial durante el embarazo, principalmente la diastólica y la presión de pulso, y también la sistólica (Ouzounian y Elkayam 2012). Por otra parte, se ha observado que el descenso en las resistencias vasculares precede, y parece inducir, el incremento del volumen sanguíneo y del gasto cardiaco (Duvekot y cols. 1993; Carbillon y cols. 2000).

2.1.d. Presión arterial

Los cambios en presión sanguínea ocurren como consecuencia de los cambios en el gasto cardiaco, el volumen intravascular y las resistencias periféricas. Este parámetro tiene la ventaja de ser de fácil medida, lo que lo convierte en una herramienta muy valiosa para valorar el estado hemodinámico. Sin embargo, este parámetro no permite valorar de forma pormenorizada los cambios hemodinámicos que inducen su variación (C. Lees y Ferrazzi 2017).

En el embarazo, como ya se ha descrito anteriormente, se produce un incremento del gasto cardiaco, un aumento en el volumen circulante y los niveles de hormonas como la renina y la angiotensina II están también elevados. Aun así, y sobre todo a partir del segundo trimestre de gestación, se produce una disminución de la presión arterial sistólica (1,72-3 mmHg) y diastólica (3,98-4,95 mmHg). Esto es debido a una disminución significativa de las resistencias periféricas que se producen por el gran desarrollo del lecho vascular útero-placentario, a la menor efectividad contráctil de la angiotensina II y a la acción relajante que ejercen la progesterona y el NO sobre el músculo liso vascular (Podjarny y cols. 1994; Tresguerres y cols. 2010).

2.2. Hemostasia

El confinamiento de la sangre circulante dentro del lecho vascular y el mantenimiento del flujo sanguíneo son esenciales para la vida y dependen de un sistema hemostático muy complejo, que engloba la interacción entre la vasculatura, las plaquetas, los factores de coagulación y el sistema fibrinolítico. La actuación conjunta y coordinada de todos estos factores permite que la coagulación solo se active bajo estímulos concretos, con un área de repercusión reducida y que, una vez reparado el daño, se resuelva el trombo de una forma segura y adecuada (Millar y Laffan 2015).

Hay que entender la hemostasia como un delicado balance entre factores procoagulantes y factores anticoagulantes. Pequeñas alteraciones en este balance producen grandes alteraciones en la hemostasia, llegando a poner en riesgo la vida de los pacientes (O'Riordan y Higgins 2003; Thornton y Douglas 2010).

Durante la gestación normal, el sistema hemostático materno sufre una serie de alteraciones, tanto a nivel de factores procoagulantes como factores anticoagulantes, dando lugar a un estado mantenido de hipercoagulación e hipofibrinólisis. Estos efectos se deben principalmente al ambiente hormonal que caracteriza a la gestación (Hellgren 2003; Brenner 2004; Millar y Laffan 2015).

Los cambios en los factores procoagulantes comienzan muy pronto en la gestación, debido a la invasión trofoblástica dentro del endometrio y al flujo fetoplacental, y se van incrementando a lo largo de la gestación (Ataullakhanov y cols. 2016). Estos cambios predisponen a la madre a sufrir tromboembolismo y otras alteraciones hemostáticas. Por el contrario, este fenotipo procoagulante, junto con la derivación del flujo sanguíneo placental

por la contracción miometral, protegen a la madre frente a complicaciones por sangrado durante el parto (Millar y Laffan 2015; Ataulakhanov y cols. 2016).

Por otro lado, también se ha descrito un descenso en los valores de algunos anticoagulantes naturales, tales como la trombomodulina y el receptor endotelial de la proteína C, que son receptores expresados en la superficie endotelial de vasos y trofoblastos placentarios. Estos receptores juegan un papel fisiológico clave en la ruta anticoagulante de la proteína C (Bremme 2003; O’Riordan y Higgins 2003; Brennan y cols. 2014).

2.2.a Plaquetas

Las plaquetas o trombocitos son pequeños fragmentos celulares, que son producidos en la médula ósea roja, a partir de megacariocitos, y tienen una vida aproximada de 10 días. En su interior no hay núcleo, pero presentan restos de retículo endoplásmico y de aparato de Golgi, lo que les permite sintetizar diferentes enzimas y, especialmente, almacenar grandes cantidades de iones calcio, esenciales para la hemostasia. También presentan gran cantidad de proteínas contráctiles (actina, miosina y trombostenina), y sistemas enzimáticos que les permiten formar ATP, ADP y prostaglandinas (Guyton y Hall 2008d).

La membrana de las plaquetas también juega un papel importante. En ella se encuentran glicoproteínas que evitan la unión de las plaquetas al endotelio normal, pero que se adhieren al subendotelio, incluso directamente al colágeno o a la vía del factor de Von Willebrand (FVW), activando la actividad plaquetaria (Guyton y Hall 2008d; Millar y Laffan 2015).

La adhesión plaquetaria se inicia con la activación de la plaqueta por contacto a la zona dañada, la liberación del contenido granular, especialmente ADP, y la síntesis de tromboxano A₂. Estos factores tienen un efecto de retroalimentación positiva, activando aún más plaquetas, que a su vez son capturadas por el VWF, y también liberan su contenido granular (Millar y Laffan 2015). Las plaquetas activadas sufren un cambio conformacional, hinchándose, emitiendo numerosos pseudópodos, y volviéndose muy pegajosas. Esto hace que se genere un agregado plaquetario, más o menos laxo, en la zona dañada, que generalmente es suficiente para taponar pequeñas lesiones (Guyton y Hall 2008d).

Esta cascada de activación tiene que ser contrarrestada por el organismo para que no se produzca de forma incontrolada. Generalmente, esto se lleva a cabo mediante el flujo activo de sangre y la producción endotelial de prostaciclina, NO y ADPasa, las cuales suprimen la

activación plaquetaria y previenen la agregación inapropiada o desmesurada (Millar y Laffan 2015).

Por normal general, se considera como trombocitopenia cuando hay recuentos plaquetarios inferiores a 150.000 plaquetas/ μ L. Estos valores son los mismos para cualquier paciente, sin tener en cuenta el sexo o el estado de salud. Debido a que durante el embarazo ocurre, en muchos casos, un descenso en el recuento plaquetario por debajo de esos valores, sin comprometer ni la salud materna ni la fetal, algunos autores han sugerido cifrar el límite para el diagnóstico de trombocitopenia en el embarazo en 116.000 plaquetas/ μ L (Boehlen y cols. 2000; Cines y Levine 2017).

Como ya se ha mencionado, durante la gestación el recuento plaquetario materno tiende a reducirse en torno a un 10-15% de forma fisiológica, dándose esta alteración entre el quinto mes de gestación y hasta el momento del alumbramiento (Kaplan y cols. 1995; Boehlen y cols. 2000; Prisco y cols. 2009). Cuando los valores de plaquetas se sitúan por debajo de 150.000 plaquetas/ μ L, se habla de trombocitopenia gestacional. Las causas más comunes de trombocitopenia se describen en la Tabla 3.

La trombocitopenia gestacional se da en aproximadamente el 10% de los embarazos, representando el 70-75% de las trombocitopenias totales registradas (Tabla 3), y siendo más prevalente en embarazos gemelares o de trillizos (Millar y Laffan 2015; Cines y Levine 2017). Normalmente, el recuento se sitúa entre 150.000 y 75.000 plaquetas/ μ L, sin comprometer ni la salud materna ni la fetal, por lo que es considerada como una trombocitopenia leve (Sainio y cols. 2000; Cines y Levine 2017). En cambio, las trombocitopenias graves, marcadas por un recuento plaquetario inferior a 50.000 plaquetas/ μ L y que ponen en riesgo la vida, solo se dan en el 0,1% de los embarazos, y generalmente es asociado a alguna patología, como HELLP o CID (Coagulación Intravascular Diseminada) (Sainio y cols. 2000; Cines y Levine 2017).

Actualmente, el origen o la causa concreta que produce la trombocitopenia gestacional no se conoce con exactitud y se requiere un mayor número de estudios para poder dilucidarlo (Reese y cols. 2017). Entre los factores que se han señalado como posible causa de la trombocitopenia gestacional se encuentra la hemodilución que ocurre durante la gestación (Palta y Dhirman 2016; Ciobanum y cols. 2016; Cines y Levine 2017). Como se ha descrito anteriormente para el hematocrito, el incremento del volumen plasmático que

tiene lugar durante la gestación es mayor que la velocidad de la médula ósea para producir plaquetas, por lo que se produce una disminución de la concentración de plaquetas (Cines y Levine 2017).

Trombocitopenia: Causas	
Relacionadas con embarazo (% casos)	No relacionadas con embarazo (% casos)
<ul style="list-style-type: none"> ○ Trombocitopenia gestacional (74%). ○ Preeclampsia/ eclampsia (21%). ○ Síndrome de HELLP. ○ Hígado graso agudo. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pseudotrombocitopenia. ○ Púrpura trombocítica inmune. ○ Lupus eritematoso sistémico. ○ Desórdenes inmunológicos. <p style="text-align: right;">} (4%)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Síndrome hemolítico urémico. ○ Síndrome antifosfolipídico. ○ VIH, virus hepatitis B y C. ○ Coag. Intravascul. diseminada. ○ Drogas. <p style="text-align: right;">} (<1%)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Enfermedad de V. Willebrand tipo IIb. ○ Disfunción médula ósea. ○ Esplenomegalia. ○ Deficiencias nutricionales: Vit. B12, folato...

Tabla 3. Causas principales de trombocitopenia durante la gestación. Se muestran las principales causas que producen reducción del número de plaquetas durante la gestación. Las causas relacionadas directamente con la gestación se indican en la columna de la izquierda (Relacionadas con embarazo). Aquellos factores que no están relacionados directamente con la gestación, pero que sí contribuyen a que se produzca la trombocitopenia durante el embarazo (no relacionados con embarazo), se indican en la columna de la derecha. Tabla adaptada de *Thrombocytopenia in pregnancy* (Ciobanum y cols. 2016). Porcentajes obtenidos de *Maternal thrombocytopenia at term: a population-based study* (Sainio y cols. 2000).

Otros factores que se han sugerido para explicar la caída del recuento plaquetario son el incremento del consumo de plaquetas en los tejidos periféricos, la reducción de la producción de plaquetas por la médula ósea o el aumento de la tasa de reposición de plaquetas (Palta y Dhirman 2016). En este sentido, estudios tempranos no han mostrado de forma consistente una reducción de la vida media de las plaquetas durante el embarazo (Wallenburg y van Kessel 1978; Rakozci y cols. 1979). Es posible que el incremento del

volumen plaquetario reportado por algunos estudios, en conjunción con la caída del recuento plaquetario, sean signos de un aumento de la destrucción de plaquetas (Fay y cols. 1983; Sill y cols. 1985).

La activación plaquetaria es otro factor clave propuesto en la trombocitopenia gestacional. El incremento de la activación plaquetaria ha sido demostrado en diferentes complicaciones del embarazo, como la hipertensión o preeclampsia, pero el papel que juega sobre la caída del recuento plaquetario en embarazos normales es menos claro (Millar y Laffan 2015). Aun así, la agregación plaquetaria espontánea, el incremento de la reactividad de las plaquetas al ácido araquidónico y el incremento de la activación y adhesión plaquetaria se han demostrado en mujeres embarazadas normotensas (Burgess-Wilson y cols. 1986; Karalis y cols. 2005). Por un lado, se ha descrito un incremento en la circulación de agregados plaquetarios, y un aumento de β -tromboglobulina, factor plaquetario 4 y tromboxano B2 (el producto estable del tromboxano A2), lo que sugiere un aumento de la reactividad plaquetaria (O'Brien y cols. 1986; Fitzgerald y cols. 1987). Por otro lado, se ha descrito que la reactividad plaquetaria se ve incrementada en las mujeres embarazadas respecto a las mujeres no gestantes (Umazume y cols. 2015), y sobre todo en mujeres embarazadas de gemelos (Umazume y cols. 2016) lo cual concuerda con el descenso de plaquetas observado en los embarazos múltiples, anteriormente descritos. Por consiguiente, hay algunas evidencias del incremento de la activación plaquetaria en embarazos sin complicaciones, pero no está claro cómo pueden contribuir en la caída del número de plaquetas (Millar y Laffan 2015).

2.2.b. Sistema de coagulación

La ruta central de la coagulación sanguínea incluye la generación de trombina a partir de la protrombina (Mann 2003). Esta proteína se origina mediante el corte proteolítico de la protrombina, zimógeno producido por el hígado, por medio del factor de coagulación X activado (Figura 1) (Guyton y Hall 2008d).

Una vez activada la trombina, esta enzima cataliza el corte proteolítico del fibrinógeno en monómeros de fibrina, con capacidad de polimerizarse con otros monómeros, formando la red proteica necesaria para la estabilización de los agregados de plaquetas, en el sitio donde está localizado el daño vascular (Guyton y Hall 2008d).

Para activar la trombina y desencadenar el depósito de fibrina, existen dos rutas de activación, denominadas vía extrínseca y vía intrínseca. Como se puede ver en la Figura 1, ambas rutas están formadas por diferentes factores de coagulación, cuyas cascadas tienen como efecto último la activación del factor X de la coagulación, que cataliza el paso de protrombina a trombina, como ya se ha indicado anteriormente.

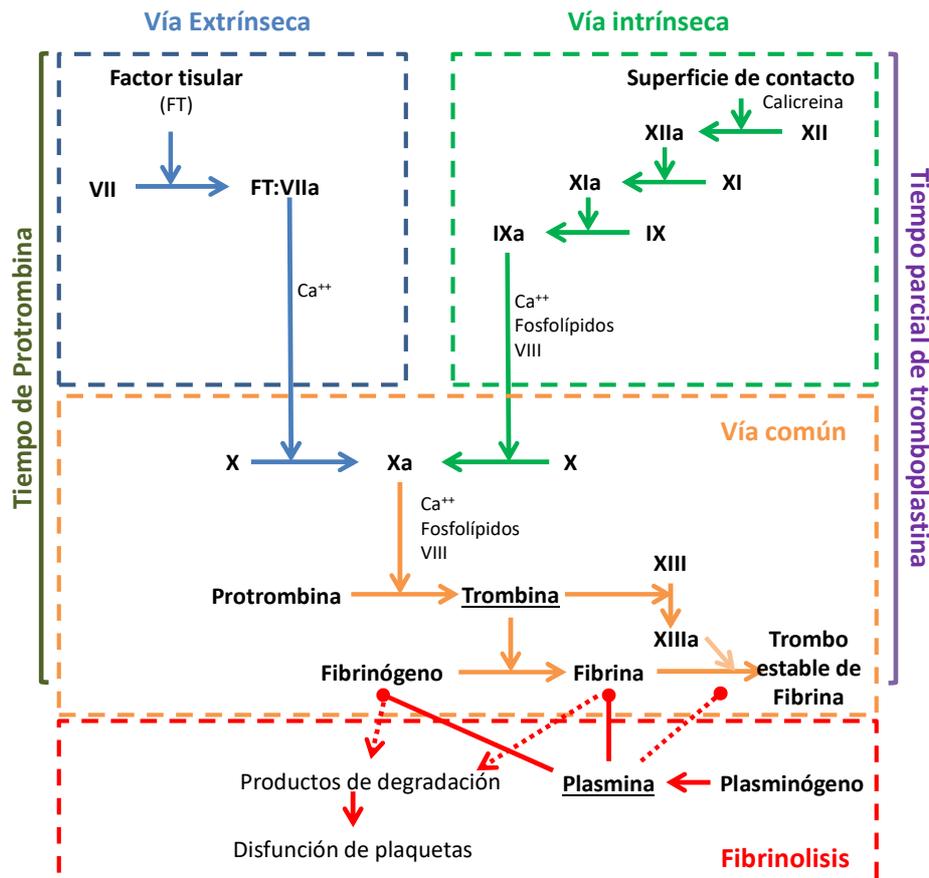


Figura 1. Vías de coagulación y fibrinólisis. Se representan las vías de coagulación intrínseca y extrínseca, la vía común de ambas vías y la fibrinólisis. En números romanos se indican los distintos factores de la coagulación, mientras que la letra "a" indica el correspondiente factor activado.

Como se ha mencionado con anterioridad, durante la gestación se produce un incremento de diversos factores procoagulantes. Se ha descrito que los niveles de FVW se incrementan desde el inicio de la gestación, y continúan aumentando a medida que ésta se desarrolla (Cadroy y cols. 1993). El FVW se encuentra en el plasma, en el tejido conectivo subendotelial y en las plaquetas. No presenta capacidad catalítica, sino que interviene en la unión plaqueta-plaqueta y la unión de la plaqueta al subendotelio. Además, este factor se

une al factor VIII de la coagulación, protegiéndolo de la degradación prematura y permitiendo que los niveles plasmáticos de este factor aumenten (Sadler 1998).

Los niveles del factor VIII (asociado al aumento del FVW), del X y XII se encuentran incrementados durante toda la gestación, mientras que el factor VII incrementa lentamente sus niveles a lo largo de toda la gestación (Hellgren 2003; Thornton y Douglas 2010). Por su parte, se ha descrito que el fibrinógeno, precursor de la fibrina, incrementa sus niveles hasta 200 veces durante el embarazo (Thornton y Douglas 2010). El único factor de la coagulación que se ha descrito que disminuye sus niveles durante el embarazo es el factor XI (Hellgren y Blomback 1981), cuya ausencia total, en modelos murinos, no se asocia con alteraciones de la hemostasia (Wheeler y Gailani 2016).

El incremento de estos factores produce un incremento de la coagulación, lo que se observa clínicamente por una reducción de los valores de TP e INR (para la vía extrínseca) y los valores de TPT (vía intrínseca) (Hellgren 2003; Thornton y Douglas 2010).

2.2.c. Sistema fibrinolítico

La fibrinólisis es una parte muy importante de la hemostasia, ya que una vez reparado el daño que originó la activación de la hemostasia, es necesario que el trombo sea resuelto de una forma adecuada.

La enzima clave de la fibrinólisis es la plasmina, la cual se produce por la activación proteolítica del plasminógeno (Figura 1). La plasmina es una enzima proteolítica capaz de digerir tanto las fibras de fibrina como proteínas coagulantes (por ejemplo, fibrinógeno), los factores V, VIII y XII y la protrombina. Esta capacidad permite no solo resolver el coágulo, sino también destruir muchos factores procoagulantes, haciendo que la sangre sea menos coagulable (Guyton y Hall 2008d).

La actividad fibrinolítica plasmática también se encuentra reducida durante la gestación, sobre todo en el tercer trimestre, permaneciendo baja durante el parto, y retornando a los valores previos de una forma rápida tras el alumbramiento (Stirling y cols. 1984; O'Riordan y Higgins 2003).

Entre los factores que se encuentran disminuidos durante la gestación se encuentra el *activador del plasminógeno tisular*, cuyos niveles se mantienen bajos durante toda la

gestación y empiezan a recuperarse tras la primera hora post-parto (Hellgren 2003; Thornton y Douglas 2010).

Por el contrario, durante la gestación se encuentran incrementados los niveles del *inhibidor de la activación del plasminógeno-1* (PAI-1) y -2 (PAI-2). Los niveles de PAI-1 se encuentran elevados durante toda la gestación, llegando a alcanzar el triple del valor basal, disminuyendo rápidamente después del parto. Por el contrario, PAI-2, que también se encuentra en niveles elevados, no disminuye hasta varios días después del alumbramiento (Hellgren 2003; Thornton y Douglas 2010).

Al estar disminuida la capacidad fibrinolítica durante la gestación, pueden aparecer marcadores de coagulación, como los dímeros D de fibrina, pero estos valores no tienen por qué reflejar un aumento de la coagulación intravascular local, sino que muestran el descenso de la capacidad fibrinolítica normal (Bremme 2003; O'Riordan y Higgins 2003; Brenner 2004; Thornton y Douglas 2010).

2.3. Función renal

Como ya se ha descrito, el embarazo comprende una considerable batería de cambios fisiológicos, con el fin de adaptarse a las necesidades de un proceso biológico tan complejo. Entre estos cambios adaptativos, la función renal es uno de los sistemas que se ven más afectados. De hecho, el embarazo afecta a todos los sistemas esenciales de la fisiología renal. El aumento de las funciones renales se debe al incremento del débito cardiaco, al incremento de la volemia y a la necesidad de eliminar catabolitos y productos de excreción fetal. Además, los riñones juegan un papel importante en el desarrollo del ambiente hormonal del embarazo, respondiendo y contribuyendo a los cambios en el organismo materno y fetal.

2.3.a. Cambios anatómicos

Durante el embarazo, los riñones sufren un aumento de tamaño y de peso de hasta el 30% (Christensen y cols. 1989; Roy y cols. 1995), recuperando el tamaño normal en torno a los 6 meses postparto (Bailey y Rolleston 1971). Durante mucho tiempo se ha atribuido este incremento del tamaño renal a la hidronefrosis (Christensen y cols. 1989). La hidronefrosis es una alteración renal muy común durante el embarazo. Según el autor que se consulte, la hidronefrosis se fija entre el 43% y 100% de los embarazos, siendo más prevalente a medida que avanza la edad de la gestación (Faundes y cols. 1998). La máxima aparición de la

hidronefrosis se da en torno a la semana 28 de gestación, con cerca de un 63% de incidencia (Cheung y Lafayette 2013). Los sistemas colectores dilatados pueden albergar entre 200 y 300 mL de orina, lo que provoca estasis urinaria e incrementa el riesgo de infección (Rasmussen y Nielsen 1988). Estas alteraciones comienzan en torno a la semana de 10 de gestación. Las causas de estas alteraciones pueden ser la compresión que sufren los uréteres por efecto mecánico del útero grávido, además del efecto de ciertas hormonas, como la progesterona, capaz de reducir el tono uretral, la peristalsis y la presión de contracción (Cheung y Lafayette 2013). Algunos autores han propuesto que en lugar de la hidronefrosis, el incremento del tamaño renal se deba a un aumento de la vascularidad renal, al incremento del volumen intersticial y al incremento del número de nefronas (Beydoun 1985; Cheung y Lafayette 2013).

2.3.b. Cambios funcionales

Como se ha descrito anteriormente, durante el embarazo se produce una expansión del volumen sanguíneo, a la vez que ocurre una disminución de las resistencias vasculares periféricas, lo que conlleva a una reducción de la PA.

Entre los mecanismos que subyacen tras el descenso de las resistencias vasculares se encuentra el efecto sobre la actividad del *sistema renina-angiotensina-aldosterona* (RAA). Se ha descrito que durante el embarazo normal se produce un incremento de todas las proteínas y enzimas relacionadas con el sistema RAA, salvo de la *enzima convertidora de angiotensina*, que es la única que ve reducidos sus niveles respecto a las mujeres no embarazadas (Irani y Xia 2011).

A pesar de este incremento del sistema RAA, el efecto producido sobre las resistencias vasculares que se observa en mujeres embarazadas es el contrario. En este sentido, se ha descrito que en condiciones de embarazo, las mujeres presentan una resistencia al efecto de la Ang II de entre 2 y 3 veces respecto a las condiciones basales (Ramsay y cols. 1992). Esta reducción de la respuesta a Ang II se ha relacionado con la presencia en elevados niveles de otras hormonas, como la progesterona y las prostaciclina (Gant y cols. 1980).

Por otro lado, la aldosterona es responsable, al menos en parte, del incremento del volumen plasmático. Así, durante el embarazo se produce un incremento de los niveles de aldosterona como consecuencia del aumento de actividad del sistema RAA. Esta elevación de los niveles de aldosterona se da en torno a la semana 8 de gestación, y se mantiene

durante todo el embarazo, observándose unos valores de entre 3 y 6 veces los observados en mujeres no gestantes. El aumento de los niveles de aldosterona son responsables de una mayor reabsorción de sodio, produciendo un aumento del volumen sanguíneo entre 1 y 1,6 litros (Cheung y Lafayette 2013).

2.3.b.i. Tasa de filtrado glomerular

Uno de los primeros cambios renales que ocurren durante la gestación es el incremento del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtrado glomerular (TFG). Este incremento del flujo renal y de la TFG se ha cifrado en aproximadamente 50%, empezando los cambios a partir de la semana 14 de gestación (Davison y Dunlop 1980; Davison 1987; Krutzén y cols. 1992).

El principal mecanismo detrás del incremento de la TFG parece ser la vasodilatación secundaria de las arteriolas aferente y eferente, relacionada con la vasodilatación sistémica que tiene lugar durante el embarazo, lo que conlleva un incremento en el flujo renal (Cheung y Lafayette 2013; Costantine 2014).

La presión oncótica es otro factor que juega un papel importante en el aumento de la TFG. Así, la expansión del volumen plasmático, descrito con anterioridad, produce una dilución de las proteínas plasmáticas, reduciendo la presión oncótica, y por lo tanto incrementando la TFG. Además, el coeficiente de ultrafiltración también se ve ligeramente incrementado, debido a cambios en la superficie de filtración y la permeabilidad hidráulica (Deng y Baylis 1995). Todos estos cambios producen un incremento de la TFG. Esto produce un aumento del paso de moléculas desde la sangre a la orina.

2.3.b.ii. Manejo de moléculas por el riñón

Se ha descrito que el aclaramiento de creatinina en 24 horas está incrementado hasta en un 45% en las mujeres gestantes (Davison y Noble 1981). Este incremento en el aclaramiento de creatinina puede hacer subestimar la TFG calculada mediante las ecuaciones MDRD-4 (del inglés, *Modification of Diet in Renal Disease Study group* (Levey y cols. 1999)) y CKD-epi (del inglés, *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*, (Levey y cols. 2009)) (Cheung y Lafayette 2013) que son fórmulas muy utilizadas en la clínica para la estimación de la TFG, y que utilizan la creatinina plasmática como parámetro de cálculo.

La detección de glucosuria es más común en el embarazo que en mujeres no embarazadas, llegando a registrarse un aumento de 10 veces respecto a las condiciones basales (Davison y Dunlop 1980). La glucosa es parcialmente filtrada en el glomérulo, y

prácticamente la totalidad de esta glucosa es reabsorbida en el túbulo proximal y, en menor medida, en el túbulo colector. La presencia de glucosuria indica que la carga de glucosa filtrada es mayor que la capacidad de reabsorción del túbulo. Además, durante el embarazo se produce una reducción de la capacidad reabsorción de glucosa en el túbulo proximal (Cheung y Lafayette 2013).

En el embarazo normal, hay un incremento de las proteínas urinarias totales, siendo especialmente notable a partir de la semana 20 de gestación. Este aumento de la proteinuria durante el embarazo es generalmente atribuido al incremento del TFG. Esto hace que en un embarazo normal se encuentren niveles de proteína total en orina entre 200 y 300 mg/día y 30 mg/día de albuminuria sin ser considerados patológicos (Higby y cols. 1994). Hay que tener mucho cuidado con valores de proteinuria total superiores a 300 mg/día, ya que estos valores se asocian a procesos patológicos.

El riñón también juega un papel central en la osmorregulación del sodio y del agua. El riñón sano presenta una ganancia infinita para el control del agua y de los electrolitos, principalmente el sodio. Durante el embarazo, la respuesta excretora renal que controla el volumen de líquido corporal debe ser modificada para dar cabida a todos los cambios fisiológicos necesarios, lo que precisa de un reajuste del propio riñón (Davison 1987). Esto se consigue mediante la acción coordinada de diferentes hormonas. Así, el efecto vasodilatador de las prostaglandinas, el factor natriurético atrial y la progesterona favorecen las natriuresis, mientras que la angiotensina II, la aldosterona y los estrógenos favorecen la retención de sodio (Barron y Lindheimer 1984).

Aunque la elevada TFG conduce a una gran pérdida de sodio, los altos niveles de aldosterona hacen que se incremente enormemente la reabsorción de sodio en la nefrona, reduciendo la pérdida de sodio en la orina (Barron y Lindheimer 1984).

El incremento de la reabsorción de sodio produce un aumento en la retención de agua y aumento del volumen hídrico general en hasta 8 litros, que incluye el incremento en los volúmenes de plasma (ya descrito), del feto, de la placenta y del líquido amniótico, además de los edemas típicos de la gestación (Costantine 2014).

3. Alteraciones fisiológicas en la preeclampsia

3.1. Placenta

Como ya se ha descrito anteriormente, el origen de la preeclampsia parece radicar en la placenta. En concreto, se ha observado que entre la semana 16 y 22 ocurre una segunda etapa de migración trofoblástica que invaden la capa muscular de las arterias espirales, produciendo el remodelado arterial y facilitando el paso de sangre hacia la placenta (Ahmed y cols. 2017). Cuando este evento no se da de forma correcta, se produce preeclampsia (Rigol 2004b). Esta implantación incompleta produce hipoperfusión, lo cual hace que la placenta vea reducida su producción de prostaciclina (con efecto vasodilatador y anticoagulante), aumente la producción de tromboxanos (vasoconstrictores y procoagulantes), que juegan un papel importante, tanto en el desarrollo correcto del embarazo, como de los síntomas de la preeclampsia (Rigol 2004b).

3.2. Sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular es un sistema clave en el desarrollo correcto de la gestación.

3.2.a. Sangre

La sangre es un tejido sometido a una serie de modificaciones tanto de composición como de reología, lo cual ayuda a las adaptaciones fisiológicas necesarias durante el embarazo.

Las mujeres con preeclampsia, o que van a desarrollar esta patología, presentan una expansión del volumen sanguíneo en torno a un 40% menor que el que se observa en los embarazos normales, llegando a ser cerca de un litro menos de sangre (Carlsson 1984; Rigol 2004b).

Los estudios demuestran que la preeclampsia, sobre todo en los estadios más graves, se relaciona con una concentración de las células sanguíneas y, por lo tanto, un incremento del hematocrito. De hecho, el grado de hemoconcentración se ha apuntado como un índice de la severidad de la preeclampsia, y que la prognosis de esta patología es más grave si el aumento del hematocrito se mantiene o si aumenta (Dieckmann 1936; de Haas y cols. 2017).

En esta línea de pensamiento, cuando se ha analizado la sangre de las mujeres con preeclampsia o incluso eclampsia, se ha observado que el número de células es más o menos constante, y muy similar a lo observado en mujeres con embarazo normal. Por lo

tanto, la única posibilidad para que se produzca la hemoconcentración es una disminución del volumen plasmático (de Haas y cols. 2017).

Otros trabajos han demostrado que durante la primera mitad de la gestación, el incremento del volumen plasmático es similar al que ocurre en mujeres con gestación normal, pero a partir del tercer trimestre no solo no sigue aumentando, sino que disminuye, lo cual conlleva al incremento del hematocrito (Gallery y cols. 1979; Rigol 2004b).

Estos cambios pueden ser muy leves en mujeres con estadios de preeclampsia leve, pero pueden ser muy elevados en mujeres con preeclampsia grave o eclampsia. Además, estas fluctuaciones pueden darse de una forma muy rápida, comprometiendo la vida de la paciente (de Haas y cols. 2017).

Esta hemoconcentración, o disminución de la expansión sanguínea durante la preeclampsia, puede tener importantes connotaciones fisiológicas. Por un lado, la disminución del volumen sanguíneo puede explicar, al menos en parte, la susceptibilidad de las mujeres con preeclampsia o eclampsia a sufrir shock hipovolémico (de Haas y cols. 2017). También hay que tener en cuenta que el incremento del volumen plasmático es de gran importancia para el correcto desarrollo del feto, para rellenar los nuevos lechos vasculares que se generan por el desarrollo uteroplacental, además de garantizar el retorno venoso para que se pueda dar el gasto cardíaco correcto. Todo esto se ve comprometido por la falta de expansión del volumen sanguíneo.

Por otro lado, el incremento del hematocrito se asocia con una mayor viscosidad, que junto con el incremento de las resistencias periféricas típico de la preeclampsia, demanda un gran aumento de la fuerza cardíaca, lo cual podría estar relacionado con los signos de daño cardíaco asociados a 2/3 de las muertes por eclampsia y con un aumento del riesgo cardiovascular (Scholten y cols. 2015; de Haas y cols. 2017).

Además de los cambios en el volumen plasmático, también se han observado diferencias en la composición del plasma. Así, se ha observado que las proteínas plasmáticas están, en general, reducidas frente al plasma de mujeres con gestación normal, produciéndose un descenso de la albúmina sérica, e incrementando ligeramente las globulinas (Dieckmann 1936; Rigol y cols. 2004).

3.2.b. Gasto cardiaco

El gasto cardiaco es otro de los factores afectados durante el embarazo lo que permite adaptarse a las nuevas necesidades fisiológicas que plantea la gestación. El gasto cardiaco depende directamente del número de latidos por minuto y del volumen eyectado en cada latido, que a su vez depende del retorno venoso, entre otros factores.

El gasto cardiaco se incrementa durante la gestación con lo que se consigue el aporte sanguíneo necesario para las nuevas condiciones fisiológicas, incluyendo un nuevo órgano: la placenta. Sin embargo, algunos autores han descrito que las mujeres que presentan preeclampsia entre la semana 35 y 37 desarrollan la enfermedad con un incremento de las resistencias periféricas y un aumento de la presión arterial media, pero que presentan un descenso en el gasto cardiaco, debido principalmente a una reducción en la frecuencia cardíaca (Guy y cols. 2017).

Otros autores, por el contrario, describen que se puede clasificar la preeclampsia en dos tipos, descritos en la Tabla 4.

Un estudio publicado en 2016 ha analizado diferentes parámetros en mujeres no embarazadas, pero que presentaron preeclampsia en un embarazo anterior, comparándolo con mujeres no embarazadas que tuvieron embarazo normal (Valensise y cols. 2016). Las variables cardiacas que se analizaron fueron el volumen de eyección, el gasto cardiaco, la velocidad de flujo a través de la válvula mitral y la masa ventricular izquierda, además de las resistencias vasculares periféricas. Lo que se observó es que las mujeres que habían tenido preeclampsia en un primer embarazo, y que sufrieron cuadros de preeclampsia recurrentes en los siguientes embarazos presentaban unos niveles de gasto cardiaco y volumen de eyección menores, mientras que las resistencias vasculares periféricas, la masa ventricular izquierda y el flujo a través de la válvula mitral eran mayores que en las mujeres que no habían presentado preeclampsia en un primer embarazo (Valensise y cols. 2016). Además, las mujeres que habían sufrido preeclampsia en un primer embarazo, pero no lo volvieron a sufrir, presentaban unos niveles de los parámetros intermedios entre las mujeres con preeclampsia recurrente y las mujeres sin preeclampsia (Valensise y cols. 2016). Estos resultados sugieren que los efectos sobre el sistema cardiovascular en general, y el gasto cardiaco en particular, que se producen en preeclampsia van más allá del propio embarazo y que, en caso de ser lo suficientemente importantes, estos cambios predisponen a nuevos eventos de preeclampsia en embarazos sucesivos.

Clasificación de la preeclampsia: según gasto cardiaco y resistencias vasculares	
Estadio	Características fisiológicas
<p>Preeclampsia temprana (Antes de la semana 34)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Presenta un descenso del gasto cardiaco. <ul style="list-style-type: none"> ▪ Descenso de la frecuencia cardíaca. ▪ Descenso del volumen de eyección ○ Incrementan las resistencias vasculares. ○ Asociado a bajo índice de masa corporal. ○ Mediado por la placenta: invasión trofoblástica deficiente. ○ Reducción del tamaño fetal.
<p>Preeclampsia tardía (después de la semana 34)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Presenta un incremento del gasto cardiaco. <ul style="list-style-type: none"> ▪ Aumento de la frecuencia cardíaca. ▪ Aumento del volumen de eyección ○ Disminuyen las resistencias vasculares. ○ Asociado a un alto índice de masa corporal. ○ Mediado por otros factores: obesidad... ○ Tamaño fetal aparentemente normal.

Tabla 4. Clasificación de preeclampsia según los cambios en el gasto cardiaco y resistencias vasculares periféricas. Esta clasificación complementa la descrita en la Tabla 2, aunque en este caso la clasificación no se basa en el momento de la aparición, sino en los síntomas. Los datos cualitativos (incrementos y descensos) se referencian frente a mujeres con embarazo normal. Esta tabla ha sido generada a partir de los datos publicados (Easterling y cols. 1991; Valensise y cols. 2008; Tomsin y cols. 2013).

3.2.c. Resistencias vasculares

Las resistencias vasculares juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la presión arterial. Durante el embarazo normal las resistencias vasculares periféricas disminuyen, tanto como respuesta a cambios hormonales, como a la aparición de nuevos lechos vasculares, lo que permite adaptar la homeostasis del organismo a los nuevos requerimientos.

En cambio, en mujeres con preeclampsia en la fase clínica no se observa este descenso característico de las resistencias vasculares, por lo que los valores de las resistencias vasculares son más elevados que en un embarazo normal (Carlsson 1984; Groenendijk y cols. 1984; Zemel y cols. 1990; Valensise y cols. 2008).

Como hemos visto en el apartado anterior, algunos autores han descrito la *preeclampsia tardía* como un tipo de preeclampsia de aparición posterior a la semana 34, donde los niveles de resistencias vasculares son parecidos a los embarazos normales, y que se asocian con un incremento del gasto cardiaco (Tabla 4) (von Dadelszen y cols. 2003; Valensise y cols. 2008). Otros autores sugieren que estas diferencias son previas al establecimiento de la clínica y que luego, tanto en la *preeclampsia temprana* como en la *preeclampsia tardía*, las resistencias vasculares aumentan respecto a los embarazos normales, siendo esto último una característica propia de la patología (Bosio y cols. 1999; Gyselaers y cols. 2011; Guy y cols. 2017; Lucovnik y cols. 2017).

El hecho de que las resistencias periféricas en el embarazo normal sean menores a los valores de no gestación, y que en preeclampsia los valores se aproximen más a lo observado en no gestantes, indican que en preeclampsia hay una inhibición de las respuestas vasodilatadoras. En este sentido, se han apuntado diferentes causas.

3.2.c.i. Disfunción endotelial

El endotelio vascular materno parece ser la principal diana de los factores que desencadenan la preeclampsia, o factores gatillo (Powe y cols. 2011).

La función fisiológica esencial de las células endoteliales es el control de la función vascular, a través de la detección y transducción de señales sanguíneas, así como de conformar una barrera física que impida el movimiento inadecuado de agua, iones, proteínas y células, desde la sangre a los tejidos adyacentes. La función del endotelio como barrera y receptor de señales se ve claramente afectado en la preeclampsia. Así, observamos que la respuesta angiogénica y la respuesta vasodilatadora a diferentes estímulos están disminuidas, así como la respuesta a factores físicos, como el estrés mecánico por fuerzas de cizallamiento producidos por flujos de sangre inadecuados (Boeldt y Bird 2017).

La función endotelial está regulada por un delicado equilibrio entre factores que promueven la contracción y la relajación, jugando un papel esencial en el control de la elasticidad arterial, la resistencia vascular y la presión arterial (Roberts y cols. 2003; Thadhani y cols. 2005). Cuando se produce una alteración en la producción o acción de alguno de estos factores, la vasculatura se predispone a la vasoconstricción, activación endotelial, unión leucocitaria, estrés oxidativo y la inflamación vascular (Roberts y cols. 2003; Thadhani y cols. 2005; George y Granger 2010).

Tanto el desequilibrio en la contracción/relajación, como la pérdida de estabilidad física de la barrera endotelial, se conocen como disfunción endotelial.

En preeclampsia hay evidencias de daño endotelial, tanto desde el punto de vista histológico como funcional (Yee Khong y cols. 1992; Cunningham y Lindheimer 1992). Esta disfunción endotelial contribuye en todos los principales síntomas de la preeclampsia: hipertensión, edema, proteinuria y desregulación de la agregación plaquetaria (Boeldt y Bird 2017). Además, estas manifestaciones vasculares de la disfunción endotelial pueden también afectar al hígado y al cerebro, lo que se asocia con estadios más graves de la enfermedad, como puede ser el HELLP o la eclampsia (Powe y cols. 2011; Cipolla 2007).

Aunque, la disfunción endotelial comprende un desbalance entre factores constrictores y relajantes, en el ámbito del embarazo, parece que son los factores relajantes los que juegan un papel más importante en el establecimiento de la nueva homeostasis. Entre los principales factores se encuentran el NO y la prostaciclina. Ambos incrementan sus niveles durante el embarazo normal, siendo actores principales en la vasorrelajación gestacional (Hodžić y cols. 2017; Boeldt y Bird 2017).

3.2.c.ii. Óxido nítrico

La producción de NO está significativamente elevada durante el embarazo normal, jugando un importante papel en la reducción de las resistencias vasculares durante la gestación (LaMarca 2012). El NO es capaz de difundir desde las células endoteliales, donde es producido por la eNOS, hasta las células musculares, donde promueve la formación de GMPc, produciendo vasodilatación (Vedernikov y cols. 1999).

Multitud de estudios han demostrado que durante la preeclampsia se produce un descenso, tanto en la producción como en la biodisponibilidad de NO a niveles similares a los presentes en mujeres no gestantes (Taylor y cols. 1998; Vedernikov y cols. 1999; Shaamash y cols. 2000; Roberts y Von Versen-Hoeynck 2007; Speer y cols. 2008; Hodžić y cols. 2017).

Así, se ha demostrado que las células endoteliales provenientes de mujeres con preeclampsia producen una cantidad de NO menor que las provenientes de embarazos normales. Del mismo modo, al tratar células endoteliales de mujeres con gestación normal con plasma proveniente de mujeres con preeclampsia, también se produce una reducción

en la cantidad de NO (Hayman y cols. 2000; Krupp y cols. 2013). Esto hace pensar que moléculas presentes en el plasma son capaces de inhibir la producción de NO.

La enzima clave en la producción de NO por las células endoteliales es la eNOS. Para que esta reacción tenga lugar, se debe producir la dimerización de eNOS (Rafikov y cols. 2011), ya que los monómeros por sí mismos son capaces de producir una reacción parcial, en la que se generan iones superóxido, aumentando el estrés oxidativo (Kietadisorn y cols. 2012; Zhao y cols. 2015). Así, los iones superóxido reaccionan con las moléculas de NO, produciendo iones peroxinitrito, lo cual reduce la biodisponibilidad de NO, contribuyendo a la disfunción endotelial e incrementado el estrés oxidativo (Figura 2) (Kietadisorn y cols. 2012; Goulopoulou y Davidge 2015).

Por otro lado, el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como son el ion superóxido y el ion peroxinitrito, dificulta el correcto acoplamiento de BH4 y la dimerización de la eNOS, lo cual incrementa aún más la aparición de ROS y disminución de NO (Kietadisorn y cols. 2012; Zhao y cols. 2015). La producción de NO puede verse comprometida por descensos del sustrato L-arginina (Figura 2). El estrés oxidativo incrementa los niveles de arginasa, una enzima capaz de reducir los niveles de L-arginina (Zhao y cols. 2015). Los niveles de L-arginina también pueden descender por metilación, produciéndose dimetilarginina asimétrica (ADMA, por sus siglas en inglés), que además de reducir los niveles disponibles de L-arginina, compite con esta por la unión a la eNOS, inhibiendo su actividad (Figura 2) (Bode-Boger y cols. 2006; Speer y cols. 2008; Lucovnik y cols. 2017).

Se ha descrito que los niveles de ADMA en plasma de mujeres con preeclampsia están elevados, siendo capaces de inhibir la producción de NO en células endoteliales de pacientes con embarazo normal, cultivadas en presencia de este plasma (Speer y cols. 2008; Goulopoulou y Davidge 2015; Lucovnik y cols. 2017), por lo que ADMA es una de las moléculas candidatas como factor plasmático que altera la producción de NO. Sin embargo, los niveles de ADMA sólo se han visto elevados en la preeclampsia temprana, pero no así en la preeclampsia tardía (Alpoim y cols. 2013).

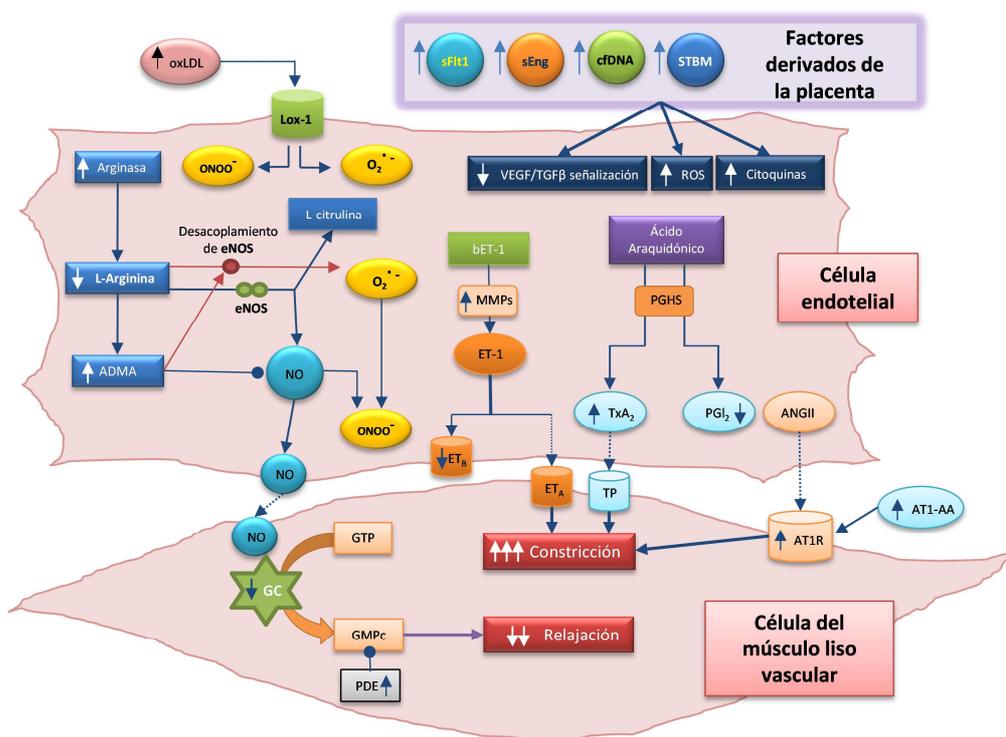


Figura 2. Disfunción endotelial en relación con la preeclampsia. Se representa, de forma esquematizada, el proceso de regulación vascular afectado por la circulación y factores endoteliales en preeclampsia. Figura adaptada de Gouloupoulou y Davidge 2015. *ADMA*: Dimetilarginina asimétrica; *ANGII*: Angiotensina II; *AT1R*: Receptor de angiotensina I; *AT1R-AA*: Anticuerpos anti-AT1R; *bET-1*: Endotelina 1 grande; *cfDNA*: DNA de células de la placenta libre; *eNOS*: óxido nítrico sintasa endotelial; *ET-1*: Endotelina-1; *ET-A*: Receptor A de endotelina; *ET-B*: Receptor B de endotelina; *GC*: Guanilato ciclasa; *GMPc*: Guanilil monofosfato cíclico; *GTP*: Guanilil trifosfato; *Lox-1*: Receptor 1 de LDL; *MMPs*: Metaloproteasas; *NO*: Óxido nítrico; $O_2^{\bullet-}$: Anión superóxido; $ONOO^{\bullet-}$: Peroxinitrito; *OxLDL*: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas; *PDE*: Fosfodiesterasa; *PGHS*: Prostaglandina-endoperóxido sintasa (ciclooxigenasa); *PGI₂*: Prostaciclina; *sFlt-1*: forma soluble del receptor de VEGF; *sEng*: Endoglina soluble; *STBM*: Microparticulas derivadas de sincitiotrofoblastos; *TGFβ*: Factor de crecimiento transformante β; *TP*: Receptor de tromboxano; *TxA₂*: Tromboxanos A₂; *VEGF*: Factor de crecimiento del endotelio vascular.

También se ha visto una reducción en la respuesta vasodilatadora mediada por NO y producida mediante estrés por cizalladura en ensayos *ex-vivo*, lo que sugiere que la activación de la eNOS como respuesta a este tipo de señales está inhibida (Cockell y Poston 1997; Kublickiene y cols. 2000). Aunque cabría la posibilidad de argumentar que los niveles de ADMA y estrés oxidativo puedan comprometer la biodisponibilidad de NO y no su síntesis, Cockell y Poston (1997) demuestran que el endotelio sí es capaz de responder a acetilcolina (Ach), incrementando el NO, algo que no ocurre con el estrés por cizallamiento.

Esto significa que la activación de la eNOS por este tipo de estrés está comprometida (Cockell y Poston 1997).

Por último, se ha descrito que los niveles plasmáticos de TGF- β durante la preeclampsia están más elevados que en pacientes con gestación normal (Lygnos y cols. 2006; Darmochwal-Kolarz y cols. 2017). El papel que juega TGF- β durante la preeclampsia no está del todo claro, puesto que su elevación se debería asociar con una mayor producción de NO y vasorrelajación, mientras que el efecto observado es el contrario. La explicación a la aparente falta de efecto del TGF- β parece que se encuentra en la elevación de los niveles de sEng observado en preeclampsia (Venkatesha y cols. 2006). Este argumento será tratado más adelante en este trabajo, englobado dentro de los efectos de la propia sEng sobre la preeclampsia.

3.2.c.iii. Prostaciclina

En la misma línea de lo observado con el NO, otro potente vasodilatador incrementado durante la gestación, la prostaciclina, también está reducido en preeclampsia.

La prostaciclina es un mediador de origen lipídico, perteneciente a la familia de los eicosanoides. Es producida a partir del ácido araquidónico, mediante la acción de dos enzimas, la ciclooxigenasa (COX, también denominadas *prostaglandina-endoperóxido sintasa*) y la *prostaciclina sintasa* (Mitchell y cols. 2014). Se ha descrito que la prostaciclina está relacionada con el incremento del gasto cardíaco y con una disminución de las resistencias vasculares (Remuzzi y cols. 1980).

La prostaciclina tiene una vida media muy corta. Aun así, la concentración plasmática y en orina de los metabolitos de degradación de prostaciclina están muy reducidos en pacientes con preeclampsia. Este hecho se debe a la reducción en la producción de prostaciclina en muchos lechos vasculares, como los uterinos, subcutáneos, en la placenta y cordón umbilical (Downing y cols. 1980; Remuzzi y cols. 1980).

Una de las causas para el descenso de la producción de prostaciclina es el descenso en la actividad de la *prostaciclina sintasa*. Esta enzima es dependiente del incremento del calcio intracelular de las células endoteliales, hecho que no se da en preeclampsia, afectando tanto a la actividad de la prostaciclina sintasa como a la de eNOS (Steinert y cols. 2002; Krupp y cols. 2013). Otro factor muy importante en la biodisponibilidad de prostaciclina es que el

incremento del estrés oxidativo, asociado a la preeclampsia, inhibe la producción de prostaciclina (Lorentzen y cols. 1991).

Se ha descrito que en preeclampsia hay una desviación de la producción de prostaciclina hacia la producción de tromboxano A₂, otro eicosanoide producido a partir del ácido araquidónico y con un gran poder de contracción (Figura 2)(Chavarría y cols. 2003; Possomato-Vieira y Khalil 2016). Además, la disminución en la producción de prostaciclina y el aumento de tromboxano A₂ ocurre antes de la manifestación de los síntomas, siendo más evidente en el tercer trimestre (Chavarría y cols. 2003; LaMarca 2012; Possomato-Vieira y Khalil 2016).

3.2.d. Presión arterial

La hipertensión arterial es el síntoma más característico de la preeclampsia. Durante décadas, el incremento de la presión arterial ha sido el único signo capaz de ser medido. Esto ha producido que el incremento de la presión arterial durante la gestación haya sido denominado con muchos nombres, los cuales han englobado diferentes patologías o diferentes estadios. No es hasta la descripción de otros síntomas, en concreto la proteinuria, cuando se empieza a definir la preeclampsia como se hace actualmente (C. Lees y Ferrazzi 2017).

Como ya se ha descrito, la aparición *de novo* de hipertensión durante la segunda mitad del embarazo es el principal criterio para el diagnóstico de la preeclampsia, aunque se precisa que se den de forma conjunta otra serie de signos (Tabla 1).

Como se ha venido desgranando a lo largo de esta sección, el incremento de la presión arterial durante la preeclampsia es la consecuencia clara de un aumento de las resistencias vasculares respecto a lo que ocurre en un embarazo normal. Esto hace que, aunque el gasto cardiaco y el volumen plasmático no aumenten (cosa que sí ocurre en embarazos normales), la presión arterial sí que aumenta (Hibbard y cols. 2009).

Por otro lado, diferentes parámetros de la presión arterial pueden ser utilizados como marcadores tempranos de la patología. Así, se ha descrito que las mujeres destinadas a desarrollar preeclampsia tienen una elevación de la presión arterial media, en comparación con las mujeres que desarrollarán una gestación normal ya desde la semana 9 de gestación (Page y Christianson 1976; Moutquin y cols. 1985).

Claramente, la elevación de la presión arterial en fases tempranas de la gestación es un factor de riesgo para el desarrollo posterior de preeclampsia. Sin embargo, los valores de presión arterial por sí solos, y en etapas tan iniciales del embarazo, son un pobre predictor de preeclampsia, por lo que se precisa comparar con otros tipos de estudios (Conde-Agudelo y cols. 1993; Hermida y Ayala 2002).

Diferentes estudios han demostrado que también se observa una variación en el patrón circadiano de la presión arterial en mujeres que van a desarrollar o desarrollan preeclampsia. En estas mujeres, el patrón diurno es superior al de mujeres con gestación normal, mientras que el patrón nocturno de las mujeres con la patología no muestra el descenso típico de la presión arterial durante la noche, lo que además supone un factor de riesgo cardiovascular (Beilin y cols. 1982; Benedetto y cols. 1996).

3.3. Hemostasia

En cuanto a la hemostasia, actualmente se considera que los cambios observados en los estadios más leves de la enfermedad son debidos a un incremento en las respuestas fisiológicas normales en la madre. Esta afirmación contrasta con lo que pasa en los estadios más graves de preeclampsia, en los cuales se produce un desequilibrio desmesurado y patológico del sistema hemostático. Esto es un claro reflejo de la inflamación sistémica y la disfunción endotelial, característicos de esta patología (Gardiner y Vatish 2015; Gardiner y Vatish 2017).

3.3.a. Plaquetas

La preeclampsia es la segunda patología que más trombocitopenia produce durante el embarazo, siendo responsable del 21 % de los casos descritos durante la gestación (Tabla 3) (Bockenstedt 2011). La reducción del número de plaquetas se ha descrito en el 50% de las mujeres diagnosticadas de preeclampsia, principalmente durante el tercer trimestre de gestación (Bockenstedt 2011).

Esta reducción en el recuento plaquetario se ha asociado con una excesiva activación plaquetaria durante la preeclampsia. Esta relación se ha establecido desde hace tiempo, y es un rasgo característico de la propia patología, siendo incluso un criterio para el diagnóstico (Tabla 1) (Redman y cols. 1978; Gardiner y Vatish 2015). Este incremento en la reactividad y la disminución en el número de plaquetas puede ocurrir varias semanas antes de la aparición de los síntomas maternos (Redman y cols. 1978).

Como ya se ha descrito, para considerar la trombocitopenia como signo diagnóstico de preeclampsia, el número de plaquetas debe ser inferior a 100.000 plaquetas/ μ L (Tabla 1). Aunque diferentes autores consideran que valores entre 100.000 y 75.000 plaquetas indican un grado leve de trombocitopenia (Sainio y cols. 2000; Cines y Levine 2017), otros autores consideran que valores inferiores a 100.000 ya suponen un riesgo grave para la salud por hipocoagulación (Sharma y cols. 1999).

El incremento de la activación plaquetaria en preeclampsia está bien descrito en la bibliografía, y no solo se basa en la reducción en el recuento plaquetario. Así, se ha descrito que durante la preeclampsia se produce un incremento en los marcadores de activación plaquetaria, tales como β -tromboglobulina, tromboxanos y un incremento en los niveles circulantes de P-selectina soluble, respecto a lo que ocurre en embarazo normal (Janes y Goodall 1994; Karalis y cols. 2005). También se ha descrito la presencia de niveles elevados de calcio dentro de las plaquetas de pacientes con preeclampsia (Kilby y cols. 1990). Todos estos signos demuestran que las plaquetas se encuentran más activadas en preeclampsia que en una gestación normal.

Algunos autores describen que durante la preeclampsia se produce un incremento del volumen plaquetario medio (Piazzè y cols. 2006). Se ha señalado que este incremento del volumen plaquetario medio puede ser un reflejo de un incremento de la síntesis de plaquetas en la médula, como respuesta al incremento del consumo de plaquetas (Piazzè y cols. 2006). En este sentido, algunos estudios han demostrado un aumento de la trombopoyesis, evidenciado por un aumento del recuento de plaquetas reticuladas (Kazmi y cols. 2011). A su vez, se ha señalado que el incremento de la activación plaquetaria podría ser debido a una alteración en el flujo uteroplacentario (Kanat-Pektas y cols. 2014). Este posible origen del incremento de la activación plaquetaria, unido a la correlación entre los valores de volumen plaquetario con el crecimiento fetal retardado y la preeclampsia, hacen de este parámetro un buen candidato a marcador de preeclampsia (Kanat-Pektas y cols. 2014; Vilchez y cols. 2017). Además, el incremento del volumen plaquetario se produce hacia el final del primer trimestre de gestación, por lo que ha sido señalado como un predictor de la restricción del crecimiento intrauterino y de la preeclampsia (Kanat-Pektas y cols. 2014; Gardiner y Vatish 2015), donde se le ha otorgado unos valores de hasta 90% de sensibilidad y 86% de especificidad (Vilchez y cols. 2017).

Por otro lado, no todos los autores ven diferencias en el volumen plaquetario medio en mujeres con preeclampsia, lo cual se suele relacionar con las diferentes técnicas utilizadas para su medición (Karalis y cols. 2005; Ceyhan y cols. 2006).

Aunque hemos comentado que las plaquetas muestran un mayor grado de activación y de consumo durante la preeclampsia, muchos autores no obtienen diferencias respecto a los embarazos normales, aunque sí frente a las mujeres no embarazadas. Una de las posibles fuentes de controversia es la utilización de sangre completa a la hora de realizar los experimentos. Así, la falta de respuesta a agonistas activadores, como colágeno, ADP, ácido araquidónico y adrenalina, puede ser el reflejo del agotamiento plaquetario por la propia activación (Kazmi y cols. 2011). En este sentido, el consumo de plaquetas en preeclampsia produce un incremento de productos relacionados con la agregación plaquetaria, como la β -tromboglobulina, pero se observa una reducción en los niveles de ATP, lo que sugiere que las plaquetas se encuentran previamente activadas (Kazmi y cols. 2011).

Además, algunos autores señalan que la gran activación y agregación plaquetaria podría ser la causa del aumento de los niveles plasmáticos de TGF- β 1, característico de la preeclampsia (Peraçoli y cols. 2008). Estos autores también ven una asociación en la menor capacidad de respuesta de las plaquetas con los altos niveles de TGF- β 1 en plasma de mujeres con preeclampsia, lo que sugiere que esta citoquina juega un papel en la fisiopatología de la preeclampsia, y que ésta es dependiente de la activación plaquetaria (Peraçoli y cols. 2008).

3.3.b. Sistema de coagulación y fibrinólisis

La relación entre la activación del sistema de coagulación y la preeclampsia ha sido reconocido desde hace tiempo (Pritchard y cols. 1954). El desplazamiento del balance hemostático hacia un patrón procoagulantes e hipofibrinolítico observado en el embarazo normal y descrito anteriormente, se da de forma exagerada en pacientes con preeclampsia. Este hecho se evidencia por un incremento de los depósitos de fibrina alrededor de las vellosidades de la placenta y un incremento en la infartación placentaria (Bonnar y cols. 1971).

Las pruebas de coagulación demuestran que el grado de cambio hacia el fenotipo procoagulante es proporcional a la gravedad de la propia preeclampsia. Así, se observa que tanto el TP como el TPT tienden a ser menores en mujeres con preeclampsia, mientras que

otros factores, como el fibrinógeno o el factor VIII están elevados (Donnelly y cols. 2013; Gardiner y Vatish 2015). También se observa un incremento en los dímeros-D, así como de marcadores *in vivo* del aumento de trombina y del potencial endógeno de trombina (de Boer y cols. 1989; Ataulakhanov y cols. 2016).

De la misma manera que ocurre en la gestación, se produce una reducción en los niveles de anticoagulantes naturales, siendo esta reducción mayor en la preeclampsia (Gardiner y Vatish 2015). En esta línea, se ha demostrado una reducción en los niveles de antitrombina, de la proteína C, y de la sensibilidad a la resistencia de la proteína C (Donnelly y cols. 2013; Paternoster y cols. 2002; Gardiner y Vatish 2015). Es bastante notable que la resistencia a la proteína C activada persista durante mucho tiempo en las mujeres después del parto.

Sin embargo, el cambio más llamativo está en las proteínas asociadas con la disfunción endotelial. Así, se ha descrito que tanto el *activador tisular de plasminógeno*, como el inhibidor PAI-1, la trombomodulina soluble, el receptor APC endotelial y el FVW están todos muy incrementados en pacientes con preeclampsia (Gardiner y Vatish 2015). Estos datos demuestran que durante la preeclampsia se dispara el sistema de coagulación hacia un estado muy procoagulante y hipofibrinolítico, el cual se relaciona con la gravedad de la enfermedad.

3.4. Función renal

El riñón es uno de los órganos que, como se ha descrito, sufren una serie de alteraciones durante la gestación, para conseguir adecuar la homeostasis materna a las necesidades de la gestación. Durante la preeclampsia, estas alteraciones del riñón siguen apareciendo, de un modo similar a lo que ocurre en un embarazo normal.

En cambio, durante la preeclampsia es normal que aparezcan signos de daño renal, en concreto la proteinuria. Desde el punto de vista obstétrico, la utilización de la proteinuria como un criterio diagnóstico ha sido puesto en duda, puesto que muchas pacientes diagnosticadas de preeclampsia no llegan a desarrollar nunca proteinuria (August 2013; Craici y cols. 2014). Esto hace necesario la utilización de otros criterios para el diagnóstico de la preeclampsia (Tabla 1).

El mecanismo concreto por el cual se produce la proteinuria en la preeclampsia no está aún aclarado del todo puesto que en muchas patologías glomerulares se produce la liberación de proteínas en la orina, principalmente albúmina (August 2013).

El paso clave para la aparición de proteinuria es la alteración de la membrana basal del glomérulo. Esta membrana basal es la principal barrera para la filtración de proteínas, ya que presenta una serie de características físico-químicas que limitan el paso de diferentes moléculas desde la sangre hacia la orina (Guyton y Hall 2008c). En este sentido, se ha descrito el papel crítico que juega la integridad de los podocitos en la regulación de la correcta filtración glomerular, así como en el establecimiento de la proteinuria en muchas formas de daño glomerular.

La principal lesión renal que se produce durante la preeclampsia es la endoteliosis. La endoteliosis es una inflamación de las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos (August 2013). El establecimiento de esta alteración del endotelio vascular en preeclampsia se ha asociado al incremento de los niveles plasmáticos de sFlt-1, en relación con la disminución de los niveles de VEGF.

Se ha descrito que el VEGF es un factor clave en el mantenimiento y correcto funcionamiento del endotelio vascular, por lo que la reducción en sus niveles compromete la integridad del endotelio vascular (Eremina y cols. 2003).

Por su parte, el sFlt-1 es liberado por la placenta durante la preeclampsia, fruto de la incorrecta implantación de la placenta, con el consecuente aumento de hipoxia y estrés oxidativo. Este factor anti-angiogénico se une al VEGF plasmático, reduciendo su biodisponibilidad.

La relación entre endoteliosis, VEGF y sFlt-1 con el establecimiento de la proteinuria ha sido ampliamente descrita. Así, se ha demostrado que, en modelos animales, al inyectar o sobreexpresar sFlt-1 se produce un incremento del daño endotelial y proteinuria (Sugimoto y cols. 2003; Venkatesha y cols. 2006). En mujeres con preeclampsia en fases iniciales, se ha observado que al disminuir los niveles de sFlt-1 mediante aféresis extracorpórea, mejora la ratio proteína/creatinina (Thadhani y cols. 2011). Además, en pacientes con cáncer y que son tratados con anticuerpos anti-VEGF, se ha observado que desarrollan proteinuria (August 2013).

3.4.a. Podocituria

Además del daño de la membrana basal del glomérulo, también se ha descrito que en preeclampsia se produce una pérdida de podocitos (Garovic y cols. 2007a).

Los podocitos son células de la capa visceral de la cápsula de Bowman. Son células altamente diferenciadas, con una morfología estrellada y que presentan una serie de prolongaciones citoplasmáticas primarias, dirigidas hacia las asas capilares. Estas prolongaciones primarias se subdividen a su vez en una serie de cortas prolongaciones secundarias, denominadas *pedicelos* (Armelloni y cols. 2014).

Los pedicelos se interdigitan unos con otros, estableciendo fuertes uniones mediadas por un complejo proteico, en el que destacan la nefrina y la podocina. Estas interdigitaciones generan un complejo entramado que actúa como un cedazo, permitiendo seleccionar, por tamaño y carga, las moléculas plasmáticas que pueden pasar a la orina (Armelloni y cols. 2014).

Así, los podocitos se encuentran adosados a la membrana basal de los capilares fenestrados, rodeando con sus prolongaciones y pedicelos toda la superficie del capilar. El conjunto de los capilares fenestrados, la membrana basal y los podocitos conforman la barrera de filtración glomerular. Cuando la barrera de filtración glomerular está intacta, las proteínas plasmáticas no pueden ser filtradas a la orina, debido a su elevado tamaño y a la carga que presentan (Garovic y cols. 2007b; August 2013).

Es cierto que durante el embarazo, se produce una leve pérdida de proteínas en la orina, pero esta se debe principalmente al incremento del filtrado glomerular y al aumento de la permeabilidad de la barrera de filtración glomerular (Müller-Deile y Schiffer 2017). Esta pérdida de proteínas es considerada normal y una consecuencia de los ajustes fisiológicos necesarios durante el embarazo.

Diferentes autores han demostrado que durante la preeclampsia se produce una pérdida de podocitos en la orina (Garovic y cols. 2007a; Henao y Saleem 2013). También se ha descrito una disminución de la expresión glomerular de algunas de las proteínas involucradas en las uniones entre los pedicelos, concretamente la nefrina y la sinaptopodina, en mujeres con preeclampsia (Henao y Saleem 2013; Craici y cols. 2013). Estos datos han sido confirmados por un incremento de los niveles urinarios y séricos de nefrina, así como

un incremento de la excreción urinaria de podocalixina en las mujeres con preeclampsia, comparadas con las mujeres con un embarazo normal (August 2013).

En conjunto, estos hechos sugieren que, en preeclampsia, la pérdida de unión entre pedicelos y la pérdida de podocitos completos genera una pérdida de la integridad de la barrera de filtración, generándose poros a través de ella por los que pueden escapar no solo las moléculas que deben ser filtradas, sino que también se pierden moléculas de alto valor biológico, como proteínas, mayores cantidades de glucosa, etc...

Otra de las funciones clave de los podocitos es la síntesis de la membrana basal glomerular, además de ser la mayor fuente de VEGF en el glomérulo (Simon y cols. 1995). Este VEGF derivado de los podocitos tiene una función paracrina en las células endoteliales, permitiendo su supervivencia, así como un efecto autocrino sobre los propios podocitos (Müller-Deile y Schiffer 2014).

Así, un plausible escenario emerge, en el cual los niveles elevados de sFlt-1, relacionados con una baja perfusión placentaria, conducen a una depleción del VEGF, lo cual contribuye a las alteraciones de la barrera de filtración glomerular, incluyendo la disrupción de las células del endotelio glomerular y el daño/depleción en los podocitos (August 2013). La denudación de los podocitos podría ser la última fase del daño (August 2013).

La podocituria tiene una significativa sensibilidad y especificidad como factor diagnóstico de la preeclampsia, toda vez que ningún marcador angiogénico por sí solo o por la combinación de varios de ellos, es un buen marcador de preeclampsia en el segundo trimestre (Craici y cols. 2013). El número de podocitos perdidos en la orina muestra una fuerte correlación con el grado de hipertensión, lo que lo convierte en un mejor marcador de daño que la proteinuria, la cual no se correlaciona en ningún caso con el grado de daño que sufre la madre (Müller-Deile y Schiffer 2014).

Aunque la podocituria parece ser un buen marcador y predictor de preeclampsia, hay que tener cuidado con el parámetro concreto que se utiliza para su valoración. Así, hay que tener en cuenta que la expresión de las proteínas pueden variar dependiendo de diversos factores, como la presencia de la preeclampsia, el entorno de la propia orina o el estado de diferenciación de los propios podocitos (Müller-Deile y Schiffer 2014).

A pesar de toda la información con la que contamos actualmente, la preeclampsia sigue siendo una enfermedad poco conocida desde el punto de vista del establecimiento y desarrollo de la patología. La importancia de dilucidar el papel que juegan los diferentes marcadores, como la sEng y sFlt-1 se muestra como un elemento clave, no solo a la hora de utilizar estas moléculas como marcadores o predictores de la enfermedad, sino que pueden actuar como *Piedra de Roseta* para describir los mecanismos que subyacen tras la sintomatología y, tal vez, brindar posibles dianas terapéuticas, que permitan tratar y mitigar el daño de esta patología.

Uno de estos factores, con efecto anti-angiogénico, es la sEng. Existen numerosos estudios que afirman que este factor se encuentra elevado en el plasma antes de la aparición de las manifestaciones clínicas, relacionándose con alguno de los síntomas (Venkatesha y cols. 2006; Levine y cols. 2006; López-Novoa 2007; Troisi y cols. 2008; Farina y cols. 2008; Maynard y cols. 2010).

Por lo tanto, el objetivo que nos planteamos en este trabajo es intentar elucidar el papel que juega la sEng en los diferentes síntomas de la preeclampsia, con el fin de entender algunos de los procesos que tiene lugar en esta compleja enfermedad.

4. Endogлина

Endogлина, también conocida como CD105, es una glicoproteína de membrana homodimérica, formada por dos subunidades de 90 kDa cada una, unidas entre sí mediante puentes disulfuro (Gougos y Letarte 1990).

El gen de la endogлина se encuentra codificado en el cromosoma 9q34qter (Fernandez-Ruiz y cols. 1993). La secuencia está flanqueada por el extremo 5' por una región rica en GC, cercanas al sitio de transcripción, y por motivos de unión Sp1, que juegan un papel esencial para el inicio de la transcripción (Botella y cols. 2001). El promotor también presenta sitios de unión para diferentes factores de transcripción, como Smad, HIF-1, KLF6, NFκB, GATA-2, AP2, glucocorticoides, vitamina D y Ets (Rius y cols. 1998; Graulich y cols. 1999).

Endogлина es una proteína que se expresa principalmente en células endoteliales, siendo considerada como marcador de este tipo celular (Gougos y Letarte 1990; Bernabeu y cols. 2007). También se expresa en otros tipos celulares, como los sincitiotrofoblastos, donde es particularmente abundante (St-Jacques y cols. 1994; Bernabeu y cols. 2007).

Endogлина actúa como un receptor auxiliar, o tipo II, de la superfamilia de citoquinas de TGF- β . Es una proteína transmembrana, con una región extracelular y una citoplasmática (López-Novoa y Bernabeu 2010).

La región extracelular se divide a su vez en un dominio huérfano, y un dominio de zona pelúcida (ZP), implicado probablemente en interacciones proteína-proteína. Este dominio ZP, contiene 8 residuos cisteína conservados, que generan puentes disulfuro, y el tripéptido RGD, una secuencia consenso altamente conservada de unión a integrinas (Llorca y cols. 2007; García-Pozo y cols. 2008; Saito y cols. 2017).

La región citosólica presenta una serie de dominios susceptibles de ser fosforilados, que además se encuentran fosforilados de forma constitutiva, pero no presenta capacidad enzimática, por lo que puede actuar como modulador de la señalización, pero no generarla. Además, presenta regiones clave de interacción con otras proteínas que pueden interferir en la señalización (López-Novoa y Bernabeu 2010).

Existen dos isoformas de membrana producidas por *splicing* alternativo: la endogлина larga, que es la mayoritaria, y la endogлина corta, con un dominio citosólico mucho más corto. Ambos tipos de endogлина son capaces de mediar en la respuesta a TGF- β , pero activando rutas diferentes, incluso siendo antagónicos sus efectos (Bellón y cols. 1993; Blanco y cols. 2008; López-Novoa y Bernabeu 2010).

Además de estas dos isoformas de membrana, existe una tercera isoforma soluble, la sEng. Esta isoforma no está anclada a la membrana, ya que carece de los dominios transmembrana y citosólico, y se origina mediante el corte proteolítico de las isoformas de membrana, catalizado por la metaloproteasa MMP-14 (Matrix Metalloproteinase-14) (Hawinkels y cols. 2010; Valbuena-Diez y cols. 2012; Gallardo-Vara y cols. 2016).

4.1. Función de endogлина

Endogлина juega un papel esencial en el desarrollo y mantenimiento del sistema vascular. Esto queda patente al observar que ratones *knock-out* para el gen de Endogлина mueren durante el desarrollo embrionario debido a graves alteraciones en la vascularización, mientras que los ratones heterocigotos para esta proteína, que son haploinsuficientes, generan malformaciones arteriovenosas y otros defectos vasculares (Bourdeau y cols. 2000; Jerkic y cols. 2006b; Kapur y cols. 2013; Li y cols. 2016). Se ha observado que endogлина

aumenta su expresión en células endoteliales en zonas con angiogénesis activa (Anderberg y cols. 2013; Barnett y cols. 2014).

La importancia de endogлина en el correcto proceso de neovascularización y remodelado vascular está avalada por el hecho de que mutaciones en heterocigosis del gen de endogлина causan una enfermedad rara conocida como Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 1 (HHT-1; del inglés, *Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia*), caracterizada por la presencia de anomalías vasculares, como son malformaciones arteriovenosas, edema pulmonar y hepático, hemorragias recurrentes y problemas cerebrovasculares, asociada con una disminución de los niveles de endogлина de membrana (Shovlin 2010; Ruiz-Llorente y cols. 2017).

También se ha descrito que endogлина está implicada en la regulación del tono vascular. Así, se ha observado que los ratones haploinsuficientes para endogлина tienen una menor capacidad de respuesta a los estímulos vasodilatadores producidos por acetilcolina o bradiquinina. Además, estos animales presentan unos niveles reducidos de eNOS, lo que desemboca en una menor producción de NO y una menor vasodilatación (Jerkic y cols. 2004; Jerkic y cols. 2006).

Endogлина también juega un papel muy importante en la permeabilidad vascular. Se ha descrito una disminución de los niveles de proteínas de unión célula-célula, como VE-cadherina, β -catenina, PECAM y ZO-1, en animales haploinsuficientes de endogлина. En estos animales también se ha descrito un aumento de la permeabilidad vascular dependiente de pericitos, asociado a la unión a integrinas. Estos hallazgos muestran una menor unión entre las células endoteliales y una menor estabilidad del vaso que conllevan a un aumento de la permeabilidad vascular (Park y cols. 2013; Jerkic y Letarte 2015; Rossi y cols. 2016).

Todo esto demuestra que endogлина juega un importante papel en el mantenimiento y la regulación de la función vascular, y que su ausencia se asocia con diversas patologías, como HHT-1, hipertensión pulmonar, arterioesclerosis e, incluso, preeclampsia (Kapur y cols. 2013).

Estos resultados hacen referencia a la isoforma más numerosa, la isoforma larga. Sin embargo, no todas las isoformas de endogлина ejercen el mismo papel. Por ejemplo, la isoforma corta de la endogлина actúa como una molécula anti-angiogénica. La sobreexpresión de esta isoforma en ratones hace que se produzca un retraso en el crecimiento tumoral, mientras que al ser sobreexpresada en células se observan alteraciones

en la senescencia celular (Quintanilla y cols. 2003; Pérez-Gómez y cols. 2005; Düwel y cols. 2007; Blanco y cols. 2008).

Con endoglina soluble sucede algo similar, asociándose con un efecto anti-angiogénico, y con la hipertensión y la preeclampsia (Venkatesha y cols. 2006; Valbuena-Diez y cols. 2012). Una posible explicación para la diferente función de las distintas formas de endoglina es que aquellas proteínas que carecen, de parte (endoglina corta) o de todo (sEng), el dominio intracelular, están actuando como un dominante negativo sobre la función de la isoforma larga, al competir con ésta por la unión al ligando.

4.2. Endoglina soluble

La endoglina soluble, sEng, se compone de la región extracelular de la endoglina de membrana, correspondiente al extremo N-terminal. Esta proteína se encuentra en bajas concentraciones en el plasma de la población normal. Sin embargo, se ha descrito un incremento en los niveles de sEng en varias condiciones patológicas relacionadas con el endotelio, incluida preeclampsia (Venkatesha y cols. 2006; Oujo y cols. 2013; Gregory y cols. 2014), aterosclerosis, hipercolesterolemia (Blann y cols. 1996; Blaha y cols. 2008; Rathouska y cols. 2015), diabetes mellitus (Blázquez-Medela y cols. 2010; Ceriello y cols. 2015; Emeksiz y cols. 2016), hipertensión (Blázquez-Medela y cols. 2010), retinopatía diabética (Malik y cols. 2005), enfermedad arterial coronaria (Li y cols. 2000b; Ikemoto y cols. 2012; Saita y cols. 2017), HHT tipo I (Letarte y cols. 2005; Botella y cols. 2015), infarto agudo de miocardio (Cruz-Gonzalez y cols. 2008) o cáncer (Li y cols. 2000a; Bernabeu y cols. 2009). Se ha postulado que los niveles desregulados de sEng en plasma, suero u orina de los pacientes son un marcador fiable para la correlación de gravedad y el pronóstico de estas enfermedades. Además, sEng parece estar jugando un papel activo durante el establecimiento y desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, se ha descrito que: i) en preeclampsia, sEng es patogénica, lo que contribuye a la hipertensión y a la afectación renal (Venkatesha y cols. 2006; Valbuena-Diez y cols. 2012); ii) en aterosclerosis, sEng induce una respuesta pro-inflamatoria que conduce a la disfunción endotelial (Jezkova y cols. 2016; Varejckova y cols. 2017); y iii) en cáncer, sEng actúa como proteína anti-angiogénica mediante la inhibición de la neoangiogénesis asociada con el crecimiento de tumores sólidos (Hawinkels y cols. 2010; Castonguay y cols. 2011). A pesar de la amplia gama de efectos fisiopatológicos de sEng descritos en el sistema cardiovascular, el mecanismo de acción que subyace en las células endoteliales es poco conocido. Varias líneas de evidencia

respaldan el papel patogénico de la sEng en la preeclampsia, incluida la actividad anti-angiogénica (Venkatesha y cols. 2006; Hawinkels y cols. 2010) y el aumento de la permeabilidad vascular y la hipertensión (Venkatesha y cols. 2006; Valbuena-Diez y cols. 2012). Además, sEng muestra una actividad pro-inflamatoria a través de NFκB e IL6 (Varejckova y cols. 2017) y puede modular la adhesión y transmigración de los leucocitos asociados a la inflamación (Rossi y cols. 2013). Se ha postulado que la actividad sEng se basa en su capacidad para antagonizar la función de la endoglina unida a la membrana. Por ejemplo, sEng se une a BMP9, un miembro de la familia TGF-β, con alta afinidad (Castonguay y cols. 2011; Alt y cols. 2012; Saito y cols. 2017) y esto puede llevar a un secuestro de BMP9, o cualquier otro ligando de TGF-β específico, evitando la unión a la endoglina de superficie y la posterior señalización intracelular corriente abajo del complejo receptor de TGF-β (Venkatesha y cols. 2006; Hawinkels y cols. 2010; Gregory y cols. 2014). Además, tanto endoglina ligada a membrana como sEng contienen una secuencia RGD accesible, que es un motivo consenso de unión para el reconocimiento de integrinas (Gougos y Letarte 1990; Saito y cols. 2017), y se ha demostrado que sEng puede inhibir la adhesión celular mediada por integrinas a la endoglina endotelial, probablemente compitiendo con su unión a dichas integrinas (Rossi y cols. 2013; Rossi y cols. 2016). Sin embargo, a pesar de todas las evidencias descritas, los mecanismos moleculares exactos de acción de sEng aún no se han dilucidado.

Se ha propuesto que sEng es generada y liberada al medio extracelular mediante el corte proteolítico de la endoglina de membrana, catalizado por la metaloproteasa MMP-14 (también denominada MT1-MMP) (Hawinkels y cols. 2010; Valbuena-Diez y cols. 2012). Así, aunque en la secuencia extracelular de la endoglina de membrana existen cuatro sitios potenciales de corte para la MMP-14 (Gly-Leu), en concreto las posiciones 299, 387, 453 y 586, parece ser que la metaloproteasa corta en la posición yuxtamembrana 586. El corte proteolítico en esta posición conlleva que sEng presente un tamaño de 65 kDa y que contenga prácticamente toda la secuencia del dominio extracelular de la endoglina de membrana (Hawinkels y cols. 2010; Gregory y cols. 2014). Sin embargo, algunos autores ponen en duda que sea esta posición donde se produzca el corte proteolítico, situándolo en la posición 453, puesto que estudios de proteómica sólo han sido capaces de detectar péptidos hasta el residuo 406 (Gregory y cols. 2014). Así, la liberación de sEng se puede desencadenar por inflamación, TNF-α, daño endotelial o por anticuerpos anti-endoglina (Li y cols. 2003; Kumar y cols. 2014; Gallardo-Vara y cols. 2016). Con el fin de conocer el papel

que juega la sEng en preeclampsia, sería importante conocer el mecanismo exacto de producción de sEng en la placenta, su estructura y secuencia exacta, ya que parece que el mecanismo de liberación depende del tipo de tejido del que provenga y, por lo tanto, de la patología que lo origina.

4.2.a. Regulación de la liberación de sEng

Los niveles plasmáticos de sEng están regulados por diferentes factores que, además de inducir la proteólisis y la liberación, también pueden regular la expresión de la endogлина de membrana, sustrato de las metaloproteasas y origen de sEng. En este sentido, se ha observado que en preeclampsia se produce un incremento de la expresión de la endogлина de membrana, principalmente en sincitiotrofoblastos y citotrofoblastos invasivos, lo que puede conllevar a un aumento de sEng por acción proteolítica de MMP-14 sobre la endogлина de membrana (Levine y cols. 2004; López-Novoa y Bernabeu 2010).

4.2.a.i. Hipoxia

La hipoxia es uno de los inductores de la síntesis de endogлина de membrana más estudiado. En un ambiente hipóxico se produce un incremento en la concentración del *factor inducible por hipoxia* (HIF-1, por sus siglas en inglés) como respuesta a la baja concentración de oxígeno, actuando como un factor de transcripción de una gran cantidad de genes, entre los que se encuentra el gen de la endogлина (*ENG*). En el promotor del gen *ENG* se han identificado secuencias HRE, que son capaces de unir HIF-1, modulando la expresión génica en respuesta hipoxia.

La transcripción de *ENG* puede estar incrementada en hipoxia de una manera indirecta, activada por acción del incremento de TGF- β y algunas BMPs, cuyos genes también presentan elementos de respuesta a HIF-1 (Sánchez-Elsner y cols. 2002; Tseng y cols. 2010) o mediante la activación de la vía de MAPK (Zhu y cols. 2003). Ambos mecanismos contribuirían al aumento de la síntesis de endogлина.

El incremento de endogлина de membrana en condiciones de hipoxia es un hecho generalmente aceptado (Sánchez-Elsner y cols. 2002; Li y cols. 2003; Park y cols. 2013). Sin embargo, existe controversia en la relación entre la hipoxia y la liberación de sEng por parte de la placenta.

Se ha descrito que los niveles de HIF-1 y sEng incrementan en respuesta a hipoxia en experimentos *in vivo* mediante la técnica de reducción de perfusión uterina (RUPP, por sus

siglas en inglés) (Gilbert y cols. 2009). Además, experimentos *in vitro* con trofoblastos demuestran un incremento de la liberación de sEng al medio cuando se someten a hipoxia (Valbuena-Diez y cols. 2012).

Por otro lado, se ha descrito que los trofoblastos provenientes de mujeres con gestación normal no muestran diferencias en la liberación de sEng al ser sometidos a hipoxia respecto a lo que se observa en normoxia, mientras que los trofoblastos procedentes de mujeres con preeclampsia sí que presentan una mayor liberación de sEng como respuesta a hipoxia (Gu y cols. 2008). Del mismo modo, explantes placentarios procedentes de gestaciones normales, no liberan sEng tras ser sometidos a hipoxia durante 48 horas, aunque sí se produce incremento de sFlt-1 (Munaut y cols. 2008).

Con todas estas evidencias, el papel de la hipoxia en la liberación de sEng en la placenta no está del todo claro. Parece que la hipoxia podría estar contribuyendo al incremento de la endoglina, pero son necesarios otros condicionantes previos para la liberación de la forma soluble de endoglina. En este sentido, un estudio demostró que al tratar células de coriocarcinoma humano con suero procedente de mujeres con preeclampsia y en condiciones de normoxia, se producía un aumento en la liberación de sEng por estas células, lo que indica que algún otro factor presente en preeclampsia es necesario para que se produzca la liberación de sEng (Aoki y cols. 2012).

4.2.a.ii. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es otro de los factores que influyen en la disfunción endotelial y en la liberación de sEng. El incremento del estrés oxidativo es normal en el embarazo, debido al incremento del metabolismo materno y placentar, aunque este incremento está normalmente contrabalanceado con la producción de antioxidantes naturales (Sánchez-Aranguren y cols. 2014; Ali y Khalil 2015). En preeclampsia se ha descrito que se produce un incremento del estrés oxidativo, sobre todo en la placenta, que puede ser debido a diferentes factores, como la hipoxia por mala placentación, al efecto de ciertas citoquinas, como interleuquina-6, interleuquina-10 y TNF- α (del inglés, *Tumor Necrosis Factor- α*), o a la reducción de expresión de diferentes moléculas antioxidantes, como la hemooxigenasa-1 (HO-1) y hemooxigenasa-2 (HO-2), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa (Sánchez-Aranguren y cols. 2014; Possomato-Vieira y Khalil 2016).

En cualquier caso, no se ha descrito un efecto directo del estrés oxidativo sobre la liberación de sEng, sino que se ha asociado con la elevación de los niveles de oxisteroles

(óxidos de colesterol) y al incremento de la respuesta inflamatoria, originada por dicho estrés oxidativo.

Los oxisteroles son diferentes productos de la oxidación del colesterol, que juegan un importante papel en muchos procesos biológicos, entre los que se encuentran la regulación de la homeostasis del colesterol, el metabolismo de esfingolípidos, la agregación plaquetaria, apoptosis y prenilación de proteínas (Poli y cols. 2013; Luu y cols. 2016).

Los oxisteroles se unen a sus receptores LXR (por sus siglas en inglés, *Liver X Receptor*), activándolos. Esta activación hace que se forme un heterodímero entre los LXR con un segundo receptor, RXR (por sus siglas en inglés, *Retinoic X Receptor*), actuando como un factor de transcripción que regula la expresión de diferentes genes, entre los que se encuentra el de endogлина (Henry-Berger y cols. 2008).

Por otro lado, se ha descrito que en preeclampsia hay un incremento tanto en la concentración de oxisteroles circulantes como del receptor LXR en sincitiotrofoblastos (Brownfoot y cols. 2014). Estos niveles elevados de oxisteroles circulantes y de LXR han demostrado ser capaces de inducir la expresión de endogлина de membrana, además de incrementar la expresión y la actividad de la MMP-14, lo que se traduce en la liberación de grandes cantidades de sEng (Valbuena-Diez y cols. 2012; Brownfoot y cols. 2014).

4.2.a.iii. Factores inflamatorios

La inflamación vascular es otro factor que se produce durante la gestación normal, pero que se dispara en la preeclampsia (Redman y Sargent 2009).

Se ha demostrado que al tratar células endoteliales con citoquinas pro-inflamatorias, como son TNF- α o INF γ (interferón gamma) se produce un incremento de la liberación de sEng, que además puede ser inhibido por la acción de la HO-1 (Cudmore y cols. 2007). En este estudio demuestran que la sobreexpresión de HO-1 inhibe la liberación de sEng producida por estas citoquinas, mientras que si se bloquea HO-1, primero se produce un incremento de la liberación basal de sEng, mientras que el efecto del TNF- α se ve incrementado (Cudmore y cols. 2007).

Otros estudios muestran que en preeclampsia hay niveles elevados del anticuerpo agonista del receptor tipo 1 de la angiotensina, o AA-AT1, que produce un incremento en la

liberación de sEng que es mediada por TNF- α y, a su vez, inhibe la acción de la HO-1 (Zhou y cols. 2010; LaMarca 2012).

En cambio, otros autores señalan que HO-1 no disminuye en placentas provenientes de pacientes con preeclampsia, y que tampoco es un regulador negativo de la liberación de sEng (Tong y cols. 2015).

4.3. Mecanismo de acción

A pesar de que la sEng se asocia con diversas patologías asociadas con el sistema cardiovascular, los mecanismos de acción a través de los cuales actúa no están aún bien definidos. Una de las teorías más comúnmente aceptada por la comunidad científica es que sEng ejerce su acción mediante la inhibición de la ruta de señalización de TGF- β .

Como ya se ha descrito, la endoglina de membrana actúa como correceptor y modulador de la vía de señalización de la superfamilia del TGF- β , interaccionando tanto con el ligando como con el resto del complejo receptor mediante el dominio extracelular. Según esta línea de pensamiento, la sEng actuaría como un inhibidor competitivo, antagonizando la unión del ligando al complejo receptor de la membrana (Venkatesha y cols. 2006). Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que la endoglina, tanto la de membrana como la soluble, no puede unirse a TGF- β por sí sola, sino que precisa de la interacción previa del ligando con los otros receptores de complejo (los receptores tipo I y tipo II) (Letamendía y cols. 1998; Barbara y cols. 1999). Así, sEng no sería capaz de realizar una acción directa sobre TGF- β , sino que se uniría al ligando unido previamente a los receptores de membrana. En este sentido, sEng competiría con la endoglina de membrana por la unión a este complejo y, al carecer de dominio intracelular capaz de modular la señal, se comportaría de la misma manera que la endoglina corta. Otra posibilidad es que sEng forme un complejo con el receptor soluble de tipo I o el tipo II de TGF- β (sEng-sT β RI o sEng-sT β RII), lo que bloquearía la interacción con los receptores de membrana e inhibiría su señalización. Por otro lado, se ha demostrado que la afinidad de endoglina por otros miembros de la superfamilia de TGF- β , como las BMPs, es mucho mayor. Estos ligandos se unen a sEng con la misma afinidad que al receptor de TGF- β tipo I, por lo que los niveles elevados de sEng podrían actuar como secuestradores de estas moléculas, impidiendo su unión al complejo receptor de membrana y, por lo tanto, inhibiendo la señalización (Castonguay y cols. 2011; Alt y cols. 2012; Gregory y cols. 2014).

4.4. Biomarcador

Durante los dos últimos meses de embarazo se produce un incremento de los niveles plasmáticos de sEng (Romero y cols. 2008). En las mujeres que desarrollan preeclampsia, este incremento se produce de una forma más temprana y mucho más pronunciada, llegando a detectarse niveles muy elevados de sEng en plasma antes de la aparición de los síntomas clínicos (Levine y cols. 2006; Maynard y cols. 2010).

La sEng por sí sola no ha demostrado ser un buen marcador de preeclampsia, puesto que hay numerosas patologías, como hipertensión gestacional o hipertensión crónica, donde se produce un incremento de los niveles de sEng sin ser preeclampsia (Salahuddin y cols. 2007). Por el contrario, se ha descrito que sEng puede ser un buen marcador para el diagnóstico de preeclampsia cuando se utiliza de forma conjunta con otros parámetros, como la concentración plasmática de sFlt-1, PIGF y TGF- β (Lim y cols. 2008), junto con la ratio sFlt-1:PIGF (Levine y cols. 2006; Grill y cols. 2009), los niveles del receptor LXR (Wang y cols. 2016) o los niveles de DNA fetal libre en plasma materno (AbdelHalim y cols. 2016). Incluso, se ha utilizado el nivel de sEng para el desarrollo de un algoritmo capaz de predecir la preeclampsia entre las semanas 11 y 13 de gestación (Akolekar y cols. 2011).

También se ha descrito que los niveles plasmáticos de sEng se correlacionan con la gravedad de la enfermedad, de tal manera que las pacientes que presentan estadios más graves de la enfermedad, como pueden ser preeclampsia severa con una gran restricción del crecimiento fetal o incluso el síndrome de HELLP, presentan niveles de sEng hasta 4 veces superiores a lo que se muestran en casos leves de preeclampsia, que a su vez son significativamente superiores a los que presentan las mujeres con gestación normal (Levine y cols. 2006; Signore y cols. 2008).

4.5. Síntomas clínicos de la preeclampsia y su relación con endoglina soluble

La sEng ha sido asociada con diferentes síntomas de la preeclampsia.

4.5.a. Hipertensión

El aumento de los niveles de sEng se ha asociado a un incremento de la presión arterial. Así, se ha observado un incremento de la presión arterial en ratas gestantes al ser tratadas con adenovirus que portaban un fragmento de DNA que codifica para sEng, incrementando los niveles de esta proteína en plasma (Venkatesha y cols. 2006). En nuestro laboratorio,

hemos comprobado que ratones transgénicos que sobreexpresan sEng en plasma, presentan unos valores de presión arterial mayores que sus controles (Valbuena-Diez y cols. 2012; Nemeckova y cols. 2015). También se ha comprobado que la administración de oxisteroles, y a través de la activación de los receptores LXR, produce un incremento de la presión arterial que se correlaciona con un incremento de los niveles de sEng en plasma. Además, al tratar a estos ratones con el péptido 583, el cual compite con la endoglina de membrana como sustrato de la MMP-14, se reduce la liberación de sEng al plasma y, consecuentemente, la presión arterial (Valbuena-Diez y cols. 2012).

El efecto hipertensor de sEng se ha asociado con una reducción de la síntesis de NO inducida por TGF- β . Se ha descrito que TGF- β se une a sus receptores de membrana que, de forma conjunta con la endoglina de membrana, induce un aumento en la expresión de eNOS, incrementando con ello la producción de NO (Jerkic y cols. 2004). Se ha sugerido que la presencia de sEng modifica la señalización mediada por TGF- β , reduciendo con ello la síntesis de NO y la vasodilatación, lo que contribuye al incremento de la presión arterial (Venkatesha y cols. 2006; López-Novoa y Bernabeu 2010; Oujo y cols. 2013). Sin embargo, esta hipótesis únicamente ha sido comprobada en un modelo *in vitro* con células endoteliales y anillos de aorta de ratón, pero en ningún caso se demuestra la interacción sEng-TGF β (Venkatesha y cols, 2006).

Uno de los objetivos de este trabajo es descubrir el mecanismo por el cual la sEng es capaz de inducir hipertensión.

4.5.b. Proteinuria

Como ya hemos descrito, la presencia de proteínas en orina es otra de las manifestaciones clínicas que caracterizan a la preeclampsia. La proteinuria se ha asociado al daño en los capilares glomerulares debido a la endoteliosis, lo que conlleva alteraciones en las células endoteliales del glomérulo, además de depósitos de fibrinógeno y un aumento del contenido lipídico en las células mesangiales (Krane y Hamrahian 2007).

Durante la preeclampsia se produce un desprendimiento de podocitos y una pérdida de estas células murales a través de la orina. Esta denudación de podocitos produce una pérdida de capacidad de filtración y, como consecuencia, la aparición de proteinuria (Aita y cols. 2009; Henao y Saleem 2013). La podocituria ha sido propuesta como un predictor de preeclampsia, puesto que la pérdida de estas células murales precede a la aparición de los

demás síntomas clínicos, estableciéndose en torno al final del segundo trimestre (Craici y cols. 2013).

El papel que juega sEng en el desarrollo de la proteinuria no está muy claro aún. Al sobreexpresar sEng en ratas, mediante la administración de adenovirus que contienen el cDNA para la forma soluble de endogлина, se ha observado un incremento de la excreción de proteínas en la orina, además de producirse endoteliosis glomerular y otras lesiones renales semejantes a las observadas en preeclampsia (Venkatesha y cols. 2006).

Recientes estudios realizados en nuestro grupo, han demostrado que sEng puede interactuar con las integrinas presentes en el endotelio, debido a que contiene el dominio RGD. Esta interacción puede bloquear la unión de los leucocitos a las integrinas de membrana del endotelio, interfiriendo en el proceso de infiltración leucocitaria (Rossi y cols. 2013). Basándonos en estos resultados, nos planteamos la hipótesis de que la sEng podría ser capaz de interactuar con las integrinas presentes en los podocitos, inhibiendo o impidiendo su correcta unión con las lamininas de la membrana basal del glomérulo. La unión entre las integrinas y las lamininas de la membrana basal es uno de los mecanismos básicos de interacción de los podocitos con la membrana basal, sin el cual no se produce la correcta unión (Sachs y Sonnenberg 2013). Este debilitamiento o incluso pérdida de las uniones, junto con las fuerzas hidrostáticas a las que son sometidos los podocitos por acción del flujo a través de los capilares, podría producir el desprendimiento de los podocitos y su arrastre con la orina, produciéndose la podocituria y posterior proteinuria.

Todo esto constituye otro de los objetivos de este trabajo, en el que se intenta esclarecer qué papel juega la sEng en el establecimiento y desarrollo de la podocituria y proteinuria.

4.5.c. Hemostasia

Como ya se ha descrito anteriormente, la preeclampsia se caracteriza por una reducción en el recuento plaquetario causado, en gran medida, por un incremento de la activación plaquetaria. En la bibliografía se ha descrito que la inhibición del efecto TGF- β por parte de sEng produce un incremento de la activación endotelial, que conlleva a una reducción del número total de plaquetas (Walshe y cols. 2009a). En este mismo estudio, los autores describen que esta reducción del número de plaquetas no se acompaña de una mayor activación plaquetaria, puesto que no observan diferencias en la expresión de P-selectina ni de la integrina α IIb β III.

Por su parte, la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$ solo se expresa en plaquetas, jugando un papel muy importante tanto en la adhesión como en la agregación plaquetaria y la estabilización del trombo, ya que es capaz de unirse a diferentes factores de la coagulación, tales como el FVW o el fibrinógeno (Bennett 2005; Rossi y cols. 2017). Recientemente, en nuestro grupo, se ha descrito la importancia que tiene la endoglina de la membrana endotelial en la unión de las plaquetas, mediante la interacción de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$ en conformación activada (Rossi y cols. 2017).

Puesto que sEng presenta el dominio extracelular de la endoglina de membrana, incluyendo el dominio RGD, hipotetizamos que sEng es capaz de unirse a las integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$ activadas, lo que conlleva una serie de implicaciones. Por un lado, la unión de la sEng a $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$ dificultaría tanto la agregación como la adhesión de las plaquetas activadas al endotelio, además de impedir la unión al FVW y fibrinógeno, comprometiendo la estabilidad del trombo. Además, esta unión podría inhibir el reconocimiento de la conformación de $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$ activada por parte del anticuerpo utilizado por Walshe y colaboradores, lo que implicaría que las plaquetas sí que se encuentran activadas, y por eso se produce la reducción de su número (Walshe y cols., 2009a). Por último, otro objetivo de este estudio es analizar el papel que sEng puede estar jugando en la hemostasia.

Como conclusión, basándonos en las evidencias descritas, postulamos que sEng podría ser responsable, al menos en parte, de la aparición de los principales síntomas de la preeclampsia (hipertensión y proteinuria), además de otros síntomas asociados (como la trombocitopenia) aunque el mecanismo por el cual sEng produce esos efectos no está claramente demostrado.

Objetivos

"Las preguntas que no podemos contestar son las que más nos enseñan. Nos enseñan a pensar. Si le das a alguien una respuesta, lo único que obtiene es cierta información. Pero si le das una pregunta, él buscará sus propias respuestas".

Patrick Rothfuss

Kvothe -El temor de un hombre sabio -

Objetivo general:

Analizar el papel de sEng en la aparición de varios de los principales síntomas de preeclampsia.

Objetivos particulares:

1. Determinar el papel que juega endoglina soluble en el establecimiento de la proteinuria y podocituria.
2. Analizar el efecto de endoglina soluble sobre la permeabilidad vascular y capilar.
3. Estudiar el efecto de endoglina soluble sobre la hemostasia.
4. Investigar los mecanismos mediante los cuales endoglina soluble produce hipertensión.

Materiales y Métodos

"Un experimento es una pregunta que la ciencia plantea a la naturaleza, y una medición es el registro de la respuesta de la naturaleza".

Max Planck.

1. Generación de ratones modificados genéticamente

Los animales de experimentación utilizados en el desarrollo de este trabajo fueron ratones transgénicos de fondo híbrido CBAx57BL/6J, que portaban una construcción que permite la sobreexpresión de la proteína endoglina soluble humana de forma ubicua, tal como se ha descrito previamente (Valbuena-Diez y cols. 2012). Para la generación de estos animales se utilizó el vector pCAGGS, en una versión modificada para la utilización en ratones transgénicos (Niwa y cols. 1991). Este plásmido contiene, en orientación 5'-3', una secuencia amplificadora de CMV (*Citomegalovirus*) y el promotor ubicuo del gen de la actina de pollo, un intrón de β -globulina y sitio de corte *EcoRI*. Justo después del sitio *EcoRI* se encuentra un motivo de poliadenilación del gen de la β -globina.

Para obtener la secuencia de la endoglina soluble humana, se partió de DNA complementario (cDNA) de endoglina humana insertado en un plásmido pDisplay, y marcada con una secuencia de hemaglutinina (HA) (Guerrero-Esteo y cols. 2002). A partir de esta construcción se obtuvo una secuencia de DNA que codificaba para una forma truncada de la endoglina humana. Esta forma truncada de la proteína contenía la secuencia de aminoácidos comprendida entre las posiciones 26 y la 437, incluyendo el dominio huérfano y el dominio ZP-N. Esta composición, que se corresponde con la secuencia aminoacídica de la endoglina soluble humana, es una secuencia de un tamaño de 1,3 kb, que fue clonada dentro de un plásmido pCRII-TOPO (Invitrogen). El vector resultante fue amplificado y digerido con *EcoRI*, lo cual permitió insertar la secuencia de la endoglina soluble humana dentro del plásmido pCAGGS, quedando así bajo la regulación del promotor ubicuo de la actina.

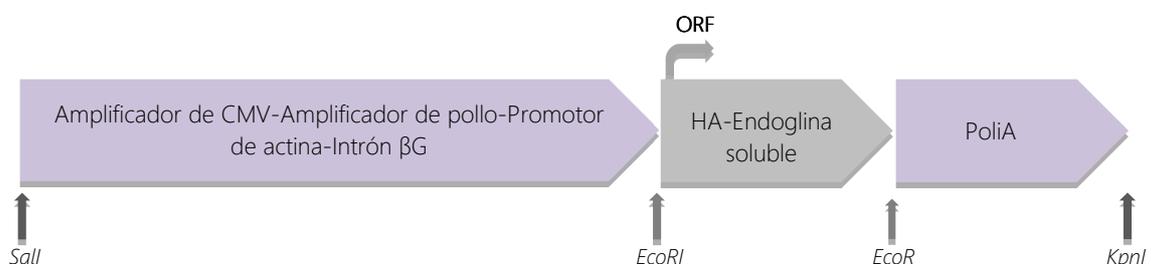


Figura 3. Construcción utilizada para la generación de los ratones sEng. β G, beta-globina; CMV, citomegalovirus; HA, hemaglutinina; ORF, Marco de lectura abierta (*Open Reading Frame*). Adaptado de Valbuena-Diez y cols., 2012.

Para la obtención de fragmentos lineales para la microinyección, la construcción fue digerida con las enzimas *Sall/KpnI*, obteniéndose una secuencia lineal de un tamaño de 4,2 kb. Posteriormente, se realizó una separación y purificación de la secuencia portadora del gen mediante electroforesis en gel de agarosa (Lonza).

Los fragmentos obtenidos de la electroforesis fueron microinyectados en óvulos fecundados de ratón, de genotipo híbrido (CBAxC56BL/6J)F1. La microinyección en estadios tan iniciales del desarrollo, como es el caso del óvulo recién fecundado, permite que el transgen esté presente en todas las células del organismo, incluyendo la línea germinal. De esta forma, los nuevos animales expresarán endoglina soluble humana de forma ubicua y serán capaces de transmitir la secuencia génica a su descendencia. Por último, los óvulos fecundados y modificados fueron implantados en hembras nodriza.

El proceso de microinyección se llevó a cabo por el Servicio de Animales Transgénicos de la Universidad de Salamanca, siguiendo protocolos estandarizados del propio servicio.

1.1. Establecimiento de las colonias de ratones transgénicos

Para seleccionar los machos fundadores de colonias, se analizó la progenie alumbrada por las hembras nodriza mediante genotipado por PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) (descrito más adelante). Entre todos los animales se obtuvieron tres machos candidatos a ser fundadores de las nuevas colonias.

Cada uno de los machos fundadores se cruzó con hembras de fenotipo híbrido (CBAxC57BL/6J)F1, para establecer las nuevas colonias y perpetuar la línea transgénica. La utilización de hembras híbridas, en vez de intentar establecer la colonia en una cepa homocigótica, se debió a la observación de que al intentar consolidar los genotipos puros, se perdía la expresión del transgen.

Las líneas obtenidas a partir de los tres fundadores mostraron características fenotípicas similares entre sí y constantes en toda la descendencia. Entre las características analizadas estaban los niveles de endoglina soluble expresados por los animales positivos, peso de los animales adultos, composición y tamaño de la camada, etc.

Para la realización de este trabajo se utilizaron animales descendientes de los 3 fundadores originales, obtenidos mediante este protocolo. En todos los casos se cruzaron machos transgénicos con hembras híbridas (CBAxC57BL/6J)F1, usando los hermanos de camada sin transgen como animal control de los animales endoglina soluble positivos.

1.2. Mantenimiento de los animales

Los ratones utilizados en nuestros experimentos se mantuvieron en régimen de confinamiento controlado en las dependencias del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, en un animalario con barrera libre de patógenos (SPF). Entre las condiciones de mantenimiento dentro del animalario, se siguió un ciclo diario de luz-oscuridad de 12 horas. La temperatura se mantuvo constante a 22°C (\pm 2°C), con una humedad de 55% (\pm 10%).

Todos los animales se alimentaron con una dieta estándar, con la siguiente composición: almidón (34,8% del total), proteína bruta (20,2%), cenizas brutas (5,5%), materias grasas brutas (5%), lisina (1%), calcio (0,9%), fósforo (0,6%), metionina (0,6%), sodio (0,28%), vitamina A (15 UI/g), vitamina D3 (2,2 UI/g) y vitamina E (70 UI/g). En su preparación se utilizaron los siguientes ingredientes: cereales, subproductos de molinería, harinas o tortas oleaginosas, harina de carne, compuestos minerales y corrector vitamínico mineral. El agua de bebida provenía de la acometida de distribución general, la cual era filtrada antes de ser suministrada. Tanto la disponibilidad de comida como de bebida fue *ad libitum*, revisando y cambiando periódicamente el alimento.

1.3. Manejo de los animales y aspectos legales

Durante la realización de este trabajo se siguió el principio de las 3 "Rs" (Reemplazo, Reducción y Refinamiento).

Los animales fueron manipulados siguiendo las recomendaciones promulgadas por la Asamblea Médica Mundial en la Declaración de Helsinki, y los principios de cuidado y utilización de los animales de experimentación estipulados por las regulaciones internacionales y las instituciones europeas y nacionales, recogidos en la Directiva Europea 2010/63/UE, la Ley del Estado Español 32/2007 de cuidado de los animales, y los Reales Decretos RD1201/2005 y RD53/2013, que versan sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y para otros fines científicos.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo siguiendo estricta y rigurosamente las guías para la eutanasia de los animales de experimentación detalladas en el Anexo III del RD 53/2013, basadas en el reglamento 1099/2009 del Consejo Europeo. Concretamente, han sido utilizadas técnicas de dislocación cervical, exceso de anestésico, decapitación (para los ensayos de contractilidad de anillos de aorta) e hipoxia (desplazamiento paulatino del O₂ por gaseado con CO₂).

Todos los protocolos seguidos en la realización de este trabajo han contado con la aprobación explícita del Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

1.4. Genotipado de los ratones

El genotipo de los ratones se determinó mediante PCR. Para llevar a cabo esta técnica se cortó una pequeña porción del extremo de la cola de los animales en el momento del destete, y las muestras obtenidas se congelaron hasta el momento de la extracción del DNA.

Para la extracción del DNA, cada porción de cola fue digerida en 200 μ L de tampón de lisis (Tris 50 mM pH=7,5; EDTA 5 mM; NaCl 100 mM; DTT [ditiotreitolo] 1mM; espermidina 0,5 mM; pH=8,0), al que se añadió 250 ng/ μ L de proteinasa K (Roche), durante 24 horas a 55°C. Tras la digestión, el DNA genómico se quedó en el sobrenadante, que fue almacenado a -20°C hasta el momento de realizar la PCR. Las condiciones de la PCR serán descritas más adelante en el apartado específico para esta técnica. El producto de la PCR se separó en un gel de agarosa al 3% (Lonza), utilizando un marcador específico de 1 Kb (Invitrogen). Tras la electroforesis, se colocó el gel de agarosa en un transiluminador para poder visualizar las bandas obtenidas. Así, se observaba una banda de 300 pb que aparece tanto en los animales positivos como en los negativos, y una banda de 360 pb, que corresponde solo a los animales positivos.

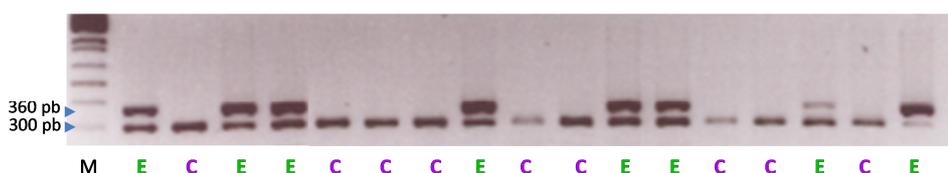


Figura 4. Genotipado de los ratones utilizados en el estudio. Muestra de gel de electroforesis, realizado para el genotipado de las crías en el momento del destete. Se observan dos bandas: una de 300 pb, común a todos, y una de 360 pb, característica de los sEng. M=marcador; C= WT/control; E=sEng.

2. Extracción de muestras

2.1. Anestesia y procedimientos quirúrgicos

Este trabajo se ha realizado en gran medida mediante estudios *in vivo*. Muchas de las técnicas utilizadas precisaban someter a los animales a anestesia para diferentes procedimientos quirúrgicos. Así, los métodos de anestesia utilizados han sido:

- Anestesia inhalatoria: Muy utilizada por la velocidad de inducción del plano de anestesia correcto, además de ser un tipo de anestesia reversible, con bajas o nulas complicaciones. Para este método se ha utilizado como agente anestésico el isoflurano (IsoFlo, Esteve Veterinaria) y una máquina de anestesia inhalatoria para isoflurano (MSS International). Esta máquina va equipada con una bomba de oxígeno y permite regular el flujo de aire y porcentaje de anestésico. Además, cuenta con una cámara de inducción de anestesia y una mascarilla adaptada para ratones. El flujo de aire se fijó en 1mL/minuto, con un porcentaje de isoflurano del 4% para la inducción y 1,5 % para el mantenimiento del plano de anestesia.
- Anestesia intraperitoneal con pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol). Este método de anestesia presenta mayores complicaciones que la anestesia inhalatoria, entre ellos la muerte del animal. Por ello, este método solo se utilizó en aquellos casos en los que el animal iba a ser sacrificado. La dosis terapéutica utilizada fue de 60mg/kg de peso del animal, utilizándose dosis de 200mg/kg para el sacrificio por exceso de anestésico.

Además de anestesia, se utilizó analgesia en todos los procedimientos quirúrgicos que requirieron que el animal se despertara en un corto periodo de tiempo, tales como extracción de sangre, implantación de bombas osmóticas, etc. En concreto se utilizó buprenorfina (Indivior) a una concentración de 0,3 mg/kg de peso corporal. Dicha analgesia se inyectó antes de empezar las cirugías, para que hiciera su efecto durante la operación, y en los días posteriores ante el mínimo signo de dolor.

La temperatura corporal de los animales es un factor crítico durante los procedimientos quirúrgicos, por lo que la superficie de operación se mantuvo caliente mediante una manta eléctrica de uso doméstico, a potencia media.

2.2. Extracción de sangre y obtención de plasma

Las muestras de sangre necesarias para la realización de los experimentos se obtuvieron utilizando diferentes técnicas:

Extracción de sangre de la yugular: Para la extracción de sangre de la yugular fue necesario anestésiar a los animales, lo que se hizo por medio de anestesia inhalatoria (isoflurano al 1,5 %). Esta técnica requiere realizar una incisión en el cuello del animal, por lo que una vez anestésiado, se depiló y desinfectó la zona con betadine. Se realizó una pequeña incisión de la piel del cuello, por encima del músculo pectoral. Tras separar los tejidos circundantes y localizar la yugular, se realizó una punción con una aguja de 25G y con anticoagulante, extrayendo la cantidad mínima necesaria para realizar los experimentos. La punción se realizó a través del músculo pectoral, hasta entrar en la yugular. Tras la extracción, se suturó la herida con sutura no absorbible (5-0) y se aplicó de nuevo betadine.

Esta técnica también fue utilizada para la inyección intravenosa en diferentes experimentos.

Extracción de sangre del maxilar: Para la extracción de sangre del maxilar los animales fueron sometidos a anestesia inhalatoria y se realizó una punción en la región submaxilar con la ayuda de una aguja de 21G. La sangre se recogió bien en un tubo Eppendorf con el anticoagulante, o bien fue utilizada directamente sobre tiras reactivas. Una vez obtenida la cantidad de sangre necesaria (unas pocas gotas), se presionó ligeramente la zona con un papel para contener la hemorragia.

Extracción de sangre por punción cardiaca: Esta técnica solo fue utilizada para la obtención de muestras de sangre en aquellos experimentos que implicaban inexorablemente el sacrificio del animal. Para llevarlo a cabo se anestésieron los animales intraperitonealmente con pentobarbital sódico a dosis subletal. Una vez que el animal presentaba un plano de anestesia profunda y antes de morir, se realizó una punción cardiaca con una aguja de 21G (o calibre superior), extrayendo la mayor cantidad posible de sangre. Tanto la aguja, como la jeringa y el tubo Eppendorf, donde posteriormente se depositó, contenían un anticoagulante.

Obtención de plasma: El plasma fue obtenido a partir de muestras de sangre extraídas siguiendo alguno de los protocolos descritos anteriormente. Las muestras utilizadas en el ELISA de BMP-4 fueron obtenidas con EDTA (0,5M, a razón de 20 μ L/mL sangre), mientras

que en las muestras para el ELISA de sEng se utilizó material ligeramente impregnado en heparina. Las muestras de sangre se centrifugaron a 2.500 g durante 10 minutos a 4°C. Una vez obtenidas, fueron mantenidas a -80°C hasta el momento de la utilización.

2.3. Extracción y procesamiento de órganos

En este trabajo se han realizado ensayos de inmunohistoquímica (IHC) y PCR a partir de diferentes órganos. Para la extracción de los diferentes órganos, se anestesiaron los animales con una dosis subletal de pentobarbital sódico. Una vez alcanzado el plano de anestesia total, se practicó una incisión profunda y extensa, tanto de la piel como de la capa muscular a través de la línea alba del abdomen, dejando accesible toda la masa visceral. A continuación, se accedió a la caja torácica donde, tras extraer el máximo de sangre posible sin comprometer en exceso la función cardiaca, se canuló el corazón a través de ápex o zona apical. A través de esta vía se hizo circular sistémicamente una solución de suero salino isotónico (0,9%) con heparina (1:1.000), a 37°C y una presión cercana a los 100mmHg. Se abrió el sistema circulatorio mediante la sección de la vena cava ascendente para que la perfusión fuera correcta.

Una vez perfundidos los órganos, proceso que tardó entre 5 y 10 minutos, se aislaron y procesaron los pulmones, el estómago y el primer tercio del intestino delgado (duodeno). Los órganos se limpiaron de tejido conectivo y tejido graso. Uno de los pulmones, una mitad del estómago (cortado a través del plano frontal respecto a la posición anatómica del ratón) y una mitad del intestino (cortado trasversalmente a la luz del tubo) se introdujeron en formaldehído al 4% para su fijación y posterior inclusión, mientras que el otro pulmón y las mitades restantes de intestino y estómago fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservados a -80°C hasta su utilización.

Además de estos órganos, también se utilizaron retinas, cuyo protocolo será descrito más adelante.

2.4. Extracción de orina (podocituria/proteinuria inducida)

Como consideraciones previas, se estableció inyectar 6µg de endoglina soluble por cada kilogramo de peso de animal por bolo, lo cual corresponde a la cantidad necesaria para conseguir una concentración de 100ng/mL en plasma, cantidad ligeramente superior a la presentada por mujeres con preeclampsia. Además, se decidió inyectar esa misma cantidad en dos bolos, cada uno de 200 µL.

Una vez pesado, se anestesió al animal con pentobarbital sódico (Dolethal). Tras alcanzar el plano de anestesia adecuado, se colocó al animal en posición *decúbito supino* sobre una tabla de cirugía termostatzada. A continuación, se realizó una incisión profunda en la zona inferior del abdomen a través de la línea alba, lo cual permitió aislar la vejiga urinaria. Con sumo cuidado, se realizó un pequeño corte en la zona apical de la vejiga con ayuda de unas tijeras. Acto seguido, se introdujo por la abertura una pequeña cánula de plástico, acampanada en el extremo introducido, y se fijó con la ayuda de un hilo de sutura. El extremo externo se introdujo en un tubo Eppendorf para la recogida de orina. Se dejó estabilizar durante un periodo de 30 minutos, recogiendo la orina como control "basal". Por otro lado, se canuló la vena yugular siguiendo el procedimiento previamente descrito para la extracción de sangre.

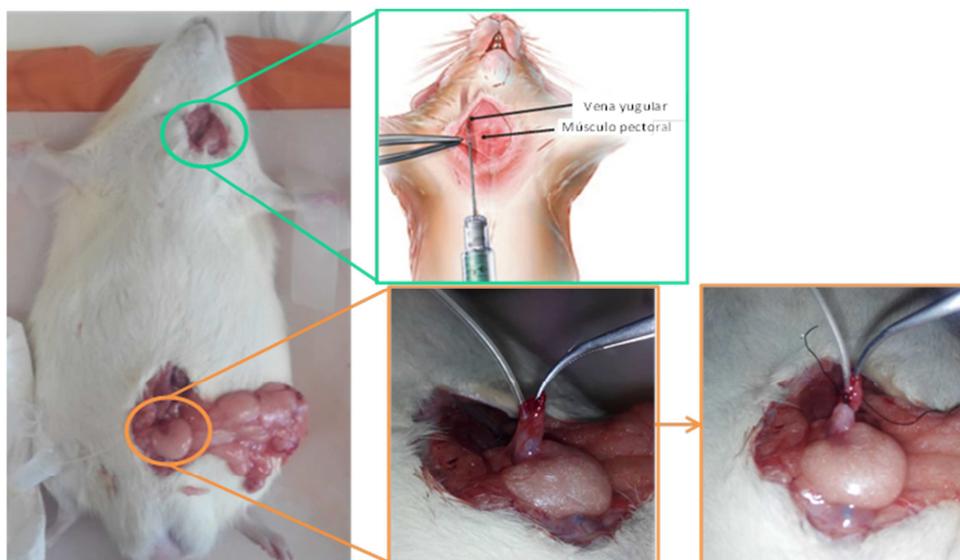


Figura 5. Proceso de inoculación de sEng y extracción de orina. En el recuadro verde se muestra un esquema del proceso de inoculación de sEng en la vena yugular. En los recuadros naranjas se muestra el proceso de canulación de la vejiga.

Pasados los 30 minutos de estabilización, se inoculó un bolo de endoglina soluble a través de la cánula, cambiando el tubo Eppendorf por uno limpio ($t=0$). A los 30 minutos se volvió a realizar el procedimiento con el segundo bolo ($t=30$). A partir de ese momento se recogieron muestras a una hora, dos horas, tres horas y cuarto horas. Durante toda la prueba se comprobó con frecuencia el estado correcto del plano de anestesia, además de hidratación intraperitoneal frecuente.

Una vez acabado el experimento, se centrifugaron todos los tubos a 2.500g durante 5 minutos. Posteriormente se guardaron por separado el pellet y el sobrenadante, siendo congelados a -80°C hasta el momento de la utilización.

2.5. Cultivos celulares

Para la realización de este trabajo, se utilizó un cultivo primario de células endoteliales derivadas de cordón umbilical humano (HUVECs, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*; obtenidas de Lonza) en pase 6-8. El cultivo de estas células se realizó sobre placas pre-tratadas con gelatina bovina (Sigma) diluida al 0,2% en solución salina de fosfato (PBS, del inglés, *Phosphate Buffer Saline*) durante 30 minutos a 37°C , para equiparar las condiciones de adhesión a una matriz extracelular. Las células HUVECs se cultivaron en medio básico endotelial EBM2 (*Endothelial Basic Medium*; Lonza) suplementado con medio de crecimiento endotelial EGM2 (*Endothelial Growth Medium*; Lonza). Además, el medio fue suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina (Gibco). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO_2 .

Los ensayos se realizaron utilizando endoglina recombinante humana (R&D Systems), que se reconstituyó en PBS con 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés). Los experimentos se realizaron a diferentes concentraciones de endoglina (40 ng/mL, 100 ng/mL o 500 ng/mL) durante 24 horas en medio EBM2/EGM2 con antibióticos y sin FBS (del inglés, *Fetal Bovine Serum*). Posteriormente, se decantaron y centrifugaron los sobrenadantes a la máxima velocidad durante 5 minutos, para eliminar los posibles restos celulares. Sobre este sobrenadante se determinaron los niveles de BMP-4, tal y como se describe en el apartado de "ELISA". Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Eunáte Gallardo-Vara del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid).

3. Análisis de las muestras

3.1. ELISA

El ensayo de inmunoabsorción enzimática o ELISA (del inglés, *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) es un método cuantitativo basado en la detección de un antígeno presente en una muestra usando anticuerpos que, directa o indirectamente, producen una reacción cuantificable espectrofotométricamente (Engvall y Perlmann 1971). En concreto, se ha utilizado un ELISA de tipo *sándwich* directo (Figura 6). Esta técnica se basa en una fase

sólida que contiene inmovilizado un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno de interés. Una vez que el antígeno específico se une al anticuerpo de captura, un segundo anticuerpo monoclonal acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *Horseradish peroxidase*) se une específicamente al antígeno capturado. Esta HRP cataliza la reacción de reducción del sustrato TMB (tetrametilbencidina) en presencia de agua oxigenada, dando lugar a la aparición de un producto soluble y de coloración azul. A los 30 minutos de incubación con el sustrato TMB, se para la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 2N, lo cual provoca un viraje de color del azul al amarillo, siendo este último más estable. El grado de coloración de las muestras se cuantifica mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm. La concentración final se calcula mediante la interpolación en la curva estándar.

En este trabajo se utilizaron una serie de kits de ELISA comerciales que, aun teniendo diferencias internas entre protocolos, siguen la estructura de ELISA anteriormente descrita. Para medir los niveles plasmáticos de endogлина soluble humana se utilizó Human Endoglin/CD105 Quantikine ELISA kit (R&D), para los niveles plasmáticos de BMP-4 de ratón se utilizó el Mouse BMP4 ELISA kit (Life Technologies), y para la determinación de los niveles de BMP-4 humano se utilizó el Human BMP4 Quantikine ELISA kit (R&D). En todos los casos, el ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la lectura de las placas se utilizó un lector de placas ELx808 (BioTek).

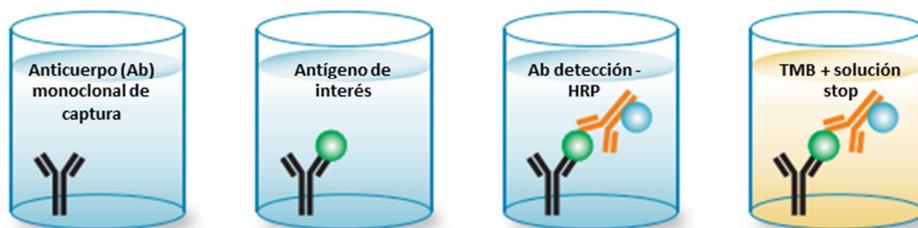


Figura 6. Esquema general del sistema de inmunodetección de proteínas mediante ELISA. Ab: anticuerpo; HRP: Peroxidasa de rábano; TMB: Tetrametilbencidina.

3.2. Hemograma

La cuantificación hematológica se realizó mediante hemograma, utilizando un analizador de hematología ADVIA 120 (Siemens Healthcare Diagnostics) unido a un ordenador para el análisis informático de los resultados. Este análisis se realizó mediante el software Multi-Species System V.3.1.8-MS (Siemens Healthcare Diagnostics).

3.3. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHC) es una técnica histológica que se basa en la utilización de un anticuerpo específico contra un antígeno concreto, que es el objetivo del estudio. Estos anticuerpos pueden estar unidos directamente a HRP, o utilizar anticuerpos secundarios unidos a dicha enzima, lo que permite la visualización de las zonas en las que se encuentra el antígeno.

Para realizar la IHC de BMP-4, se extrajo pulmón, estómago e intestino de animales que sobreexpresan endoglina soluble y de animales control, como ya se ha descrito en el apartado "extracción y procesamiento de órganos". En las 24 horas siguientes a su extracción y fijación en formaldehído al 4%, estos órganos fueron incluidos en parafina, para lo cual se realizó una deshidratación progresiva mediante concentraciones crecientes de etanol (desde 50% a etanol absoluto) y posteriormente en xileno. Una vez deshidratadas las muestras, se incubaron con parafina a 60°C durante 24 horas y posteriormente se dejaron solidificar. Una vez formados los bloques, se tallaron y, con la ayuda de un microtomo, se cortaron en secciones transversales de 2 micrómetros, para posteriormente depositarlos en portaobjetos, donde fueron desparafinados y rehidratados, primero con xileno, y posteriormente con concentraciones decrecientes de etanol (desde etanol absoluto hasta agua destilada). Una vez desparafinados y rehidratados, las muestras fueron teñidas.

Para la tinción con anti-BMP-4 se realizó un desenmascaramiento del epítipo por medio de calor en una solución TRIS-EDTA pH=8. Posteriormente, se incubaron las muestras con un anticuerpo de conejo anti-BMP-4 (R&D) a una dilución 1/100 durante 40 minutos. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo unido a HRP (OmniMap). La presencia del antígeno fue visualizada mediante un kit comercial que utiliza diaminobencidina (DAB, Roche). Como tinción de contraste de la IHC se utilizó hematoxilina. Para ello, se introdujeron las muestras hidratadas en un baño con hematoxilina durante 10 minutos, y después se lavó el exceso de colorante con agua del grifo. Una vez teñidas, las muestras fueron deshidratadas de nuevo con alcoholes y xiloles, para finalmente ser montadas utilizando el medio de montaje DPX.

3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.4.a. PCR semicuantitativa

La PCR semicuantitativa permite determinar la presencia o ausencia de un amplicón específico, además de inferir, *grosso modo*, diferencias entre el patrón de expresión. En este estudio se realizó una PCR semicuantitativa para determinar el genotipado de los ratones y para analizar la presencia de podocitos en la orina. El genotipado de los ratones se realizó a partir de 5 µL de sobrenadante rico en DNA, proveniente de la digestión de las colas de los ratones. Este DNA se incubó con los cebadores (Tabla 5), que amplifican de forma específica el transgen de *ENG*, junto con DNA polimerasa (Biotools), dNTP (Roche) en tampón de reacción, hasta un volumen final de 20 µL. El producto de esta amplificación se utilizó para la electroforesis del genotipado.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tª anill. (°C)	Amplicón (pb)
ENG	Directo (Fw)	GGGGATATCCACCATGGAGA	59,18	365
	Reverso (Rv)	TGCAGGAAGACACTGCTGTTTAC	59,24	
Podocina	Directo (Fw)	TTGGCACATCGATCCCTCAC	60,11	205
	Reverso (Rv)	CAATCACCCGCACTTTGGC	60,08	
Podocalixina	Directo (Fw)	CCACACCACTACAGCCTACG	60	236
	Reverso (Rv)	TGGAGGGCTCCCCTTACAA	57,89	
BMP-4	Directo (Fw)	CGTTACCTCAAGGGAGTGGA	58,74	116
	Reverso (Rv)	ATGCTTGGGACTACGTTTGG	58,18	
18S	Directo (Fw)	CTCAACACGGGAAACCTCAC	58,77	110
	Reverso (Rv)	CGCTCCACCAACTAAGAACG	58,93	

Para determinar la podocituria, analizamos la presencia del mRNA de 3 proteínas características de los podocitos, como son podocina, podocalixina y nefrina. Para llevar a cabo los experimentos, se unificaron en uno todos los pellet obtenidos de la orina de las ratas, tras ser tratadas con sEng. Para la extracción del RNA total se utilizó el kit comercial

NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones de utilización del propio kit. Todo el RNA total fue utilizado para la obtención de cDNA, para lo cual se utilizó el kit *iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR* (Bio-Rad). Por último, se incubaron 2 μ L del cDNA, junto con la polimerasa (Biotools), la mezcla de dNTP (Roche), el tampón de reacción y la pareja de cebadores específica para cada proteína (Tabla 5). Tras esta PCR, se analizó el producto resultante mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Lonza), visualizando las bandas resultantes con un transiluminador (Bio-Rad).

3.4.b. PCR cuantitativa de mRNA (qRT-PCR)

La expresión de BMP-4 inducida por sEng se analizó mediante qRT-PCR (del inglés, *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica molecular permite cuantificar la cantidad de RNA presente en una muestra. Básicamente este ensayo se divide en dos partes: una transcripción reversa (RT) y una amplificación con cebadores específicos (PCR). Es en este segundo paso donde se cuantifica la cantidad de RNA que hay en la muestra analizando la velocidad de aparición amplicones en cada ciclo.

El RNA total de las células fue aislado de los diferentes órganos obtenidos siguiendo el protocolo descrito en el apartado "extracción de órganos". Para ello se utilizaron 30 mg de cada órgano, que fueron homogeneizados mecánicamente, extrayendo y purificando el RNA total mediante el kit RNeasy (Qiagen) según las instrucciones de utilización. Se realizó la retrotranscripción a partir de 1 μ g de RNA con el kit comercial de alta capacidad de retrotranscripción de cDNA *iScript cDNA Synthesis kit* (Bio-Rad), para un volumen final de 20 μ L. El cDNA resultante se utilizó como molde para la posterior PCR cuantitativa a tiempo real, en la que se utilizó SYBR Green como marcaje del DNA de doble cadena completo amplificado y acumulado durante la PCR.

En concreto, se prepararon las muestras en un volumen de reacción de 20 μ L, añadiendo el volumen necesario de cDNA, cebadores (Tabla 5, BMP-4 y 18S) y iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del kit. La reacción fue llevada a cabo en un termociclador "iQ5" (Bio-Rad). Como control interno del experimento (*housekeeping*) se utilizó la expresión del RNA ribosómico 18S de ratón, debido a su abundante expresión y porque sus niveles no se ven influenciados por los mecanismos normales de regulación transcripcional. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, y los resultados se muestran como la media de los experimentos normalizados respecto a los niveles de expresión del RNA ribosómico 18S, mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

La intensidad de la señal de fluorescencia se normalizó teniendo en cuenta la cantidad de producto genético existente. La especificidad de los productos de la PCR se dilucidó observando las curvas de disociación, en las que solo se muestran los productos amplificados.

3.5. Proteinuria

La determinación de la concentración de proteínas en orina se realizó mediante el método de Bradford. Esta técnica utiliza un colorante hidrofóbico (azul brillante de Coomassie G-250) que en disolución, y en presencia de ácido fosfórico, presenta un color pardo, pero que al interactuar con las proteínas, principalmente a residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina, vira a azul intenso, siendo muy fácil de medir. Para llevar a cabo el experimento se pusieron en cada pocillo de una placa de 96, 200 μL de Bradford diluido 1:5, y 10 μL de muestra. A continuación, se midió la absorbancia de la muestra en un lector de placas Epoch (BioTek) a una longitud de onda de 595 nm.

Paralelamente a la determinación de la proteinuria, se determinaron los valores de creatinina en orina mediante el uso de un kit comercial. Este procedimiento se basa en que la creatinina reacciona con iones picrato en un entorno alcalino, dando una coloración rojiza, la cual puede ser medida a 510 nm. El experimento se llevó a cabo según las instrucciones del uso del kit, midiendo la absorbancia a 510 nm nada más poner la reacción, y a los 5 minutos en un lector Epoch (BioTek). El cálculo de los datos se realizó sustrayendo al valor de absorbancia final el valor de absorbancia inicial e interpolando en la recta. Los valores de concentración de creatinina en orina se utilizaron para normalizar los niveles de proteinuria.

4. Estudios ex vivo

4.1. Anillos de aorta

Para llevar a cabo el abordaje de las diferentes hipótesis de este trabajo se realizaron experimentos *ex vivo* de contractilidad con anillos de aorta en baño de órganos. En estos experimentos de contractilidad se utilizó un miógrafo de alambre (DMT) [Figura 7].

Los experimentos de anillos de aorta se realizaron utilizando ratones C57BL/6J estándar. Tras el sacrificio de los animales por decapitación, se procedió a la extracción de la porción torácica de la arteria aorta. Tras la extracción, la aorta se colocó inmediatamente en una

placa Petri que contenía una solución de Krebs (118 mM NaCl; 4,73 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 25 mM NaHCO₃; 1,2 mM MgSO₄; 0,026 mM EDTA; 1,2 mM KH₂PO₄; 11mM glucosa; pH 7,4),

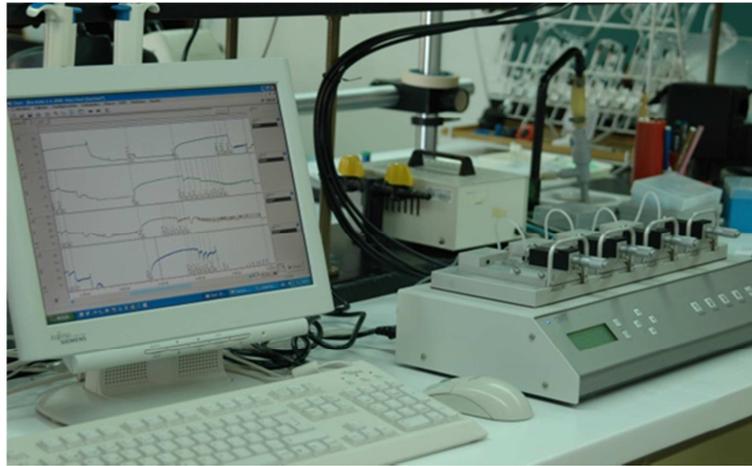


Figura 7. Miógrafo de alambre y Sistema de Multi Miografía 620 M (DMT). Consta de cuatro baños individuales, conectados a un ordenador mediante el que se analizan las curvas de respuesta a través del programa LabChart 7.

todo ello mantenido en frío sobre una bandeja de hielo. Tras eliminar cuidadosamente el tejido conectivo y el tejido graso que recubre el vaso, se cortó la aorta en anillos de 2 mm de longitud (Figura 8A). Esta longitud del anillo viene determinada por el espacio disponible en el miógrafo para la colocación de los anillos.

Para la colocación de los anillos se utilizaron dos finos alambres de acero de 40 micras y se fijó cada uno de ellos a un soporte (Figura 8B). Uno de los soportes estaba fijado a un micrómetro, lo que permitió el control de la tensión aplicada al vaso. El otro soporte estaba unido a un transductor de fuerza para la medición de la contracción.

Cada anillo quedó colocado en un baño que contenía 5 mL de la solución Krebs, que se mantuvo a 37°C y aireada con un flujo constante de carbógeno (95% O₂, 5% CO₂), dejándose estabilizar durante 20 minutos. Posteriormente, se normalizaron los anillos a una tensión de 13,3 kPa (equivalente a 100 mmHg), y a partir de este punto se sometieron a una tensión adicional de 5 mN (milinewtons), dejándolos estabilizar durante 20 minutos, y ajustando la tensión siempre que era necesario.

Tras el periodo de estabilización, se comprobó la funcionalidad de los anillos mediante la contracción producida como respuesta a potasio. Para ello, se cambió el medio Krebs por una solución hiperpotásica (se sustituyó el sodio del Krebs por 120 mM potasio), y se dejó

incubar durante 10 minutos, tiempo en el cual se produce contracción del vaso hasta alcanzar una meseta. Una vez alcanzada la fase meseta, los anillos se lavaron repetidamente con solución Krebs normal. Este procedimiento se repitió tras un periodo de 15 minutos (tiempo que tarda aproximadamente un anillo en recuperar su tensión basal).

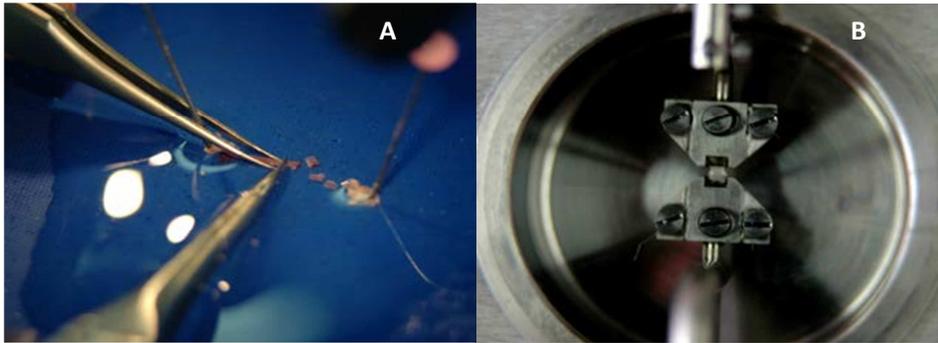


Figura 8. Estudio de vasomotricidad con anillos aórticos. A) preparación de los anillos de aorta de 2 mm de longitud. B) Colocación de cada anillo individual en los soportes, a los que se fijan con alambres de acero inoxidable de 40 micras. Estos soportes, a su vez, están conectados a un micrómetro y a un transductor de fuerza

Para analizar el efecto de sEng, los anillos se incubaron con endoglina recombinante humana (R&D) a una concentración de 250 ng/mL (4,1 μ M) durante 20 minutos. Además, sobre anillos incubados con sEng, se midió la respuesta a potasio (solución hiperpotásica) y se hicieron curvas de contracción con fenilefrina (PE) (desde 10^{-8} a 10^{-4} M) y curvas de relajación con nitroprusiato (NTP) (concentraciones de NTP desde 10^{-8} a 10^{-4} M, en anillos pre-contráidos con 10^{-6} M PE). También se realizó la curva de relajación con acetilcolina (Ach) (desde 10^{-8} a 10^{-4} M).

Los resultados se expresan como curva dosis-respuesta, calculados en porcentajes, y también como la concentración efectiva 50 (EC50, del inglés *effective concentration 50*). En todos los casos, se representaron los valores de la media aritmética y el error estándar de la media.

5. Estudios *in vivo*

5.1. Medida de presión arterial en la cola

El incremento de presión arterial (PA) es una de las manifestaciones clínicas más claras y características de la preeclampsia. Debido a ello, en este trabajo hemos querido evaluar la relación de la endoglina soluble con la presión arterial.

Para determinar la presión arterial se recurrió al método de medida de la presión arterial en cola por pletismografía. Este es un método simple, reproducible y no traumático para el animal, a la vez que permite la toma de las medidas con el animal despierto. Como inconveniente principal destacamos que, para que la toma de medidas por este método sea correcta y precisa, es necesario habituar al animal a este tipo de manipulación.

Esta técnica es muy similar a la utilizada para medir la presión arterial de los pacientes en la clínica. El fundamento de esta técnica se basa en ocluir la arteria caudal mediante compresión y detectar los ruidos de Korotkoff a medida que la presión de compresión disminuye (Whitesall y cols. 2004).

Esta técnica implica un periodo de acostumbramiento de los animales durante varios días de forma previa a las medidas definitivas. Este acostumbramiento reduce el estrés que genera tanto el cepo, como la compresión de la cola, mejorando la calidad de las medidas tomadas.

Una vez realizado el acostumbramiento, se mide la PA al menos en 3 días diferentes, tomando en cada uno de los días más de 10 medidas correctas. La toma de las medidas se realizó siempre a la misma hora (entre las 9 y las 12 de la mañana), en una habitación oscura, aislada de ruido y con temperatura constante, con el fin de evitar que tanto factores externos como factores circadianos puedan alterar las mediciones.

Para llevar a cabo la toma de medidas es necesario favorecer previamente la dilatación y la circulación de la sangre a través de la arteria caudal. Para ello, los animales son expuestos a una fuente de calor moderado durante un periodo de entre 10 y 15 minutos. A continuación, se sitúa al animal dentro de un cepo apropiado a su tamaño (Figura 9B), que mantiene sujeto al animal, a la vez que deja libre la cola para colocar el manguito y el sensor. El cepo con el animal se coloca bajo una fuente de calor moderado (unos 38 grados

centígrados), que evita la pérdida de temperatura y favorece el mantenimiento del flujo sanguíneo caudal.

La técnica fue llevada a cabo mediante el uso de un equipo NIPREM 645 (Cibertec) (Figura 9A), que consta de dos partes dentro del mismo aparato:

- Una bomba neumática, que es la que aporta la presión al manguito. El incremento de la presión para la toma de la medida precisa de la intervención del usuario, mientras que el desinflado es automático. El usuario puede establecer también la presión máxima que alcanza la bomba o abortar la toma de medida.
- Un transductor, que lleva conectado un sensor por infrarrojos. Este transductor convierte las señales mecánicas registradas por el sensor, en señales eléctricas.

Este equipo está conectado a un ordenador, al cual le envía información constante tanto de la presión del manguito como de las señales del sensor por infrarrojos, que analiza las señales mediante un software específico (Sistema Computerizado PowerLab/800 para Windows, Cibertec S.A) (Figura 9A). Esto permite la monitorización en "tiempo real" de la presión y del flujo, y facilita la determinación de la presión arterial.



Figura 9. Equipo NIPREM 1.5. y ratón en el cepo de medida. A) sistema computerizado PowerLab/800 para Windows (Cibertec S.A) que permite la monitorización y obtención de valores de PAS y de FC. B) Imagen de un ratón durante el periodo de acostumbramiento en el cepo.

Las señales detectadas por el sensor son mostradas en el ordenador como un patrón gráfico (Figura 10), lo que permite discernir entre qué es señal de pulso y que es ruido de fondo, producido por movimientos del animal. Una vez obtenida una señal de pulso adecuada, se hincha el manguito neumático hasta la oclusión total de la arteria, lo cual se representa gráficamente por una pérdida de la señal de pulso. Una vez alcanzada la presión

máxima (Figura 10A), la bomba neumática va disminuyendo paulatinamente la presión del manguito hasta valores de presión muy bajos. En ese momento, el usuario debe acudir a los gráficos para ver en qué punto se recupera la señal (Figura 10B) y la presión del sistema en ese momento, que se corresponde con la presión arterial sistólica (PAS) (Figura 10C).

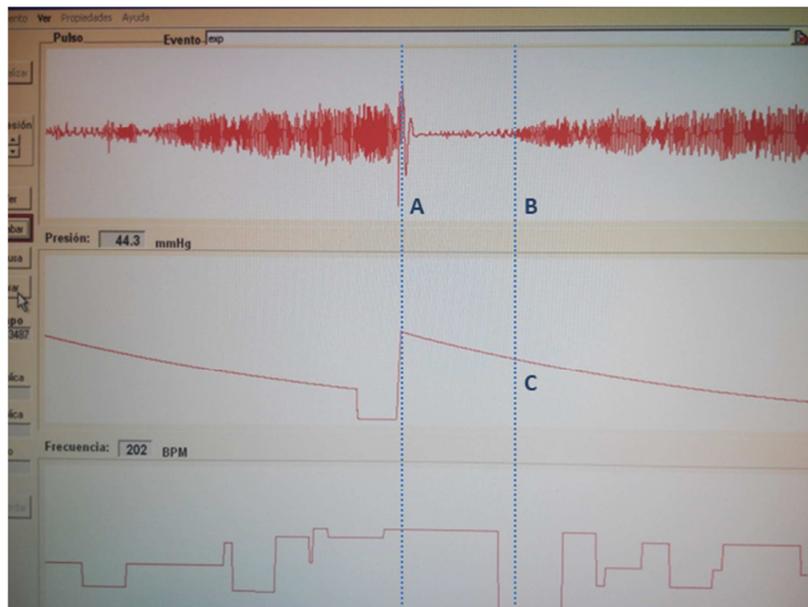


Figura 10. Imagen de la pantalla de registro de presión medida en cola. Se especifican cada uno de los pasos: A) oclusión de la arteria a través del manguito neumático; B) aparición de la onda de pulso a medida que disminuye la presión que ejerce el manguito; y C) la presión neumática medida en el punto de aparición de la onda de pulso se corresponde con la presión arterial sistólica.

5.2. Tiempo de sangrado

El tiempo de sangrado o *bleeding time* es una técnica habitual en los estudios de función plaquetaria y hemostasia.

Para realizar el experimento, el animal se anestesió por inhalación, colocándolo sobre una tabla termostatzada, en posición *decúbito prono* y de tal manera que la cola del animal colgara libre fuera de dicha tabla. La tabla fue colocada a unos 15 cm sobre la superficie de la poyata para facilitar la visualización y toma de datos.

Una vez colocado y anestesiado el animal, se seccionó una pequeña porción de la cola del animal con un diámetro de 0,8 mm de sección. Inmediatamente se introdujo la cola en

un tubo Falcon de 15 mL con suero salino y a una temperatura de 37°C, de tal manera que una porción de 2-3 cm de la cola quedaran sumergidos.

Durante 30 minutos, contados desde el momento que se introduce la cola, se va registrando tanto el tiempo como el grado de sangrado. Para ello, y de forma previa al experimento, se estableció una escala de valoración cualitativa en 6 niveles, que iban desde el 0 para la ausencia de flujo, hasta el valor 5 para un flujo masivo de sangre, característico de los primeros instantes tras el corte. En el tiempo que dura la prueba, se registra cualquier cambio de flujo y el momento en el que ocurre.

Con el propósito de preservar la salud y el bienestar del animal, se tomó como medida de seguridad que, si el tiempo de sangrado y el flujo de sangre era muy alto y mantenido en el tiempo, el experimento se daba por finalizado, fuera cual fuere el tiempo de experimento transcurrido.

Una vez finalizado el experimento, se extrajo la cola del animal, se secó y se presionó el extremo de la cola durante 5 minutos, manteniéndola por encima del plano del animal, facilitando así el proceso de hemostasia.

Para el análisis de los datos se contabilizó tanto el tiempo total de sangrado, como la puntuación de sangrado. Para el cálculo de la puntuación de sangrado se sumó el valor cualitativo dado al flujo en cada segundo del experimento.

5.3. Tiempo de protrombina

Para llevar a cabo la medición del tiempo de protrombina se usó un coagulómetro (Alere) con tiras reactivas específicas para la medición del TP e INR (Alere). Para la extracción de sangre, se realizó una punción submaxilar, extrayendo 2-3 gotas de sangre, que se depositaron directamente sobre una tira reactiva colocada en el coagulómetro.

5.4. Trombocitopenia inducida por colágeno/adrenalina

Para llevar a cabo este experimento, los animales fueron sometidos a anestesia inhalatoria, colocándolos sobre una tabla termostaticada. Siguiendo el protocolo descrito para la "extracción de sangre de la yugular", se practicaron dos incisiones, una por cada yugular. Se extrajeron unos 150-200 µL de sangre, a través de una de ellas, con ayuda de una cánula. A continuación, se inyectó una solución con colágeno (150 µg/kg de peso,

Chorno-log) y adrenalina (50 µg/kg de peso, Sigma-Aldrich). Pasados 3 minutos, se extrajo sangre de la otra yugular, utilizando otra cánula. Ambas muestras de sangre fueron depositadas en tubo Eppendorf, utilizando EDTA como anticoagulante.

Posteriormente, las muestras de sangre fueron analizadas con el hemocitómetro, siguiendo el protocolo descrito en el apartado "hemocitómetro".

5.5. Oclusión de la carótida producida por cloruro férrico

Esta técnica se realizó con los animales anestesiados de forma inhalatoria. Una vez alcanzado el plano de anestesia óptimo, se practicó una incisión de unos 3 cm de longitud en la zona medial del cuello. Con la ayuda de una lupa binocular, y tomando la tráquea como referencia, se fueron apartando las glándulas salivares y desgarrando el tejido conectivo mediante el uso de pinzas hasta localizar la carótida. Una vez localizada, se aisló la carótida del nervio vago, además de todo el tejido conectivo que se pudo, dejando el vaso lo más limpio posible.

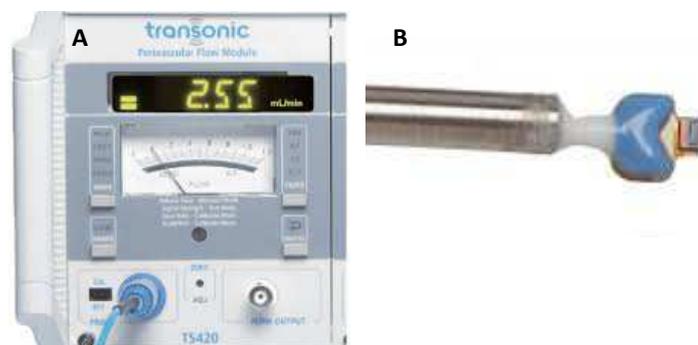


Figura 11. Equipo utilizado para la medición del flujo. A) Medidor de flujo. B) Sonda de medición de flujo. Transonic Systems.

La carótida se colocó en una sonda especial (Transonic Systems) (Figura 11B) unida a un medidor de flujo (Transonic Systems) (Figura 11A), utilizando un adaptador de plástico para mantener completamente aislado el vaso del resto del cuello (Figura 12A). Con el fin de mejorar la medición de la sonda, se puso gel ecográfico (Lessa) y nos aseguramos que había un flujo de sangre superior a 0,8 mL/min mantenido en el tiempo, antes de iniciar el experimento propiamente dicho. Se colocó sobre la superficie de la carótida un papel de filtro de 1x2 mm embebido en una solución de cloruro férrico al 7,5% y, transcurrido un minuto y medio, se cambió el papel por otro nuevo en las mismas condiciones

anteriormente descritas (Figura 11B). Tras otro minuto y medio se retiró el segundo papel y se pusieron unas gotas de suero salino, para prevenir la deshidratación y la pérdida de señal. A continuación, se dejó correr la prueba durante 30 minutos, recogiendo los datos de forma continua en un ordenador conectado al medidor de flujo. Los datos fueron registrados y procesados con el software *Chart 5 for Windows*.

Para el análisis de los resultados, los datos fueron normalizados y expresados en porcentaje. Así, se estableció la apertura total (100%) como el promedio de los 100 primeros segundos de experimento. A partir de aquí, se calculó el porcentaje de apertura en cada momento del experimento. También se consideró como cierre total todos aquellos datos de flujo inferiores al 10% de la apertura total.

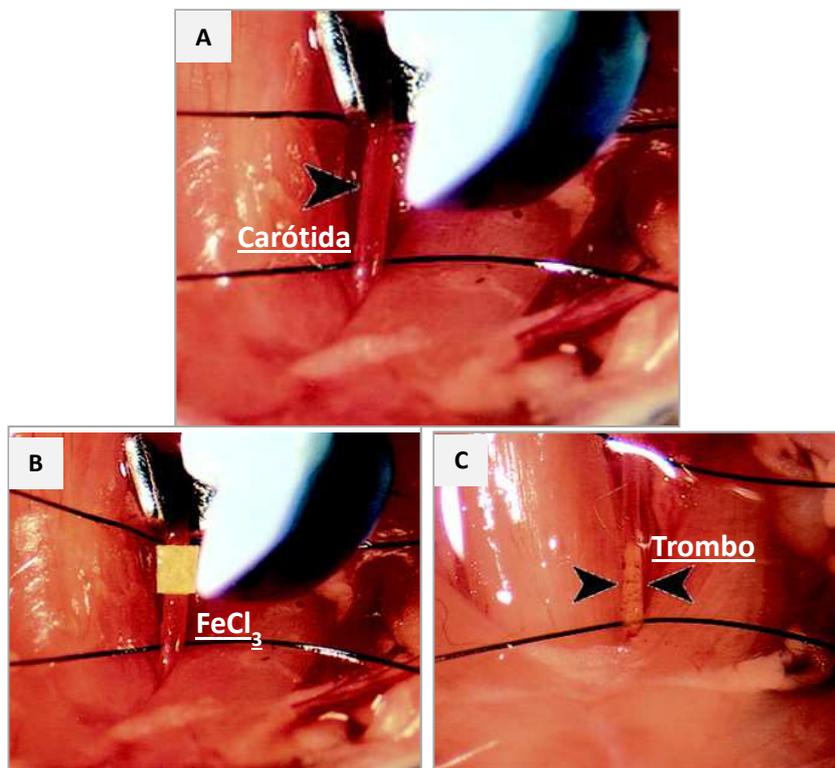


Figura 12. Progresión de la formación del trombo inducido por cloruro férrico. A) Colocación de la carótida aislada dentro de la sonda. B) Colocación de los apósitos con cloruro férrico 7,5%. C) Apariencia de la carótida y del trombo una vez estabilizado.

5.6. Perfusión continua de noggin: bomba osmótica.

Las bombas osmóticas son pequeños módulos capaces de liberar una determinada solución de forma estable y continuada. Estas bombas utilizan el incremento de presión

interna, debida a la captación de agua desde el medio, para liberar una solución previamente cargada en la bomba.

En nuestro experimento se utilizaron micro bombas Alzet mod.2001, que garantizan un flujo constante de 1 μL /hora durante 7 días. Se estableció una dosis de 1 μg de noggin por hora y kilo de peso del animal, preparando la solución específica según el peso de cada animal. Esta solución fue cargada en cada bomba con ayuda de una jeringuilla y una aguja especial, según determinaban las instrucciones del producto.

Para implantar la bomba, se anestesiaron los animales de forma inhalatoria, hasta alcanzar el plano de anestesia adecuado. Se depiló y desinfectó una pequeña área del abdomen, sobre la cual se practicó una incisión en la piel de unos 2 cm de largo. Con la ayuda de unas tijeras romas, se preparó un pequeño bolsillo por debajo de la piel donde se alojó la bomba (Figura 13B). Por último, se suturó con sutura no absorbible (5-0) y se aplicó el desinfectante betadine sobre la herida (Figura 13C).

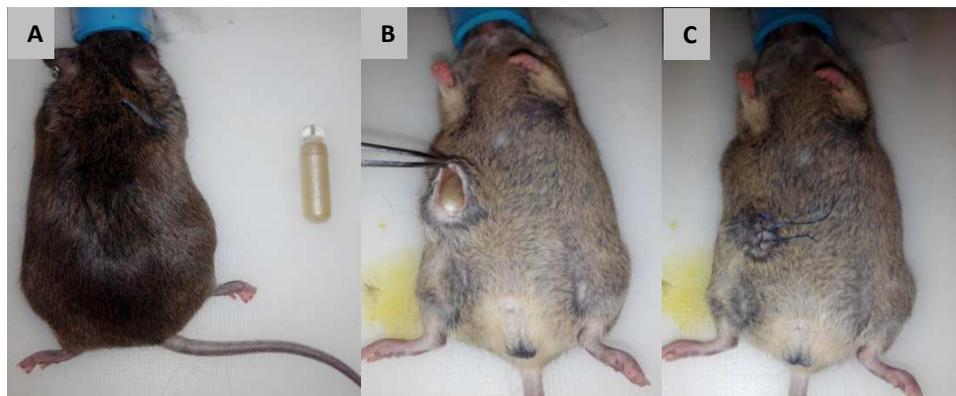


Figura 13. Proceso de implantación de la bomba osmótica con noggin. A) tamaño relativo de la bomba osmótica cargada respecto al tamaño corporal del ratón. B) Tras realizar una pequeña incisión y separar la piel, se coloca la bomba. C) Una vez colocada la bomba, se sutura la herida.

5.7. Análisis de la permeabilidad de la vasculatura de la retina

Para llevar a cabo estos experimentos, se accedió y canuló la vena yugular del ratón de la misma forma descrita para la extracción de sangre. A través de la cánula se perfundieron 200 μL de una solución de dextrano de 2.000 kDa de peso molecular, marcado con isotiocianato fluoresceína (FITC-dextrano) (Sigma-Aldrich), a razón de 100 mg de FITC-dextrano por kilo de peso del animal. Una vez infundido el dextrano, se retiró la cánula y se

suturó la herida. Se retiró la anestesia inhalatoria al animal y se le dejó una hora para que el FITC-dextrano pudiera circular y perfundir libremente.

Pasado este tiempo, se sacrificó al animal por dislocación cervical para posteriormente extraer los ojos de las cuencas oculares mediante la utilización de fórceps. Los ojos fueron introducidos inmediatamente en paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos a temperatura ambiente, fijando así las estructuras oculares. Transcurrido ese tiempo, se pasaron los ojos a PBS 2X durante al menos una hora a temperatura ambiente, para hidratar bien todas las estructuras y para que sea más fácil la separación del tejido.

Posteriormente, se aislaron las retinas mediante el protocolo descrito previamente (Tual-Chalot y cols. 2013). Bajo la lupa y con la ayuda de fórceps de microcirugía (F.S.T.), se limpia el globo ocular de todo el músculo y tejidos anejos al ojo, pero no el nervio óptico, el cual se usa para poder manipular el ojo sin dañar el globo ocular. Una vez limpio, y con la ayuda de unas tijeras de microcirugía (Fine Science Tools GmbH, Alemania), se seccionó el ojo por el plano frontal/coronal, desechando la mitad anterior. Con sumo cuidado, se separó la retina de la coroides, cortando con cuidado el nervio óptico en el último momento. Esto dejó una retina en forma cóncava y libre, por lo que se transfirió a un portaobjetos, donde se le practicaron una serie de cortes para que quedara en forma plana. Por último, se puso *prolong antifade* (Invitrogen) como líquido de montaje y se cubrió con un cubreobjetos.

Las retinas fueron evaluadas mediante análisis de imagen. Para ello, se hizo un barrido por toda la muestra, y se tomaron imágenes a x10 aumentos con un microscopio de fluorescencia Axiovert 200M (Carl Zeiss), utilizando la longitud de onda de 488 nm como fuente de excitación del fluorocromo. Una vez obtenidas todas las imágenes, se realizó el montaje correspondiente.

El análisis de cada una de las imágenes obtenidas se realizó mediante el software *Fiji*. Para llevar a cabo este análisis, se hicieron una serie de transformaciones genéricas, como la reducción de canales exclusivamente al canal verde, una reducción de las imágenes al 25%, eliminación del ruido de fondo y delimitación del área del área total de la retina. Una vez realizadas estas modificaciones, se empleó una máscara de selección mediante la utilización de la herramienta *umbral* ("*threshold*"), la cual diferencia y delimita zonas de diversa intensidad. Esta máscara se correspondió con los vasos de la retina. Cuando se identificaron exactamente los vasos sanguíneos, diferenciándolos de aquellas estructuras que no lo eran,

se realizó una segunda máscara que permitió delimitar todas las zonas de extravasación, que son zonas de menor intensidad que los vasos pero sensiblemente superiores al fondo. Por último, se midieron el área e intensidad de las 3 máscaras: retina total, vasos y extravasación.

Sobre las imágenes obtenidas, y utilizando las máscaras generadas, se calcularon una serie de parámetros:

Se calcularon los valores del área total de cada retina, puesto que este parámetro variaba debido a la manipulación (punto de corte, áreas plegadas...). También se valoró el área total de vasos (áreas delimitadas de gran intensidad de señal) y el área total de extravasaciones (áreas con fluorescencia de baja intensidad, pero debida al FITC y fuera del área de los vasos) para cada retina. Estos resultados se expresaron como número de píxeles.

Para el cálculo de la intensidad de señal se midió la densidad óptica integrada y se determinó tanto para la retina completa como para los vasos y para las extravasaciones.

5.8. Tratamiento de los datos y análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como la media aritmética \pm el error estándar de la media (EEM). En la experimentación *in vivo* se utilizaron un mínimo de 6 animales para cada grupo, siempre que fue posible. En los ensayos *ex vivo* se utilizaron un mínimo de 3 anillos para cada condición, mientras que en los ensayos *in vitro* se realizaron al menos 3 experimentos.

Todos los resultados obtenidos fueron introducidos en Microsoft Excel 2016 y en el paquete estadístico GraphPad Prism, en sus versiones 5.01 y 6.01, para su análisis estadístico y la realización de gráficos.

Se fijó como límite de la significación estadística en $p \leq 0,05$ para todos los test estadísticos.

El ajuste de los conjuntos de datos a una distribución gaussiana fue analizado mediante el test de normalidad de D'Agostino-Pearon para todos aquellos conjuntos de datos superiores a 8, y el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para aquellos conjuntos de datos inferiores.

Para la comparación de dos variables cuantitativas se utilizó el t-Student para variables paramétricas, mientras que las no paramétricas fueron comparadas mediante el test u-Mann-Whitney. Para la comparación de variables cuantitativas paramétricas con más de dos grupos se utilizó el test estadístico de análisis de la varianza (ANOVA), empleando el test de Dunnett para las comparaciones "post hoc", mientras que para las no paramétricas se empleó el test de Kruskal-Wallis, con el test de Dunn's como "post hoc".

Se utilizó ANOVA de doble vía para comparar variables cuantitativas afectas por dos factores o variables de clasificación, utilizando el test de Tukey como post-test.

La bondad de ajuste de los datos observados respecto a los esperados se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher.

Tabla 6. Relación de productos y reactivos utilizados

Producto	Nombre comercial	Referencia	Casa comercial
Agarosa	SeaKem LE Agarose	50000	Lonza
Aguja 19 gauges (19 G)	Sterican 19Gx1 1/2" - 1,1x40mm marfil	4657799	Braun
Aguja 23 gauges (23 G)	Sterican 23Gx1" - 0,6x25mm azul	4657667	Braun
Aguja 25 gauges (25 G)	Sterican 25Gx5/8" - 0,5x16mm naranja	4657853	Braun
Albúmina sérica bovina (BSA)	Bovine Serum Albumin	A7906	Sigma-Aldrich
Anticuerpo anti-BMP4 IHC	Mouse BMP-4 Antibody	MAB5020	R&D Systems
Anticuerpo Anti-Rabbit-HRP	DISCOVERY OmniMap anti-Rb HRP	760-4311	Omnimap
Antifade	ProLong Gold Antifade Mountant	P10144	Invitrogen
Bomba osmótica	Alzet Osmotic Pump Mod.2001	292	Alzet
Buprenorfina	Buprex inyectable 0.3 mg	961425	Indivior
Cloruro férrico	Iron (III) chloride	451649	Sigma Aldrich
Cloruro sódico	Sodium chloride	S3014	Sigma-Aldrich
Colágeno	CHRONO-PAR COLLAGEN	P/N 385	Chrono-log
Cubreobjetos (22x22)	COVN-022-200 Cover Glass	13835	Labbox
DNA polimerasa	DNA Polimerasa 1 U/μl	10003-4101	Biotools

dNTP	dNTP mix 10 mM	11277049001	Roche
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate	E5134	Sigma-Aldrich
Endoglina recombinante	Recombinant Human Endoglin/CD105 Protein	EN-1097	R&D Systems
Adrenalina (coagulación)	Epinephrine hydrochloride	E4642	Sigma-Aldrich
FITC-dextrano (2000 kDa)	Fluorescein isothiocyanate-dextran	FD2000S	Sigma-Aldrich
Gel ecográfico	Quick-Eco Gel	99.800.20	Lessa
Isoflorano	IsoFlo	34009XN	Esteve Veterinaria
Jeringa 1 mL	Jeringa Omnifix tuberculina 1 mL sin aguja	9161406V	Braun
Kit ELISA BMP-4 humano	Human BMP-4 Quantikine ELISA Kit	DBP400	R&D Systems
Kit ELISA BMP-4 Ratón	Mouse BMP4 ELISA Kit	LS-F13543	Life Technologies
Kit ELISA Endoglina humana	Human Endoglin/CD105 Quantikine ELISA Kit	DNDG00	R&D Systems
Kit extracción RNA (BMP-4)	RNeasy Mini Kit (50)	74104	Qiagen
Kit extracción RNA (podocitos)	NucleoSpin RNA XS	740902.50	Macherey-Nagel
Kit Retrotranscriptasa (BMP-4)	iScript cDNA Synthesis	1708891	Bio-Rad
Kit Retrotranscriptasa (podocitos)	iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR	1708841	Bio-Rad

Kit revelado DAB IHC	DISCOVERY ChromoMap DAB Kit	760-159	Roche
Marcador DNA (1 Kilobase)	1 Kb Plus DNA Ladder	10787-018	Thermo Fisher Scientific
Mastermix para q-PCR	iQ SyBR-Green Supermix	1708880	Bio-Rad
Material quirúrgico	-	-	Fine Science Tools (F.S.T)
Medio de cultivo EBM2/EGM2	EGM-2 BulletKit (CC-3156 & CC-4176)	CC-3162	Lonza
Noggin	Murine Noggin	250-38	PeproTech
Paraformaldehído (PFA)	Paraformaldehyde	P6148	Sigma-Aldrich
Pentobarbital sódico	Dolethal	570681.8	Vetoquinol
Placas de cultivo	-	-	Corning
Portaobjetos	Thermo Scientific / Menzel-Gläser Portaobjetos	5161110	Thermo Fisher Scientific
Proteinasa K	Proteinase K, recombinant, PCR Grade	3115879001	Roche
Sutura 5/0 no absorbible	Sutura 5/0 aguja ½ circulo redonda	06185	Aragó
Sutura 5/0 absorbible	Sutura 5/0 aguja ½ circulo redonda	47002	Aragó
Tiras reactivas TP/INR	Alere INRatio®PT/INR Test Strips	#0100139	Alere

Tabla 7. Relación de aparatos utilizados

Equipos/aparatos	Casa comercial
Analizador de hematología ADVIA 120	Siemens Healthcare Diagnostics
Campana de flujo laminar vertical Gelarie TC-48	Flow Laboratories
Centrífugas	Eppendorf
Equipo Electroforesis PCR	Bio-Rad
Fuente de alimentación Power Pac 3000	Bio-Rad
Incubador de células Forma Scientific 3111	Thermo Fisher Scientific
Lector de placas ELISA Epoch	Bio Tek
Lupa	Nikon
Máquina de anestesia inhalatoria	MSS Isoflurane
Medidor de flujo	Transonic Systems
Medición de PA Niprem 1.5 (PowerLab/800 para Windows)	Cibertec
Microscopio de fluorescencia Axiovert 200M	Carl Zeiss
Sonda de medición de flujo	Transonic Systems

Miógrafo de alambre (Multiwire Myograph System, Model 620M)	DMT
Nanodrop (ND-1000)	Thermo Fisher Scientific
Termociclador iQ™5	Bio-Rad
Termociclador MyCycler™	Bio-Rad
Transiluminador GelDoc	Bio-Rad
Ultracongelador	Thermo Fisher Scientific

Resultados

"La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos, tarde o temprano, siempre se aplican."

Severo Ochoa

1. Descripción general de la línea de ratones

Para abordar el estudio del papel que endoglina soluble juega en preeclampsia se utilizó un modelo murino en el cual se sobreexpresa endoglina soluble humana de forma ubicua, sobre un fondo genético híbrido (ratones sEng). Además, se utilizaron los hermanos de camada que no portan el transgen como animales control o wild type (WT) (Figura 14).

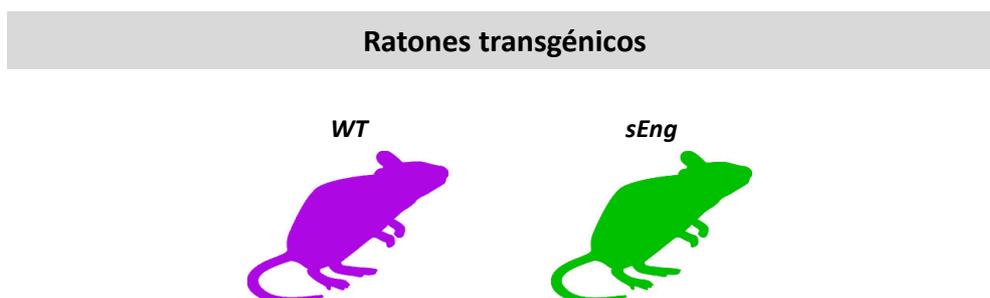


Figura 14. Modelo animal utilizado en el trabajo. Animales utilizados para llevar a cabo este estudio, marcados con el código de colores empleado. WT, como controles, y sEng, que sobreexpresan endoglina soluble humana, como ratones problema.

Los animales transgénicos para endoglina soluble humana presentan niveles muy variables de expresión de sEng en plasma. Por esta razón se hizo necesario medir los niveles plasmáticos de sEng. Los niveles de sEng en plasma fueron medidos mediante un kit de ELISA específico para endoglina soluble humana, que es la que sobreexpresan estos animales. Los niveles promedio de sEng en los animales problema se situaron en torno a 1600 ng/mL, mientras que los ratones WT no presentaban sEng en su plasma (Figura 15). Se estableció un umbral mínimo de 1000 ng/mL de sEng en plasma para que los animales fueran incluidos en el grupo de estudio.

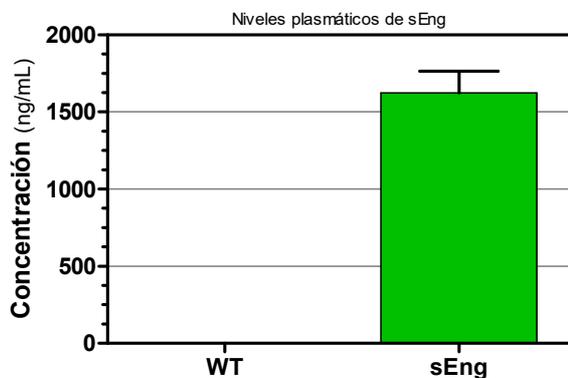


Figura 15. Fenotipado de los ratones utilizados en el estudio. Niveles plasmáticos de endoglina soluble humana presente en los animales WT y sEng utilizados en este estudio. N=35 para ambos genotipos. Se representa la media y el error estándar de la media.

Una vez comprobado que el transgen se heredaba y que se expresaba en la descendencia, se quiso comprobar que la presencia del transgen no alteraba las características generales de los animales. Para ello se pesaron ratones adultos de ambos sexos, con el fin de analizar si había diferencias en el tamaño entre ambos genotipos. Los valores que se obtuvieron en ambos genotipos fueron muy similares (Figura 16A). Otro de los parámetros que se analizó fue el tamaño promedio de las camadas. Para ello se comparó el tamaño de las camadas alumbradas por hembras híbridas, tras haber sido cruzadas con machos WT o sEng. Observamos que el tamaño promedio de las camadas era prácticamente igual, con independencia del genotipo del macho parental, situándose en torno a 6 crías nacidas en cada camada (Figura 16C). Por otra parte, se quiso contabilizar cual era la composición de las camadas en cuanto al sexo de las crías, y si esto se veía influenciado por el genotipo del macho. Para ello se contabilizaron el número de machos y de hembras que componían un total de 25 camadas para cada genotipo paterno, calculando el tanto por ciento de cada sexo. El porcentaje de machos y de hembras fue aproximadamente del 50%, independientemente del genotipo parental (Figura 16B). Por último, quisimos analizar en la descendencia obtenida con machos sEng, el porcentaje de las crías nacidas que presentaban el transgen, y si existía paridad entre sexos. Como se puede comprobar en la Figura 16D, el porcentaje de animales de genotipo híbrido fue de un 30% aproximadamente, con independencia del sexo de la cría. Todos estos resultados mostraban que los animales sEng presentaban gran uniformidad tanto en la transmisión del gen, como en las características generales, al ser comparados con los animales WT. Estas características nos permiten comparar los resultados obtenidos en ambos genotipos y relacionar las posibles diferencias únicamente con los niveles de sEng, y no con otras posibles alteraciones genéticas debidas a la presencia del transgen.

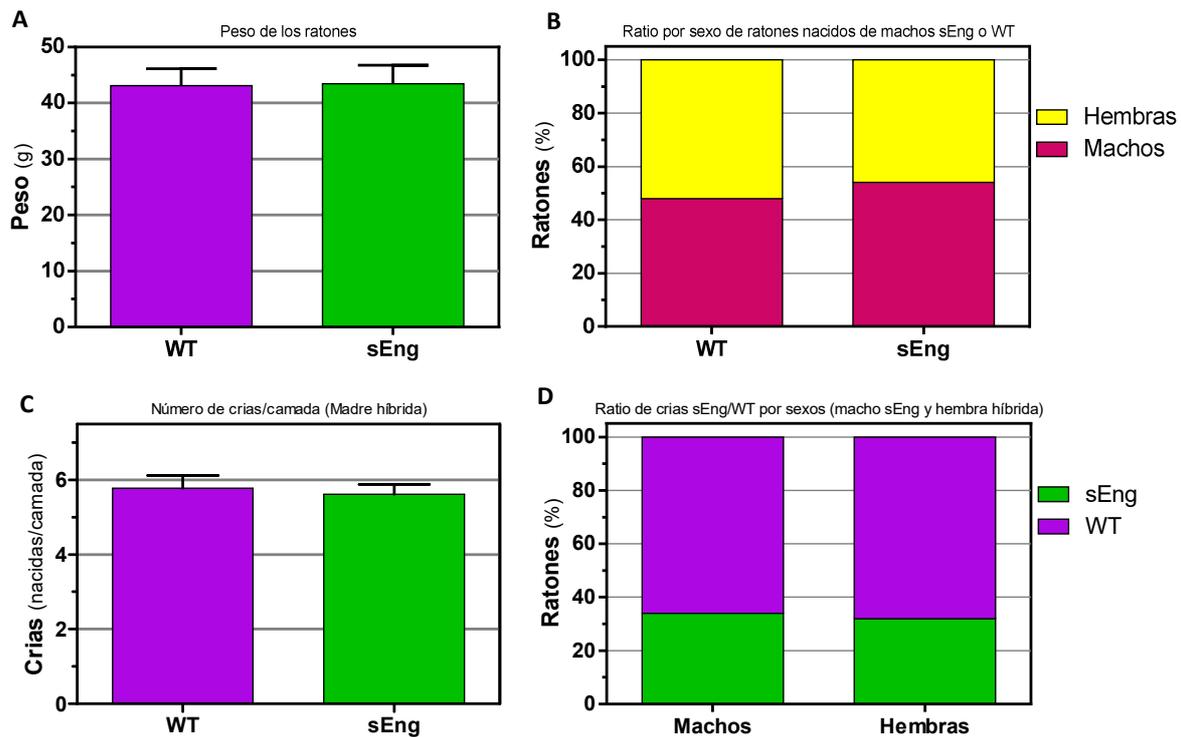


Figura 16. Caracterización general de los ratones utilizados en este estudio. A) Peso de los animales WT y sEng en edad adulta. N: WT=11, sEng=10. B) Número de crías nacidas en cada camada, separadas por el genotipo del padre (WT o sEng). Las madres son genotipo híbrido. N= 47 camadas WT y 63 camadas sEng. C) Porcentaje de animales de cada sexo nacido y destetado. Se representa en porcentajes, separados por sexo y por el genotipo del padre (WT o sEng). La madre es siempre genotipo híbrido. N= 25 camadas por genotipo del padre. D) Porcentaje de crías de cada genotipo, separado por sexos, al cruzar machos sEng y hembras híbridas. N=25 camadas. En **A** y **B** se representa la media y el error estándar de la media, comparados mediante t-Student para muestras no pareadas. Los valores en **C** y **D** se representan en porcentajes, comparados mediante prueba exacta de Fisher.

2. Síntomas de la preeclampsia y el papel de endoglina soluble

El objetivo general de este trabajo es determinar qué papel juega la sEng en los diferentes síntomas y manifestaciones clínicas de la preeclampsia.

2.1. Efecto de la endoglina soluble sobre la proteinuria y podocituria

Como ya se ha descrito en la Introducción, uno de los principales síntomas clínicos que permiten el diagnóstico de la preeclampsia es la aparición de proteinuria durante el tercer trimestre de la gestación (The American College of Obstetricians and Gynecologists y cols.

2013). El establecimiento de la proteinuria se ha asociado a una pérdida de podocitos, que se eliminan con la orina, con la consecuente alteración de la filtración del glomérulo. Esta podocituria ha demostrado ser un marcador más sensible y específico que la propia proteinuria (Garovic y cols. 2007b).

Es bien conocido que las integrinas juegan un importante papel en la unión entre los podocitos y la membrana basal glomerular. Puesto que sEng presenta un dominio de unión a integrinas, nos planteamos la hipótesis de que sEng pudiera competir con otras proteínas de la membrana basal en su unión a integrinas, desestabilizando así la unión y produciendo la liberación de los podocitos.

Para comprobar si sEng es capaz de realizar este efecto de forma directa, se decidió analizar los efectos del tratamiento agudo con sEng sobre la podocituria y la proteinuria. Debido a limitaciones experimentales, este experimento se llevó a cabo en ratas Wistar, debido a que los ratones presentan un flujo urinario muy bajo y no se obtiene suficiente cantidad de orina para llevar a cabo las determinaciones.

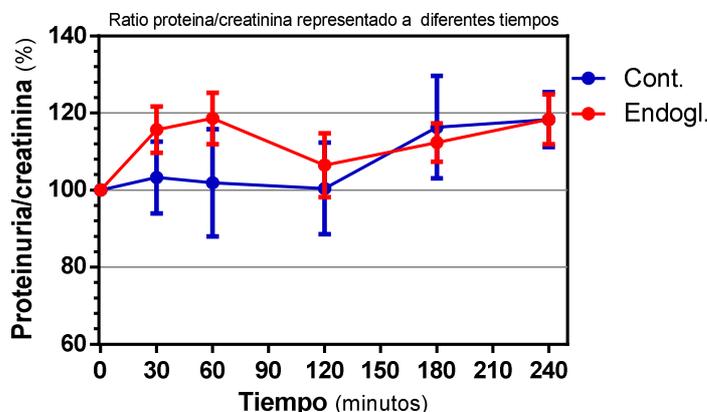


Figura 17. Proteinuria inducida por endoglina soluble. Evolución del cociente proteinuria/creatinina a diferentes tiempos. N= 6 con vehículo y 7 con endoglina. Se representa la media y el error estándar de la media, comparando los resultados mediante ANOVA.

Se inocularon dos bolos de endoglina (a 0 y 30 minutos), y se obtuvieron muestras de orina a diferentes tiempos: una muestra basal, otra muestra desde el minuto 0 al minuto 30, otras muestras del minuto 30 al 60, del 60 al 120, del 120 a 180, y una última, de 180 a 240. Estas muestras se centrifugaron para separar las células (pellet) de la fase acuosa. Sobre la fase acuosa se midieron las concentraciones de proteínas en orina a los diferentes tiempos.

Además, se midieron los niveles de creatinina, con el objetivo de normalizar los niveles de proteinuria respecto a la excreción de creatinina. El cociente proteinuria/creatinina obtenidos para cada tiempo se normalizó frente a la ratio basal de cada animal y se representó su evolución a lo largo del tiempo. Al analizar la evolución del cociente proteinuria/creatinina no se observaron diferencias significativas entre la proteinuria de los animales a los que se les había administrado endoglina y los animales control (Figura 17). Aun así, en las ratas tratadas con endoglina soluble, se observó un ligero incremento en el cociente proteinuria/creatinina en los tiempos 30 y 60 minutos, que posteriormente revertía a los valores de las ratas tratadas con el vehículo. Estas medidas, a 30 y 60 minutos, coincidían con los periodos de tiempo posteriores a la inoculación de los dos bolos de endoglina. Esto nos hizo plantearnos la posibilidad de que la endoglina podría ser eliminada de alguna forma, y que el incremento de proteinuria se circunscribía únicamente al periodo de inoculación.

Por otro lado, quisimos comprobar si se habría producido liberación de podocitos en la orina. Para comprobar la podocituria, se unieron los pellet de cada rata, obtenidos de cada una de las muestras de orina, en uno solo. Esta unificación de las muestras se debió a que el número de podocitos esperados era tan pequeño, que la división en diferentes tiempos nos podría llevar a la pérdida de información.

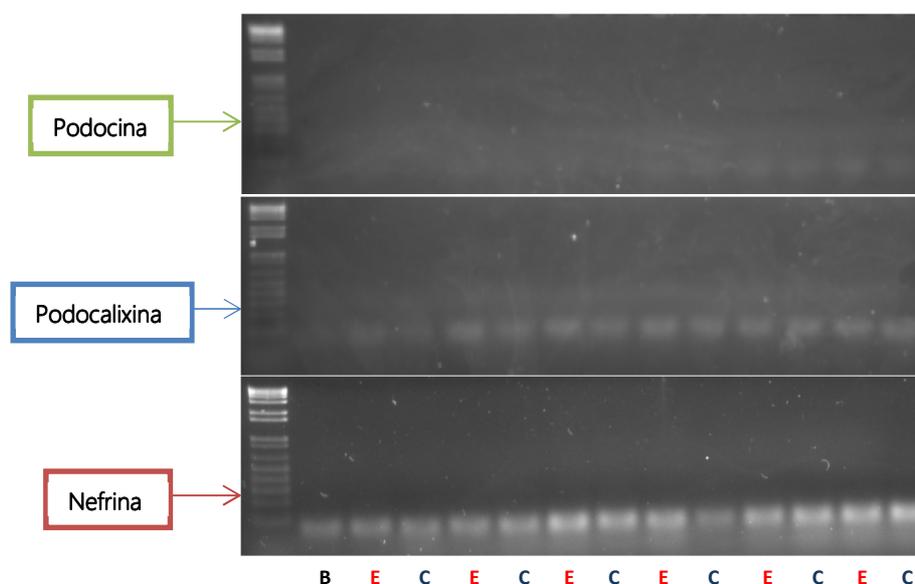


Figura 18. Podocituria inducida por endoglina soluble. Electroforesis del producto de la PCR para podocina, podocalixina o nefrina. Se muestra el nombre cada proteína a la altura en la que debería aparecer el amplicón correspondiente. B= blanco; C= con vehículo; E= con endoglina.

La presencia de podocitos se analizó mediante PCR semicuantitativa, donde se amplificaron las muestras con cebadores específicos para tres proteínas características de los podocitos, como son la podocina, la podocalixina y la nefrina. En la bibliografía se ha descrito que un incremento de los niveles de transcritos de estos genes por PCR es un marcador de podocituria (Zou y cols. 2010; Kim y cols. 2016). Aunque se habían unido todos los pellets y se utilizó todo el material genético aislado, no se consiguió detectar la presencia de podocitos y, por lo tanto, no se pudo medir la podocituria asociada a la inoculación de endoglina (Figura 18).

2.2. Efecto de la Endoglina soluble sobre la permeabilidad

Otro signo clínico característico de la preeclampsia es la aparición de edemas generalizados en todo el organismo (M. Brown 1995; Boeldt y Bird 2017). Estos edemas tienen cierto componente renal, debido a la mayor retención de sodio y agua que tiene lugar durante la gestación (Barron y Lindheimer 1984), pero la mayor profusión y gravedad de estos edemas en las mujeres con preeclampsia se debe a la disfunción endotelial, que compromete a la integridad estructural de los vasos (Boeldt y Bird 2017). En este sentido, quisimos evaluar si sEng era capaz de comprometer el mantenimiento de la estructura vascular, y más concretamente los capilares, incrementando la extravasación de agua y proteínas desde los vasos a los tejidos.

Para ello, se inoculó FITC-dextrano, de 2.000 kDa de peso molecular, tanto en ratones WT como animales sEng. El tamaño del dextrano es el factor limitante para la extravasación del FITC-dextrano, por lo que la utilización de un dextrano de tan alto peso molecular permite evaluar zonas donde el grado de alteración de la permeabilidad vascular es muy elevado. Se dejó circular libremente el FITC-dextrano durante media hora. Tras este tiempo, se extrajeron las retinas de estos ratones, se fijaron y montaron para su posterior análisis mediante microscopía de fluorescencia.

La utilización de la retina como tejido de análisis se basó en que la retina cuenta con un gran lecho vascular en un plano de poca profundidad, con una gran cantidad de capilares estabilizados mediante pericitos, y de fácil análisis, puesto que es un tejido muy fino y relativamente transparente.

De cada una de las retinas se tomaron imágenes a 10x, hasta cubrir toda la superficie de la retina en un microscopio de fluorescencia, utilizando las longitudes de onda de FITC

como longitudes de excitación y de emisión. Todas las imágenes se montaron en una única imagen de toda la retina.

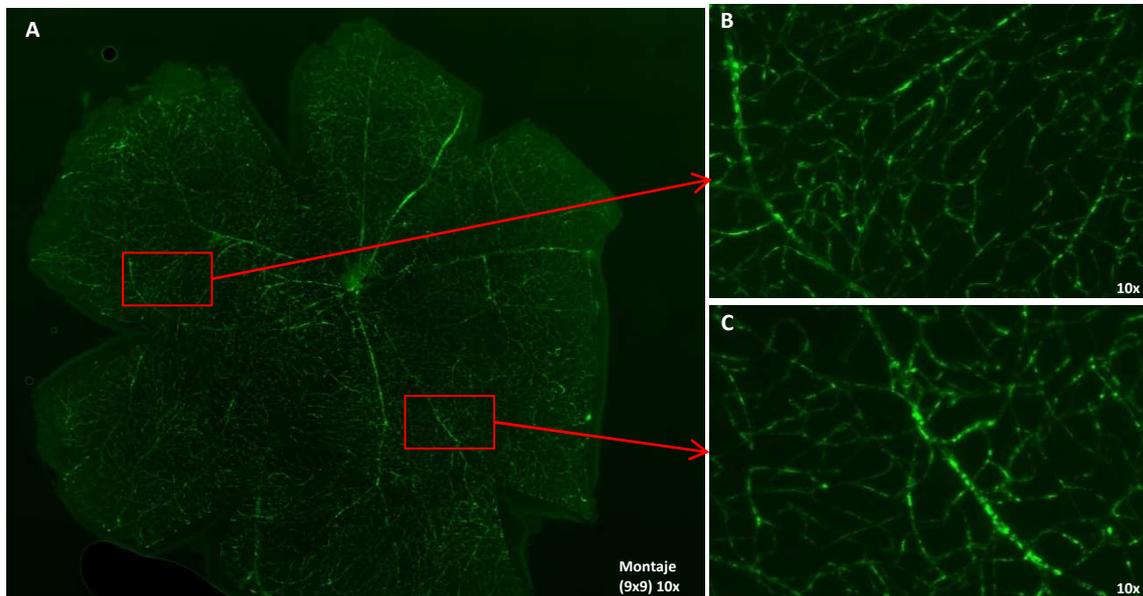


Figura 19. Retina tipo de ratón con genotipo WT. A) se muestra una reconstrucción de la retina, realizada mediante un montaje de 81 fotografías que exploran toda la superficie de la retina, con un aumento de 10x y tomadas con microscopía de fluorescencia (canal para FITC). B y C corresponden a dos secciones de 10x al azar, es la que se puede ver con más detalle los capilares.

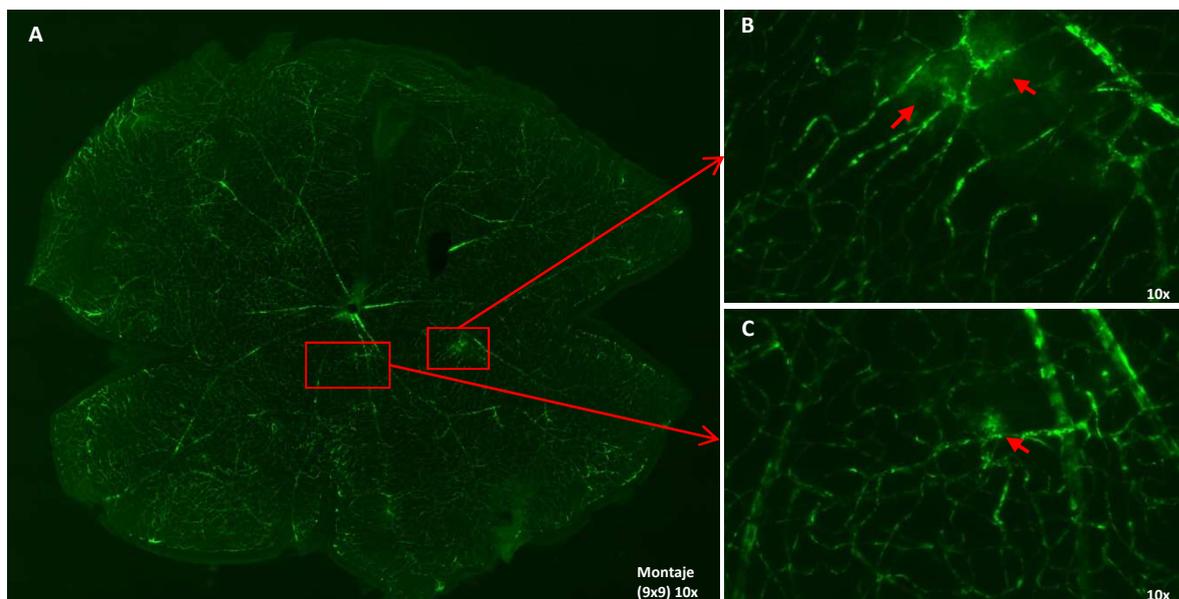


Figura 20. Retina tipo de ratón con genotipo sEng. A) se muestra una reconstrucción de una retina proveniente de un ratón sEng, realizada mediante un montaje de 81 fotografías que exploran toda la superficie de la retina, con un aumento de 10x y tomadas con microscopía de fluorescencia (canal para FITC). B y C corresponden a dos secciones de 10x al azar, donde se pueden ver con más detalle los capilares. Las flechas indica indican extravasaciones de FITC-dextrano.

Cuando se observaron las retinas de los ratones WT se vio que eran similares en cuanto a tamaño y estado, siendo adecuadas para el análisis (Figura 19A). Cuando ampliamos las imágenes hasta el tamaño de cada captura individual, observamos una red capilar bien definida y continua, sin muestras claras de extravasación (Figura 19B y 19C).

Al estudiar las imágenes obtenidas de los ratones sEng, también se observó homogeneidad de tamaño y estado, y además parecían similares a las de los ratones control (Figura 20A). En cambio, cuando se observaron más minuciosamente las retinas, nos dimos cuenta de la presencia de ciertas zonas de la red capilar con extravasaciones. Estas se caracterizaban por tener apariencia de una nube, sin bordes definidos, y de mayor señal que el fondo. dicha nubes se encontraba rodeando a capilares concretos, los cuales no mostraban signos aparentes de rotura o daño (Figura 20B y 20C).

Para analizar más minuciosamente las imágenes de las retinas se recurrió al tratamiento informático de las imágenes. Una vez montadas todas las imágenes que conformaban una retina completa en una sola imagen (Figura 21A), se realizaron una serie de transformaciones y se generaron máscaras que permitían, por un lado, analizar una imagen tan grande y pesada, y por otro lado, determinar las diferentes variables del estudio. Así, tras descomponer y reducir la imagen, se sustrajo el ruido de fondo de toda la imagen (Figura 21B). Sobre esta imagen se midió el área total, que correspondía a toda el área de la retina, y se midió la fluorescencia total (densidad integrada).

A partir de aquí, se generaron dos máscaras independientes, utilizando la intensidad de fluorescencia como patrón. La primera de ellas se correspondía con la totalidad de los vasos, obviando toda señal fuera de ellos (en la Figura 21C se muestra solo esta máscara, que se corresponde con la totalidad de los vasos). Para determinar la segunda máscara, se eliminaron de la imagen todos los vasos (Figura 21D), y se generó una máscara que contenía todas las áreas de extravasación. Sobre cada una de estas máscaras se midió tanto el área como la intensidad de señal (densidad integrada).

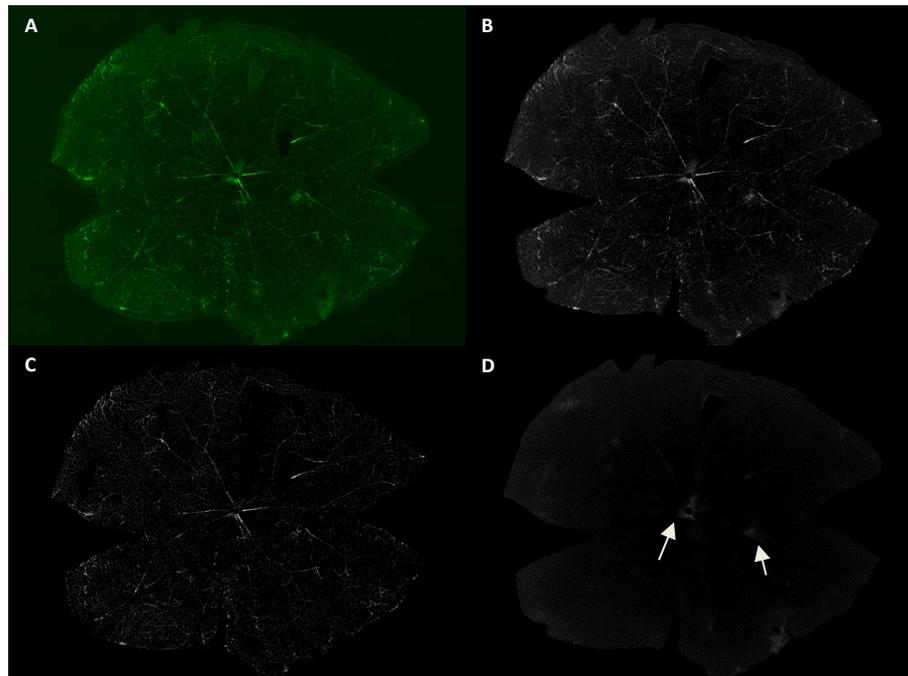


Figura 21. Procedimiento de análisis de las retinas. A) Imagen original de la retina completa a 10x. B) En esta imagen se ha quitado el ruido de fondo (*background*), y sobre esta imagen se mide tanto el área total, como la densidad integrada (cantidad de señal de señal de FITC) de la retina total. C) Esta imagen muestra solamente los vasos que componen la retina, y sobre ella se miden el área total y la densidad integrada de todos los vasos. D) En esta imagen se muestran solo las áreas de extravasación, donde se mide el área y la densidad integrada de estas extravasaciones.

Como ya se ha comentado, una de las variables que se determinó fue el área total de cada una de las retinas. Esto se debe a que en el proceso de corte de la retina para su aislamiento existe una cierta variabilidad por la propia manipulación, y los resultados se pueden ver alterados por esta situación. Así, al comparar los datos del área total de las retinas se obtuvieron valores muy similares entre ambos genotipos, situándose en torno a los 3×10^6 píxeles (Figura 22A). En este mismo sentido, se midió también la cantidad total de fluorescencia de las retinas, con el fin de observar si existían diferencias en la fluorescencia del conjunto. En ambos genotipos, los resultados de intensidad que se obtuvieron fueron muy similares (Figura 22B). Estos resultados nos permitieron abordar el resto de análisis con la seguridad de que no había alteraciones debidas a la manipulación.

Cuando se analizó el área que ocupan los vasos, se observó que esta comprendía, aproximadamente, una cuarta parte del área total de la retina, situándose en torno a los 7×10^5 píxeles (Figura 22C), y siendo igual en ambos genotipos. Estos resultados nos

parecieron interesantes ya que algunos autores han definido a sEng como un factor anti-angiogénico, por lo que esperaríamos una menor formación de vasos en las retinas de los ratones sEng, máxime cuando la angiogénesis de este órgano se produce después del nacimiento. En cuanto a la intensidad de fluorescencia, ambos genotipos mostraban unos valores de densidad integrada muy similares, algo lógico si tenemos en cuenta que el desarrollo de la vasculatura era parecido (Figura 22D).

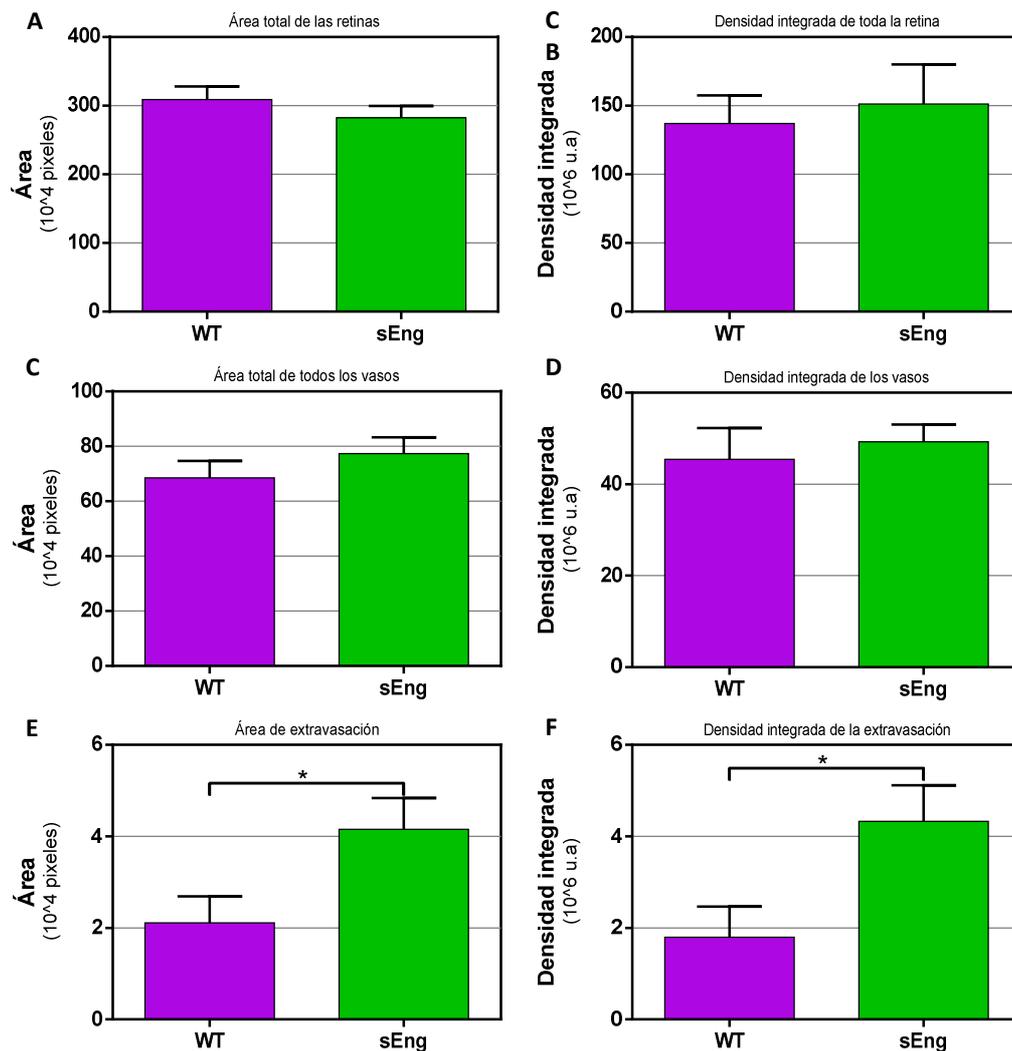


Figura 22. Efecto de la endoglina soluble sobre la permeabilidad. Se representa el área en pixeles y la intensidad en unidades arbitrarias de densidad integrada. **A)** Área total de la retina y **B)** su densidad integrada. **C)** Área total de los vasos y **D)** su densidad integrada. **E)** Área total de las extravasaciones. **F)** Densidad integrada de las extravasaciones. N=12 retinas WT y 10 retinas sEng. Se representa la media y el error estándar de la media. Los datos se comparan mediante t-Student para muestras no pareadas. Significación estadística: *p<0,05.

Por el contrario, cuando analizamos las extravasaciones, se observó que los animales sEng presentaban mayor área de extravasaciones que los ratones WT (Figura 22E). Del mismo modo, no solo el área de las extravasaciones era mayor, sino que la intensidad de señal de estas áreas era significativamente mayor en los animales problema (Figura 22F). Ambos datos nos indicaron que, mientras el desarrollo vascular era similar en ambos genotipos, la presencia de sEng era capaz de comprometer la estabilidad del vaso, permitiendo la extravasación de moléculas de gran tamaño, como el FITC-dextrano usado en nuestros experimentos (2.000 kDa de peso molecular).

2.3. Hemostasia

La hemostasia es otro sistema materno que puede sufrir muchas alteraciones en preeclampsia. Estas alteraciones pueden ir desde una ligera disminución del recuento plaquetario y pequeños depósitos de fibrina en la placenta, hasta casos realmente graves, como en el HELLP (la forma más agravada de preeclampsia), donde se produce un consumo excesivo de plaquetas, y la aparición de trombosis intravascular diseminada (Gardiner y Vatish 2015; Fisher 2015).

Por otro lado, se ha descrito que las integrinas, en concreto la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, juegan un papel muy importante tanto en la agregación plaquetaria como en la adhesión de la plaqueta al endotelio. Estos procesos están mediados por la unión al dominio RGD de la endogлина de membrana (Bennett 2005; Rossi y cols. 2017), y podrían ser antagonizados por la presencia de sEng.

Con estos antecedentes, quisimos analizar si sEng era capaz de generar algún tipo de alteración que pudiera explicar los cambios observados en la hemostasia durante la preeclampsia.

2.3.a. Tiempo de sangrado

Una técnica que permite valorar de forma conjunta todos los sistemas involucrados en la hemostasia es el tiempo de sangrado.

Esta técnica consiste en realizar un corte en el extremo de la cola del animal, cuantificando el tiempo que se mantiene sangrando y la intensidad del sangrado. Cuando se realiza el corte en la cola del animal anestesiado, se observa un abundante sangrado de procedencia tanto venosa como arterial. Normalmente, este flujo de sangre va disminuyendo de intensidad hasta que se produce un cese completo del sangrado. Este

cese completo se produce en torno a los 160 segundos de haber realizado el corte de la cola, y en nuestro estudio se denomina a este momento "primer sangrado". También es normal que, tras este primer cierre de la herida, se produzcan rebotes de la hemorragia, de número, duración e intensidad variables. A estos rebotes es a lo que se ha denominado "resangrados".

Por otro lado, y con la intención de cuantificar de alguna manera el grado de sangrado de los animales, se estableció una escala de valoración cualitativa en 6 niveles, que iban desde el 0 para la ausencia de flujo, y hasta el valor 5 para un flujo masivo de sangre, característico de los primeros instantes tras el corte. Estos valores se promediaron en rangos de 10 segundos, siendo la cuantificación del sangrado la suma del valor cualitativo de todos los rangos. Tras determinar un tiempo máximo de experimento de 30 minutos, y determinar la escala cualitativa que se iba a seguir, se realizó la prueba tanto a ratones sEng como animales control.

Cuando analizamos los datos, se observó que el tiempo del primer sangrado era similar en ambos genotipos, situándose en valores en torno a 160 segundos desde el momento del corte hasta el cese total de sangrado (Figura 23A). Algo similar se encontró al cuantificar este primer sangrado, donde tampoco se encontraron diferencias en la intensidad de los sangrados en ambos grupos de animales (Figura 23B).

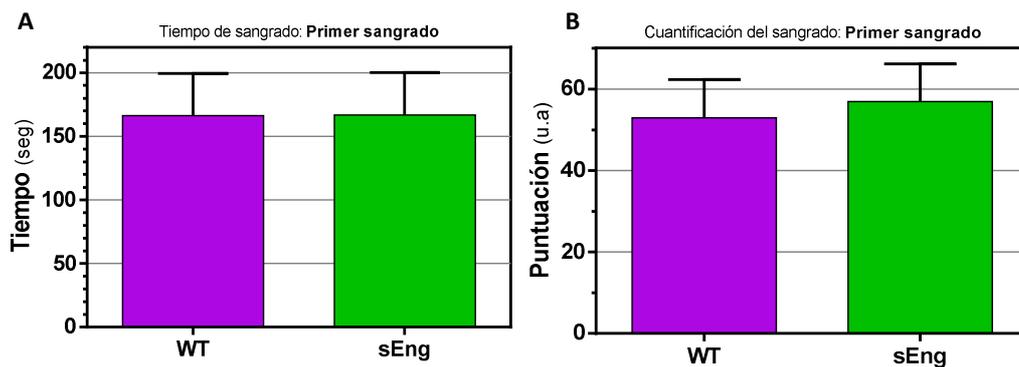


Figura 23. Tiempo y cuantificación del sangrado. A) Tiempo de sangrado desde que se inicia el experimento hasta el primer corte del flujo de sangre de más de 10 segundos. B) Cuantificación del sangrado, calculado como la suma del número de segundos multiplicado por el valor cualitativo del sangrado, desde que se inicia el experimento hasta el primer corte del flujo de sangre de más de 10 segundos. N= 8 ratones WT y 9 ratones sEng. Se representa la media y su error estándar. Los datos se comparan mediante t-Student para muestras no pareadas.

Por el contrario, cuando se analizó el tiempo de sangrado en conjunto de todos los rebotes posteriores al primer cierre (resangrados), observamos que los animales sEng presentaban un incremento en el tiempo de sangrado, siendo en torno a 4 veces mayor que el tiempo de resangrado de los animales control (Figura 24A). Resultados similares se observaron al cuantificar los resangrados, donde el incremento fue de 3,5 veces respecto a los valores de los animales WT (Figura 24B).

Otro parámetro que se cuantificó fue el número de eventos de reapertura que sufría cada animal. Aquí se observó que los animales WT presentaban, en promedio, dos reaperturas en los 30 minutos que duraba la prueba, mientras que los animales sEng presentaban el doble de rebotes de sangrado, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 24C).

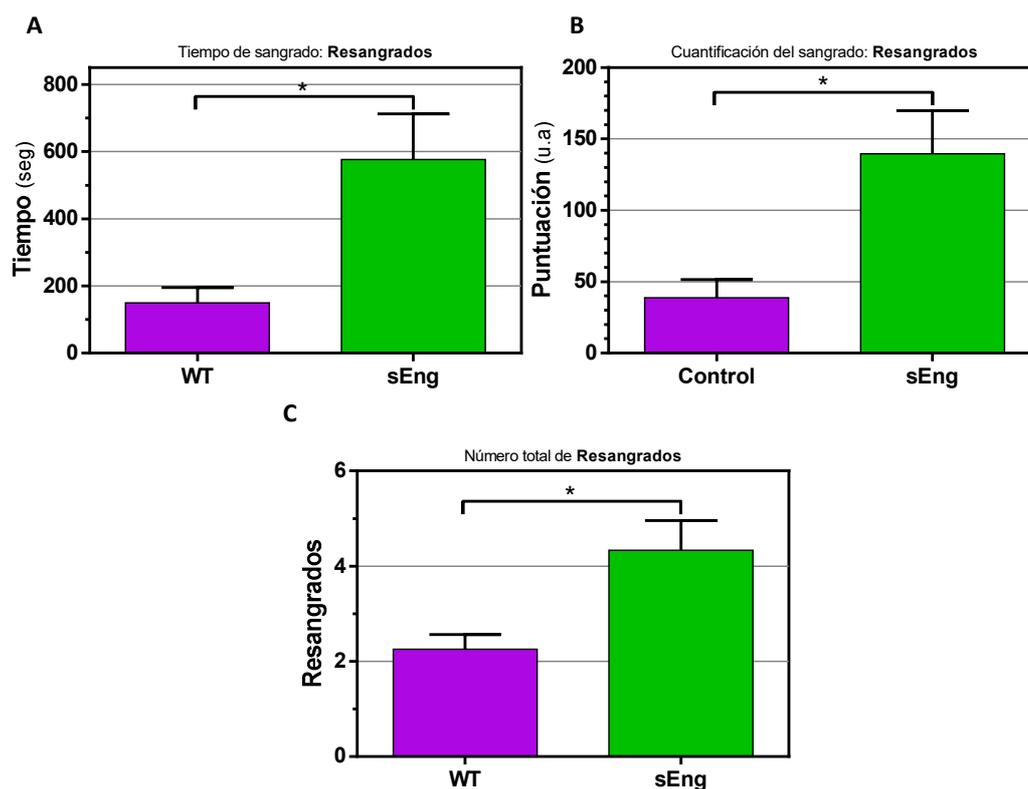


Figura 24. Tiempo y cuantificación de los resangrados. A) Tiempo total de resangrado: sangrados que se producen desde el primer cese de flujo hasta el momento final del experimento. B) Cuantificación de resangrados, calculado como la suma de los segundos multiplicado por la intensidad, a partir del primer corte del flujo y hasta el final del experimento. C) Número total de resangrados. N= 8 ratones WT y 9 ratones sEng. Se representa la media y su error estándar. Los datos se comparan mediante u-Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

Por último, se observó que algunos animales continuaban sangrando una vez alcanzados los 30 minutos de experimento. Esta variable también se cuantificó, y observamos que hasta 7 de los 9 ratones sEng utilizados en el experimento continuaban sangrando en el momento de acabar la prueba, mientras que únicamente 2 de los ratones WT continuaban sangrando (Figura 25).

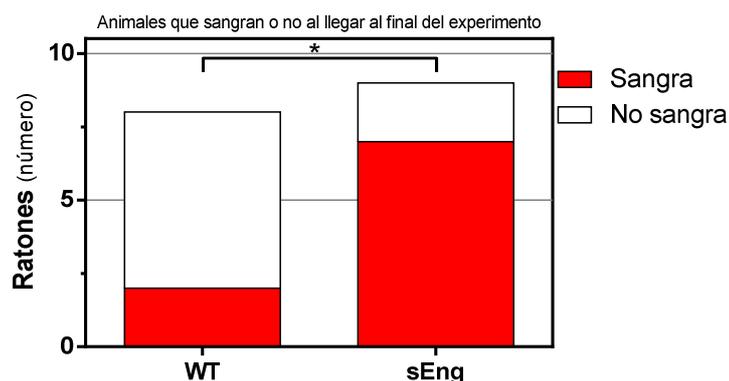


Figura 25. Estado de los animales al final del experimento. En esta gráfica se recoge el número de animales que sangraban al llegar el final del experimento y los que no sangraban. N= 8 ratones WT y 9 ratones sEng. Los datos se comparan mediante prueba exacta de Fisher. * $p < 0,05$.

2.3.b. Recuento plaquetario

Otro de los síntomas que se utilizan para el diagnóstico de preeclampsia, sobre todo en ausencia de proteinuria, es la reducción del número de plaquetas (The American College of Obstetricians and Gynecologists y cols. 2013). Esta reducción del recuento plaquetario se produce como fruto de la disfunción endotelial y los cambios hemodinámicos que tienen lugar durante la preeclampsia. La trombocitopenia en preeclampsia puede ir desde una trombocitopenia ligera, en los estadios más leves de la enfermedad, a una caída drástica del recuento plaquetario en el estadio de HELLP, con una gran coagulación intravascular diseminada (Gardiner y Vatish 2015).

Puesto que en el tiempo de sangrado se había observado un mayor grado de sangrado en los animales sEng, nos planteamos la hipótesis de que sEng podría inducir, de algún modo, un descenso en el recuento plaquetario de estos animales, y que fuera este descenso, a su vez, el responsable del incremento de los sangrados.

Para comprobar esta hipótesis, se analizaron los niveles de plaquetas tanto de los animales WT como sEng, donde se observó que, en ambos casos, el recuento plaquetario era muy similar, y se situaba en torno a las 750×10^3 plaquetas/ μL de sangre (Figura 26A).

Una vez que se observó que sEng por sí sola no era capaz de producir un descenso en el número de plaquetas, nos planteamos ver qué ocurría en el ambiente hormonal de la gestación. La hipótesis que se baraja es que, puesto que en el propio embarazo ya se produce un descenso del 10% en el número de plaquetas (Millar y Laffan 2015), la sEng puede de amplificar este efecto, siendo capaz de producir desde la trombocitopenia asociada a preeclampsia, hasta el HELLP. Para comprobar esta hipótesis, se cruzaron hembras de genotipo híbrido con machos sEng y WT. Por un lado, se midió la concentración de basal de plaquetas, antes del cruzamiento, con el fin de comprobar si ambos grupos de hembras presentaban niveles iguales de plaquetas. Se observó que los niveles de plaquetas se situaban en torno a 850×10^3 plaquetas/ μL , siendo similares en ambos grupos de hembras (Figura 26B). Esta medida era importante, puesto que la sEng la portarían únicamente las crías, y variaciones previas en el recuento plaquetario podría inducir a errores de análisis. Además, estos valores de recuento plaquetario eran similares a los que se observaban en los machos WT (Figura 26A).

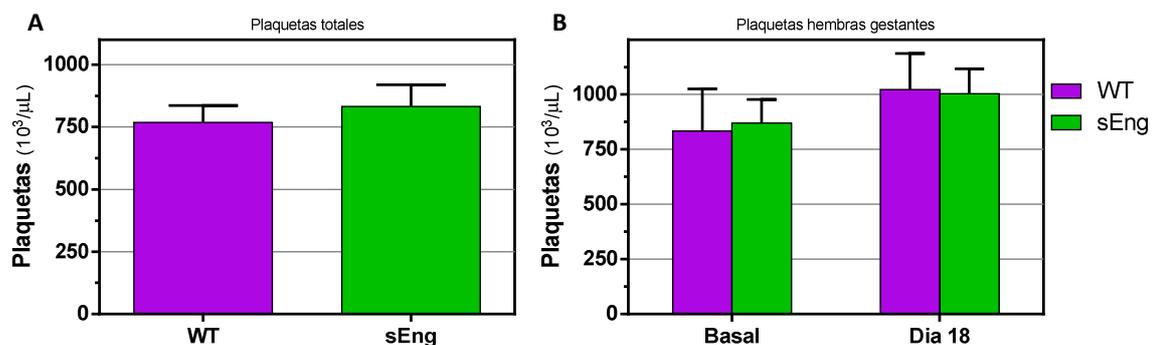


Figura 26. Recuento plaquetario. A) Número de plaquetas basales, expresado como concentración. N= 27 ratones WT y 28 ratones sEng. B) Número de plaquetas en hembras híbridas puestas en cruce con machos WT o machos sEng. Se midieron las plaquetas basales antes de poner los cruces y a día 18 post-copula. N =6 basales y 6 en gestación de ratones WT; N= 6 basales y 9 en gestación (tres dobles gestaciones) de ratones sEng. Se representa la media y su error estándar. Los datos de la gráfica A se comparan mediante u-Mann-Whitney. Los datos de B se comparan utilizando ANOVA de doble vía.

Por otro lado, se midió el número de plaquetas a día 18 de gestación. Cuando se analizaron los resultados, no se observaron diferencias en el recuento plaquetario entre las hembras puestas en cruce con machos sEng y las hembras puestas en cruce con machos control (Figura 26B). En relación a la gestación, y en contra de lo que cabría esperar por lo descrito en la bibliografía, lo que sí se observó fue un incremento en los recuentos plaquetarios, tanto de hembras cruzadas con machos control, como con las puestas en cruce con machos sEng. En cualquier caso, este incremento del recuento plaquetario no fue estadísticamente significativo en ninguno de los casos (Figura 26B).

2.3.c. Tiempo de protrombina e INR

Puesto que no se habían observado diferencias en el recuento plaquetario, pero sí en el tiempo de sangrado, quisimos analizar las vías de coagulación. En concreto se analizó el tiempo de protrombina (TP), que evalúa la vía extrínseca de la coagulación. Además, y a partir de TP, se calculó el INR (de *International Normalized Ratio*), que es una expresión normalizada del TP, que permite estandarizar los resultados. Se observó que los animales WT presentaban unos valores de TP en torno a los 9 segundos, siendo estos ligeramente inferiores a los valores medios que presentaban los animales sEng (11 segundos). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 27A). Además, estos resultados fueron sustancialmente más bajos que los valores de TP obtenidos por otros autores en ratones, los cuales sitúan los valores de TP entre 13,8 y 16,4 segundos (Palm y cols. 1997). Ante la diferencia observada en el TP, y puesto que los ratones utilizados en ese estudio eran de genotipo CD-1, mientras que los nuestros eran de genotipo híbrido, decidimos utilizar los datos de INR, que permite normalizar los resultados independientemente de la técnica utilizada. Así, el INR mostró la misma tendencia que el TP, pero sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre los animales sEng y los WT. Por otro lado, los valores obtenidos variaban entre 0,9 y 1,1, lo que sitúa a nuestras medidas dentro de los límites propuestos para el INR (0,8-1,2) (Figura 27B).

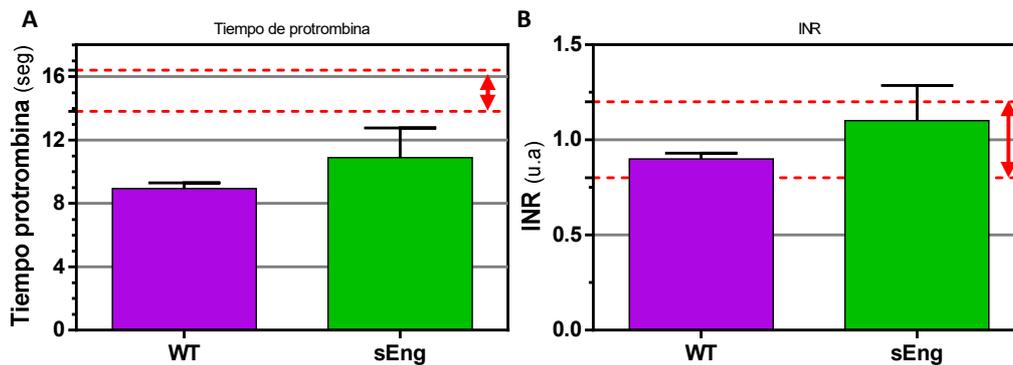


Figura 27. Tiempo de protrombina e INR. A) Tiempo de protrombina. B) INR (International Normalized Ratio). N= 7 ratones WT y 8 ratones sEng. Se representa la media y su error estándar. Los datos se comparan mediante u-Mann-Whitney. También se representan los límites descritos para el tiempo de protrombina y el INR mediante dos líneas discontinuas rojas y flechas.

2.3.d. Agregación plaquetaria

Otro de los mecanismos que quisimos evaluar si se encontraba alterado en los ratones sEng, y que podría explicar los resultados obtenidos en el análisis del sangrado de los ratones, fue la agregación plaquetaria *in vivo*. Para evaluar este parámetro, nos aprovechamos de que en un hemocitómetro se pueden medir el número de plaquetas libres presentes en la sangre. Al tratar a los animales con un activador de la agregación plaquetaria (en este caso colágeno y adrenalina) se produce activación y agregación plaquetaria, produciéndose trombos y una reducción del número de plaquetas libres totales.

En primer lugar, se extrajo sangre de la yugular (muestra basal) para determinar el número de plaquetas de cada animal antes de inducir la agregación plaquetaria. Una vez extraída la muestra basal, se inyectó una solución de colágeno y adrenalina, agonistas de la activación plaquetaria, y se dejó actuar y difundir por el torrente sanguíneo durante 3 minutos, tiempo tras el cual se extrajo otra muestra de sangre (muestra col/adre), donde se valoró el número de plaquetas que quedan libres tras la agregación plaquetaria inducida.

El primer paso en el análisis de los datos fue comprobar que no existían diferencias entre el recuento plaquetario basal de los animales sEng y los animales control, tal y como habíamos observado anteriormente (Figura 28). Una vez que se comprobó que los resultados basales eran consistentes con los anteriormente descritos, se comprobó que los agonistas realmente habían surtido el efecto esperado, produciendo una reducción en el número de plaquetas. Se observó que los agonistas produjeron un descenso de,

aproximadamente, un 50% en el recuento plaquetario y no se observaron diferencias entre ambos genotipos, sEng y WT (Figura 28), lo que nos indica que no hay una alteración en la susceptibilidad de las plaquetas a ser activadas en los ratones sEng.

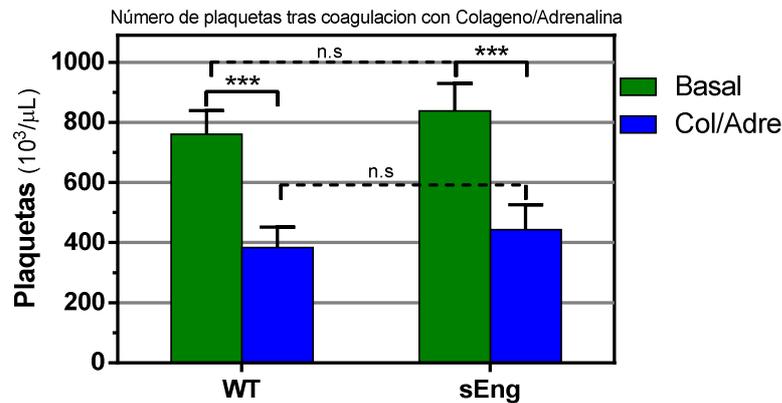


Figura 28. Trombocitopenia intravascular inducida por colágeno y adrenalina. Se representa el número de plaquetas basales y 3 minutos después de inyectar una solución de colágeno/adrenalina en ratones sEng y WT. N= 8 ratones WT y 7 ratones sEng. Se representa la media y su error estándar. Los datos se comparan mediante ANOVA de doble vía. Significación estadística: *** $p < 0,001$; n.s = no significativo.

2.3.e. Formación y estabilización de trombo

Otro de los pasos clave en la hemostasia que quisimos analizar fue la estabilización del trombo una vez que se ha formado. Una alteración en la unión de las plaquetas, y por ende del trombo, al endotelio o una estabilización inadecuada del trombo puede ocasionar que dicho trombo se libere o no ocluya la herida adecuadamente. Esto sería compatible con lo observado en el tiempo de sangrado, donde los animales sEng presentaban mayores rebotes de la hemorragia. En este sentido, tal y como se ha descrito anteriormente, parece que la unión entre las integrinas (principalmente $\alpha IIb\beta 3$) y endogлина de membrana juegan un papel crucial en la unión y estabilización del trombo (Bennett 2005; Rossi y cols. 2017).

Con estos antecedentes se planteó la hipótesis de que sEng podría ser capaz de inhibir las correctas uniones entre las integrinas y la endogлина de membrana, desestabilizando las uniones entre el trombo y el endotelio. Esta desestabilización inhibiría la correcta hemostasia, produciéndose cierres incompletos de la herida e, incluso, la liberación del trombo y rebotes del sangrado.

Para abordar esta hipótesis, se recurrió a un modelo de trombosis arterial inducido por cloruro férrico. Este modelo de trombosis es una técnica experimental que permite evaluar tanto el tiempo de formación de un trombo, como la estabilización del mismo. Esta técnica consiste en producir un daño endotelial localizado mediante la utilización de un compuesto químico, el cloruro férrico, que induce daño endotelial a través de la formación de especies reactivas de oxígeno, hecho por el cual se produce un incremento de la adhesión plaquetaria al endotelio y la formación de trombos oclusivos ricos en plaquetas (Denis y Wagner 2007).

Los ratones fueron anestesiados y se les colocó una sonda que registra el flujo a través de la carótida. Una vez estabilizado el flujo, se aplicó el cloruro férrico durante 3 minutos, y se registraron los datos durante 30 minutos.

Para llevar a cabo el análisis de los datos, estos fueron expresados como porcentaje de flujo, para lo cual se estableció el 100% de flujo como la media aritmética del flujo en los 100 primeros segundos, antes de la aplicación del cloruro férrico. A partir de este valor, se calculó el valor porcentual para cada momento del experimento (1.800 segundos).

Puesto que, por las características de la técnica, se podía registrar cierta señal aun cuando se había producido el cierre completo del vaso, se estableció considerar cierre completo cuando el porcentaje de flujo fuera inferior al 10% del flujo inicial.

Con la normalización de los datos siguiendo estas dos consideraciones previas, en primer lugar se realizó un análisis cualitativo de los resultados. Para ello, se representó gráficamente el porcentaje de flujo en cada instante del tiempo y para cada ratón. Este tipo de representación mostró que el flujo de los animales WT era bastante estable, donde se producía un descenso bastante pronunciado del flujo en un momento dado (específico para cada ratón) que continuaba hasta el cese completo del flujo, y que no se solía recuperar (Figura 29A). En cambio, las curvas que describían el comportamiento del flujo de los ratones sEng era más caótica, con caídas y recuperaciones del flujo bastante frecuentes, aunque una vez cesado absolutamente el flujo, no se volvía a recuperar (Figura 29B). A partir de cada una de estas curvas se calculó el área bajo la curva.

Puesto que parecía existir bastante disparidad entre los resultados de los animales de cada genotipo, se realizó una curva promedio, con el fin de evidenciar gráficamente si existían diferencias entre ambos genotipos en momentos clave, como podrían ser los

momentos en el que empieza a descender el flujo y cese total del flujo o variaciones en la dinámica de cierre (que evidencian la formación del trombo). Esta representación de la curva promedio mostró que, aunque el comportamiento general era muy similar en ambos genotipos, tanto al inicio de la caída del flujo (90-70%) como al final (20-0%) la caída del flujo era menos pronunciada en los animales sEng que en los WT (Figura 29C).

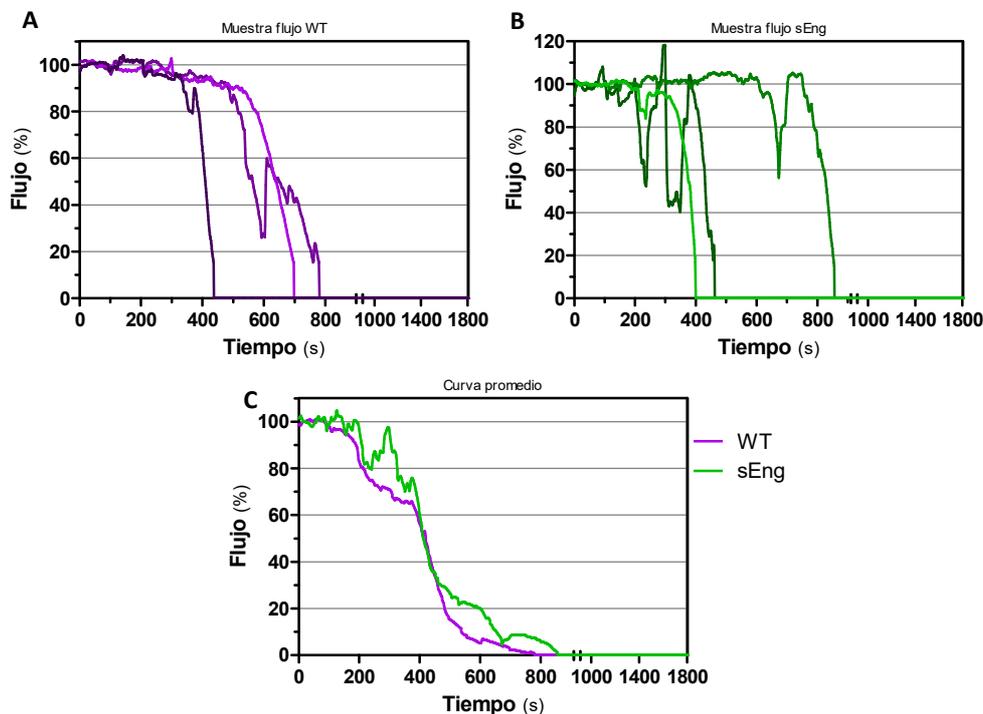


Figura 29. Medición de flujo y formación de trombo por medio de cloruro férrico. Se representan los datos como porcentaje, donde el 100% se corresponde con el flujo promedio de los 100 segundos primeros, antes de empezar el experimento. **A)** Representación de curvas tipo de 3 animales WT. **B)** Representación de curvas tipo de 3 animales endoglina soluble. **C)** Representación del flujo medio de todos los ratones. N= 18 ratones WT y 12 ratones sEng.

Por otro lado, quisimos hacer un análisis más pormenorizado de los datos obtenidos. Uno de los parámetros evaluados fue el tiempo que tardaba en producirse el primer cese total del flujo a través de la carótida. Se observó que este cese total del flujo se producía en torno a los 500 segundos de haber puesto el primer papel con cloruro férrico. Además, este resultado era igual en ambos genotipos (Figura 30A). También se observó que, una vez que

se producía este cese total del flujo, la mayoría de los animales no experimentaban ningún restablecimiento del flujo, lo que indica que este cierre era bastante estable (Figura 30C).

Otra variable que se quiso analizar para cuantificar la evolución de la formación del trombo fue el área bajo la curva que describe el comportamiento del flujo a lo largo del tiempo. Este parámetro fue calculado como el promedio de las áreas bajo la curva de cada ratón. Puesto que habíamos observado un flujo más caótico en los animales sEng, esperábamos observar diferencias en este parámetro. En cambio, los valores del área bajo la curva promedio eran similares entre ambos grupos, aunque es cierto que el área bajo la curva de los animales sEng era ligeramente superior al área que presentaban los animales WT (Figura 29B).

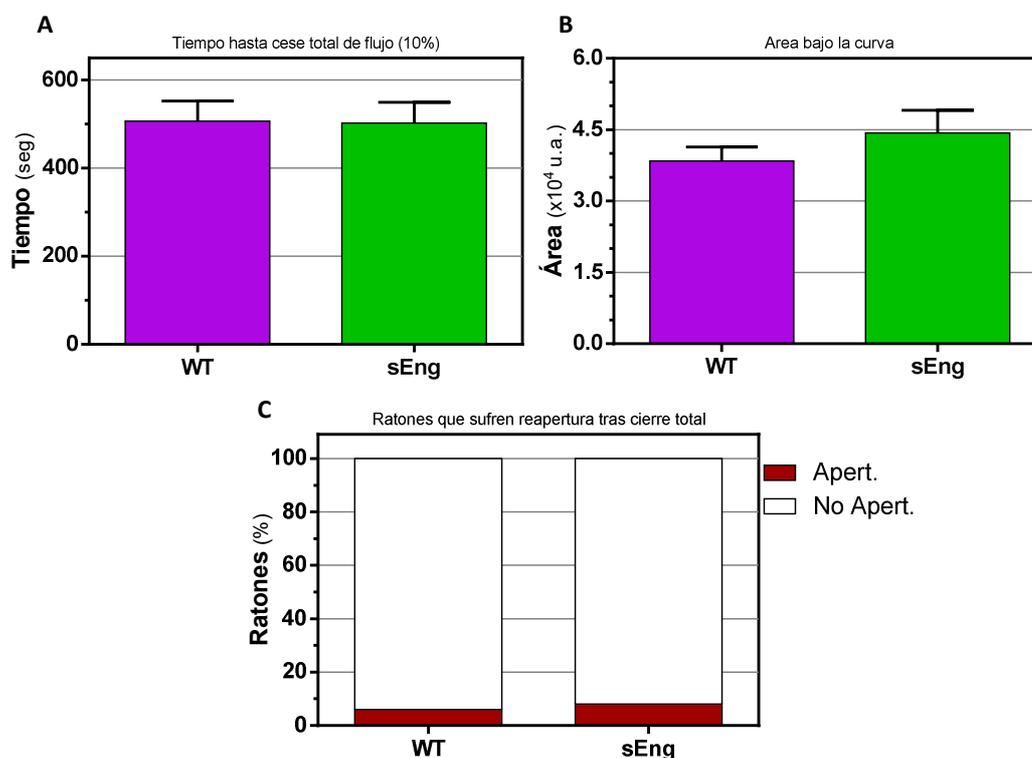


Figura 30. Análisis cuantitativo de la curva descrita por el flujo de la carótida. A) Tiempo hasta el primer cese total del flujo. Estos datos comprenden desde el momento en el que coloca el primer papel con cloruro férrico hasta que el flujo alcanza valores inferiores al 10% durante un tiempo superior a 15 segundos. B) Área bajo la curva. Calculada a partir de cada área bajo la curva de cada uno de los animales. C) Reapertura tras cierre total. Se representa el porcentaje de animales que recupera el flujo tras un cierre total superior a 15 segundos. N= 18 ratones WT y 12 ratones sEng. Los datos de los gráficos A y B se representan como la media y su error estándar, comparándose mediante t-Student para muestras no pareadas. Los datos de la gráfica C se representan como porcentaje, comparándose mediante la prueba exacta de Fisher.

Con el fin de cuantificar todos aquellos eventos en los que se observaba una reducción significativa del flujo que se recuperaba súbitamente, para volver a disminuir paulatinamente, se decidió establecer un nuevo parámetro, al que se denominó como "cierre parcial". Para el cálculo de esta nueva variable se tuvieron en cuenta todos los eventos de reapertura que, entre el valor de flujo en el instante anterior a la reapertura y valor de flujo tras la reapertura presentaran una diferencia de, al menos, el 20% del flujo total (Figura 31). Estas reaperturas tras cierre parcial dan idea de inestabilidad en el proceso de formación y estabilización del trombo, ya que representan ciertos movimientos o desprendimientos del trombo, permitiendo el paso de la sangre a través de la herida o, como en este caso, a través de la carótida.

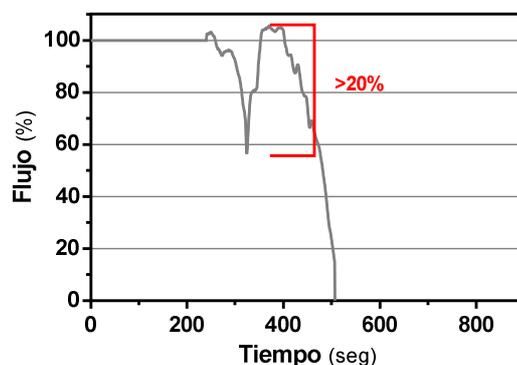


Figura 31. Curva modelo de cierre parcial en la medición de flujo y formación de trombo. En esta gráfica se muestra lo que se ha considerado un cierre parcial. Como se puede ver, al principio se produce una caída continua del flujo, que súbitamente vuelve a incrementarse en, al menos, un 20% del flujo, para acto seguido continuar descendiendo.

Cuando se analizaron los resultados obtenidos, observamos que más del 70% de los ratones sEng presentaban eventos de reapertura, una vez empezada la formación del trombo. En cambio, menos del 40% de los animales control presentaba alguno de estos eventos (Figura 32A). Además, cuando consideramos el promedio de eventos de reapertura de todos los animales observamos que los animales sEng mostraban un mayor número de eventos que los animales WT (Figura 32B).

Estos eventos de reapertura podrían ser debidos a dos posibles razones. La primera es la hipótesis de partida, es decir que sEng sea capaz de alterar la formación y estabilización del trombo. La segunda posibilidad es que los animales sEng presentaran un mayor flujo a través de la carótida, ya que algunos autores han relacionado la presencia de sEng con un incremento en la presión arterial (Venkatesha y cols. 2006; Valbuena-Diez y cols. 2012). Para comprobar esta segunda hipótesis, se comparó el promedio de los valores de flujo de los 100 primeros segundos (los mismos que se utilizaron para establecer el 100% de flujo). De esta forma se observó que los animales sEng presentaban un flujo sanguíneo significativamente menor que los animales WT (Figura 32C). Estas diferencias en el flujo serán probablemente debidas a la manipulación experimental, pero demuestran que los eventos de reapertura no pueden ser debidos al flujo. En su conjunto, estos resultados

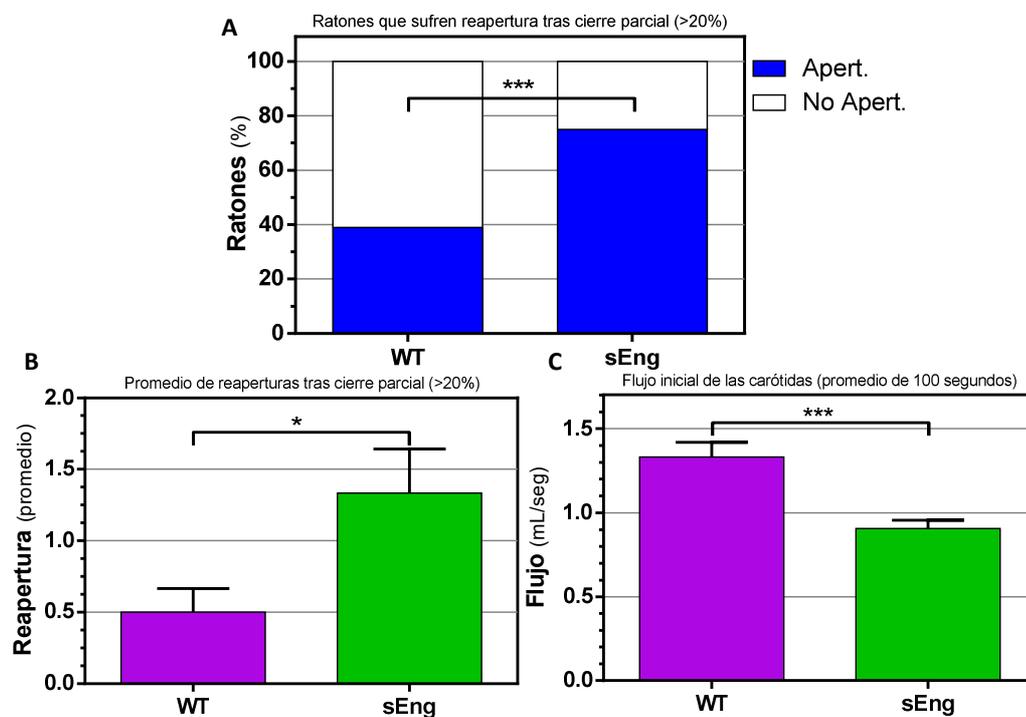


Figura 32. Análisis de las aperturas tras cierre parcial y flujo sanguíneo inicial. A) Porcentaje de ratones que sufren, al menos, un evento de reapertura tras cierre parcial. Se representa el porcentaje de ratones que sufren una caída del flujo de al menos 20% y que se recupera de forma súbita. B) Promedio de reaperturas tras cierre parcial. Se muestra el promedio de eventos de reapertura de todos los animales. C) Flujo sanguíneo inicial. Se calcula como el promedio de los valores de flujo absolutos de los 100 primeros segundos. N= 18 ratones WT y 12 ratones sEng. sEng. Los datos del gráfico A se representan como porcentaje, comparándose mediante la prueba exacta de Fisher. Los datos de las gráficas B y C se representan como la media y el error estándar de la media, comparándose mediante *t-Student para muestras no pareadas*. Significación estadística: * $p < 0,05$. *** $p < 0,001$.

demuestran que sEng es capaz de alterar la formación y estabilización del trombo, lo que produce un cierre ineficaz de la herida y que conduce a un incremento en el tiempo y en la cantidad del sangrado.

2.4. Presión arterial y endoglina soluble

El rasgo más característico y el principal factor para el diagnóstico de la preeclampsia es el incremento de la presión arterial durante el tercer trimestre de la gestación en mujeres que previamente no mostraban elevación de la PA. Aun así, la preeclampsia no es la única patología de la gestación que cursa con incremento de la PA, de ahí la importancia de los demás síntomas clínicos analizados (The American College of Obstetricians and Gynecologists y cols. 2013).

Por otra parte, se ha descrito la relación entre el incremento de la PA y la sEng (Venkatesha y cols. 2006; Valbuena-Diez y cols. 2012). En esta línea, se ha propuesto que sEng inhibe la biodisponibilidad de NO inducida por TGF- β , lo que produce un incremento de la PA (Venkatesha y cols. 2006; López-Novoa y Bernabeu 2010). Sin embargo, el mecanismo a través del cual sEng produce hipertensión no está claro aún.

2.4.a. Presión arterial basal y en gestación

A pesar de todas las evidencias que señalan la relación entre la sEng y la hipertensión, quisimos comprobar si la sobreexpresión de sEng en nuestro modelo animal era capaz de inducir un incremento de la PA. Para comprobarlo, se midió la PA de los ratones mediante la técnica de la medición en cola por pletismografía, tras haber sido sometidos a un periodo de adaptación previo. Al analizar los resultados, se observó que los animales sEng presentaban unos niveles de presión arterial sistólica en torno a 120 mmHg, frente a los únicamente 106 mmHg que presentaban los animales control (Figura 33A).

Una vez que se comprobó que sEng era capaz de generar un aumento de la PA en nuestro modelo de ratón, quisimos comprobar si este efecto se repetía en otros modelos animales asociados a la gestación. Por un lado, se midió la PA basal de hembras sEng y WT, y a continuación se pusieron en cruce, midiendo la PA durante la gestación. Al analizar los resultados observamos que la PA basal de las hembras sEng se situaban en torno a 121 mmHg, mientras que las hembras control solo mostraban unos valores de 108 mmHg (Figura 33C). Además, al ponerlas en cruce y medir la PA durante la gestación, tanto los valores de PA de las hembras control como de las hembras sEng se mantuvieron en valores

similares a lo observado con la PA basal (Figura 20-C). Por otro lado, se cruzaron hembras híbridas con machos sEng o con machos WT. En este modelo, la sEng no proviene de la hembra, sino del feto, por lo que resulta un modelo más cercano a la preeclampsia. Cuando se analizaron los resultados, observamos que las hembras puestas en cruce con machos control, presentaban unos niveles de presión arterial sistólica (PAS) de 106 mmHg (Figura 33B), similares a los niveles que presentaban los animales WT del primer experimento (Figura 33A). Por otro lado, las hembras que se cruzaron con machos sEng, y que por lo tanto portaban fetos sEng positivos, presentaban unos niveles de PAS de 123 mmHg (Figura 33B), que no solo eran muy superiores a los de las hembras cruzadas con machos control, sino que eran, incluso, superiores a los valores de los propios animales sEng. Este resultado demostró que sEng es capaz de producir hipertensión por sí sola tanto en un modelo de sobreexpresión sistémica como en un modelo más localizado en la placenta y cercano a lo que ocurre en preeclampsia.

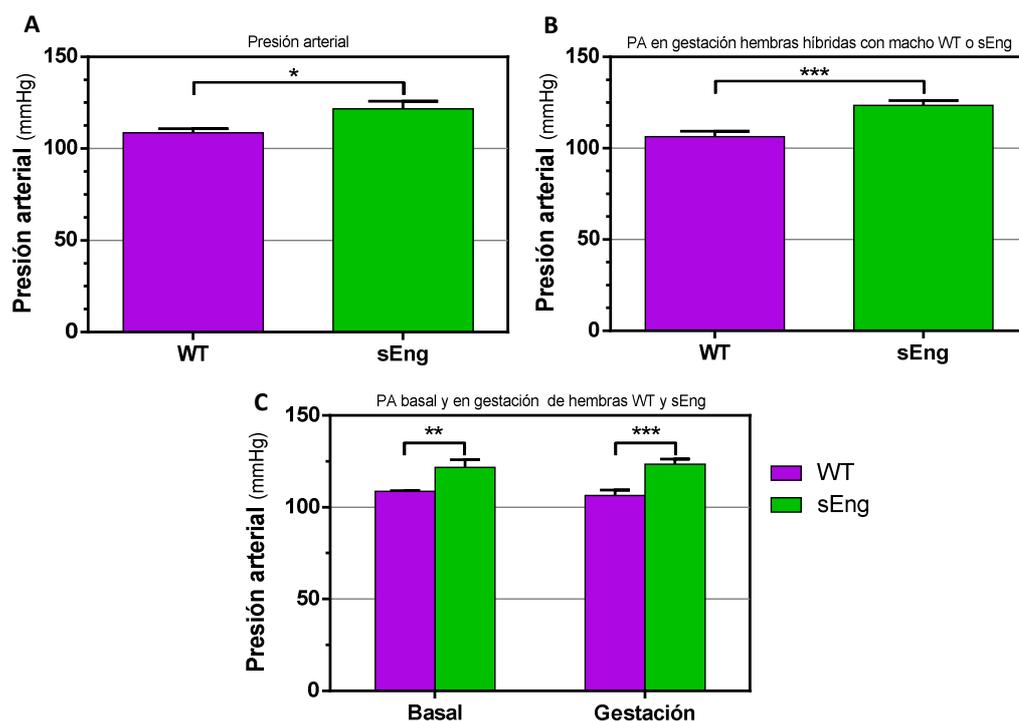


Figura 33. Presión arterial sistólica basal y en gestación. A) Presión arterial sistólica medida en cola. N= 11 ratones WT y 11 ratones sEng. B) Presión arterial sistólica medida en cola de hembras híbridas gestantes, puestas en cruce con machos WT o sEng. N= 9 ratones WT y 10 ratones sEng. C) Presión arterial sistólica basal y en gestación de hembras WT o sEng puestas en cruce con machos control. N= 9 ratones WT y 10 ratones sEng. Se representa la media y su error estándar. Los datos de la gráfica A se comparan por medio de u-Mann-Whitney. Los datos de las gráficas B y C se comparan mediante t-Student para muestras no pareadas. Significación estadística: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

2.4.b.Efecto vasomotor de endoglina soluble

Puesto que se había comprobado que sEng era capaz de inducir hipertensión por sí misma, nos planteamos la hipótesis de que sEng fuera capaz de producir este efecto mediante la interacción directa con el endotelio vascular. Para comprobar esta hipótesis, se recurrió a ensayos *ex vivo*, utilizando anillos de aorta como material biológico. Este tipo de técnicas son muy utilizadas en estudios de vasomotricidad inducida por diferentes agonistas.

Para analizar el efecto directo de sEng sobre los vasos, se incubaron los anillos de aorta normalizados con una concentración de 250 ng/mL de endoglina recombinante humana, registrando continuamente la tensión producida por el anillo de aorta. Tras una incubación de 20 minutos, no se observó ningún tipo de diferencias en la tensión de los anillos (datos no mostrados).

Puesto que no habíamos observado ningún tipo de efecto directo, se planteó la hipótesis de que, quizá, sEng era capaz de modular la respuesta vasomotora de algún agonista, ya fuera disminuyendo el efecto vasodilatador o potenciando el efecto vasoconstrictor de diferentes tipos de señales.

Con el fin de comprobar si la endoglina soluble era capaz de potenciar el efecto de señales vasoconstrictoras, se analizó la respuesta de los anillos de aorta, incubados con endoglina, ante un estímulo vasoconstrictor con potasio. El potasio no es un agonista *per se*, sino que induce la contracción muscular al modificar el potencial de acción. Aun así, el potasio produce una contracción máxima, por lo que se utilizó con la intención de comprobar si endoglina era capaz de modificar la respuesta contráctil máxima. Al analizar los resultados de contracción inducida por potasio se observó un grado de contracción similar, tanto en anillos incubados con endoglina, como en aquellos incubados con el vehículo, sugiriendo que endoglina no es capaz de incrementar la capacidad de contracción de los vasos (Figura 34A).

El siguiente paso fue comprobar si endoglina era capaz de potenciar el efecto constrictor de fenilefrina (PE). En este caso se realizó una curva de contracción dosis-respuesta con PE en anillos incubados con endoglina o con el vehículo, donde no se observaron diferencias en ambas curvas (datos no mostrados). Aun así, quisimos analizar el efecto de sEng al tratar los anillos con una dosis submáxima de PE, en concreto 10^{-6} M. La utilización de esta dosis

se debió a que es una dosis bastante alta, capaz de producir una contracción cercana al 100%, y que fue la dosis utilizada para los posteriores estudios de relajación. Así, cuando se normalizaron los resultados de la contracción con PE respecto a la contracción con potasio durante la normalización, se observó que los anillos incubados con endoglina presentaban un 20% menos de contracción que los anillos incubados con el vehículo, aunque las diferencias no fueron significativas (Figura 34B). Estos resultados eran contrarios a lo esperado, ya que la endoglina no solo no potenciaba el efecto vasoconstrictor, sino que lo inhibía parcialmente. Una vez observado que endoglina soluble no producía ningún efecto claro sobre la contracción, nos planteamos analizar su efecto sobre la relajación. Estos estudios se realizaron incubando previamente los anillos en presencia de sEng o del vehículo, para posteriormente inducir una contracción submáxima con PE (10^{-6} M).

El primer agonista sobre el que se quiso analizar el efecto de sEng fue la Ach. Este agonista produce vasodilatación dependiente del endotelio, ya que estimula la producción de NO por parte de las células endoteliales. Se realizó una curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de Ach. A partir de estos resultados se calculó la dosis efectiva 50 (EC50), que es una medida muy utilizada para comprobar la potencia de diferentes moléculas. Al analizar los resultados, se observó la EC50 de la Ach era similar entre los anillos incubados con endoglina y los anillos incubados con el vehículo, lo que demuestra que en este modelo, sEng no inhibe el efecto de la vasodilatación dependiente de endotelio (Figura 34C).

Por último, se quiso comprobar si sEng era capaz de potenciar el efecto vasodilatador de agonistas no dependiente de endotelio. Para ello se utilizó NTP, que es un donador de NO, y por lo tanto su efecto es independiente del estado y función del endotelio. Para el análisis de este agonista, se calculó el porcentaje de relajación que se producía al añadir una dosis submáxima de NTP (10^{-4} M), en anillos precontraídos con PE e incubados con sEng o con vehículo. Así, los resultados de relajación que se obtuvieron fueron muy próximos al 100% de relajación respecto a la contracción que indujo la PE (Figura 34D). Además, el porcentaje de relajación fue independiente de que el anillo estuviera incubado con endoglina o con el vehículo, lo que demuestra que endoglina soluble no es capaz de inhibir el efecto vasodilatador no dependiente de endotelio.

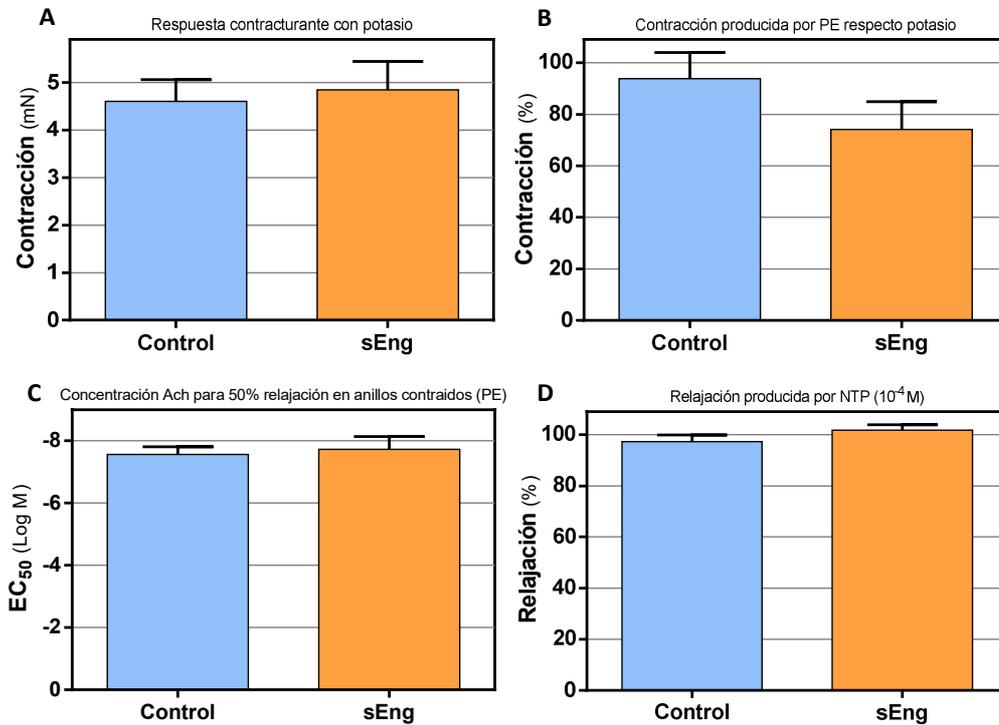


Figura 34. Estudio del efecto vasomotor de la endoglina. Anillos incubados con 250 ng/mL de sEng o con el vehículo (control) **A)** Grado de contracción en anillos de aorta como respuesta a potasio. N= 6 arterias control y 6 arterias sEng. **B)** Porcentaje de contracción producido por PE (10^{-6} M) en anillos de aorta. Estos valores son referenciados respecto a la contracción media obtenida con el potasio en el proceso de normalización. N= 6 arterias control y 6 arterias sEng. **C)** Concentración efectiva 50 para la acetilcolina en anillos pre-contraídos con PE (10^{-6} M). N= 6 arterias control y 6 arterias sEng. **D)** Porcentaje de relajación producido por NTP (10^{-4} M) en anillos contraídos con PE (10^{-6} M). Estos valores son referenciados respecto a la contracción producida por la PE en cada anillo. N= 6 arterias control y 6 arterias Eng. Se representa la media y su error estándar. Los datos de gráfica **A** se comparan mediante t-Student para muestras no pareadas. Los resultados de **B**, **C** y **D** se comparan mediante u-Mann-Whitney.

2.4.c. Papel de BMP-4 en la hipertensión asociada a altos niveles de endoglina soluble

Habíamos comprobado que sEng era capaz de inducir hipertensión *in vivo* en dos modelos animales, pero seguíamos sin conocer el mecanismo por el cual sEng era capaz de inducir hipertensión. Por un lado, habíamos demostrado que sEng, por sí sola, no era capaz de producir ningún efecto vasomotor, y que tampoco era capaz de modificar el efecto de diferentes agonistas vasomotores sobre el vaso. Por otro lado, estudios realizados en el

laboratorio y llevados a cabo en paralelo, demostraron que sEng no era capaz de modificar ninguno de los mecanismos hormonales del control de la presión arterial, como el sistema renina-angiotensina-aldosterona, catecolaminas, etc.

Con todo esto, hipotetizamos que debía existir una molécula mediadora entre el efecto de la sEng y la hipertensión.

Por otra parte, estudios recientes de expresión proteica y análisis del secretoma realizados en el laboratorio del CIB en Madrid, mostraron que, entre las proteínas que veían incrementada su expresión por acción de sEng, se encontraba BMP-4. Curiosamente, se había descrito previamente que BMP-4 es capaz de producir un incremento de la presión arterial, asociado a un incremento del estrés oxidativo (Wong y cols. 2013). Así, BMP-4 estimularía la producción de superóxido por parte de la NADPH oxidasa vascular, y la producción de ROS, con la consecuente disfunción endotelial (Miriyyala y cols. 2006; Wong y cols. 2010; Wong y cols. 2013).

Con estos antecedentes, nos planteamos la hipótesis de que sEng produce un incremento de la expresión de BMP-4, que a su vez produce un incremento del estrés oxidativo y disfunción endotelial, produciendo la hipertensión.

2.4.c.i. Estudio en células

El primer paso fue confirmar que realmente sEng era capaz de inducir un incremento de BMP-4. Para ello, se trataron células HUVECs con diferentes concentraciones de sEng (40, 100 y 500 ng/mL) además del control, que fue incubado con el correspondiente vehículo. Sobre estas células se midieron los niveles de mRNA de BMP-4. Así, se observó que los niveles de expresión de BMP-4 aumentaban cuando las células eran tratadas con sEng, aunque este incremento solo fue significativo al utilizar concentraciones superiores a 100 ng/mL (Figura 35A).

El siguiente paso fue analizar si este incremento de la expresión de mRNA se traducía en una mayor secreción de BMP-4 al medio. Esto se determinó utilizando un kit específico de ELISA para la detección de BMP-4 humano, analizando con ello el sobrenadante de los cultivos celulares incubados con sEng a las concentraciones de 40, 100 y 500 ng/mL. Los datos se normalizaron frente al control, y se observó que la expresión proteica de BMP-4 en las células tratadas con sEng se situaba en torno a 1,4 veces superior que las células control, mostrando una significación estadística a la concentración de 100 ng/mL (Figura 35B).

Estos resultados corroboraron la hipótesis de que sEng es capaz de inducir la expresión y la liberación de BMP-4, lo que postula a esta molécula como un firme candidato a mediar en el efecto de la sEng sobre la hipertensión.

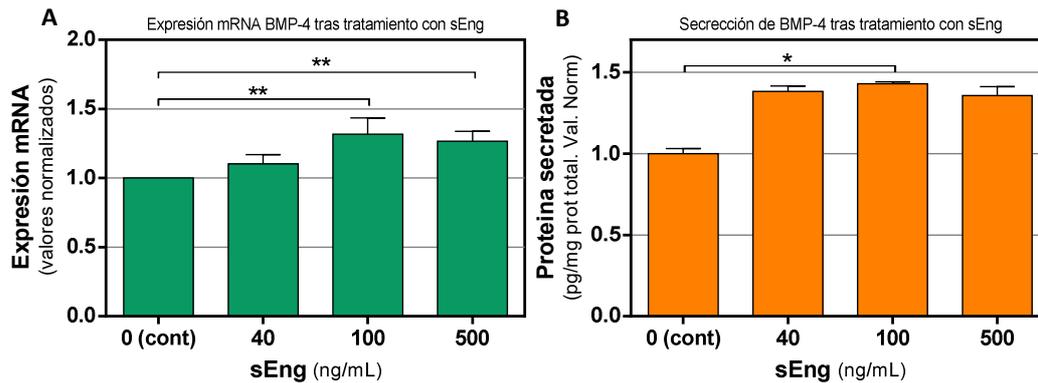


Figura 35. Expresión de BMP-4 en células. **A)** Niveles de expresión génica de BMP4 en HUVECs tratadas con concentraciones crecientes de sEng. Los valores han sido normalizados frente a los valores del control. n=5. **B)** Niveles de proteína BMP4 secretada al medio tras tratar las HUVECs con sEng. Los valores han sido normalizados frente al control. n=4. Se representa la media y su error estándar. Los datos de la gráfica **A** han sido comparados mediante ANOVA de una vía, utilizando como post-test el test de Dunnet. Los datos del panel **B** han sido comparados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, utilizando el test de Dunn como post-test. Significación estadística: *p<0,05;**p<0,01.

2.4.c.ii. Estudios in vivo

Una vez comprobado el efecto de sEng sobre la expresión de BMP-4 en células endoteliales, el siguiente paso que se siguió fue verificar que estos efectos se produjeran también en los animales. Así, la hipótesis de trabajo era que los elevados niveles de sEng presente en nuestros animales transgénicos produciría un incremento en la expresión de BMP-4.

2.4.c.ii. Efecto de sEng sobre la expresión de BMP-4 *in vivo*

El primer paso fue evaluar, mediante ELISA, los niveles plasmáticos de BMP-4 tanto en los animales que sobreexpresan sEng como en los animales control. Se observó que los ratones sEng presentaban unos niveles de BMP-4 en plasma en torno a 25 ng/mL, frente a los 15 ng/mL que presentaban los animales control (Figura 36A). Además, estas diferencias mostraban una fuerte significación estadística.

Esto indicaba que, al igual que se había observado en células endoteliales en cultivo, la sobreexpresión de sEng induce un incremento en los niveles de BMP-4 circulantes.

Con objeto de profundizar en esta regulación, se analizó si sEng era capaz de modificar la expresión de BMP-4 en diferentes órganos. Para llevar a cabo esta comprobación, se escogieron dos órganos que muestran un alto nivel de expresión de BMP-4 en individuo adulto, como son el estómago y el duodeno. Además, se incluyó el pulmón por dos razones, primera porque es un órgano con bastante expresión de BMP-4, y segunda porque presenta una gran cantidad de endotelio, lo que nos permitiría ver el posible efecto directo de sEng en la expresión de BMP-4 por el endotelio (v17.proteinatlas.com 2017).

En un primer experimento, se midió la expresión génica de BMP-4 tanto en pulmón, como estómago y duodeno de los animales sEng, comparándolos con la expresión en los animales control. Esta valoración se realizó mediante qRT-PCR, utilizando como referencia el RNA ribosómico 18S. Los resultados se normalizaron frente al RNA 18S mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, y también frente a la expresión de los animales control. Al analizar los resultados, se observó que la expresión génica de BMP-4 era casi 2 veces mayor en los animales sEng que en los animales control, siendo estas diferencias altamente significativas (Figura 36B). En el mismo sentido, tanto la expresión de BMP-4 en estómago como en duodeno mostraron unos niveles cercanos a 2,5 veces la expresión de los animales control, siendo también altamente significativas estas diferencias (Figura 36C y 36D).

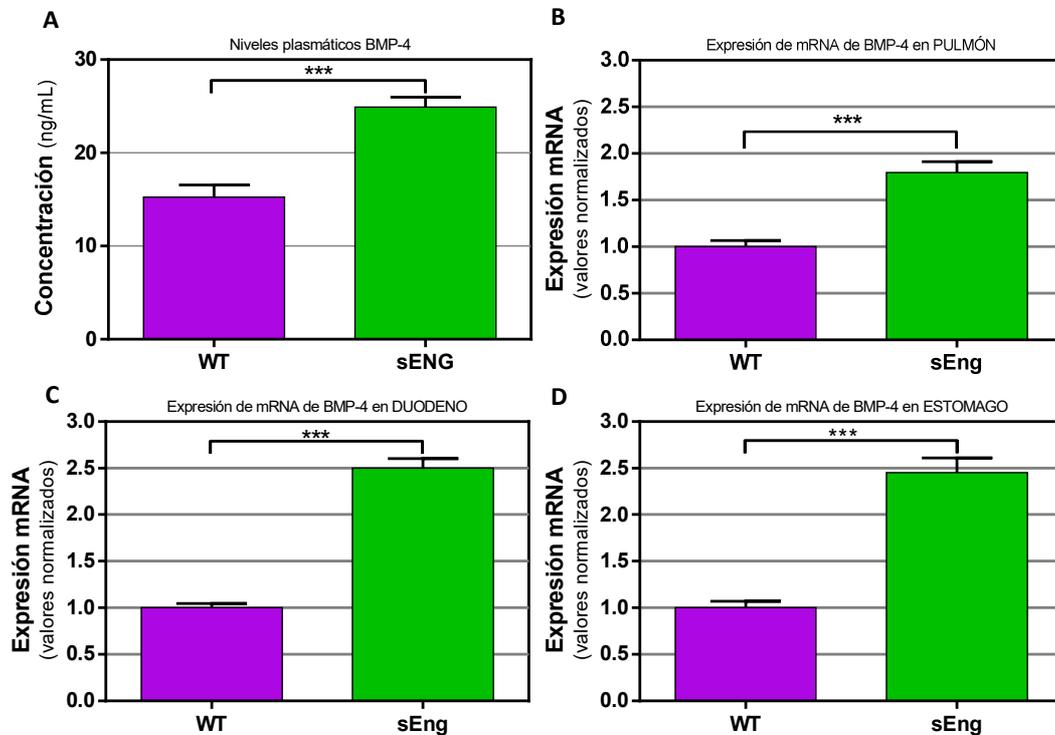


Figura 36. Niveles plasmáticos y de expresión genética de BMP-4. A) Niveles plasmáticos de BMP-4 circulantes en plasma. N= 6 ratones WT y 5 ratones sEng. B) Niveles de expresión de mRNA de BMP-4 en pulmón. N=7 animales para en ambos genotipos. C) Niveles de expresión de mRNA de BMP-4 en duodeno. N= 7 ratones WT y 8 ratones sEng. D) Niveles de expresión de mRNA de BMP-4 en estómago. N= 5 ratones WT y 7 ratones sEng. Los resultados de las gráficas B, C y D se expresan normalizados, utilizando como control interno de la qRT-PCR la expresión de RNA ribosómico 18S. Se representa la media y su error estándar. Los datos de la gráfica A han sido comparados mediante u-Mann-Whitney. Los datos de las gráficas B, C y D han sido comparados mediante t-Student para muestras no pareadas. Significación estadística: *** $p < 0,001$.

2.4.c.iii. Patrón de expresión tisular de BMP-4 en ratones sEng y WT.

Una vez observado que los animales sEng presentaban un mayor grado de expresión genética de BMP-4, se decidió analizar el patrón de localización de la proteína en cada uno de los órganos estudiados. Es de resaltar que aunque la expresión tisular de BMP-4 se ha descrito en humanos (v17.proteinatlas.com 2017), la información sobre el patrón de expresión en tejidos de ratón es escasa. Un objetivo adicional de esta aproximación era

comprobar si la sobreexpresión de sEng, además de incrementar la expresión de BMP-4, era capaz de modificar su patrón de expresión dentro del tejido.

Para esta aproximación, se obtuvieron muestras de pulmón, estómago y duodeno de ratones sEng y WT. Estas muestras se fijaron en formaldehído, se incluyeron en parafina para el corte, y posteriormente se tiñeron con un anticuerpo específico anti-BMP-4. El revelado de esta tinción se realizó mediante diaminobencidina, y se utilizó hematoxilina como tinción de contraste.

Tras hacer una inspección general de las muestras a pocos aumentos, no se observaban grandes diferencias entre el patrón de tinción de los órganos controles respecto a los órganos de animales que sobreexpresaban sEng. Posteriormente, se realizó un análisis más pormenorizado de las muestras, utilizando para ello el objetivo de 20 aumentos (x20).

En pulmón, se pudo observar como el patrón de expresión de BMP-4 se situaba en la lámina basal del árbol bronquial, así como en la pared de los vasos sanguíneos y en macrófagos pulmonares. El resto del tejido pulmonar no mostraba tinción para BMP-4. Este patrón de expresión era igual en ambos genotipos, no observándose diferencias entre los que sobreexpresaban sEng y los animales WT (Figura 37 Pulmón).

En el caso del duodeno, el grado de tinción que se observaba era mucho mayor que en pulmón, lo que parecía concordar con lo observado por qRT-PCR. Dentro de este órgano, se observó una gran cantidad de tinción en las células del epitelio intestinal, siendo más patente hacia la zona apical de las células, quizá debido a la localización basal de los núcleos, algo característico de este tipo celular. El resto de la pared intestinal mostraba una tinción más escasa. En este caso, tampoco se observaron diferencias en el patrón de expresión como efecto de la sobreexpresión de sEng (Figura 37 Duodeno).

En el caso del estómago, se observó una tinción de BMP-4 menos intensa que en el caso del duodeno. Esta tinción se centraba, sobre todo, en las células que recubren la parte apical de la mucosa. Además, se observó tinción en la lámina *muscularis mucosae*, aunque de menor intensidad que en el resto. En este caso, tampoco se observaban diferencias entre ambos genotipos (Figura 37 Estómago).

La gran cantidad de tinción que se observaba en los animales WT, sumada a la propia naturaleza cualitativa de la técnica utilizada, no permitieron la cuantificación exacta de la expresión de BMP-4. Por tanto, no se pudieron observar las diferencias como las obtenidas de los estudios del mRNA de BMP-4 en los mismos tejidos.

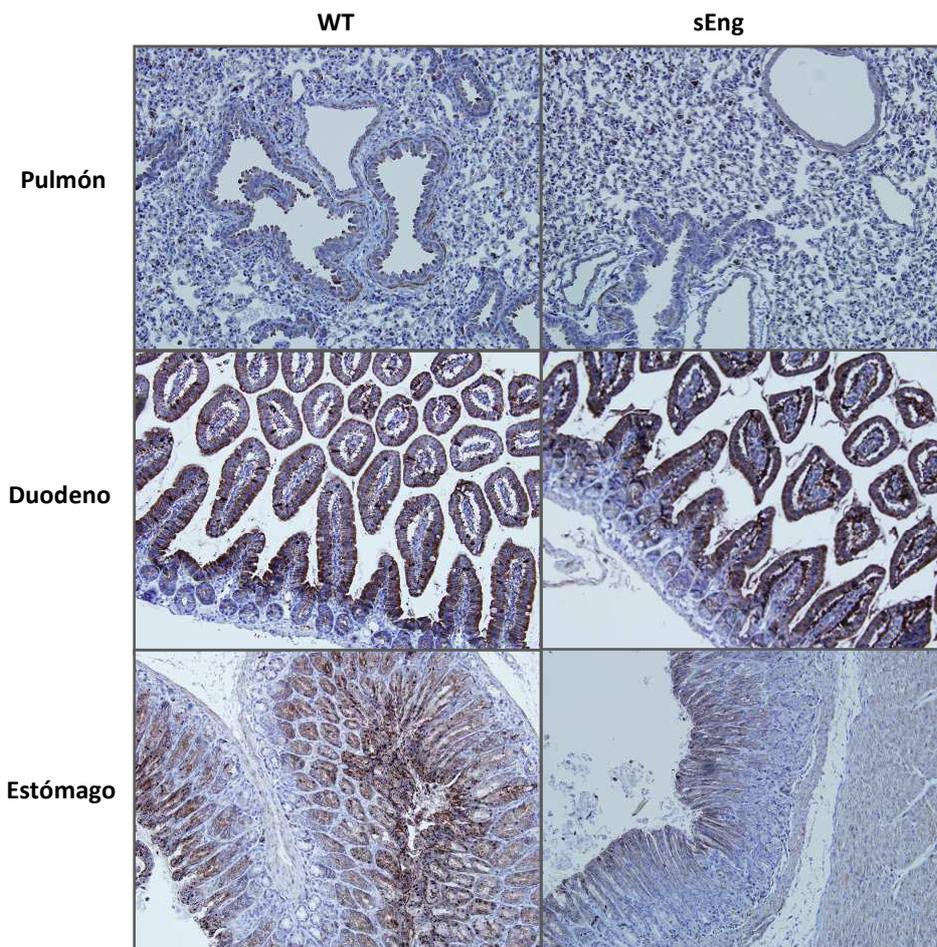


Figura 37. Inmunohistoquímica de BMP-4 en pulmón, intestino y estómago. Muestras de pulmón, intestino y estómago fijadas e incluidas en parafina fueron teñidas con anti-BMP-4, con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa, y con DAB para revelar la presencia del antígeno (color marrón). Como tinción de contraste se utilizó hematoxilina (color azul). Las imágenes fueron tomadas a 20x.

2.4.c.iv. Efecto mediador de BMP-4 en la respuesta hipertensora de endoglina soluble.

Una vez comprobado que sEng es capaz de producir un incremento de los niveles de BMP-4, y basándonos en lo descrito sobre el efecto de BMP-4 y la hipertensión, quisimos comprobar si BMP-4 estaba involucrada en el aumento de presión arterial producido por

sEng. Para comprobar esta relación entre la sEng, el BMP-4 y la hipertensión, nos propusimos bloquear BMP-4 en los animales sEng, para ver si así la hipertensión remitía.

Noggin es una glicoproteína homodimérica de 64 kDa de peso molecular, conocida por ser un regulador de BMPs y, en concreto, de BMP-4, al que se une y secuestra (Hirsinger y cols. 1997; Krause y cols. 2011). Por tanto, decidimos utilizar noggin para bloquear el efecto de BMP-4, y corroborar así si era efectivamente, el mediador en el efecto hipertensor de sEng. Para llevar a cabo los experimentos se generó un lote de 7 animales de cada genotipo. Tras un periodo de acostumbramiento, se midió la presión arterial en cola de todos los animales durante varios días. Una vez que se obtuvieron los datos de todos los animales, se compararon los resultados de los animales control con los animales sEng, comprobando que, efectivamente, los animales con sEng presentaban mayor presión arterial (Figura 38A).

Una vez comprobada la presión arterial, se implantaron bombas osmóticas con noggin o con el vehículo, tanto en animales sEng como animales control. En los días siguientes a esta implantación, se continuó midiendo la presión arterial de los animales.

Al analizar los resultados, se observó que ya aparecían diferencias entre los dos grupos a día 2 post-implantación (datos no mostrados). A día 4, se observó que los animales que portaban bombas osmóticas con el vehículo presentaban niveles de PA ligeramente superiores a los observados durante la medida de la PA basal. Aun así, los animales sEng continuaban mostrando unos niveles de PA significativamente superiores a los animales control. Al comparar los animales que portaban bombas con vehículo con los animales que portaban las de noggin, se observó que se producía una reducción muy significativa de los valores de PA en el grupo tratado con noggin, siendo mucho mayor el descenso en los animales sEng. Esto hizo que las diferencias en la PA existentes entre ambos genotipos desaparecieran completamente al tratarse con noggin (Figura 38B).

Los resultados a día 7 post-implantación seguían mostrando el mismo patrón que a día 4 (resultados no mostrados).

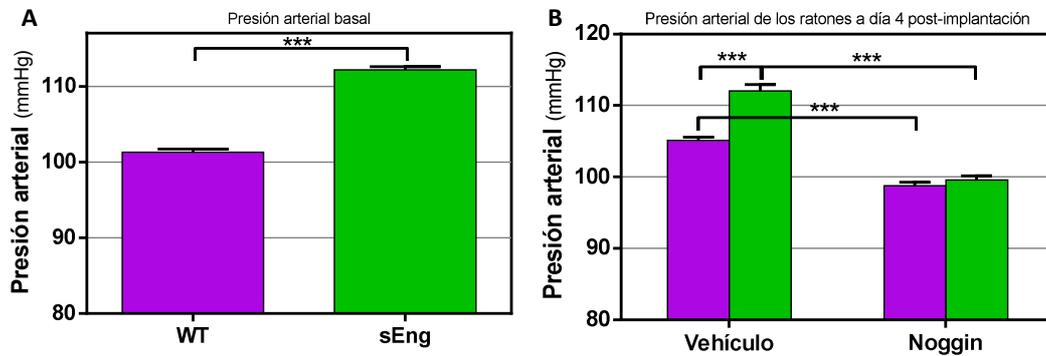


Figura 38. Presión arterial basal y con administración de noggin o vehículo. **A)** Presión arterial basal de los ratones antes de implantar la bomba con noggin o vehículo. N= 7 ratones WT y 7 ratones sEng. **B)** Presión arterial de los ratones cuatro días después de implantar la bomba. N= 4 ratones WT con noggin y 3 ratones WT con vehículo; N= 4 ratones sEng con noggin y 3 ratones sEng con vehículo. Se representa la media y su error estándar. Las barras verdes representan los ratones sEng, mientras que las barras magenta representan los ratones WT. Los datos de la gráfica **A** han sido comparados mediante u-Mann-Whitney. Los datos de la gráfica **B** han sido comparados mediante ANOVA de doble vía utilizando el test de Tukey como post-test. Significación estadística: *** $p < 0,001$.

Al analizar los niveles plasmáticos de BMP-4 en los animales que portaban la bomba con vehículo, se observó de nuevo que los animales sEng presentaban mayores niveles de BMP-4 que los animales WT. En cambio, al fijarnos en los animales tratados con noggin, observamos que los niveles plasmáticos de BMP-4 en ambos genotipos son muy similares y que además se correlacionan con los niveles de BMP-4 de los animales WT con vehículo (Figura 39A). Estos resultados demuestran que noggin es capaz de reducir el aumento de los niveles plasmáticos de BMP-4 inducidos por sEng.

Por otro lado, al analizar los niveles plasmáticos de sEng humana (que es la proteína que sobreexpresan los animales sEng), observamos que no modifican por la presencia de noggin, mostrando los mismos niveles tanto al tratar a los animales sEng con el vehículo como al hacerlo con noggin (Figura 39B).

En su conjunto, todos estos resultados demuestran que sEng produce hipertensión a través de la mediación de BMP-4. Así, sEng es capaz de inducir la expresión de BMP-4, incrementando sus niveles en plasma. A su vez, la inhibición de BMP-4 mediante la utilización de noggin revierte el fenotipo hipertensivo inducido por sEng. Estos resultados podrían explicar el retraso observado entre el incremento de los niveles plasmáticos de endogлина soluble y la aparición de la hipertensión observado tanto en pacientes como en modelos experimentales (Perez-Roque, 2017).

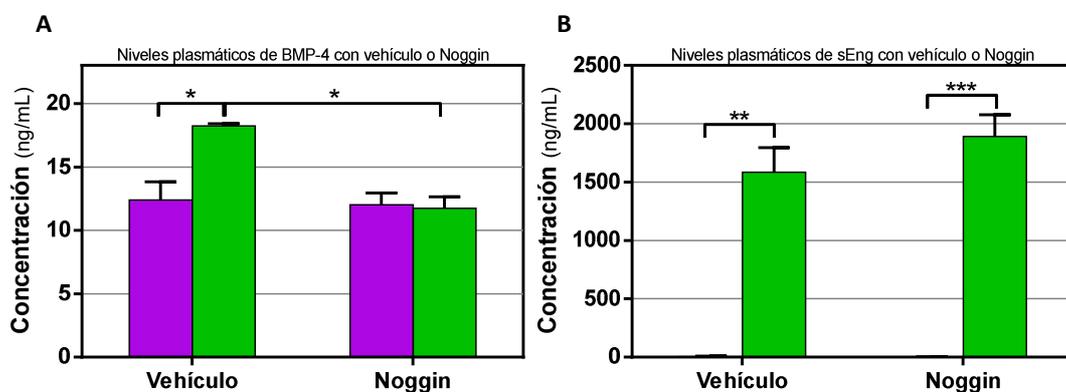


Figura 39. Niveles plasmáticos de BMP-4 y sEng tras tratamiento con noggin. A) Niveles plasmáticos de BMP-4 a los 7 días de haber implantado la bomba. B) Niveles plasmáticos de BMP-4. Las barras verdes representan los ratones sEng, mientras que las barras magenta representan los ratones WT. N= 4 ratones WT con noggin y 3 ratones WT con vehículo; N= 4 ratones sEng con noggin y 3 ratones sEng con vehículo. Se representa la media y su error estándar. Los datos de ambas gráficas han sido comparados mediante ANOVA de doble vía utilizando el test de Tukey como post-test. Significación estadística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Discusión

"Conserva celosamente tu derecho a reflexionar, porque incluso el hecho de pensar erróneamente es mejor que no pensar en absoluto".

Hipatia de Alejandría

La preeclampsia es una patología del embarazo de gran incidencia mundial y que supone un gran riesgo, tanto para la vida de la madre, como del feto. Las manifestaciones clínicas más características de esta patología son la hipertensión, la proteinuria, el edema pulmonar, cerebral y en la retina, así como el fallo renal y las coagulopatías (Neal y cols. 2004; Lin y cols. 2012). La complejidad de las manifestaciones clínicas y el impacto socioeconómico de esta enfermedad hace necesaria la identificación de las moléculas implicadas en el establecimiento y desarrollo de la patología, así como el papel específico y el mecanismo concreto por el cual producen sus efectos. Todo esto es esencial para el entendimiento de la fisiopatología de esta enfermedad y el desarrollo futuro de terapias para la misma, así como de un diagnóstico más temprano y certero de esta patología (Grill y cols. 2009).

Como ya ha quedado patente en las anteriores secciones de esta tesis, la forma soluble de la endoglina (sEng) podría jugar algún papel en la fisiopatología de la preeclampsia, ya que sus niveles plasmáticos se relacionan con la gravedad de los síntomas y se encuentran aumentados incluso antes de que aparezcan dichos síntomas clínicos (Levine y cols. 2006; Hagmann y cols. 2012; Venkatesha y cols. 2006). El objetivo de este estudio es desvelar cuál es el papel concreto que esta molécula juega en los diferentes síntomas y signos que aparecen en preeclampsia.

Para la realización de este trabajo, hemos utilizado una línea de ratones transgénicos que sobreexpresa endoglina soluble humana de forma ubicua. Comparamos sus respuestas con las de los ratones control (WT). Se utilizó la sobreexpresión de la proteína humana y no de ratón porque esto permite diferenciar la proteína endógena de la modificada exógenamente.

Una vez generadas y establecidas las colonias de ratones sEng, analizamos tanto las características generales de los animales (peso, camadas...) como de la herencia del transgen (número de crías que lo heredaban y el sexo) fueran homogéneas. Así, se observó que, al intentar establecer la modificación en un genotipo puro, la expresión del transgen se perdía, por lo que hubo que mantener las colonias en un genotipo híbrido. Por lo demás, las características físicas eran similares entre los animales, a excepción de los niveles de sEng que presentaban en el plasma.

1. Papel de la endoglina en proteinuria y podocituria.

Nuestra primera aproximación fue el estudio del papel de la sEng en el establecimiento de la podocituria y la proteinuria. Tradicionalmente, se ha descrito a la proteinuria como uno de los signos más característicos de la preeclampsia, siendo uno de los criterios clínicos para el diagnóstico de la preeclampsia. Por otro lado, actualmente se reconoce a la podocituria como otro signo de la patología, incluso se ha propuesto como un marcador temprano de la preeclampsia (Craici y cols. 2013; Konieczny y cols. 2013; Furuta y cols. 2017; Garovic y cols. 2007a; Aita y cols. 2009).

Tanto la podocituria como la proteinuria están relacionadas con un mismo problema: la pérdida de la barrera de filtración. La barrera de filtración está compuesta por la pared de los capilares glomerulares, en la que pueden encontrarse tres capas: el endotelio fenestrado que recubre los capilares por su cara interna, la membrana basal y el espacio dejado por los pedicelos, una serie de prolongaciones citoplasmáticas de los podocitos que rodean los capilares. Esto, junto con el manto celular cargado negativamente, genera un entramado que actúa como un cedazo selectivo por tamaño y carga de las moléculas que se pueden filtrar (Gould y Burgner 2016). La unión de los podocitos a la membrana basal de glomérulo está mediada, entre otras moléculas, por integrinas (Sachs y Sonnenberg 2013). Puesto que sEng presenta un dominio de unión a integrinas (RGD), nosotros nos planteamos la hipótesis de que sEng fuera capaz de interferir en la unión de los podocitos mediada por integrinas, produciéndose podocituria y proteinuria.

En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que la sobreexpresión continua de sEng en ratones es capaz de generar podocituria (Rossi y cols. 2016). Esta pérdida de podocitos debería relacionarse con un incremento de la proteinuria, ya que la pérdida de los podocitos glomerulares se asocia siempre a proteinuria en múltiples enfermedades renales (Trimarchi 2017) pero, en cambio, la relación entre la sEng y la proteinuria no está clara. Así, algunos estudios muestran un ligero incremento del cociente proteinuria/creatinina al sobreexpresar sEng, pero estas diferencias no llegaron a ser significativas (Venkatesha y cols. 2006). Si sEng es capaz realmente de producir una pérdida de podocitos, lo más normal es que se correlacionase con un incremento de la proteinuria (Aita y cols. 2009; Craici y cols. 2013). Esta discrepancia puede ser debida a que la podocituria descrita fue medida en un modelo de exposición crónica a sEng (Rossi y cols. 2016), mientras que la proteinuria medida en esta tesis fue tras una exposición aguda a sEng.

En nuestro estudio, analizamos el papel de la sEng en la aparición de la podocituria tras un aumento agudo de las concentraciones plasmáticas de sEng. Determinamos la presencia de marcadores específicos de podocitos en la orina mediante PCR. En concreto, analizamos las cantidades urinarias de mRNA de podocina, podocalixina y nefrina, que son proteínas bastante específicas de los podocitos (Kim y cols. 2016; Furuta y cols. 2017), y que, al formar parte del complejo proteico del diafragma en hendidura, están estrechamente relacionadas con la función de filtración glomerular (Barisoni 2005). Al analizar los amplicones correspondientes de estos genes, no observamos ningún tipo señal en las zonas donde deberían estar localizados (Figura 18). Esto significa que, a diferencia de lo que ocurre con los aumentos crónicos (Rossi y cols. 2016), el aumento agudo de las concentraciones plasmáticas de sEng no es capaz de producir podocituria, ni siquiera a concentraciones superiores a los niveles presentes en mujeres con preeclampsia.

Al igual que en el caso de la podocituria, nuestros resultados demuestran también que en nuestras condiciones el aumento agudo de los niveles de sEng no es capaz de producir proteinuria. Que nuestros resultados con los incrementos agudos de sEng no indujeran efectos en proteinuria y podocituria, no significa que sEng no sea capaz de producir podocituria y proteinuria en otro contexto experimental. Los podocitos son células irregulares, que emiten gran cantidad de prolongaciones, y establecen gran número de uniones, tanto con la membrana basal como en las interdigitaciones de los pedicelos (Armelloni y cols. 2014). Esto puede hacer que, aunque sEng sea capaz de alterar las uniones que mantienen anclados los podocitos a la membrana, el corto periodo de tiempo de los experimentos en agudo no sea suficiente para producir la liberación completa del podocito. Además, se ha descrito que cuando se produce la pérdida de un número limitado de podocitos, los podocitos adyacentes son capaces de emitir prolongaciones citoplasmáticas que cubren los huecos dejados, reestableciendo la barrera de filtración (Trimarchi 2017). Así, aunque se pierda un número limitado de podocitos, la barrera de filtración glomerular se mantendrá estable, sin que aparezca la proteinuria. Todo esto haría que se necesite una exposición crónica a niveles elevados de sEng para que se produzca la liberación de suficiente número de podocitos, tanto para ser detectados como para comprometer la estabilidad de la barrera de filtración. Ésta hipótesis concordaría con lo observado en pacientes con preeclampsia, donde se ha descrito que los niveles de sEng aumentan, y se mantienen elevados, desde mucho antes de que aparezca la proteinuria y las demás manifestaciones clínicas (Levine y cols. 2006; Hagmann y cols. 2012).

Para comprobar el efecto a la exposición crónica de sEng, se utilizaron los ratones sEng, que sobreexpresan sEng en niveles elevados a lo largo de toda su vida. De estos ratones se extrajeron los riñones y se hicieron tinciones con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y tinciones específicas con anticuerpos anti- α SMA, podocina y Wilms Tumor-1 (WT-1), donde se pudo observar que los niveles de estas proteínas, y por tanto de podocitos, eran significativamente menores en los animales sEng que en los animales WT (Rossi y cols. 2016). Estos resultados corroborarían la hipótesis de que sEng produce podocituria. En cambio, otros autores han descrito que el número de podocitos en los riñones de mujeres con preeclampsia es similar al que presentan mujeres con gestación normal y mujeres no gestantes (Penning y cols. 2014). En este estudio se describe un incremento de la proliferación celular en el glomérulo, lo que explicaría por qué el número de podocitos no desciende aun habiendo podocituria (Penning y cols. 2014). A su vez, la explicación de este hecho mediante el incremento de la proliferación no se correlaciona con la baja tasa de reposición y de proliferación descrita en podocitos (Zhai y cols. 2016; Trimarchi 2017). En este sentido, pensamos que tras una exposición crónica a niveles elevados de sEng, se produce una gran pérdida de podocitos y debido a la altísima especialización de estas células, su tasa de reposición es muy baja, comprometiéndose la estructura de la barrera de filtración. Además, este hecho se correlacionaría con la persistencia de los síntomas durante varias semanas, incluso meses, después del alumbramiento, mientras que los niveles de sEng se normalizan rápidamente tras el parto (Craici y cols. 2013; Wang y cols. 2015; Zhai y cols. 2016).

Por otro lado, en los ratones sEng se realizó la recogida de orina durante 24 horas en jaulas metabólicas. Estas orinas fueron sometidas a citospin, con el fin de que todas las células presentes en la orina quedaran adheridas a un portaobjetos. Una vez fijadas las células se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina, para poner de manifiesto la presencia de células, además de tinciones específicas para detectar podocitos: α SMA, podocina y WT-1. Se observó que el número de células marcadas positivamente con estos anticuerpos era mayor en las orinas provenientes de ratones sEng que en los ratones control. Por último, se midió en orina la concentración de nefrina y podocina por medio de la técnica de ELISA. Aquí observamos un aumento significativo de los niveles proteicos de estos marcadores de podocituria en los ratones sEng. Todos estos resultados han sido publicados por nuestro grupo (Rossi y cols. 2016), aunque no son mostrados en esta tesis.

Así, nuestros resultados sugieren que sEng es capaz de competir con la endogлина de membrana en su unión a las integrinas. Este bloqueo desestabiliza la unión entre las células endoteliales y los podocitos, de forma que por acción de la presión de la orina los podocitos se liberan y se secretan con ésta. La pérdida de podocitos, junto con la baja o nula tasa de renovación de este tipo celular tan específico (Pabst y Sterzel 1983; Zhai y cols. 2016; Furuta y cols. 2017), hace que se pierda la barrera de filtración glomerular normal y es un factor de riesgo de daño glomerular posterior al parto (Müller-Deile y Schiffer 2017). Esta pérdida de la barrera de filtración sería la responsable de la proteinuria observada en preeclampsia. Además, nuestros resultados muestran que para que se dé la desestabilización de las uniones y la pérdida de podocitos, se precisa una exposición continuada a niveles elevados de sEng, tal y como ocurre en preeclampsia. Esto podría explicar el retraso que hay entre la elevación de los niveles plasmáticos de sEng, la liberación de podocitos y el establecimiento clínico de la proteinuria (Levine y cols. 2006; Ahmed y cols. 2017; Craici y cols. 2013).

2. Endogлина soluble y permeabilidad vascular.

El incremento de la permeabilidad vascular es otra de las características clínicas de la preeclampsia (Walshe y cols. 2009b). Aunque la presencia de edemas es dependiente del incremento del volumen plasmático, regulado mediante la retención renal de sodio y agua, el aumento de permeabilidad implica un desbalance en el flujo de fluidos a través de las paredes de los capilares (Oian y cols. 1986). Este desbalance parece ser la pieza clave en el desarrollo de la permeabilidad, ya que en la gestación normal se produce un incremento del volumen plasmático sin que esto desemboque en un aumento en la permeabilidad y el edema (Brown y cols. 1989).

Uno de los factores clave para que se altere el flujo de fluido a través de las paredes de los capilares es la pérdida de la función del propio vaso como barrera. Entre las causas que podrían posibilitar la pérdida de la función de barrera, se ha descrito un incremento en el tamaño de los poros endoteliales (Neal y cols. 2004), el cambio en el patrón de expresión y redistribución de proteínas de unión intercelulares, tales como VE-caderina y ocludina (Wang y cols. 2002) o la aparición de los efectos de VEGF-A y de VEGF165b (isoforma de VEGF-A) a concentraciones fisiológicas normales, debido a que la disminución de los niveles de PlGF-1 en preeclampsia desbloquea la expresión de VEGFR1, su receptor natural, amplificando sus efectos (Bills y cols. 2011). Algunos estudios señalan que este aumento de la permeabilidad vascular se debe a factores presentes en el plasma de mujeres con

preeclampsia (Bills y cols. 2011; Roberts y cols. 1992; Zhang y cols. 2003; Neal y cols. 2004). También se ha descrito que la interacción pericito-célula endotelial juega un papel muy importante en el desarrollo y estabilidad de los vasos. De igual manera, se ha postulado que para que esta interacción se produzca de forma óptima, son necesarios tanto la señalización a través de TGF- β , como la presencia de niveles adecuados de endogлина de membrana (Walshe y cols. 2009b; Rossi y cols. 2016). En ambos casos, sEng podría actuar como antagonista competitivo, comprometiendo la estabilidad del vaso y la unión de los pericitos (Rossi y cols. 2016), y perdiendo su función como barrera.

Para determinar si sEng es capaz de producir un incremento en la permeabilidad vascular, utilizamos las retinas de ratones sEng y control a los que se les había inyectado previamente FITC-dextrano por vía intravenosa. La retina de ratón nos permitió analizar de una forma visual tanto la extravasación del fluorocromo fuera de los capilares, como la posible existencia de malformaciones arteriovenosas que lo pudieran explicar. Además, la utilización de este tejido estaba respaldada por la bibliografía, ya que diferentes autores han descrito la presencia de daños por extravasación en las retinas de mujeres en fases agudas de la preeclampsia (Morikawa y cols. 2017; Androudi y cols. 2007; Lin y cols. 2012).

Utilizamos como fluorocromo FITC unido a dextrano de un peso molecular de 2.000 kDa. Este tamaño de molécula tan elevado se usó para evidenciar zonas con alteraciones muy significativas en la permeabilidad capilar. Tras una hora desde la inoculación de la molécula fluorescente, se extrajeron y analizaron las retinas. Observamos que la estructura general de la retina y de los vasos era muy similar en ambos genotipos, sin la presencia de grandes alteraciones. Esto se evidenció porque tanto el área que ocupaban los vasos como la intensidad de señal de los propios vasos era muy similar en ambos casos. Además, no se observaban alteraciones en la estructura de la red capilar de ninguno de los animales. Por otro lado, se observó que tanto el área ocupada como la intensidad de la señal fluorescente de las extravasaciones en los animales que presentaban niveles elevados de sEng eran mayores que en los ratones WT. Estos resultados demuestran que sEng es capaz de alterar la permeabilidad vascular. Estos hallazgos son similares a los descritos por otros autores en diferentes órganos, como el pulmón y el riñón (Venkatesha y cols. 2006), demostrando que sEng es capaz de producir edemas en multitud de órganos como los descritos en preeclampsia (Neal y cols. 2004; Lin y cols. 2012).

Nuestros resultados también concuerdan con los datos que obtuvimos con los ratones heterocigotos de endoglina, donde la disminución en los niveles de esta proteína en la membrana dificulta el correcto acoplamiento entre las células endoteliales y murales, provocando la pérdida de estas últimas y aumentando la permeabilidad vascular. Puesto que sEng es capaz de competir con la endoglina de membrana por la unión a integrinas, impidiendo tanto la unión integrina-endoglina de membrana como la cascada de señalización intracelular, el modelo de sobreexpresión de sEng podría asemejarse a la haploinsuficiencia de endoglina de membrana. Teniendo en cuenta todos estos resultados, podemos, en este caso, proponer que sEng actuaría como un inhibidor competitivo de la endoglina de membrana, produciendo alteraciones en las uniones entre células murales y endoteliales, lo que conllevaría un incremento en la permeabilidad del vaso (Rossi y cols. 2016).

3. Efecto de endoglina soluble sobre la hemostasia.

Otro de los síntomas característicos de la preeclampsia es que las pacientes que la sufren presentan alteraciones en los sistemas encargados de la coagulación (Gardiner y Vatish 2015; Gardiner y Vatish 2017). Si bien es cierto que, en estado de gravidez, las mujeres gestantes ya experimentan alteraciones en los diferentes sistemas involucrados en la hemostasia, en preeclampsia los efectos son mucho más marcados. Así, en mujeres con gestación normal se produce un incremento moderado de factores pro-coagulantes y una disminución de los sistemas fibrinolíticos, y que se relacionan con una adaptación fisiológica en aras de controlar y reducir el sangrado en el momento del parto (Holmes y Wallace 2005; Pinheiro y cols. 2013; Gardiner y Vatish 2015; Gardiner y Vatish 2017).

En preeclampsia, se han descrito, desde los años 50, defectos en la coagulación sanguínea y trombocitopenias como signos frecuentes (Pritchard y cols. 1954). Muchos de los cambios hemostáticos observados en los estadios menos graves de preeclampsia se pueden asociar con un aumento de la respuesta fisiológica materna normal, mientras que en los estadios más graves se produce un desbalance patológico de la hemostasia, reflejando la inflamación sistémica y la disfunción endotelial características de esta patología (Macey y cols. 2010; Gardiner y Vatish 2015; Gardiner y Vatish 2017).

En este trabajo quisimos evaluar la función hemostática en general. Para ello, medimos el tiempo de sangrado, para comprobar si los ratones sEng presentaban alteraciones en la coagulación respecto a los ratones control. La técnica de tiempo de sangrado es una técnica

ampliamente utilizada en modelos animales para determinar, de forma general, si hay algún tipo de alteración en la hemostasia. Además, esta técnica ha sido utilizada para predecir el riesgo de hemorragia en mujeres gestantes ante la necesidad de practicarles una cesárea (McDonagh y cols. 2001). En nuestros experimentos, observamos que no existían diferencias entre los ratones sEng y los WT en el tiempo de sangrado durante los primeros momentos de la prueba y hasta el primer cierre del flujo (Figura 23A-B). En esta parte del experimento hay que tener en cuenta que, tras el corte y en los primeros momentos del daño, se produce una constricción de los vasos dañados, lo cual favorece la formación del trombo primario. Este espasmo vascular no dura mucho en el tiempo. Por el contrario, cuando analizamos el tiempo de sangrado de los resangrados (Figura 24A-B), los animales sEng presentaban un grado de sangrado mayor y una duración mayor que los animales control. Además, el número de animales sEng que sufrían resangrados y el número de ratones que continuaban sangrando al final del tiempo de técnica estipulado era sensiblemente mayor que los ratones WT.

La alteración en el tiempo de sangrado y el número de resangrados nos indicó que sEng podría estar alterando de algún modo el proceso de formación y estabilización del trombo, ya que los animales que presentaban niveles elevados de endoglina soluble en el plasma, mostraban dificultades a la hora de resolver adecuadamente la hemorragia. Esta alteración iría más allá del primer cierre, donde la respuesta espasmódica del vaso ante el daño estaría jugando un papel muy importante.

Estos resultados van en la misma línea que los aportados por otros autores, que describen un incremento del tiempo de sangrado en las mujeres con preeclampsia respecto a mujeres sin preeclampsia (Kelton y cols. 1985; Fuentes y cols. 1995; Eskild y Vatten 2009), aunque otros autores señalan que esto solo ocurre en los casos más graves de preeclampsia, mientras que en los más leves no hay diferencias significativas (Ivankovic y cols. 1994). Además, los datos obtenidos también están en la línea con lo descrito para el tiempo de sangrado en los ratones haploinsuficientes de endoglina de membrana (Rossi y cols. 2017). Así, la presencia de sEng antagonizaría el efecto de la endoglina de membrana, disminuyendo las interacciones entre esta endoglina de membrana y las integrinas, comprometiendo el proceso de formación del trombo.

Por otro lado, cabría esperar que, al ser la preeclampsia una patología del embarazo donde se ha descrito una exacerbación de efectos pro-coagulantes, el tiempo de sangrado

fuera menor en las mujeres con preeclampsia. Esta discordancia entre un incremento del tiempo de sangrado y un aumento de la actividad pro-coagulante puede ser debida a un excesivo desequilibrio de la hemostasia que tiene lugar en preeclampsia, lo que generaría un ligero agotamiento de los factores necesarios para la coagulación, comprometiendo el correcto cierre de la herida.

Entre las posibles causas que podrían explicar el incremento del tiempo de sangrado y del número de reaperturas estarían variaciones en la cascada de coagulación. Está ampliamente aceptado que en preeclampsia la cascada de coagulación presenta unos niveles de activación superiores a los niveles observados en embarazos normales, lo que se pone de manifiesto por una reducción en el tiempo de protrombina, tromboplastina, etc. (Gardiner y Vatish 2015; Shen y cols. 2013). Sin embargo, el efecto de una mayor activación de la cascada de coagulación podría sugerir una mayor coagulación y un menor tiempo de sangrado, lo que no estaría de acuerdo con lo observado en este trabajo.

Para valorar si sEng era capaz de modificar por sí sola la cascada de coagulación, medimos el tiempo de protrombina y el INR de los ratones transgénicos, comparándolo con los animales controles. Al analizar los resultados de ambos genotipos, no observamos diferencias significativas ni en el tiempo de protrombina ni en el INR. Estos resultados parecen contradecir lo que se describe en preeclampsia pero, en el caso de esta patología, entrarían en juego todo el ambiente hormonal propio del embarazo, el cual es capaz de producir por sí mismo el incremento de la cascada de coagulación, tal y como se observa en embarazos sin patologías asociadas (Hammerova y cols. 2014; Millar y Laffan 2015). Además, y en la misma línea de lo obtenido en este trabajo, otros autores han señalado que no encontraron diferencias en el tiempo de protrombina entre mujeres con preeclampsia y con embarazo normal (Y. Chen y Lin 2017) o incluso que el tiempo de protrombina aumentaba en las mujeres con preeclampsia (Spiezia y cols. 2015). Todo esto nos hizo pensar que sEng no ejerce un efecto claro sobre la vía extrínseca de la coagulación, por lo que las deficiencias de la hemostasia observadas en el tiempo de sangrado no se deben a este factor.

Otra de las posibles vías que pudieran explicar las diferencias observadas en el tiempo de sangrado es una disminución en el número de plaquetas. En una gestación normal, se produce una ligera reducción, en torno al 10%, del número de plaquetas mientras que a la vez se produce un incremento en el volumen plaquetario medio (Sill y cols. 1985; Boehlen y

cols. 2000). Sin embargo, en preeclampsia, la reducción del número de plaquetas es bastante superior, siendo un criterio de diagnóstico de preeclampsia un recuento plaquetario inferior a 100.000 plaquetas/ μ L (The American College of Obstetricians and Gynecologists y cols. 2013; Cines y Levine 2017).

Quisimos comprobar si sEng era capaz de producir un descenso en el recuento plaquetario por sí sola. Para ello, cuantificamos y comparamos el número de plaquetas basales que presentaban los animales control y los animales sEng, siendo estos valores prácticamente iguales en ambos genotipos (Figura 26A). Tampoco observamos una reducción del número de leucocitos sanguíneos (datos no mostrados) que sugiriera la formación de agregados plaquetas-leucocitos, característicos de la hiperactivación plaquetaria que ocurre en preeclampsia (Holthe y cols. 2005).

Puesto que la preeclampsia es una patología gestacional, decidimos comprobar si sEng necesitaba del ambiente hormonal de la gestación para producir un efecto que se tradujera en una reducción del número de plaquetas. Para ello, se midieron los niveles de plaquetas basales y a día 18 post-copula en hembras híbridas puestas en cruce con machos sEng o control. Al analizar los resultados, no solo no se encontramos diferencias en el número de plaquetas que presentaban las hembras de los diferentes cruces, sino que además observamos un incremento en el recuento plaquetario en torno al 25%. Estos resultados no se correlacionan con lo descrito en mujeres gestantes, ya sea con gestación normal o en casos de preeclampsia, ya que en todos los casos de gestación se describe una disminución del recuento plaquetario (Sill y cols. 1985; Reese y cols. 2017).

Por otro lado, que el exceso de sEng no produzca una reducción en el número de plaquetas respecto a lo que ocurre en animales normales concuerda con lo descrito por otros autores, que describen que sEng no tendría efecto sobre el recuento plaquetario por sí misma, sino que se necesitaría de la presencia conjunta de niveles elevados de sFlt-1 y sEng para producir dicho efecto (Venkatesha y cols. 2006).

Todos estos resultados demuestran que sEng por sí sola no es capaz de generar una disminución en el número de plaquetas, por lo que el incremento en el tiempo de sangrado observado en los animales sEng no se debe a una reducción en el número de plaquetas.

Una vez comprobado que el número de plaquetas no estaba jugando un papel en el incremento del tiempo de sangrado, quisimos analizar la capacidad de activación de las

propias plaquetas, ya que problemas en su activación podrían desembocar en una disminución de la capacidad de agregación plaquetaria y una hemostasia alterada.

Desde el punto de vista clínico, se ha descrito que en la preeclampsia se da un incremento en la activación plaquetaria respecto a los embarazos normales. Además, este incremento en la activación es anterior a la aparición de los demás signos clínicos de la enfermedad (Janes y Goodall 1994; Redman y cols. 1978; Gardiner y Vatish 2015). También se ha descrito que las plaquetas provenientes de mujeres con preeclampsia presentan una mayor respuesta a la activación con agonistas, en ensayos *in vitro*, que las plaquetas de mujeres con una gestación normal (Holthe y cols. 2004).

En este trabajo, hemos evaluado la capacidad de activación plaquetaria mediante la inyección intravenosa de una solución con colágeno y adrenalina, dos agonistas frecuentemente utilizados en este tipo de ensayos. La acción de los agonistas produce la activación plaquetaria, que desencadena la agregación plaquetaria y la formación de trombos intravasculares, lo cual se traduce en una reducción del número de plaquetas libres. Estos ensayos de trombocitopenia inducida se realizaron en animales sEng y control. Al comparar el número de plaquetas basales de ambos animales, no se observaron diferencias entre ambos grupos, lo que estaba de acuerdo con los resultados descritos anteriormente. Al inocular la solución de colágeno y adrenalina se observó un descenso a la mitad en el número de plaquetas, siendo estas diferencias altamente significativas. Este resultado nos indicó que el experimento funcionó adecuadamente, y que el colágeno y la adrenalina fueron capaces de activar las plaquetas. Cuando comparamos el número de plaquetas de los animales de ambos genotipos tras la inyección de los agonistas, observamos que el número de plaquetas era muy similar, lo cual indica que la capacidad de activación de las plaquetas no se ve influenciada por la presencia de sEng.

Los datos de activación plaquetaria obtenidos se correlacionan bien con la ausencia de diferencias en el recuento plaquetario anteriormente descrita. Puesto que el descenso en el recuento plaquetario, tanto en gestación normal como en preeclampsia, se asocia con una mayor activación plaquetaria y mayor agregación, esto conduciría a un consumo de las plaquetas libres (Redman y cols. 1978; Holthe y cols. 2004). Sin embargo, en nuestros experimentos no observamos ni una mayor activación plaquetaria ni un descenso en el recuento plaquetario. Estos resultados nos indican que sEng no es responsable de la mayor

activación plaquetaria ni del consumo de plaquetas observado en el embarazo y preeclampsia.

Dado que no habíamos encontrado diferencias ni en el número de plaquetas, ni en su activación, ni tampoco en el tiempo de protrombina que pudieran explicar el mayor tiempo de sangrado, decidimos analizar la maduración del trombo y la estabilidad con la que se une al vaso. El proceso de maduración y estabilización del trombo es un proceso complejo y tiene una importancia clave en la hemostasia. Generalmente, se había considerado este proceso como consecuencia directa de la agregación plaquetaria, pero en los últimos años se viene postulando la idea de que son procesos independientes (Denis y Wagner 2007). En este sentido, se ha descrito que tras la primera cascada de activación plaquetaria, se debe producir una segunda cascada de activación en las plaquetas, que desemboca en la estabilización del trombo (Denis y Wagner 2007). En esta segunda cascada de activación se producen una serie de señales, que previenen la agregación de más plaquetas (limitando la expansión del trombo), además de activar la retracción del trombo (Denis y Wagner 2007). En este sentido, se ha descrito que la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ juega un papel esencial tanto en la agregación inicial de las plaquetas, como en los procesos de estabilización y retracción del trombo (Denis y Wagner 2007; Cosemans y cols. 2013). La importancia de la señalización mediada por esta integrina es tal, que los procesos de estabilización y retracción del trombo no se dan en ausencia de esta proteína (Denis y Wagner 2007). La integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ también desempeña una importante función en la unión del trombo a la pared del vaso, ya que está involucrada en la adhesión de las plaquetas al FVW, además de interactuar con proteínas transmembrana de la pared vascular (Denis y Wagner 2007; Cosemans y cols. 2013). Puesto que la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ juega un papel esencial en el proceso de maduración y estabilización del trombo, y puesto que se ha descrito que la sEng es capaz de competir por la unión a esta integrina (Rossi y cols. 2017), nosotros planteamos la hipótesis que sEng es capaz de desestabilizar la correcta maduración y estabilización del trombo.

Para comprobar esta hipótesis, medimos el flujo carotídeo, a la vez que indujimos la formación de un trombo en la carótida con cloruro férrico. Este modelo permite analizar la dinámica de formación del trombo tras un daño químico (Kurz y cols. 1990). Puesto que el flujo puede ser un factor determinante, modificando la formación y estabilización del trombo (Cosemans y cols. 2013), se estableció un flujo carotídeo mínimo de 0,8 mL/min para comenzar el experimento. Este flujo depende, en gran medida, de la propia manipulación.

Nuestros resultados no mostraron diferencias entre ratones sEng y WT en las curvas que describían el comportamiento del flujo carotídeo a lo largo del tiempo. Se observó que los trombos se formaban más o menos al mismo tiempo, y que el tiempo necesario para el cese total de flujo era muy similar. Este hecho parecía indicar que sEng no es capaz de alterar la formación y estabilización del trombo, lo que chocaba frontalmente con nuestra hipótesis.

En cambio, cuando analizamos con más detalle las curvas individuales, se observó que los animales sEng presentaban un mayor número de fluctuaciones. A estas alteraciones se las denominó cierres parciales. Se contabilizaron todas aquellas fluctuaciones que representaran una recuperación de, al menos, el 20% del flujo total. Se observó que estas fluctuaciones se daban en la mayoría de los ratones con sEng, mientras que la mayor parte de los ratones WT no presentaban aumentos del flujo, una vez comenzaba a ocluirse el vaso. Por otro lado, se ha descrito que sEng es capaz de producir un incremento de la PA (Venkatesha y cols. 2006; Valbuena-Diez y cols. 2012). Este incremento de la presión podría producir un incremento del flujo y de la fuerza de arrastre de la sangre sobre el trombo, pudiendo ser la causa de las reaperturas, sin que la sEng realice ningún efecto directo. Por ello, se comparó el flujo carotídeo basal (antes de inducir la formación del trombo) de ambos genotipos, observándose que los ratones sEng presentaban un flujo inicial significativamente más bajo que el de los ratones WT, por lo que el menor cierre de los vasos de los animales sEng no parece poder explicarse por la mayor presión arterial de estos animales. Estos resultados sugieren que sEng es capaz de alterar el proceso de formación y estabilización del trombo, aunque no es capaz de impedir que se lleve a cabo en su totalidad. Esto puede ser debido a que tanto en la unión entre plaquetas, como la unión de las plaquetas al subendotelio expuesto, son llevadas a cabo por un gran número de moléculas y receptores de membrana (Denis y Wagner 2007). Que algunas de estas moléculas sean integrinas, sugiere que sEng, a través de su dominio RGD, es capaz de competir la unión de las integrinas a sus receptores, comprometiendo la correcta adhesión del trombo. Entre estas integrinas, la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ juega un papel destacado tanto en el proceso de fijación de las plaquetas como en el proceso de maduración del trombo (Denis y Wagner 2007; Shattil y Newman 2017). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que sEng no solo es capaz de unirse a la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, sino que es capaz de competir por su unión a la endoglina de membrana (Rossi y cols. 2017). Esta inhibición competitiva de la unión endoglina de membrana-plaqueta impide la correcta unión de las plaquetas al

endotelio, dificultando la adhesión del trombo (Rossi y cols. 2017). En este artículo también se describe que, aunque sEng es capaz de inhibir la unión de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ a endogлина de membrana, se sigue produciendo una adhesión residual (Rossi y cols. 2017). Esta adhesión residual es debida a otras moléculas, como el FVW, el complejo GPIIb-V-IX, o las integrinas $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ y $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, que no son interferidos por sEng y que juegan un papel menor en dicha adhesión (Rossi y cols. 2017). La duda que podría surgir es por qué no se suelta completamente el trombo, alterando otros parámetros, como el tiempo hasta cese total de flujo o área bajo la curva. La explicación que planteamos es que, aunque la aplicación del cloruro férrico fue localizada, tanto el tamaño del apósito (1x2mm) como la alta capacidad de difusión de dicho compuesto, podría generar un área extensa de daño endotelial. En este contexto, aunque sEng pueda competir con endogлина de membrana en su unión a integrinas, la existencia de otras uniones fuertes establecidas durante el daño hace que el trombo no se desprenda del todo, pero sí permita las alteraciones del flujo como las detectadas en esta tesis.

Se ha descrito que la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ es un receptor de fibrinógeno, FVW, fibronectina y vitronectina, siendo absolutamente esencial para la correcta agregación plaquetaria (Bennett 2005). En este sentido, la unión de sEng a $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ impediría que ésta se uniera a sus ligandos, lo que implicaría una disminución de la agregación plaquetaria, y una reducción en la cohesión del trombo. También se ha descrito que la activación de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ produce una cascada de señales intracelulares que conducen a una polimerización y reorganización de los filamentos de actina (Shattil y Newman 2017). Esta reorganización es fundamental para que se produzca la retracción del trombo, consolidando a las plaquetas dentro del trombo, y haciendo que el trombo sea menos susceptible a la fibrinólisis (Denis y Wagner 2007). En este sentido, la unión de sEng a la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ haría que el proceso de retracción y consolidación del trombo no sea adecuado, dificultando el proceso de coagulación. Este hecho puede explicar nuestros resultados, ya que, si no se produce una correcta retracción del trombo, éste se vuelve inestable, pudiendo dar lugar a las fluctuaciones que observamos en el flujo carotídeo de los animales sEng tras la administración de cloruro férrico.

Puesto que habíamos comprobado que sEng no afectaba a las vías de coagulación, ni al número de plaquetas, ni a la activación plaquetaria o a su capacidad de unirse entre sí, una posible explicación de estas alteraciones sería la implicación de sEng en la unión plaqueta-endotelio. Así, nuestros datos sugieren que el proceso de estabilización del trombo y su unión al endotelio pueden verse comprometidos por la presencia de sEng, sin que influya la

cantidad de flujo. De esta forma, serían estas alteraciones en el proceso de estabilización las que pueden dar lugar a los procesos de reapertura y sangrados observados en las medidas del tiempo de sangrado. El conjunto de estos resultados nos muestra que endoglina soluble no parece ser la responsable directa de desregular el balance hemostático hacia el fenotipo pro-coagulante que muestran las mujeres con preeclampsia, aunque sí que es capaz de alterar la hemostasia en general, debido a que es capaz de interferir en los procesos de formación y estabilización del trombo y su unión al endotelio.

4. Efecto de endoglina soluble sobre el incremento de la presión arterial.

El síntoma más clásico y característico de las pacientes con preeclampsia es la hipertensión asociada al embarazo. Para que se diagnostique preeclampsia, tiene que darse un establecimiento *de novo* de hipertensión en mujeres gestantes a partir de la segunda mitad de la gestación (Powe y cols. 2011), superando los 140 mmHg de presión arterial sistólica o 90 mmHg de presión arterial diastólica, y cumpliéndose, además, otros requisitos, como proteinuria, trombocitopenia, etc. (The American College of Obstetricians and Gynecologists y cols. 2013).

Aunque el incremento de presión arterial es el síntoma más característico de la preeclampsia, los mecanismos que subyacen a su aparición no se conocen del todo. Una de las posibles causas para el establecimiento de la hipertensión en la preeclampsia es la elevación de los niveles plasmáticos de sEng (Venkatesha y cols. 2006; Luft 2006; Levine y cols. 2006; Valbuena-Diez y cols. 2012), sin que se conozca el mecanismo exacto por el cual sEng lleva a cabo su actividad hipertensora.

Con la intención de arrojar un poco de luz sobre el papel que juega endoglina soluble sobre la hipertensión, se midió la PA en ratones que sobreexpresan sEng, comparándolos con los animales WT. Así, se observó que los animales sEng presentan unos niveles de PAS significativamente superiores a los que muestran los animales control. Puesto que la única diferencia, *a priori*, entre ambos grupos de animales es la sobreexpresión de sEng, este resultado confirma que sEng es capaz de producir un incremento de la PA.

Para comprobar que este incremento de la PA se debía solo y exclusivamente a la presencia de sEng, y no a otras posibles alteraciones producidas por el transgen, se midió la PA en hembras de genotipo híbrido, que habían sido cruzadas con machos WT o sEng. Este modelo recreaba mejor lo que ocurre en preeclampsia, puesto que todas las hembras

tenían el mismo genotipo, y la sEng la aportaban únicamente los fetos positivos. Además, al ser un modelo de gestación, también recreaba las condiciones hormonales que puede haber en preeclampsia. Con todo ello, los resultados también mostraron un incremento de la PA en aquellas hembras que portaban fetos sEng.

Ambos resultados reforzaron la idea de que sEng es capaz de producir un fenotipo hipertensivo, tanto en el entorno de la gestación como por sí misma. Además, estos resultados se correlacionan con las observaciones de otros autores, que describen que al sobreexpresar sEng, tanto en animales gestantes como no gestantes, se produce un incremento de la PA (Venkatesha y cols. 2006; Valbuena-Diez y cols. 2012).

Una vez que comprobado que sEng es capaz de producir un incremento de la PA, nos planteamos la hipótesis de que sEng fuera capaz de producir vasoconstricción a través de su unión a integrinas endoteliales. Esta interacción sEng-integrinas sería mediada por el dominio RGD, que se ha descrito que presenta actividad vasoconstrictora al unirse a integrinas, en concreto la integrina $\alpha V\beta 1$ (Yip y Marsh 1997; Mogford y cols. 1997).

Para comprobar esta hipótesis, incubamos anillos de aorta en presencia de sEng o del vehículo utilizado para disolverla, registrando la tensión del anillo. Tras 20 minutos de incubación, no observamos ningún tipo de variación en la tensión, ni en los anillos incubados con sEng ni en los incubados con el vehículo, lo que indicaba que sEng no es capaz de hacer ningún efecto directo sobre la vasomotricidad. Estos resultados descartan, *a priori*, la hipótesis de que sEng produce vasoconstricción por efecto directo sobre las integrinas de membrana. La falta de cualquier tipo de respuesta contrastaba con las observaciones de diferentes autores, que describen que el dominio RGD es capaz de producir vasodilatación. Esta vasodilatación sería mediada por la integrina $\alpha V\beta 3$, lo que induce la apertura de los canales de potasio, disminuyendo el calcio intracelular y provocando la relajación del vaso (Lipke y cols. 1996; Mogford y cols. 1996; Muller y cols. 1997; Ming y cols. 2000; Bakker y cols. 2001; Hein y cols. 2001; Welschoff y cols. 2014). Es probable que estas diferencias de respuesta frente al péptido RGD sean debidas a los distintos modelos experimentales usados en cada caso. En cualquier caso, nuestros resultados muestran que sEng no tiene efecto vasomotor directo.

Puesto que sEng no tiene un efecto directo sobre los vasos, nos planteamos la hipótesis de que sEng fuera capaz de modular la respuesta a diferentes agonistas vasomotores. En

este sentido, se propuso que sEng podría potenciar el efecto vasoconstrictor o inhibir el efecto vasodilatador de diferentes agonistas.

Para comprobar la hipótesis de la potenciación del efecto vasoconstrictor por la sEng, incubamos anillos de aorta en presencia de sEng y se estudió su respuesta ante dos agonistas vasoconstrictores, como son el potasio y la PE. La utilización del potasio como vasoconstrictor se debe a que produce una contracción vascular no mediada por receptores, sino que produce la despolarización de las células musculares, induciendo la contracción máxima. Por otro lado, la PE es un agonista de los receptores α -1 adrenérgicos, por lo que la contracción se produce por la activación de la fosfolipasa C (mediada por la activación de proteína Gq), que induce la liberación de inositol trifosfato, y un incremento del calcio intracelular (Hiremath y cols. 1991; Hennessey y McGuire 2013). En ninguno de los dos casos (potasio y PE) se observaron diferencias en la contracción entre los vasos incubados con sEng y los incubados con el solvente. Estos resultados sugieren que sEng no es capaz de potenciar el efecto vasoconstrictor por ninguno de los mecanismos descritos. Además, estos resultados concuerdan con lo descrito por otros autores, que no observan diferencias en la contracción, inducida por PE y potasio, de anillos de aorta tras incubarlos con plasma provenientes de mujeres con preeclampsia (Vedernikov y cols. 1999). En cambio, estos autores sí que observan una reducción de la contracción al incubar con plasma de mujeres con gestación normal (Vedernikov y cols. 1999). Estas diferencias en el patrón de contracción son dependientes de endotelio. Estos hechos, junto a la vasodilatación que se produce en la gestación normal, sugieren que en el plasma de las mujeres con preeclampsia hay una molécula que revierte el efecto refractario que tiene la gestación sobre la contracción vascular. Se ha hipotetizado que el factor responsable de este efecto actúa mediante la reducción de la síntesis de NO por las células endoteliales y, por lo tanto, reduciendo la respuesta vasodilatadora (Vedernikov y cols. 1999). Para comprobar si sEng es el factor responsable de este efecto, y si se reducía el efecto vasodilatador, incubamos anillos de aorta con sEng y se les indujo una contracción submáxima con PE. Como agonistas vasodilatadores, se utilizaron Ach (produce vasodilatación dependiente de endotelio) y NTP (un donador de NO, independiente de endotelio). La Ach actúa sobre receptores M3 muscarínicos del endotelio, acoplados a proteína Gq (J. Brown y Taylor 2006). La activación de estos receptores induce la producción de NO a través de la eNOS (J. Brown y Taylor 2006) y nos permite evaluar si sEng es capaz de reducir la liberación de NO. Por su parte, el NTP actúa como un donador de NO, por lo que no requiere la intervención ni del

endotelio ni de ningún receptor, y por tanto la información que nos daba era si sEng sería capaz de modificar el efecto propio del NO. En ambos casos, la potencia y la relajación máxima que producían era exactamente igual en presencia o ausencia de sEng, lo que nos indicaba que sEng no es capaz de modificar el efecto vasodilatador. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones de otros autores, que no observan diferencias en el efecto vasodilatador ni de Ach ni de NTP en mujeres con preeclampsia (Vedernikov y cols. 1999). Otros grupos reportan que las mujeres con preeclampsia presentan una mayor respuesta a Ach que las mujeres normales (Davis y cols. 2001). Tanto en los experimentos del grupo que no reporta diferencias, como del que reporta un mayor grado de respuesta, la vasodilatación inducida por Ach fue medida sobre la microvasculatura cutánea, mientras que nuestro estudio está hecho con la aorta. Por el contrario, otros grupos reportan que la vasorrelajación mediada por Ach se ve disminuida en arteria epigástrica (Oguogho y cols. 1996). La diferencia de los resultados podría deberse a la diferente metodología utilizada (en los dos primeros casos) y en la utilización de diferentes tipos de vasos.

En cualquier caso, lo que cabría esperar es que las mujeres con preeclampsia presentaran una menor respuesta vasodilatadora con Ach, pero que fuera similar en presencia de NTP. Esto se debería a que las mujeres con preeclampsia tendrían mayor concentración de sEng en plasma (Venkatesha y cols. 2006; Oujo y cols. 2013), que competiría con la endoglina de membrana. Se ha descrito que la endoglina de membrana juega un importante papel en la regulación de la vasodilatación dependiente de NO (Jerkic y cols. 2004), por lo que la competición con sEng produciría una menor producción de NO y, por lo tanto, una menor respuesta a Ach. Por el contrario, el NTP es un donador de NO independiente, por lo que la sEng no debería influir en su actividad.

El conjunto de los resultados muestra que sEng en condiciones agudas no es capaz de generar alteraciones en la vasomotricidad, en grandes vasos, que pudieran explicar el establecimiento del fenotipo hipertensivo.

Por otra parte, la regulación de la presión arterial es un mecanismo complejo, que implica la actuación conjunta de múltiples sistemas. Debido a esta complejidad en la regulación, otra posible explicación para el establecimiento de la hipertensión de los animales problema era que sEng fuera capaz de alterar alguno de los sistemas hormonales que regulan la presión arterial. Resultados de nuestro laboratorio, independientes a este trabajo y aun no publicados, habían mostrado que los ratones sEng no presentaban

alteraciones en los mecanismos clásicos de regulación de la presión arterial, como por ejemplo el sistema renina-angiotensina-aldosterona, etc., que pudieran explicar las bases del fenotipo hipertensivo mostrado por estos animales, respecto a los animales control.

Estos resultados concuerdan con lo que se observa en la clínica, donde el elevado incremento de los niveles de sEng es previo a la aparición de las primeras manifestaciones clínicas, dándose un periodo asintomático. Además, estos resultados también se correlacionan con los resultados de la doctora Lucía Pérez-Roque, quien describe que, en hembras híbridas cruzadas con machos sEng, se produce un incremento de la sEng hacia el día 12 de gestación, mientras que los niveles de PA no incrementan hasta días después (Pérez-Roque, 2017).

En los resultados presentados hasta ahora ha quedado demostrado que el aumento mantenido de la concentración plasmática de sEng por sí sola es capaz de inducir hipertensión. El establecimiento de esta hipertensión no se debe ni a un efecto directo de la sEng sobre el vaso, ni a la modulación de la respuesta vasomotora, ni a la producción de disfunción endotelial. También se ha demostrado que la hipertensión asociada a altos niveles de sEng no se deben a la alteración de los sistemas renina-angiotensina ni de las catecolaminas, mecanismos básicos de la regulación de la PA (Pérez-Roque 2017). Todo esto, sumado al retraso observado entre el incremento de la sEng en plasma y la aparición del fenotipo hipertensivo en el modelo de ratones hembras WT cruzadas con machos sEng, nos llevó a pensar que el efecto de sEng debe estar mediado por otro mecanismo.

Paralelamente, en el laboratorio del Dr. Carmelo Bernabeu (CIB, CSIC, Madrid), la Dra. Eunaté Gallardo Vara había analizado el secretoma de células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVECs) tratadas con sEng, mediante experimentos de *iTRAQ* y el posterior análisis por LS-MS/MS. Este análisis del secretoma arrojó un gran número de proteínas cuya expresión se modificaba por efecto de la incubación con endoglin soluble. Una de las proteínas que más aumentó su expresión fue la proteína morfogenética ósea 4 o BMP-4 (del inglés, *Bone Morphogenetic Protein-4*).

BMP-4 es un miembro de la familia de TGF- β , esencial en las primeras etapas del desarrollo (Jones y cols. 1991; Winnier y cols. 1995). En un inicio fue denominada BMP-2b, debido a la alta homología que presenta con BMP-2 (Wozney y cols. 1988). Estructuralmente, BMP-4 está altamente conservada en la evolución (Xi y cols. 2017). Se

origina como una pre-proteína de 408 aminoácidos, que tras una modificación post-transcripcional da lugar a una proteína madura de 292 aminoácidos (Cole y cols. 2016). En el extremo C-terminal contiene 7 cisteínas, de las cuales seis generan un nudo de cisteínas, mientras que la séptima permite la homodimerización o la heterodimerización con otras BMPs a través de puentes disulfuro (Xiao y cols. 2007). La transducción de la señal de BMP-4 ocurre a través de la vía canónica de la familia TGF- β : el homodímero de BMP-4 se une a los receptores BMPRIA o BMPRIB (que son receptores serina-treonina quinasa de tipo I) previamente unido a un receptor tipo II (BMPIIR), el cual activa la vía de las Smad, en concreto las Smad 1, 5 y 8 (Xi y cols. 2017). Las Smad 1/5/8 se unen a la Smad 4, translocándose al núcleo, donde actúan como un factor de transcripción (Cole y cols. 2016; Xi y cols. 2017). El homodímero de BMP-4 también se puede unir al receptor de tipo I, lo que recluta al receptor tipo II, y esto desencadena la activación de la señalización por la ruta no canónica de las MAPK (Cole y cols. 2016; Xi y cols. 2017). BMP-4 juega un papel muy importante en las primeras fases de división del embrión, en la proliferación y diferenciación de las células madre embrionarias, sobre todo en las células madre hematopoyéticas y del mesodermo (Hogan 1996). Esto hace que BMP-4 desempeñe un papel clave en la hematopoyesis embrionaria (Borges y cols. 2012). Además, BMP-4 interviene de forma destacada durante las primeras etapas de desarrollo post-implantación (Hogan 1996).

Como todas las BMPs, BMP-4 es clave en el desarrollo óseo. Se ha descrito que BMP-4 promueve la formación ósea por medio de la inducción de la osificación endocondral (Miljkovic y cols. 2008). También promueve la formación de cartílago por medio de la inducción de la diferenciación de las células madre mesenquimales a condroprogenitores, además de inducir la maduración a condrocitos (Miljkovic y cols. 2008). La participación de BMP-4 es esencial en la organogénesis del sistema digestivo, principalmente el intestino, donde además juega un importante papel en la renovación de las células epiteliales intestinales (Ishizuya-Oka y Hasebe 2008). También se ha descrito a BMP-4 como un factor clave en el sistema nervioso, regulando el desarrollo de las neuronas y de las células gliales desde las células precursoras neurales, tanto en etapas embrionarias como en todas las etapas desde el nacimiento (Jones y cols. 1991; Cole y cols. 2016).

En la vida adulta, se ha descrito la gran relevancia que BMP-4 tiene en la adhesión y diapédesis leucocitaria, siendo una molécula clave en la inflamación (Wong y cols. 2010; Helbing y cols. 2017a; Helbing y cols. 2017b). Se ha descrito a BMP-4 como una molécula proinflamatoria y profibrótica, relacionándose con inflamación en el miocardio y aorta,

asociados a la obesidad (Wu y cols. 2015). En este sentido, se ha observado que los niveles de BMP-4 se encuentran elevados en pacientes con enfermedad arterial coronaria (Stahls y cols. 2014). En cuanto a la obesidad, se ha descrito que BMP-4 desempeña una importante función en la transición de adipocitos pardos a adipocitos blancos, y el reclutamiento de estos adipocitos blancos hacia la región subcutánea (Tang y cols. 2016). También se ha relacionado BMP-4 con la hipertrofia ventricular en pacientes con hipertensión (Gu y cols. 2015). Se ha demostrado que BMP-4 puede producir estrés oxidativo y disfunción endotelial. En concreto, se ha descrito que BMP-4 es capaz de estimular la actividad de la enzima NADPH oxidasa, que inhibe el acoplamiento del grupo prostético, tetrahidrobiopterina (BH4) a la eNOS y disminuye la producción de NO, y de la enzima COX-2, incrementando la concentración de especies reactivas de oxígeno (Miriyala y cols. 2006; Wong y cols. 2010; Wong y cols. 2013; Youn y cols. 2015). Este incremento de las ROS genera una reducción de la biodisponibilidad de NO, produciendo disfunción endotelial e hipertensión (Miriyala y cols. 2006). Además, se ha relacionado a BMP-4 con la producción de disfunción endotelial mediante el incremento de la expresión de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), en concreto el homodímero AA. El incremento de PDGF-AA se ha asociado con arteriosclerosis, fibrosis, además de con la disfunción endotelial asociada a diabetes mellitus (Hu y cols. 2016). A BMP-4 también se le ha otorgado un efecto hipertensor, ya que promueve la contracción de las células de músculo liso vascular, mediante la activación del microRNA-21 (Kang y cols. 2012). Igualmente, se ha señalado que BMP-4 induce un aumento de la permeabilidad vascular, mediante la inhibición de la expresión de VE-caderina (Helbing y cols. 2017a; Helbing y cols. 2017b). Se ha publicado que BMP-4 está incrementado en pacientes con enfermedad renal crónica (Stahls y cols. 2014) y algunos autores postulan que BMP-4 es capaz de producir glomeruloesclerosis e inducir la síntesis de matriz extracelular en el riñón en diferentes tipos de nefropatías como la diabética (Tominaga y cols. 2011; Matsubara y cols. 2015). Por último, se ha descrito la importancia de BMP-4 en algunos tipos de cáncer, como gliomas (Xi y cols. 2017), carcinoma de ovario (Laatio y cols. 2011) cáncer colorrectal (Yokoyama y cols. 2017), además de promover la migración y la invasión de células cancerosas resistentes a fármacos (Zhou y cols. 2017). Así, se ha señalado que BMP-4 es capaz de inducir el crecimiento y la metástasis de adenocarcinoma de pulmón (Chen y cols. 2016). Curiosamente, a fecha de hoy no hay nada descrito sobre la posible implicación de BMP-4 en preeclampsia.

Puesto que el estrés oxidativo, la disfunción endotelial y la hipertensión arterial son síntomas característicos de la preeclampsia y se relacionan con BMP-4, hipotetizamos que esta molécula podría ser el mediador por el cual la sEng realiza su efecto hipertensor.

En primer lugar, demostramos que la incubación con sEng es capaz de inducir la expresión de BMP-4 en células HUVEC. Este efecto de sEng sobre la expresión de BMP-4 no había sido descrito anteriormente en la bibliografía. A continuación, medimos los niveles de BMP-4 en el plasma de los ratones que sobreexpresan sEng. El hecho de que los ratones que únicamente sobreexpresan sEng presentaran niveles elevados de BMP-4 corroboraba lo observado en células HUVECs. Además, los ratones sEng presentaban el doble de expresión génica de BMP-4 que los ratones control, tanto en pulmón como estómago y duodeno.

Una vez que comprobamos que sEng producía incremento de la expresión génica y de los niveles circulantes de BMP-4 *in vivo*, quisimos ver los efectos que este incremento de BMP-4 tenía en los tejidos. Al analizar cortes histológicos de pulmón, no observamos diferencias ni en la tinción de BMP-4 ni en la morfología general del órgano. Se ha descrito que BMP-4 juega un papel importante en el desarrollo del pulmón, donde algunos autores demuestran que sobreexpresión de BMP-4 provoca graves alteraciones en este órgano. Así, se ha descrito que los pulmones expuestos a una mayor concentración de BMP-4 se desarrolla menos y presentan importantes alteraciones estructurales (Bellusci y cols. 1996). Puesto que el transgen que porta la sEng se expresa de forma ubicua y que el pulmón presenta una gran cantidad de endotelio, esperaríamos que los niveles de BMP-4 más elevados de lo normal producirían alteraciones en el desarrollo pulmonar (Bellusci y cols. 1996). En cambio, los ratones sEng muestran un desarrollo pulmonar normal. Una posible explicación es que la expresión de BMP-4 inducida por sEng no es lo suficientemente alta como para producir estas alteraciones. También esperaríamos una mayor cantidad de tinción en el pulmón de los animales sEng, puesto que gran parte de la tinción que se ve en este órgano es debida a la presencia de macrófagos. Así, se ha descrito que BMP-4 favorece la diapédesis y la permeabilidad vascular (Wong y cols. 2010; Helbing y cols. 2017a; Helbing y cols. 2017b), por lo que cabría encontrar una mayor cantidad de macrófagos en el pulmón, y por lo tanto una mayor tinción. En cambio, este hecho no fue constatado.

De igual manera, analizamos el patrón de expresión y estructura de estómago e duodeno sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos, WT y sEng. Por otro lado, el patrón de tinción de BMP-4 se correlaciona con lo descrito para esta proteína en

estos órganos (v17.proteinatlas.com 2017). La tinción de BMP-4 es muy abundante en duodeno, sobre todo en el epitelio intestinal. Esta expresión de BMP-4 en el epitelio intestinal se correlaciona muy bien con el hecho de que BMP-4 juega un importante papel en la renovación del epitelio intestinal (Ishizuya-Oka y Hasebe 2008).

El hecho de no observar diferencias de la cantidad tisular de BMP-4 entre los animales WT y sEng por IHC se puede deber a la propia naturaleza de esta técnica porque no es cuantitativa. La resolución de esta técnica hace que las diferencias en la expresión génica sean insuficientes para poder ser cuantificadas como diferentes por IHC.

Una vez comprobado que sEng era realmente capaz de incrementar la expresión tisular de BMP-4 y que los niveles de esta proteína en plasma eran mayores en los animales sEng que en los WT, nuestro siguiente objetivo fue analizar si realmente BMP-4 está mediando el efecto hipertensor observado en los animales sEng. Para tratar de dar respuesta a esta pregunta se utilizó un antagonista endógeno capaz de unirse a BMP-4, denominado noggin.

Noggin es una glicoproteína homodimérica de 65 kDa, con efectos pleiotrópicos, y que ha demostrado ser capaz de unirse a ciertas BMPs, antagonizando su efecto y regulando su actividad (Zimmerman y cols. 1996; Krause y cols. 2011). Noggin es capaz de unirse a BMP-4, regulando su actividad (Zimmerman y cols. 1996; Hirsinger y cols. 1997). Gracias a esta capacidad, noggin ha probado ser una buena herramienta para definir las funciones de BMP-4 en células y tejidos, debido principalmente a que su efecto es específico (Miriyala y cols. 2006). Además, BMP-4 es capaz de inducir la expresión proteica de noggin (Krause y cols. 2011).

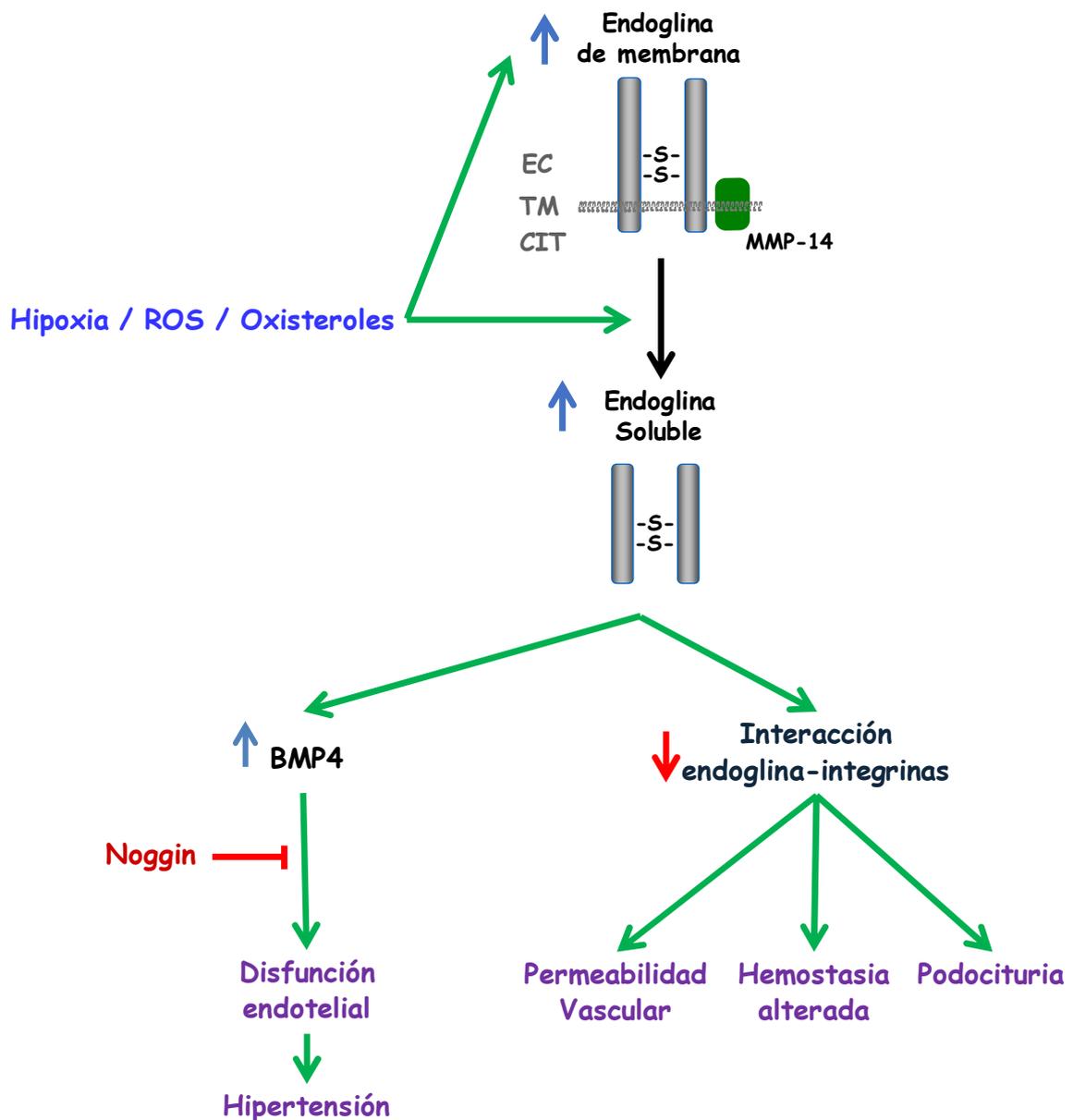
Con estos antecedentes, se planteó la hipótesis de que la infusión de noggin bloquearía BMP-4, revertiendo el efecto hipertensor inducido por la sEng. Se implantaron bombas, con noggin o con vehículo, en animales sEng y WT. Ya desde el 2º día de infusión de noggin observamos que la PA de los animales sEng se igualaba a la de los ratones WT que recibían noggin, y que era algo inferior a la que presentaban los animales WT tratados con vehículo. Además, observamos como los niveles de BMP-4 de los ratones sEng se reducían con la administración de noggin, hasta igualarse con los niveles observados en los animales WT, tanto tratados con noggin como sin él. Por otro lado, noggin no afectaba a los niveles plasmáticos de sEng.

Estos resultados nos demuestran que BMP-4 es realmente un mediador en el efecto hipertensor de altos niveles de sEng, puesto que al tratar a los animales sEng con noggin, tanto el incremento en la concentración de BMP-4, como la hipertensión (ambos inducidos por sEng) revierten hasta valores similares a los de los animales control. Además, estos resultados son compatibles con lo observado en la clínica y otros modelos animales, donde se produce un retraso entre el incremento de sEng y la aparición de los síntomas.

Parte de este efecto hipertensor de BMP-4 puede ser directo, ya que se ha descrito que BMP-4 es capaz de inducir la contracción de las células musculares lisas de los vasos (Kang y cols. 2012), lo que produce un incremento de las resistencias vasculares y, por ende, de la PA. Otra parte de los efectos de BMP-4 sobre la PA podrían estar relacionados con la disfunción endotelial que esta proteína produce. Esta disfunción endotelial es una característica de la preeclampsia y una de las bases de los otros síntomas de esta patología (Powe y cols. 2011; Craici y cols. 2013; Brennan y cols. 2014; Ahmed y cols. 2017). Así, BMP-4 es capaz de reducir la síntesis de NO mediante la inhibición de la eNOS. Lo que BMP-4 hace es inhibir el acoplamiento de BH4 a la eNOS (Youn y cols. 2015), imposibilitando la formación de NO y produciendo, además un incremento de los niveles de ROS. BMP-4, además, promueve la expresión de NADPH oxidasa y de COX-2, lo que se traduce en un incremento de los ROS, que a su vez incrementan la disfunción endotelial, al reducir la biodisponibilidad de NO (Miryala y cols. 2006; Wong y cols. 2010). Es esta disfunción endotelial y la inhibición de la vasorrelajación lo que se relaciona con el papel hipertensor de BMP-4 (Miryala y cols. 2006). A su vez, se ha observado que la administración de noggin impide que BMP-4 pueda unirse a sus receptores y producir la disfunción endotelial (Miryala y cols. 2006; Krause y cols. 2011).

5. Discusión final

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido analizar el papel que juegan las altas concentraciones plasmáticas de sEng sobre los síntomas más característicos de la preeclampsia (Figura 40).



Discusión

Figura 40. Modelo hipotético del papel de sEng en preeclampsia. La combinación de diversos factores como hipoxia, radicales libres de oxígeno (ROS) y oxisteroles estimulan la expresión de endoglina de membrana e inducen la liberación de endoglina soluble mediada por la metaloproteasa MMP-14. La endoglina soluble es capaz de interactuar con integrinas, compitiendo así con la unión entre endoglina de membrana en el endotelio y las integrinas de superficie presentes en células murales vasculares. Como resultado, se produce un incremento de la permeabilidad vascular, lo que puede provocar edemas. Además, la interacción de endoglina soluble con las integrinas plaquetarias podría dificultar los procesos de formación y estabilización del trombo, provocando un incremento en el tiempo y grado de los sangrados. Por otra parte, la administración de endoglina soluble de forma aguda no produce la liberación de podocitos, aunque sí parece inducir podocituria cuando endoglina soluble está presente en el organismo de forma constitutiva (efecto crónico). Los dominios extracelular (EC), transmembrana (TM) y citoplásmico (CYT), así como los enlaces disulfuro (S-S) de la endoglina están indicados.

No hemos visto un efecto de la exposición aguda a altos niveles plasmáticos de sEng sobre la podocituria y proteinuria, pero sí que los vemos cuando analizamos la exposición crónica a sEng. Este efecto creemos que se debe a que la sEng compete con la endoglina de membrana por la unión a integrinas, desestabilizando las uniones entre los podocitos y la membrana basal de los capilares glomerulares perdiéndose los podocitos en la orina por arrastre por el plasma ultrafiltrado (Rossi y cols. 2016) (Figura 40). Esta pérdida de podocitos altera la permeabilidad de la barrera de filtración glomerular, lo que produce la proteinuria (Craici y cols. 2013).

También hemos observado que sEng es capaz de alterar la estabilidad de los vasos. Esta desestabilización entre las uniones de las células endoteliales hace que aumente la permeabilidad vascular a moléculas de alto peso molecular, demostrando que sEng puede jugar un papel en los edemas descritos en preeclampsia (Neal y cols. 2004; Lin y cols. 2012) (Figura 40). En esta permeabilidad vascular también podría estar interviniendo BMP-4, ya que se ha descrito que BMP-4 es capaz de reducir la expresión de VE-cadherina, comprometiendo la estabilidad vascular y aumentando la permeabilidad vascular (Helbing y cols. 2017a; Helbing y cols. 2017b). En este sentido, los elevados niveles plasmáticos de sEng de la preeclampsia afectarían la permeabilidad vascular y los edemas de la preeclampsia, tanto directamente como de forma mediada por BMP-4.

En cuanto a la hemostasia, hemos visto que niveles elevados de sEng circulantes se asocian con un incremento del tiempo de sangrado, parámetro que algunos autores han relacionado con la preeclampsia (Kelton y cols. 1985; Fuentes y cols. 1995; Eskild y Vatten 2009). Al analizar los parámetros de la hemostasia que podrían estar alterados por sEng, no hemos encontrado relación de esta proteína con la trombocitopenia, ni con la alteración de las vías de coagulación o con la agregación plaquetaria. Sí que hemos observado que sEng es capaz de alterar el proceso de estabilización y maduración, debido a que es capaz de unirse a la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Rossi y cols. 2017). Esta interacción disminuye la capacidad de adhesión del trombo al endotelio y subendotelio, además de comprometer la maduración y retracción del trombo, lo que hace que el trombo sea inestable, influyendo así en el tiempo de sangrado (Figura 40).

También hemos observado que sEng es capaz de inducir la expresión tisular e incrementar los niveles circulantes de BMP-4, y que estos niveles elevados de BMP-4 pueden producir incremento de la PA (Figura 40). Este efecto podría ser tanto de forma

directa (Kang y cols. 2012) o mediante la reducción de la biodisponibilidad de NO (Miriyala y cols. 2006; Wong y cols. 2010).

BMP-4 es capaz de inducir un incremento del estrés oxidativo (Miriyala y cols. 2006; Wong y cols. 2010; Wong y cols. 2013), que a su vez es capaz de inducir la liberación de sEng, mediante la activación de la MMP-14, mediada por oxisteroles (Valbuena-Diez y cols. 2012). Esto puede hacer que los niveles de sEng y BMP-4 se retroalimenten entre sí, disparándose sus efectos y potenciándose el desarrollo de la enfermedad.

Con todo esto, un posible tratamiento para prevenir los síntomas de la preeclampsia sería reducir el estrés oxidativo inducido por BMP-4 (inducido por sEng) mediante la utilización de antioxidantes. En este sentido, hay mucha controversia sobre la eficacia de la utilización de antioxidantes en el tratamiento de preeclampsia. Mientras algunos autores defienden la utilización de antioxidantes, como la vitamina D (Sasan y cols. 2009) u otros antioxidantes (Roberts y cols. 2003) para el tratamiento de la preeclampsia, otros autores no han observado ningún efecto sobre los síntomas de la preeclampsia al tratar a las pacientes con antioxidantes como la vitamina C y E (Poston y cols. 2006). Además, los ensayos clínicos llevados a cabo para tratar la preeclampsia con antioxidantes no han mostrado ningún efecto (Duley 2009).

Otro posible tratamiento para prevenir los síntomas producidos por el BMP-4 sería la utilización de noggin o de otro tipo de molécula que pueda bloquear el efecto de BMP-4, como por ejemplo anticuerpos. El problema de este tipo de tratamiento es que BMP-4 juega un papel clave en el desarrollo y la embriogénesis (Jones y cols. 1991; Winnier y cols. 1995; Hogan 1996; Ishizuya-Oka y Hasebe 2008; Miljkovic y cols. 2008; Borges y cols. 2012; Cole y cols. 2016). Si tanto noggin, como los posibles anticuerpos que unan BMP-4, son capaces de pasar a la placenta y al feto, los problemas que pueden desarrollar al bloquear el correcto desarrollo de la función de BMP-4, pueden conllevar desde malformaciones del feto, hasta su muerte o el aborto. En este sentido, las posibilidades pasarían por desarrollar anticuerpos específicos con algún tipo de modificación que impidiera, no solo su paso al feto, sino a la placenta también. Este tipo de moléculas podrían reducir los niveles de BMP-4 circulantes, reduciendo el estrés oxidativo, la disfunción endotelial y regularía negativamente la liberación de sEng (mediada por oxisteroles). Además, esta posible reducción de la liberación de sEng disminuiría la actividad proinflamatoria de la sEng, mediado por NFκB e

IL6 (Varejckova y cols. 2017), además de la disfunción endotelial que sEng parece producir, junto a otros factores (Jezkova y cols. 2016; Rathouska y cols. 2017).

Por último, con este estudio queda demostrado, al menos en parte, que los altos niveles circulantes de sEng juegan un papel importante en el establecimiento y desarrollo de los síntomas principales que caracterizan a la preeclampsia. El bloqueo de esta isoforma soluble de la endoglina podría ser un buen tratamiento para tratar la preeclampsia pero tiene inconvenientes. El primero de todos es que las células endoteliales presentan endoglina de membrana, con una gran importancia biológica, y que tiene la misma estructura externa que la sEng. Esto imposibilitaría la utilización de anticuerpos específicos anti-endoglina, con el fin de disminuir los niveles de sEng. El segundo, es que la preeclampsia no se circunscribe únicamente a un incremento de sEng en el plasma materno, sino que se produce la variación de muchas moléculas (sFlt-1, PlGF...), por lo que la eliminación de la sEng, en el mejor de los casos, solo favorecería el pronóstico de la enfermedad. Se podría plantear la reducción mediante plasmaféresis terapéutica (un procedimiento extracorpóreo en el que, a partir de la extracción de sangre total, se separa el plasma del resto de los componentes celulares con el objetivo de disminuir o eliminar determinadas sustancias patológicas que intervienen en la fisiopatología de la enfermedad) de los niveles plasmáticos de sEng, sFlt-1, PlGF y otras posibles moléculas involucradas en la preeclampsia. Hay que hacer constar que este procedimiento ha resultado efectivo en el tratamiento de numerosas enfermedades, aunque ha sido inefectivo en otras (Nakanishi y cols. 2014). El uso de la aféresis terapéutica ha sido ya sugerido como un tratamiento de la preeclampsia (Easterling 2016) y la eliminación mediante esta técnica de sFlt-1 parece tener efectos beneficiosos al menos sobre los síntomas (Carney 2015; Thadhani y cols. 2016).

Conclusiones

"El conocimiento no es una vasija que se llena, sino un fuego que se enciende".

Plutarco

"El placer más noble es el júbilo de comprender".

Leonardo Da Vinci

- El aumento agudo de los niveles de endoglina soluble no provoca la podocituria y la proteinuria observadas en preeclampsia, que pueden ser producidas por la presencia, mantenida en el tiempo, de esos niveles elevados de endoglina soluble.
- Endoglina soluble es capaz de generar desestabilización endotelial, siendo responsable, al menos en parte, de los procesos de extravasación de líquido desde el plasma y el edema, ambos síntomas muy comunes y característicos de la preeclampsia.
- La endoglina soluble no es responsable del desbalance hemostático observado en las mujeres con preeclampsia, a la vez que no juega ningún papel en la activación plaquetaria y trombocitopenia característicos de esta patología.
- La presencia de niveles elevados de endoglina soluble dificulta los procesos de formación y estabilización del trombo, disminuyendo la hemostasia e incrementando el sangrado.
- La forma soluble de la endoglina no es capaz de producir ningún efecto directo sobre la contractilidad vascular.
- Endoglina soluble es capaz de estimular la producción de la Proteína Morfogenética Ósea 4, o BMP-4, que podría ser la mediadora y responsable del establecimiento de la hipertensión observada en animales que sobreexpresan sEng.

Bibliografía

"Me crié entre libros, haciendo amigos invisibles en páginas que se deshacían en polvo y cuyo olor aún conservo en las manos".

Carlos Ruiz Lafón-

-La sombra del viento-

- AbdelHalim, RM, DI Ramadan, R Zeyada, AS Nasr, and IA Mandour. 2016. "Circulating Maternal Total Cell-Free DNA, Cell-Free Fetal DNA and Soluble Endoglin Levels in Preeclampsia: Predictors of Adverse Fetal Outcome? A Cohort Study." *Molecular Diagnosis and Therapy* 20 (2). Springer International Publishing: 135–49. doi:10.1007/s40291-015-0184-x.
- Abitbol, M.M., C.L. Pirani, W.B. Ober, S.G. Driscoll, and M.W. Cohen. 1976. "Production of Experimental Toxemia in the Pregnant Dog." *Obstetrics and Gynecology* 48 (5): 537–48.
- Abitbol, MM, GR Gallo, CL Pirani, and WB OBER. 1976. "Production of Experimental Toxemia in the Pregnant Rabbit." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 124 (5). Elsevier Inc.: 460–70. doi:10.1016/0002-9378(76)90169-1.
- Ahmed, A, H Rezai, and S Broadway-Stringer. 2017. "Evidence-Based Revised View of the Pathophysiology of Preeclampsia." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 956. Boston, MA: Springer US: 355–74. doi:10.1007/5584_2016_168.
- Ahokas, RA, and BM Sibai. 1992. "Endothelium-Derived Relaxing Factor Inhibition Augments Vascular Angiotensin II Reactivity in the Pregnant Rat Hind Limb." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 167 (4). Mosby: 1053–58. doi:10.1016/S0002-9378(12)80037-8.
- Aita, K, M Etoh, H Hamada, C Yokoyama, A Takahashi, T Suzuki, M Hara, and M Nagata. 2009. "Acute and Transient Podocyte Loss and Proteinuria in Preeclampsia." *Nephron - Clinical Practice* 112 (2): c65-70. doi:10.1159/000213083.
- Akolekar, R, A Syngelaki, R Sarquis, M Zvanca, and KH Nicolaides. 2011. "Prediction of Early, Intermediate and Late Pre-Eclampsia from Maternal Factors, Biophysical and Biochemical Markers at 11–13 Weeks." *Prenatal Diagnosis* 31 (1): 66–74. doi:10.1002/pd.2660.
- Ali, SM, and RA Khalil. 2015. "Genetic, Immune and Vasoactive Factors in the Vascular Dysfunction Associated with Hypertension in Pregnancy." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 19 (11): 1495–1515. doi:10.1517/14728222.2015.1067684.
- Alpoim, PN, LC Godoi, LG Freitas, KB Gomes, and LM Dusse. 2013. "Assessment of L-Arginine Asymmetric 1 Dimethyl (ADMA) in Early-Onset and Late-Onset (Severe) Preeclampsia." *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* 33: 81–82. doi:10.1016/j.niox.2013.07.006.
- Alt, A, L Miguel-Romero, J Donderis, M Aristorena, FJ Blanco, A Round, V Rubio, C Bernabeu, and A Marina. 2012. "Structural and Functional Insights into Endoglin Ligand Recognition and Binding." *PLoS ONE* 7 (2): e29948. doi:10.1371/journal.pone.0029948.
- Anderberg, C, SI Cunha, Z Zhai, E Cortez, E Pardali, JR Johnson, M Franco, et al. 2013. "Deficiency for Endoglin in Tumor Vasculature Weakens the Endothelial Barrier to Metastatic Dissemination." *The Journal of Experimental Medicine* 210 (3): 563–79. doi:10.1084/jem.20120662.

- Androudi, S, P Ekonomidis, L Kump, A Praidou, and PD Brazitikos. 2007. "OCT-3 Study of Serous Retinal Detachment in a Preeclamptic Patient." *Seminars in Ophthalmology* 22 (3): 189–91. doi:10.1080/08820530701501469.
- Aoki, Y, T Yamamoto, C Fumihisa, A Nakamura, A Asanuma, and M Suzuki. 2012. "Effect on the Production of Soluble Endoglin from Human Choriocarcinoma Cells by Preeclampsia Sera." *American Journal of Reproductive Immunology* 67 (5): 413–20. doi:10.1111/j.1600-0897.2011.01086.x.
- Armelloni, S, A Corbelli, L Giardino, M Li, M Ikehata, D Mattinzoli, P Messa, C Pignatari, S Watanabe, and MP Rastaldi. 2014. "Podocytes: Recent Biomolecular Developments." *Biomolecular Concepts* 5 (4): 319–30. doi:10.1515/bmc-2014-0020.
- Ataullakhanov, FI, EM Koltsova, AN Balandina, II Serebriyskiy, Tatiana A Vuimo, and MA Panteleev. 2016. "Classic and Global Hemostasis Testing in Pregnancy and during Pregnancy Complications." *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 42 (7): 696–716. doi:10.1055/s-0036-1592303.
- August, P. 2013. "Preeclampsia: A 'Nephrocentric' View." *Advances in Chronic Kidney Disease* 20 (3). Elsevier Ltd: 280–86. doi:10.1053/j.ackd.2013.01.013.
- Bailey, RR, and GL Rolleston. 1971. "Kidney Length and Ureteric Dilatation in the Puerperium." *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 78 (1): 55–61. doi:10.1111/j.1471-0528.1971.tb00191.x.
- Bakker, EN, JC Balt, M Pfaffendorf, JA Spaan, and E VanBavel. 2001. "Vasomotor Effects Of ARG-Gly-ASP (RGD) Peptides Are Limited And Not Related To Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Relaxation In Rat Mesenteric Arteries." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 28 (11): 873–76. doi:10.1046/j.1440-1681.2001.03537.x.
- Barbara, NP, JL Wrana, and M Letarte. 1999. "Endoglin Is an Accessory Protein That Interacts with the Signaling Receptor Complex of Multiple Members of the Transforming Growth Factor-Beta Superfamily." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (2): 584–94. doi:10.1074/jbc.274.2.584.
- Barisoni, L. 2005. "Modulation of Podocyte Phenotype and the Emerging Role of Biomarkers in Podocytopathies." *2005 Annual Meeting*. <http://uscapknowledgehub.org/index.htm?94th/companion18h3.htm>.
- Barnett, JM, S Suarez, GW McCollum, and JS Penn. 2014. "Endoglin Promotes Angiogenesis in Cell- and Animal-Based Models of Retinal Neovascularization." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55 (10): 6490–98. doi:10.1167/iovs.14-14945.
- Barnhart, L. 2015. "HELLP Syndrome and the Effects on the Neonate." *Neonatal Network* 34 (5): 269–73. doi:10.1891/0730-0832.34.5.269.
- Barron, WM, and MD Lindheimer. 1984. "Renal Sodium and Water Handling in Pregnancy." *Obstetrics and Gynecology Annual* 13: 35–69.

- Beilin, LJ, J Deacon, CA Michael, R Vandongen, CM Lalor, AE Barden, and L Davidson. 1982. "Circadian Rhythms of Blood Pressure and Pressor Hormones in Normal and Hypertensive Pregnancy." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 9 (3): 321–26. doi:10.1111/j.1440-1681.1982.tb00814.x.
- Bellón, T, A Corbi, P Lastres, C Calés, M Cebrián, S Vera, S Cheifetz, J Massague, M Letarte, and C Bernabéu. 1993. "Identification and Expression of Two Forms of the Human Transforming Growth Factor- β -binding Protein Endoglin with Distinct Cytoplasmic Regions." *European Journal of Immunology* 23 (9): 2340–45. doi:10.1002/eji.1830230943.
- Bellusci, S, R Henderson, G Winnier, T Oikawa, and BL Hogan. 1996. "Evidence from Normal Expression and Targeted Misexpression That Bone Morphogenetic Protein-4 (Bmp-4) Plays a Role in Mouse Embryonic Lung Morphogenesis." *Development (Cambridge, England)* 122 (6): 1693–1702.
- Benedetto, C, M Zonca, L Marozio, C Dolci, F Carandente, and M Massobrio. 1996. "Blood Pressure Patterns in Normal Pregnancy and in Pregnancy-Induced Hypertension, Preeclampsia, and Chronic Hypertension." *Obstetrics and Gynecology and Gynecology* 88 (4): 503–10. doi:10.1161/01.HYP.36.2.149.
- Bennett, JS. 2005. "Structure and Function of the Platelet Integrin α IIb β 3." *Journal of Clinical Investigation* 115 (12): 3363–69. doi:10.1172/JCI26989.
- Berkane, N, P Liere, JP Oudinet, A Hertig, G Lefèvre, N Pluchino, M Schumacher, and N Chabbert-Buffet. 2017. "From Pregnancy to Preeclampsia: A Key Role for Estrogens." *Endocrine Reviews* 38 (2): 123–44. doi:10.1210/er.2016-1065.
- Bernabeu, C, BA Conley, and CP Vary. 2007. "Novel Biochemical Pathways of Endoglin in Vascular Cell Physiology." *Journal of Cellular Biochemistry* 102 (6): 1375–88. doi:10.1002/jcb.21594.
- Bernabeu, C, JM Lopez-Novoa, and M Quintanilla. 2009. "The Emerging Role of TGF- β Superfamily Coreceptors in Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1792 (10). Elsevier B.V.: 954–73. doi:10.1016/j.bbadis.2009.07.003.
- Beydoun, SN. 1985. "Morphologic Changes in the Renal Tract in Pregnancy." *Clinical Obstetric and Gynecology* 28 (2): 249–56.
- Bieniarz, J, E Maqueda, and R Caldeyro-Barcia. 1966. "Compression of Aorta by the Uterus in Late Human Pregnancy. I. Variations between Femoral and Brachial Artery Pressure with Changes from Hypertension to Hypotension." *Am J Obstet Gynecol* 95 (6). Elsevier Inc.: 795–808. doi:0002-9378(66)90081-0 [pii].
- Bills, VL, AH Salmon, SJ Harper, TG Overton, CR Neal, B Jeffery, PW Soothill, and DO Bates. 2011. "Impaired Vascular Permeability Regulation Caused by the VEGF165b Splice Variant in Pre-Eclampsia." *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 118 (10): 1253–61. doi:10.1111/j.1471-0528.2011.02925.x.
- Blaha, M, M Cermanova, V Blaha, P Jarolim, C Andrys, M Blazek, J Maly, et al. 2008.

- "Elevated Serum Soluble Endoglin (sCD105) Decreased during Extracorporeal Elimination Therapy for Familial Hypercholesterolemia." *Atherosclerosis* 197 (1): 264–70. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.022.
- Blanco, FJ, MT Grande, C Langa, B Oujo, S Velasco, A Rodriguez-Barbero, E Perez-Gomez, M Quintanilla, JM López-Novoa, and C Bernabeu. 2008. "S-Endoglin Expression Is Induced in Senescent Endothelial Cells and Contributes to Vascular Pathology." *Circulation Research* 103 (12): 1383–92. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.176552.
- Blann, AD, JM Wang, PB Wilson, and S Kumar. 1996. "Serum Levels of the TGF-Beta Receptor Are Increased in Atherosclerosis." *Atherosclerosis* 120 (1–2): 221–26. doi:10.1016/0021-9150(95)05713-7.
- Blázquez-Medela, AM, L García-Ortiz, MA Gómez-Marcos, JI Recio-Rodríguez, A Sánchez-Rodríguez, JM López-Novoa, and C Martínez-Salgado. 2010. "Increased Plasma Soluble Endoglin Levels as an Indicator of Cardiovascular Alterations in Hypertensive and Diabetic Patients." *BMC Medicine* 8 (1). BioMed Central Ltd: 86. doi:10.1186/1741-7015-8-86.
- Bockenstedt, PL. 2011. "Thrombocytopenia in Pregnancy." *Hematology/Oncology Clinics of North America* 25 (2). Elsevier Ltd: 293–310. doi:10.1016/j.hoc.2011.01.004.
- Bode-Boger, SM, F Scalera, JT Kielstein, J Martens-Lobenhoffer, G Breithardt, M Fobker, and H Reinecke. 2006. "Symmetrical Dimethylarginine: A New Combined Parameter for Renal Function and Extent of Coronary Artery Disease." *Journal of the American Society of Nephrology* 17 (4): 1128–34. doi:10.1681/ASN.2005101119.
- Boehlen, F, P Hohlfeld, P Extermann, TV Perneger, and P De Moerloose. 2000. "Platelet Count at Term Pregnancy: A Reappraisal of the Threshold." *Obstetric and Gynecology* 95 (1): 29–33.
- Boeldt, DD, and IM Bird. 2017. "Vascular Adaptation in Pregnancy and Endothelial Dysfunction in Preeclampsia." *Journal of Endocrinology* 232 (1): R27–44. doi:10.1530/JOE-16-0340.
- Bonnar, J, GP McNicol, and AS Douglas. 1971. "Coagulation and Fibrinolytic Systems in Pre-Eclampsia and Eclampsia." *British Medical Journal* 2 (5752): 12–16. doi:10.1136/bmj.2.5752.12.
- Borges, L, M Iacovino, T Mayerhofer, N Koyano-nakagawa, J Baik, DJ Garry, M Kyba, M Letarte, and RC Perlingeiro. 2012. "A Critical Role for Endoglin in the Emergence of Blood during Embryonic Development." *Blood* 119 (23): 5417–28. doi:10.1182/blood-2011-11-391896.
- Bosio, PM, PJ McKenna, R Conroy, and C O'Herlihy. 1999. "Maternal Central Hemodynamics in Hypertensive Disorders of Pregnancy." *Obstetrics and Gynecology* 94 (6): 978–84. doi:10.1016/S0029-7844(99)00430-5.
- Botella, LM, V Albiñana, L Ojeda-Fernandez, L Recio-Poveda, and C Bernabéu. 2015.

- "Research on Potential Biomarkers in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia." *Frontiers in Genetics* 6: 115. doi:10.3389/fgene.2015.00115.
- Botella, LM, T Sánchez-Elsner, C Rius, A Corbí, and C Bernabéu. 2001. "Identification of a Critical Sp1 Site within the Endoglin Promoter and Its Involvement in the Transforming Growth Factor- β Stimulation." *Journal of Biological Chemistry* 276 (37): 34486–94. doi:10.1074/jbc.M011611200.
- Bourdeau, A, ME Faughnan, and M Letarte. 2000. "Endoglin-Deficient Mice, a Unique Model to Study Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia." *Trends in Cardiovascular Medicine* 10 (7): 279–85. doi:10.1016/S1050-1738(01)00062-7.
- Bremme, KA. 2003. "Haemostatic Changes in Pregnancy." *Best Practice & Research Clinical Haematology* 16 (2): 153–68. doi:10.1053/ybeha.2003.260.
- Brennan, LJ, JS Morton, and ST Davidge. 2014. "Vascular Dysfunction in Preeclampsia." *Microcirculation* 21 (1): 4–14. doi:10.1111/micc.12079.
- Brenner, B. 2004. "Haemostatic Changes in Pregnancy." *Thrombosis Research* 114 (5–6): 409–14. doi:10.1016/j.thromres.2004.08.004.
- Brosens, I. 1964. "A Study of the Spiral Arteries of the Decidua Basalis in Normotensive and Hypertensive Pregnancies." *The Journal of Obstetric and Gynaecology of the British Commonwealth* 71: 222–30.
- Brosens, IA, WB Robertson, and HG Dixon. 1972. "The Role of the Spiral Arteries in the Pathogenesis of Preeclampsia." *Obstetrics and Gynecology Annual* 1: 177–91.
- Brown, JH, and P Taylor. 2006. "Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists." In *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, edited by K. Parker, L. Brunton, L.S. Goodman, J.S. Lazo, and A. Gilman, 11th ed., 183–200. New York.
- Brown, MA. 1995. "The Physiology of Pre-Eclampsia." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 22 (11): 781–91. doi:10.1111/j.1440-1681.1995.tb01937.x.
- Brown, MA, V Zammit, and SA Lowe. 1989. "Capillary Permeability and Extracellular Fluid Volumes in Pregnancy-Induced Hypertension." *Clinical Science (London)* 77 (6): 599–604.
- Browne, JC, and N Veall. 1953. "The Maternal Placental Blood Flow in Normotensive and Hypertensive Women." *The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Empire* 60 (2): 141–47.
- Brownfoot, FC, N Hannan, K Onda, S Tong, and T Kaitu'U-Lino. 2014. "Soluble Endoglin Production Is Upregulated by Oxysterols but Not Quenched by Pravastatin in Primary Placental and Endothelial Cells." *Placenta* 35 (9). Elsevier Ltd: 724–31. doi:10.1016/j.placenta.2014.06.374.
- Bujold, E, S Roberge, Y Lacasse, M Bureau, F Audibert, S Marcoux, JC Forest, and Y Ciguere. 2010. "Prevention of Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction with Aspirin

- Started in Early Pregnancy: A Meta-Analysis." *Obstetrics & Gynecology* 116 (2): 402–14. doi:10.1097/AOG.0b013e3181e9322a.
- Burgess-Wilson, ME, R Morrison, and S Heptinstall. 1986. "Spontaneous Platelet Aggregation in Heparinised Blood during Pregnancy." *Thrombosis Research* 41 (3): 385–93. doi:10.1016/0049-3848(86)90249-5.
- Burton, GJ, and E Jauniaux. 2011. "Oxidative Stress." *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 25 (3). Elsevier Ltd: 287–99. doi:10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016.
- Cadroy, Y, H Grandjean, J Pichon, R Desprats, A Berrebi, A Fournie, and B Boneu. 1993. "Evaluation of Six Markers of Haemostatic System in Normal Pregnancy and Pregnancy Complicated by Hypertension or Pre-Eclampsia." *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 100 (5): 416–20. doi:10.1111/j.1471-0528.1993.tb15264.x.
- Carbillon, L, M Uzan, and S Uzan. 2000. "Pregnancy, Vascular Tone, and Maternal Hemodynamics: A Crucial Adaptation." *Obstetrical and Gynecological Survey* 55 (9): 574–81. doi:10.1097/00006254-200009000-00023.
- Carlsson, C. 1984. "Cardiovascular Changes in Pre-Eclampsia." *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 118: 121–22.
- Carney, EF. 2015. "Hypertension: sFlt-1 Removal Seems to Be Beneficial in Women with Pre-Eclampsia." *Nature Reviews Nephrology* 11 (12). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 690. doi:10.1038/nrneph.2015.168.
- Castonguay, R, ED Werner, RG Matthews, E Presman, AW Mulivor, N Solban, D Sako, et al. 2011. "Soluble Endoglin Specifically Binds Bone Morphogenetic Proteins 9 and 10 via Its Orphan Domain, Inhibits Blood Vessel Formation, and Suppresses Tumor Growth." *Journal of Biological Chemistry* 286 (34): 30034–46. doi:10.1074/jbc.M111.260133.
- Ceriello, A, L La Sala, V De Nigris, G Pujadas, R Testa, and A Uccellatore. 2015. "GLP-1 Reduces Metalloproteinase-14 and Soluble Endoglin Induced by Both Hyperglycemia and Hypoglycemia in Type 1 Diabetes." *Endocrine* 50 (2): 508–11.
- Ceyhan, T, C Beyan, I Başer, K Kaptan, S Güngör, and A Ifran. 2006. "The Effect of Pre-Eclampsia on Complete Blood Count, Platelet Count and Mean Platelet Volume." *Annals of Hematology* 85 (5): 320–22. doi:10.1007/s00277-006-0091-7.
- Chavarría, ME, L Lara-González, A González-Gleason, Y García-Paleta, VS Vital-Reyes, and A Reyes. 2003. "Prostacyclin/thromboxane Early Changes in Pregnancies That Are Complicated by Preeclampsia." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 188 (4): 986–92. doi:10.1067/mob.2003.203.
- Chen, L, X Yi, S Goswami, YH Ahn, JD Roybal, Y Yang, L Diao, et al. 2016. "Growth and Metastasis of Lung Adenocarcinoma Is Potentiated by BMP4-Mediated Immunosuppression." *Oncoimmunology* 5 (11). Taylor & Francis: e1234570. doi:10.1080/2162402X.2016.1234570.

- Chen, Y, and L Lin. 2017. "Potential Value of Coagulation Parameters for Suggesting Preeclampsia During the Third Trimester of Pregnancy." *American Journal of the Medical Sciences* 354 (1). Elsevier: 39–43. doi:10.1016/j.amjms.2017.03.012.
- Cheung, KL, and RA Lafayette. 2013. "Renal Physiology of Pregnancy." *Advances in Chronic Kidney Disease* 20 (3). Elsevier Ltd: 209–14. doi:10.1053/j.ackd.2013.01.012.
- Christensen, T, JG Klebe, V Bertelsen, and HE Hansen. 1989. "Changes In Renal Volume During Normal Pregnancy." *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 68 (6): 541–43. doi:10.1111/j.1600-0412.1989.tb07835.x.
- Chun, D, C Braga, C Chow, and L Lok. 1964. "Clinical Observations on Some Aspects of Hydatidiform Moles." *The Journal of Obstetric and Gynaecology of the British Commonwealth* 71: 180–84.
- Cines, DB, and LD Levine. 2017. "Thrombocytopenia in Pregnancy." *Blood* 130 (21): 2271–77. doi:10.1182/blood-2017-05-781971.
- Ciobanum, AM, S Colibaba, B Cimpoaia, G Peltecu, and AM Panaitescu. 2016. "Thrombocytopenia in Pregnancy." *Maedica* 11 (1): 55–60. doi:10.3109/01443615.2015.1041893.
- Cipolla, MJ. 2007. "Cerebrovascular Function in Pregnancy and Eclampsia." *Hypertension* 50 (1): 14–24. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.079442.
- Clark, SL, DB Cotton, W Lee, C Bishop, T Hill, J Southwick, J Pivarnik, et al. 1989. "Central Hemodynamic Assessment of Normal Term Pregnancy." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 161 (6 PART 1). Mosby: 1439–42. doi:10.1016/0002-9378(89)90900-9.
- Crossen, JS, RK Morris, G Ter Riet, BW Mol, JA Van Der Post, A Coomarasamy, AH Zwinderman, et al. 2008. "Use of Uterine Artery Doppler Ultrasonography to Predict Pre-Eclampsia and Intrauterine Growth Restriction: A Systematic Review and Bivariable Meta-Analysis." *Cmaj* 178 (6): 701–11. doi:10.1503/cmaj.070430.
- Cockell, AP, and L Poston. 1997. "Flow-Mediated Vasodilatation Is Enhanced in Normal Pregnancy but Reduced in Preeclampsia." *Hypertension* 30: 247–51. doi:10.1161/01.HYP.30.2.247.
- Cole, AE, SS Murray, and J Xiao. 2016. "Bone Morphogenetic Protein 4 Signalling in Neural Stem and Progenitor Cells during Development and after Injury." *Stem Cells International* 2016. Hindawi Publishing Corporation: 9260592. doi:10.1155/2016/9260592.
- Combs, AnC, MA Katz, JL Kitzmiller, and RJ Brescia. 1993. "Experimental Preeclampsia Produced by Chronic Constriction of the Lower Aorta: Validation with Longitudinal Blood Pressure Measurements in Conscious Rhesus Monkeys." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 169 (1). Mosby: 215–23. doi:10.1016/0002-9378(93)90171-E.
- Conde-Agudelo, A, JM Belizán, R Ledo, and EF Bergel. 1993. "What Does an Elevated Mean

- Arterial Pressure in the Second Half of Pregnancy Predict - Gestational Hypertension or Preeclampsia?" *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 169 (3): 509–14. doi:10.1016/0002-9378(93)90609-M.
- Cosemans, JM, A Angelillo-Scherrer, NJ Mattheij, and JW Heemskerk. 2013. "The Effects of Arterial Flow on Platelet Activation, Thrombus Growth, and Stabilization." *Cardiovascular Research* 99 (2): 342–52. doi:10.1093/cvr/cvt110.
- Costantine, MM. 2014. "Physiologic and Pharmacokinetic Changes in Pregnancy." *Frontiers in Pharmacology* 5: 1–5. doi:10.3389/fphar.2014.00065.
- Craici, IM, SJ Wagner, KR Bailey, PD Fitz-Gibbon, CM Wood-Wentz, ST Turner, SR Hayman, et al. 2013. "Podocyturia Predates Proteinuria and Clinical Features of Preeclampsia: Longitudinal Prospective Study." *Hypertension* 61 (6): 1289–96. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01115.
- Craici, IM, SJ Wagner, TL Weissgerber, JP Grande, and VD Garovic. 2014. "Advances in the Pathophysiology of Pre-Eclampsia and Related Podocyte Injury." *Kidney International* 86 (2): 275–85. doi:10.1038/ki.2014.17.
- Cruz-Gonzalez, I, P Pabón, A Rodríguez-Barbero, J Martín-moreiras, M Pericacho, PL Sánchez, V Ramirez, et al. 2008. "Identification of Serum Endoglin as a Novel Prognostic Marker after Acute Myocardial Infarction." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12 (3): 955–61. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00156.x.
- Cudmore, M, S Ahmad, B Al-Ani, T Fujisawa, H Coxall, K Chudasama, LR Devey, SJ Wigmore, PW AHewett, and A Ahmed. 2007. "Negative Regulation of Soluble Flt-1 and Soluble Endoglin Release by Heme Oxygenase-1." *Circulation* 115 (13): 1789–97. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.660134.
- Cunningham, FG, and MD Lindheimer. 1992. "Hypertension in Pregnancy." *The New England Journal of Medicine* 326 (14): 927–32.
- Darmochwal-Kolarz, D, M Michalak, B Kolarz, M Przegalinska-Kalamucka, A Bojarska-Junak, D Sliwa, and J Oleszczuk. 2017. "The Role of Interleukin-17, Interleukin-23, and Transforming Growth Factor- β in Pregnancy Complicated by Placental Insufficiency." *BioMed Research International* 2017. Hindawi: 6904325. doi:10.1155/2017/6904325.
- Davis, KR, J Ponnampalam, R Hayman, PN Baker, S Arulkumaran, and R Donnelly. 2001. "Microvascular Vasodilator Response to Acetylcholine Is Increased in Women with Preeclampsia." *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 108 (6): 610–14. doi:10.1016/S0306-5456(00)00144-3.
- Davison, JM. 1987. "Overview: Kidney Function in Pregnant Women." *American Journal of Kidney Diseases* 9 (4). National Kidney Foundation, Inc.: 248–52. doi:10.1016/S0272-6386(87)80117-8.
- Davison, JM, and W Dunlop. 1980. "Renal Hemodynamics and Tubular Function in Normal Human Pregnancy." *Kidney International* 18 (2). Elsevier Masson SAS: 152–61.

- doi:10.1038/ki.1980.124.
- Davison, JM, and B Noble. 1981. "Serial Changes in 24 Hour Creatinine Clearance During Normal Menstrual Cycles and the" 88 (January): 10–17.
- de Boer, K, JW ten Cate, A Sturk, JJ Borm, and PE Treffers. 1989. "Enhanced Thrombin Generation in Normal and Hypertensive Pregnancy." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 160 (1): 95–100. doi:10.1016/0002-9378(89)90096-3.
- de Haas, S, C Ghossein-Doha, SM van Kuijk, J van Drongelen, and ME Spaanderman. 2017. "Physiologic Adaptation of Plasma Volume during Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 49 (2): 177–87. doi:10.1002/uog.17360.
- De Maria, F.J., and Hugh Y.C. See. 1966. "Role of the Placenta in Pre-Eclampsia." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 94 (4). Elsevier Inc.: 471–76. doi:10.1016/0002-9378(66)90046-9.
- Dechend, R, and FC Luft. 2008. "From Stem Cells to Germ Cells and Back Again." *Nature Medicine* 14 (11): 1187–88. doi:0.1038/nm1108-1187.
- Deng, A, and C Baylis. 1995. "Glomerular Hemodynamic Responses to Pregnancy in Rats with Severe Reduction of Renal Mass." *Kidney International* 48 (1): 39–44.
- Denis, CV, and DD Wagner. 2007. "Platelet Adhesion Receptors and Their Ligands in Mouse Models of Thrombosis." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (4): 728–39. doi:10.1161/01.ATV.0000259359.52265.62.
- Dieckmann, WJ. 1936. "Blood and Plasma Volume Changes in Eclampsia." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 32 (6). Elsevier Masson SAS: 927–36. doi:10.1016/S0002-9378(16)41154-3.
- Donnelly, JC, SM Cooley, TA Walsh, OP Smith, J Gillan, C McMahon, and MP Geary. 2013. "Circulating pro- and Anticoagulant Levels in Normal and Complicated Primigravid Pregnancies and Their Relationship to Placental Pathology." *Journal of Obstetrics and Gynaecology: The Journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology* 33 (3): 264–68. doi:10.3109/01443615.2012.758694.
- Downing, I, GL Shepherd, and PJ Lewis. 1980. "Reduced Prostacyclin Production in Pre-Eclampsia." *Lancet* 2 (8208–8209): 1374.
- Duley, L. 2009. "The Global Impact of Pre-Eclampsia and Eclampsia." *Seminars in Perinatology* 33 (3). Elsevier Inc.: 130–37. doi:10.1053/j.semperi.2009.02.010.
- Dusse, LM, PN Alpoim, JT Silva, DR Rios, AH BrandAo, and AC Cabral. 2015. "Revisiting HELLP Syndrome." *Clinica Chimica Acta* 451 (Pt B). Elsevier B.V.: 117–20. doi:10.1016/j.cca.2015.10.024.
- Duvekot, JJ, EC Cheriex, FA Pieters, PP Menheere, and LL Peeters. 1993. "Early Pregnancy Changes in Hemodynamics and Volume Homeostasis Are Consecutive Adjustments

- Triggered by a Primary Fall in Systemic Vascular Tone." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 169 (6). Mosby: 1382–92. doi:10.1016/0002-9378(93)90405-8.
- Düwel, A, N Eleno, M Jerkic, M Arevalo, JP Bolaños, C Bernabeu, and JM López-Novoa. 2007. "Reduced Tumor Growth and Angiogenesis in Endoglin-Haploinsufficient Mice." *Tumor Biology* 28 (1): 1–8. doi:10.1159/000097040.
- Easterling, TR. 2016. "Apheresis to Treat Preeclampsia: Insights, Opportunities and Challenges." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 27 (3). American Society of Nephrology: 663–65. doi:10.1681/ASN.2015070794.
- Easterling, TR, TJ Benedetti, KC Carlson, DA Brateng, J Wilson, and BS Schmucler. 1991. "The Effect of Maternal Hemodynamics on Fetal Growth in Hypertensive Pregnancies." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 165 (4 PART 1). Mosby: 902–6. doi:10.1016/0002-9378(91)90436-U.
- Eiland, EI, C Nzerue, and M Faulkner. 2012. "Preeclampsia 2012." *Journal of Pregnancy* 2012: 586578. doi:10.1155/2012/586578.
- Emanuel, M, and S Butt. 2015. "Frequency and Factors Leading to Recurrent Pre-Eclampsia." *Journal of the Pakistan Medical Association* 65 (11): 1173–77.
- Emeksiz, HC, A Bideci, C Damar, B Derinkuyu, N Çelik, E Döğür, O Yüce, MC Özmen, MO Çamurdan, and P Cinaz. 2016. "Soluble Endoglin Level Increase Occurs prior to Development of Subclinical Structural Vascular Alterations in Diabetic Adolescents." *JCRPE Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology* 8 (3): 313–20. doi:10.4274/jcrpe.2906.
- Engvall, E, and P Perlmann. 1971. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G." *Immunochemistry* 8 (9): 871–74. doi:10.1016/0019-2791(71)90454-X.
- Eremina, V, M Sood, J Haigh, A Nagy, G Lajoie, N Ferrara, HP Gerber, Y Kikkawa, JH Miner, and SE Quaggin. 2003. "Glomerular-Specific Alterations of VEGF-A Expression Lead to Distinct Congenital and Acquired Renal Diseases." *Journal of Clinical Investigation* 111 (5): 707–16. doi:10.1172/JCI200317423.
- Eskild, A, and LJ Vatten. 2009. "Abnormal Bleeding Associated with Preeclampsia: A Population Study of 315,085 Pregnancies." *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 88 (2): 154–58. doi:10.1080/00016340802613242.
- Farina, A, A Sekizawa, P De Sanctis, Y Purwosunu, T Okai, DH Cha, JH Kang, et al. 2008. "Gene Expression in Chorionic Villous Samples at 11 Weeks Gestation from Women Destined to Develop Preeclampsia." *Prenatal Diagnosis* 28 (10): 956–61. doi:10.1002/pd.2109.
- Faundes, A, M Bricola-Filho, and JL E Silva. 1998. "Dilatation of the Urinary Tract during Pregnancy: Proposal of a Curve of Maximal Caliceal Diameter by Gestational Age." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 178 (5): 1082–86. doi:10.1016/S0002-

- 9378(98)70552-6.
- Fay, RA, AO Hughes, and NT Farron. 1983. "Platelets in Pregnancy: Hyperdestruction in Pregnancy." *Obstetric and Gynecology* 61 (2): 238–40.
- Fernandez-Ruiz, E, S St-Jacques, T Bellon, M Letarte, and C Bernabeu. 1993. "Assignment of the Human Endoglin Gene (END) to 9q34qter." *Cytogenetics and Cell Genetics* 64 (3–4): 204–7.
- Fisher, SJ. 2015. "Why Is Placentation Abnormal in Preeclampsia?" *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 213 (4 Suppl). Elsevier Inc.: S115–22. doi:10.1016/j.ajog.2015.08.042.
- Fitzgerald, DJ, G Mayo, F Catella, SS Entman, and GA FitzGerald. 1987. "Increased Thromboxane Biosynthesis in Normal Pregnancy Is Mainly Derived from Platelets." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 157 (2). C. V. Mosby Company: 325–30. doi:10.1016/S0002-9378(87)80162-X.
- Förstermann, U, and WC Sessa. 2012. "Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function." *European Heart Journal* 33 (7): 829–37. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.
- Fuentes, A, A Rojas, KB Porter, G Saviello, and WF O'Brien. 1995. "The Effect of Magnesium Sulfate on Bleeding Time in Pregnancy." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 173 (4): 1246–49.
- Furuta, I, T Zhai, S Ishikawa, T Umazume, K Nakagawa, T Yamada, M Morikawa, and H Minakami. 2017. "Association between Nephriuria, Podocyturia, and Proteinuria in Women with Pre-Eclampsia." *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 43 (1): 34–41. doi:10.1111/jog.13180.
- Gallardo-Vara, E, FJ Blanco, M Roqué, SL Friedman, T Suzuki, LM Botella, and C Bernabeu. 2016. "Transcription Factor KLF6 Upregulates Expression of Metalloprotease MMP14 and Subsequent Release of Soluble Endoglin during Vascular Injury." *Angiogenesis* 19 (2): 155–71. doi:10.1007/s10456-016-9495-8.
- Gallery, ED, SN Hunyor, and AZ Györy. 1979. "Plasma Volume Contraction: A Significant Factor in Both Pregnancy-Associated Hypertension (Preeclampsia) and Chronic Hypertension in Pregnancy." *Quarterly Journal of Medicine* 48 (192): 593–602. doi:10.1093/oxfordjournals.qjmed.a067595.
- Gant, NF, RJ Worley, RB Everett, and PC MacDonald. 1980. "Control of Vascular Responsiveness during Human Pregnancy." *Kidney International* 18 (2): 253–58. doi:10.1038/ki.1980.133.
- García-Pozo, L, ME Miquilena-Colina, T Lozano-Rodríguez, and C García-Monzón. 2008. "Endoglin: Structure, Biological Functions and Role in Fibrogenesis." *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 100 (6): 355–60.
- Gardiner, C, and M Vatish. 2015. "Pre-Eclampsia: The Role of Hemostasis in Its

- Pathophysiology and Potential Future Therapeutic Options." In *Disorders of Thrombosis and Hemostasis in Pregnancy*, edited by Hannah Cohen and Patrick O'Brien, 2nd ed., 159–71. London: Springer-Verlag London. doi:10.1007/978-3-319-15120-5.
- Gardiner, C, and M Vatish. 2017. "Impact of Haemostatic Mechanisms on Pathophysiology of Preeclampsia." *Thrombosis Research* 151 (1). Elsevier Masson SAS: S48–52. doi:10.1016/S0049-3848(17)30067-1.
- Garovic, VD, SJ Wagner, ST Turner, DW Rosenthal, WJ Watson, BC Brost, CH Rose, et al. 2007a. "Urinary Podocyte Excretion as a Marker for Preeclampsia." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 196 (4): 320.e1–7. doi:10.1016/j.ajog.2007.02.007.
- Garovic, VD, SJ Wagner, ST Turner, DW Rosenthal, WJ Watson, BC Brost, CH Rose, et al. 2007b. "Urinary Podocyte Excretion as a Marker for Preeclampsia." *Obstetrical and Gynecological Survey* 62 (9): 560–61. doi:10.1016/j.ajog.2007.02.007.
- George, EM, and JP Granger. 2010. "Recent Insights into the Pathophysiology of Preeclampsia." *Expert Rev Obstet Gynecol* 5 (5): 557–66. doi:10.1586/eog.10.45.Recent.
- Gilbert, JS, SA Babcock, and JP Granger. 2007. "Hypertension Produced by Reduced Uterine Perfusion in Pregnant Rats Is Associated with Increased Soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1 Expression." *Hypertension* 50 (6): 1142–47. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.096594.
- Gilbert, JS, SA Gilbert, M Arany, and JP Granger. 2009. "Hypertension Produced by Placental Ischemia in Pregnant Rats Is Associated with Increased Soluble Endoglin Expression." *Hypertension* 53 (2): 399–403. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.123513.
- Gonzalo-Gil, E, and M Galindo-Izquierdo. 2014. "Role of Transforming Growth Factor-Beta (TGF) Beta in the Physiopathology of Rheumatoid Arthritis." *Reumatología Clínica* 10 (3): 174–79. doi:10.1016/j.reuma.2014.01.009.
- Gougos, A, and M Letarte. 1990. "Primary Structure of Endoglin, an Glycoprotein of Human Endothelial Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 265 (15): 8361–64.
- Gould, ER, and AM Burgner. 2016. "Glomerular Disease." In *The Kidney: A Comprehensive Guide to Pathologic Diagnosis and Management*, edited by D. E. Hansel, C. J. Kane, G. P. Paner, and S. S. Chang, 175–98. New York. doi:10.1007/978-1-4939-3286-3.
- Goulopoulou, S, and ST Davidge. 2015. "Molecular Mechanisms of Maternal Vascular Dysfunction in Preeclampsia." *Trends in Molecular Medicine* 21 (2). Elsevier Ltd: 88–97. doi:10.1016/j.molmed.2014.11.009.
- Graulich, W, DM Nettelbeck, T DKissel, and R Muller. 1999. "Cell Type Specificity of the Human Endoglin Promoter." *Gene* 227 (1): 55–62. doi:10.1016/S0378-1119(98)00585-X.
- Gregory, AL, G Xu, V Sotov, and M Letarte. 2014. "Review: The Enigmatic Role of Endoglin in the Placenta." *Placenta* 35: S93–99. doi:10.1016/j.placenta.2013.10.020.
- Grill, S, C Rusterholz, R Zanetti-Dällenbach, S Tercanli, W Holzgreve, S Hahn, and O Lapaire.

2009. "Potential Markers of Preeclampsia – a Review." *Reproductive Biology and Endocrinology* 7 (1): 70. doi:10.1186/1477-7827-7-70.
- Groenendijk, R, JB Trimbos, and HC Wallenburg. 1984. "Hemodynamic Measurements in Preeclampsia: Preliminary Observations." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 150 (3). Mosby: 232–36. doi:10.1016/S0002-9378(84)90357-0.
- Gu, GL, QY Yang, RL Zeng, and XL Xu. 2015. "The Association between BMP4 Gene Polymorphism and Its Serum Level with the Incidence of LVH in Hypertensive Patients." *Journal of Translational Medicine* 13: 14. doi:10.1186/s12967-014-0368-x.
- Gu, Y, DF Lewis, and Y Wang. 2008. "Placental Productions and Expressions of Soluble Endoglin, Soluble Fms-like Tyrosine Kinase Receptor-1, and Placental Growth Factor in Normal and Preeclamptic Pregnancies." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (1): 260–66. doi:10.1210/jc.2007-1550.
- Guerrero-Esteo, M, T Sanchez-Elsner, A Letamendia, and C Bernabeu. 2002. "Extracellular and Cytoplasmic Domains of Endoglin Interact with the Transforming Growth Factor-Beta Receptors I and II." *Journal of Biological Chemistry* 277 (32): 29197–209. doi:10.1074/jbc.M111991200.
- Guy, GP, HZ Ling, P García, LC Poon, and KH Nicolaidis. 2017. "Maternal Cardiac Function at 35–37 Weeks' Gestation: Prediction for Preeclampsia and Gestational Hypertension." *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 49 (1): 61–66. doi:10.1002/uog.17300.
- Guyton, AC, and JE Hall. 2008a. "Embarazo Y Lactancia." In *Tratado de Fisiología Médica*, 12th ed., 1003–17. Elsevier Saunders.
- Guyton, AC, and JE Hall. 2008b. "Fisiología Fetal Y Neonatal." In *Tratado de Fisiología Médica*, 12th ed., 1019–28. Elsevier Saunders.
- Guyton, AC, and JE Hall. 2008c. "Formación de La Orina Por Los Riñones: I. Filtración Glomerular, Flujo Sanguíneo Renal Y Su Control." In *Tratado de Fisiología Médica*, 12th ed., 303–26.
- Guyton, AC, and JE Hall. 2008d. "Hemostasia Y Coagulación Sanguínea." In *Tratado de Fisiología Médica*, 12th ed., 451–61. Elsevier Saunders.
- Gyselaers, W, W Mullens, K Tomsin, T Mesens, and L Peeters. 2011. "Role of Dysfunctional Maternal Venous Hemodynamics in the Pathophysiology of Pre-Eclampsia: A Review." *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 38 (2): 123–29. doi:10.1002/uog.9061.
- Hagmann, H, R Thadhani, T Benzing, SA Karumanchi, and H Stepan. 2012. "The Promise of Angiogenic Markers for the Early Diagnosis and Prediction of Preeclampsia." *Clinical Chemistry* 58 (5): 837–45. doi:10.1373/clinchem.2011.169094.
- Hammerova, L, J Chabada, J Drobny, and A Batorova. 2014. "Longitudinal Evaluation of Markers of Hemostasis in Pregnancy." *Bratisl Lek Listy* 115 (3): 140–44. doi:10.4149/BLL_2014_030.

- Hawinkels, LJ, P Kuiper, E Wiercinska, HW Verspaget, Z Liu, E Pardali, CF Sier, and P Ten Dijke. 2010. "Matrix Metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-Mediated Endoglin Shedding Inhibits Tumor Angiogenesis." *Cancer Research* 70 (10): 4141–50. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4466.
- Hayman, R, A Warren, J Brockelsby, I Johnson, and P Baker. 2000. "Plasma from Women with Pre-Eclampsia Induces an in Vitro Alteration in the Endothelium-Dependent Behaviour of Myometrial Resistance Arteries." *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 107 (1): 108–15.
- Heilmann, L. 1987. "Blood Rheology and Pregnancy." *Baillieres Clin Haematol* 1 (3): 777–99.
- Hein, TW, SH Platts, KR Waitkus-Edwards, L Kuo, SA Mousa, and GA Meininger. 2001. "Integrin-Binding Peptides Containing RGD Produce Coronary Arteriolar Dilation via Cyclooxygenase Activation." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 281 (6): H2378-2384.
- Helbing, T, L Arnold, G Wiltgen, E Hirschbihl, V Gabelmann, A Hornstein, JS Esser, et al. 2017. "Endothelial BMP4 Regulates Leukocyte Diapedesis and Promotes Inflammation." *Inflammation* 40 (6). Inflammation: 1862–74. doi:10.1007/s10753-017-0627-0.
- Helbing, T, G Wiltgen, A Hornstein, EZ Brauers, L Arnold, A Bauer, JS Esser, et al. 2017. "Bone Morphogenetic Protein-Modulator BMPER Regulates Endothelial Barrier Function." *Inflammation* 40 (2): 442–53. doi:10.1007/s10753-016-0490-4.
- Hellgren, M. 2003. "Hemostasis during Normal Pregnancy and Puerperium." *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 29 (2): 125–30. doi:10.1055/s-2003-38897.
- Hellgren, M, and M Blomback. 1981. "Studies on Blood Coagulation and Fibrinolysis in Pregnancy, during Delivery and in the Puerperium." *Gynecol Obstet Invest* 12: 141–54.
- Henao, DE, and MA Saleem. 2013. "Proteinuria in Preeclampsia from a Podocyte Injury Perspective." *Current Hypertension Reports* 15 (6): 600–605. doi:10.1007/s11906-013-0400-1.
- Hennessey, JC, and JJ McGuire. 2013. "Attenuated Vasodilator Effectiveness of Protease-Activated Receptor 2 Agonist in Heterozygous par2 Knockout Mice." *PLoS ONE* 8 (2): e55965. doi:10.1371/journal.pone.0055965.
- Hennessy, TG, D MacDonald, MS Hennessy, M Maguire, S Blake, HA McCann, and DD Sugrue. 1996. "Serial Changes in Cardiac Output during Normal Pregnancy: A Doppler Ultrasound Study." *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 70 (2): 117–22.
- Henry-Berger, J, K Mouzat, S Baron, C Bernabeu, G Marceau, JP Saru, V Sapin, JM Lobaccaro, and F Caira. 2008. "Endoglin (CD105) Expression Is Regulated by the Liver X Receptor Alpha (NR1H3) in Human Trophoblast Cell Line JAR." *Biology of Reproduction* 78 (6): 968–75. doi:10.1095/biolreprod.107.066498.

- Hermida, RC, and DE Ayala. 2002. "Prognostic Value of Office and Ambulatory Blood Pressure Measurements in Pregnancy." *Hypertension* 40 (3): 298–303. doi:10.1161/01.HYP.0000028978.99648.D0.
- Hibbard, JU, SG Shroff, and MD Lindheimer. 2009. "Cardiovascular Alterations in Normal and Preeclamptic Pregnancy." In *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*, edited by Robert N. Taylor, James M. Roberts, F. Gary Cunningham, and Marshall D. Lindheimer, Third Edit, 249–67. Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-12-374213-1.00014-8.
- Higby, K, CR Suiter, JY Phelps, T Siler-Khodr, and O Langer. 1994. "Normal Values of Urinary Albumin and Total Protein Excretion during Pregnancy." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 171 (4). Mosby-Year Book, Inc.: 984–89. doi:10.1016/S0002-9378(13)90019-3.
- Hiremath, AN, ZW Hu, and BB Hoffman. 1991. "Desensitization of Alpha-Adrenergic Receptor-Mediated Smooth Muscle Contraction: Role of the Endothelium." *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 18 (1): 151–57.
- Hirsinger, E, D Duprez, C Jouve, P Malapert, J Cooke, and O Pourquie. 1997. "Noggin Acts Downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to Antagonize BMP4 in Avian Somite Patterning." *Development (Cambridge, England)* 124 (22): 4605–14.
- Hod, T, AS Cerdeira, and SA Karumanchi. 2015. "Molecular Mechanisms of Preeclampsia." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5. doi:10.1101/cshperspect.a023473.
- Hodžić, J, S Izetbegović, B Muračević, R Iriškić, and HS Jović. 2017. "Nitric Oxide Biosynthesis during Normal Pregnancy and Pregnancy Complicated by Preeclampsia." *Medicinski Glanik (Zeneca)* 14 (2): 211–17. doi:10.17392/915-17.
- Hofmeyr, GJ, TA Lawrie, AN Atallah, L Duley, and MR Torloni. 2014. "Calcium Supplementation during Pregnancy for Preventing Hypertensive Disorders and Related Problems." *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 6 (6): CD001059. doi:10.1002/14651858.CD001059.pub4.
- Hogan, BL. 1996. "Bone Morphogenetic Proteins in Development." *Current Opinion in Genetics & Development* 6 (4): 432–38. doi:10.1016/S0959-437X(96)80064-5.
- Holmes, VA, and JM Wallace. 2005. "Haemostasis in Normal Pregnancy: A Balancing Act?" *Biochemical Society Transactions* 33 (2): 428–32.
- Holthe, Mette R., Anne C. Staff, Lillian N. Berge, and Torstein Lyberg. 2004. "Different Levels of Platelet Activation in Preeclamptic, Normotensive Pregnant, and Nonpregnant Women." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190 (4): 1128–34. doi:10.1016/j.ajog.2003.10.699.
- Holthe, MR, T Lyberg, AC Staff, and LN Berge. 2005. "Leukocyte-Platelet Interaction in Pregnancies Complicated with Preeclampsia." *Platelets* 16 (2): 91–97. doi:10.1080/09537100400004355.

- Hu, W, Y Zhang, L Wang, CW Lau, J Xu, JY Luo, L Gou, et al. 2016. "Bone Morphogenic Protein 4-Smad-Induced Upregulation of Platelet-Derived Growth Factor AA Impairs Endothelial Function." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36 (3): 553–60. doi:10.1161/ATVBAHA.115.306302.
- Hytten, FE, and DB Paintin. 1963. "Increase in Plasma Volume during Normal Pregnancy." *The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Empire* 70 (1938): 402–7. doi:10.1097/00006254-196408000-00008.
- Ikemoto, T, Y Hojo, H Kondo, N Takahashi, M Hirose, Y Nishimura, T Katsuki, K Shimada, and K Kario. 2012. "Plasma Endoglin as a Marker to Predict Cardiovascular Events in Patients with Chronic Coronary Artery Diseases." *Heart and Vessels* 27 (4): 344–51.
- Irani, RA, and Y Xia. 2011. "Renin Angiotensin Signaling in Normal Pregnancy and Preeclampsia." *Seminars in Nephrology* 31 (1). Elsevier Inc.: 47–58. doi:10.1016/j.semnephrol.2010.10.005.
- Ishizuya-Oka, A, and T Hasebe. 2008. "Sonic Hedgehog and Bone Morphogenetic Protein-4 Signaling Pathway Involved in Epithelial Cell Renewal along the Radial Axis of the Intestine." *Digestion* 77 (SUPPL. 1): 42–47. doi:10.1159/000111487.
- Ivankovic, M, J Pereira, M Bianchi, A Germain, and D Mezzano. 1994. "Bleeding Time in Preeclampsia." *Acta Obstet Gynecol Scand* 73 (9): 685–87.
- Janes, SL, and AH Goodall. 1994. "Flow Cytometric Detection of Circulating Activated Platelets and Platelet Hyper-Responsiveness in Pre-Eclampsia and Pregnancy." *Clinical Science* 86 (6): 731–39.
- Jepson, JH. 1968. "Endocrine Control of Maternal and Fetal Erythropoiesis." *Canadian Medical Association Journal* 98: 844–47.
- Jerkic, M, and M Letarte. 2015. "Increased Endothelial Cell Permeability in Endoglin-Deficient Cells." *FASEB Journal* 29 (9): 3678–88. doi:10.1096/fj.14-269258.
- Jerkic, M, JV Rivas-elena, M Prieto, R Carrón, F Sanz-Rodriguez, F Perez-Barriocanal, A Rodriguez-Barbero, C Bernabeu, and JM Lopez-Novoa. 2004. "Endoglin Regulates Nitric Oxide-Dependent." *FASEB Journal* 18 (3): 609–11. doi:10.1096/fj.03-0197fje.
- Jerkic, M, JV Rivas-Elena, JF Santibanez, M Prieto, A Rodríguez-Barbero, F Perez-Barriocanal, M Pericacho, et al. 2006. "Endoglin Regulates Cyclooxygenase-2 Expression and Activity." *Circulation Research* 99 (3): 248–56. doi:10.1161/01.RES.0000236755.98627.69.
- Jerkic, M, A Rodríguez-Barbero, M Prieto, M Toporsian, M Pericacho, JV Rivas-Elena, J Obreo, et al. 2006. "Reduced Angiogenic Responses in Adult Endoglin Heterozygous Mice." *Cardiovascular Research* 69 (4): 845–54. doi:10.1016/j.cardiores.2005.11.020.
- Jezkova, K, J Rathouska, I Nemeckova, P Fikrova, E Dolezelova, M Varejckova, B Vitverova, et al. 2016. "High Levels of Soluble Endoglin Induce a Proinflammatory and Oxidative-Stress Phenotype Associated with Preserved NO-Dependent Vasodilatation in Aortas

- from Mice Fed a High-Fat Diet." *Journal of Vascular Research* 53 (3–4): 149–62. doi:10.1159/000448996.
- Jones, CM, KM Lyons, and BL Hogan. 1991. "Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in Morphogenesis and Neurogenesis in the Mouse." *Development (Cambridge, England)* 111 (2): 531–42.
- Kanat-Pektas, M, U Yesildager, N Tuncer, DT Arioiz, G Nadirgil-Koken, and M Yilmazer. 2014. "Could Mean Platelet Volume in Late First Trimester of Pregnancy Predict Intrauterine Growth Restriction and Pre-Eclampsia?" *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 40 (7): 1840–45. doi:10.1111/jog.12433.
- Kang, H, BN Davis-dusenbery, PH Nguyen, A Lal, J Lieberman, LV Aelst, G Lagna, and A Hata. 2012. "Bone Morphogenetic Protein 4 Promotes Vascular Smooth Muscle Contractility by Activating MicroRNA-21 (miR-21), Which Down-Regulates Expression of Family of Dedicator of Cytokinesis (DOCK) Proteins * □." *Journal of Biological Chemistry* 287 (6): 3976–86. doi:10.1074/jbc.M111.303156.
- Kaplan, C, F Forestier, M Dreyfus, MC Morel-Kopp, and G Tchernia. 1995. "Maternal Thrombocytopenia during Pregnancy: Diagnosis and Etiology." *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 21 (1): 85–94. doi:10.1055/s-2007-1000382.
- Kapur, NK, KJ Morine, and M Letarte. 2013. "Endoglin: A Critical Mediator of Cardiovascular Health." *Vascular Health and Risk Management* 9 (January). Dove Press: 195–206. doi:10.2147/VHRM.S29144.
- Karalis, I, SK Nadar, E Al Yemeni, AD Blann, and GY Lip. 2005. "Platelet Activation in Pregnancy-Induced Hypertension." *Thrombosis Research* 116 (5): 377–83. doi:10.1016/j.thromres.2005.01.009.
- Kaufmann, P, S Black, and B Huppertz. 2003. "Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia." *Biology of Reproduction* 69 (1): 1–7. doi:10.1095/biolreprod.102.014977.
- Kazmi, RS, AJ Cooper, and BA Lwaleed. 2011. "Platelet Function in Pre-Eclampsia." *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 37 (2): 131–36.
- Kelton, JG, DJ Hunter, and PB Neame. 1985. "A Platelet Function Defect in Preeclampsia." *Obstetric and Gynecology* 65 (1): 107–9.
- Kerr, MG. 1965. "The Mechanical Effects of the Gravid Uterus in Late Pregnancy." *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 72 (4): 513–29. doi:10.1111/j.1471-0528.1965.tb00061.x.
- Kietadisorn, R, RP Juni, and AL Moens. 2012. "Tackling Endothelial Dysfunction by Modulating NOS Uncoupling: New Insights into Its Pathogenesis and Therapeutic Possibilities." *AJP: Endocrinology and Metabolism* 302 (5): E481–95. doi:10.1152/ajpendo.00540.2011.

- Kilby, MD, F Broughton Pipkin, S Cockbill, S Heptinstall, and E M Symonds. 1990. "A Cross-Sectional Study of Basal Platelet Intracellular Free Calcium Concentration in Normotensive and Hypertensive Primigravid Pregnancies." *Clinical Science* 78 (1): 75–80.
- Kim, SH, HJ Kim, and CW Kim. 2016. "GLCCI1 Is a Novel Component Associated with the PI3K Signaling Pathway in Podocyte Foot Processes." *Experimental and Molecular Medicine* 48. Nature Publishing Group: e233. doi:10.1038/emm.2016.28.
- Konieczny, A, M Ryba, J Wartacz, A Czyzewska-Buczyńska, Z Hruby, and W Witkiewicz. 2013. "Podocytes in Urine, a Novel Biomarker of Preeclampsia?" *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 22 (2): 145–49.
- Krane, NK, and M Hamrahian. 2007. "Pregnancy: Kidney Diseases and Hypertension." *American Journal of Kidney Diseases* 49 (2): 336–45. doi:10.1053/j.ajkd.2006.10.029.
- Krause, C, A Guzman, and P Knaus. 2011. "Noggin." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 43 (4): 478–81. doi:10.1016/j.biocel.2011.01.007.
- Krupp, J, DS Boeldt, FX Yi, M Grummer, H Bankowski Anaya, DM Shah, and IM Bird. 2013. "The Loss of Sustained Ca(2+) Signaling Underlies Suppressed Endothelial Nitric Oxide Production in Preeclamptic Pregnancies: Implications for New Therapy." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 305 (7): H969–979. doi:10.1152/ajpheart.00250.2013.
- Krutzén, E, P Olofsson, SE Bäck, and P Nilsson-Ehle. 1992. "Glomerular Filtration Rate in Pregnancy: A Study in Normal Subjects and in Patients with Hypertension, Preeclampsia and Diabetes." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 52 (5): 387–92. doi:10.3109/00365519209088374.
- Kublickiene, KR, B Lindblom, K Krüger, and H Nisell. 2000. "Preeclampsia: Evidence for Impaired Shear Stress-Mediated Nitric Oxide Release in Uterine Circulation." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 183 (1): 160–66. doi:10.1067/mob.2000.105820.
- Kuklina, EV, C Ayala, and WM Callaghan. 2009. "Hypertensive Disorders and Severe Obstetric Morbidity in the United States." *Obstet Gynecol* 113 (6): 1299–1306. doi:10.1097/01.aoa.0000370513.00986.71.
- Kumar, S, CC Pan, JC Bloodworth, AB Nixon, C Theuer, DG Hoyt, and NY Lee. 2014. "Antibody-Directed Coupling of Endoglin and MMP-14 Is a Key Mechanism for Endoglin Shedding and Dereglulation of TGF- β Signaling." *Oncogene* 33 (30). Nature Publishing Group: 3970–79. doi:10.1038/onc.2013.386.
- Kurz, KD, BW Main, and GE Sandusky. 1990. "Rat Model of Arterial Thrombosis Induced by Ferric Chloride." *Thrombosis Research* 60 (4): 269–80.
- Laatio, L, P Myllynen, R Serpi, J Rysä, M Ilves, E Lappi-Blanco, H Ruskoaho, K Vähäkangas, and U Puistola. 2011. "BMP-4 Expression Has Prognostic Significance in Advanced Serous Ovarian Carcinoma and Is Affected by Cisplatin in OVCAR-3 Cells." *Tumor*

- Biology* 32 (5): 985–95. doi:10.1007/s13277-011-0200-7.
- LaMarca, B. 2012. "Endothelial Dysfunction. An Important Mediator in the Pathophysiology of Hypertension during Pre-Eclampsia." *Minerva Ginecologica* 64 (4): 309–20. doi:R09123394 [pii].
- Lang, U, RS Baker, J Khoury, and KE Clark. 2000. "Effects of Chronic Reduction in Uterine Blood Flow on Fetal and Placental Growth in the Sheep." *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 279 (1): R53–59.
- Lastres, P, A Letamendía, H Zhang, C Rius, N Almendro, U Raab, L López, et al. 1996. "Endoglin Modulates Cellular Responses to TGF-Beta 1." *The Journal of Cell Biology* 133 (5): 1109–21. doi:10.1083/jcb.133.5.1109.
- Lees, C, and E Ferrazzi. 2017. "Relevance of Haemodynamics in Treating Pre-Eclampsia." *Current Hypertension Reports* 19 (9). Current Hypertension Reports: 76. doi:10.1007/s11906-017-0766-6.
- Lees, MM, SH Taylor, DB Scott, and MG Kerr. 1967. "Of the British Commonwealth." *The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth* 74 (3): 319–28.
- Letamendía, A, P Lastres, LM Botella, U Raab, C Langa, B Velasco, L Attisano, and C Bernabeu. 1998. "Role of Endoglin in Cellular Responses to Transforming Growth Factor-Beta. A Comparative Study with Betaglycan." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (49): 33011–19. doi:10.1074/jbc.273.49.33011.
- Letarte, M, ML McDonald, C Li, K Kathirkamathamby, S Vera, N Pece-Barbara, and S Kumar. 2005. "Reduced Endothelial Secretion and Plasma Levels of Transforming Growth Factor- β 1 in Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 1." *Cardiovascular Research* 68 (1): 155–64. doi:10.1016/j.cardiores.2005.04.028.
- Leung, MP, B Thompson, J Black, S Dai, and JM Alswailer. 2018. "The Effects of Preterm Birth on Visual Development." *Clinical & Experimental Optometry* 101 (1): 4–12. doi:10.1111/cxo.12578.
- Levey, AS, T Greene, GJ Beck, AW Caggiula, JW Kusek, LG Hunsicker, and S Klahr. 1999. "Dietary Protein Restriction and the Progression of Chronic Renal Disease: What Have All of the Results of the MDRD Study Shown?" *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 (11): 2426–39.
- Levey, AS, LA Stevens, CH Schmid, YL Zhang, AF Castro, HI Feldman, JW Kusek, et al. 2009. "A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate." *Annals of Internal Medicine* 150 (9): 604–12. doi:10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006.
- Levine, Richard J, Chun Lam, Cong Qian, Kai F Yu, D Ph, Sharon E Maynard, Benjamin P Sachs, et al. 2006. "Soluble Endoglin and Other Circulating Antiangiogenic Factors in Preeclampsia." *New England Journal of Medicine* 355 (10): 992–1005.
- Levine, RJ, SE Maynard, C Qian, KH Lim, LJ England, KF Yu, EF Schisterman, et al. 2004. "Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia." *New England Journal of*

- Medicine* 350 (7): 672–83. doi:10.1056/NEJMoa031884.
- Li, C, B Guo, PB Wilson, A Stewart, G Byrne, N Bundred, and S Kumar. 2000. "Plasma Levels of Soluble CD105 Correlate with Metastasis in Patients with Breast Cancer." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 89 (2): 122–26. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(20000320)89:2<122::AID-IJC4>3.0.CO;2-M.
- Li, C, R Issa, P Kumar, IN Hampson, JM Lopez-Novoa, C Bernabeu, and S Kumar. 2003. "CD105 Prevents Apoptosis in Hypoxic Endothelial Cells." *Journal of Cell Science* 116 (Pt 13): 2677–85. doi:10.1242/jcs.00470.
- Li, CG, H Bethell, PB Wilson, D Bhatnagar, MG Walker, and S Kumar. 2000. "The Significance of CD105, TGFbeta and CD105/TGFbeta Complexes in Coronary Artery Disease." *Atherosclerosis* 152 (1): 249–56.
- Li, DY, LK Sorensen, BS Brooke, LD Urness, EC Davis, DG Taylor, BB Boak, et al. 2016. "Defective Angiogenesis in Mice Lacking Endoglin." *American Association for the Advancement of Science* 284 (5419): 1534–37.
- Li, J, B LaMarca, and JF Reckelhoff. 2012. "A Model of Preeclampsia in Rats: The Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) Model." *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 303 (1): H1–8. doi:10.1152/ajpheart.00117.2012.
- Lim, JH, SY Kim, SY Park, JH Yang, MY Kim, and HM Ryu. 2008. "Effective Prediction of Preeclampsia by a Combined Ratio of Angiogenesis-Related Factors." *Obstetrics and Gynecology* 111 (6): 1403–9. doi:10.1097/AOG.0b013e3181719b7a.
- Lin, P, P Hahn, and S Fekrat. 2012. "Peripheral Retinal Vascular Leakage Demonstrated by Ultra-Widefield Fluorescein Angiography in Preeclampsia with HELLP Syndrome." *Retina, the Journal of Retinal and Vitreous Disease* 32 (8): 1689–90. doi:10.1097/IAE.0b013e318261a757.
- Lipke, DW, EE Soltis, RR Fiscus, L Yang, PS Newman, and SM Aziz. 1996. "RGD-Containing Peptides Induce Endothelium-Dependent and Independent Vasorelaxations of Rat Aortic Rings." *Regul Pept* 63 (1): 23–29.
- Liu, Z, GB Afink, and PT Dijke. 2012. "Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 and Soluble Endoglin Are Elevated Circulating Anti-Angiogenic Factors in Pre-Eclampsia." *Pregnancy Hypertension* 2 (4). International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy: 358–67. doi:10.1016/j.preghy.2012.06.003.
- Llorca, O, A Trujillo, FJ Blanco, and C Bernabeu. 2007. "Structural Model of Human Endoglin, a Transmembrane Receptor Responsible for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia." *Journal of Molecular Biology* 365 (3): 694–705. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.015.
- López-Novoa, JM. 2007. "Soluble Endoglin Is an Accurate Predictor and a Pathogenic Molecule in Pre-Eclampsia." *Nephrology Dialysis Transplantation* 22 (3): 712–14. doi:10.1093/ndt/gfl768.

- López-Novoa, JM, and C Bernabeu. 2010. "The Physiological Role of Endoglin in the Cardiovascular System." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 299 (4): H959-974. doi:10.1152/ajpheart.01251.2009.
- Lopez-Rodriguez, E, G Gay-Jordi, A Mucci, N Lachmann, and A Serrano-Mollar. 2017. "Lung Surfactant Metabolism: Early in Life, Early in Disease and Target in Cell Therapy." *Cell and Tissue Research* 367 (3). Cell and Tissue Research: 721-35. doi:10.1007/s00441-016-2520-9.
- Lorentzen, B, MJ Endresen, T Hovig, E Haug, and T Henriksen. 1991. "Sera from Preeclamptic Women Increase the Content of Triglycerides and Reduce the Release of Prostacyclin in Cultured Endothelial Cells." *Thrombosis Research* 63: 363-72.
- Lucovnik, M, HK Lackner, I Papousek, K Schmid-Zalaudek, G Schultze, A Roessler, and MG Moertl. 2017. "Systemic Vascular Resistance and Endogenous Inhibitors of Nitric Oxide Synthesis in Early- Compared to Late-Onset Preeclampsia: Preliminary Findings." *Hypertension in Pregnancy* 36 (3). Taylor & Francis: 276-81. doi:10.1080/10641955.2017.1364381.
- Luft, FC. 2006. "Soluble Endoglin (sEng) Joins the Soluble Fms-like Tyrosine Kinase (sFlt) Receptor as a Pre-Eclampsia Molecule." *Nephrology Dialysis Transplantation* 21 (11): 3052-54. doi:10.1093/ndt/gfl439.
- Luu, W, LJ Sharpe, I Capell-Hattam, IC Gelissen, and AJ Brown. 2016. "Oxysterols: Old Tale, New Twists." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 56: 447-67. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010715-103233.
- Lygnos, MC, KI Pappa, HA Papadaki, C Relakis, E Koumantakis, NP Anagnostou, and GD Eliopoulos. 2006. "Changes in Maternal Plasma Levels of VEGF, bFGF, TGF- β 1, ET-1 and sKL During Uncomplicated Pregnancy, Hypertensive Pregnancy and Gestational Diabetes." *In Vivo* 20 (1): 157-63.
- Macey, MG, S Bevan, S Alam, L Verghese, S Agrawal, S Beski, R Thuraisingham, and P K Maccallum. 2010. "Platelet Activation and Endogenous Thrombin Potential in Pre-Eclampsia." *Thrombosis Research* 125 (3). Elsevier Ltd: e76-81. doi:10.1016/j.thromres.2009.09.013.
- Malik, RA, C Li, W Aziz, JA Olson, A Vohra, KC McHardy, JV Forrester, et al. 2005. "Elevated Plasma CD105 and Vitreous VEGF Levels in Diabetic Retinopathy." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9 (3): 692-97.
- Matsubara, T, M Araki, H Abe, O Ueda, KI Jishage, A Mima, C Goto, et al. 2015. "Bone Morphogenetic Protein 4 and Smad1 Mediate Extracellular Matrix Production in the Development of Diabetic Nephropathy." *Diabetes* 64 (8): 2978-90. doi:10.2337/db14-0893.
- Maynard, SE, T Moore Simas, L Bur, SL Crawford, MJ Solitro, and B Meyer. 2010. "Soluble Endoglin for the Prediction of Preeclampsia in a High Risk Cohort." *Hypertension in Pregnancy: Official Journal of the International Society for the Study of Hypertension in*

- Pregnancy* 29 (3): 330–41. doi:10.3109/10641950902968684.
- McDonagh, RJ, JG Ray, RF Burrows, E Burrows, and MJ Vermeulen. 2001. "Platelet Count May Predict Abnormal Bleeding Time among Pregnant Women with Hypertension and Preeclampsia." *Canadian Journal of Anaesthesia = Journal Canadien D'anesthesie* 48 (6): 563–69.
- Meler, E, F Figueras, M Bannasar, O Gomez, F Crispi, and E Gratacos. 2010. "The Prognostic Role of Uterine Artery Doppler Investigation in Patients with Severe Early-Onset Preeclampsia." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 202 (6). Elsevier Inc.: 559.e1-559.e4. doi:10.1016/j.ajog.2010.01.048.
- Miljkovic, ND, GM Cooper, and KG Marra. 2008. "Chondrogenesis, Bone Morphogenetic Protein-4 and Mesenchymal Stem Cells." *Osteoarthritis and Cartilage* 16 (10): 1121–30. doi:10.1016/j.joca.2008.03.003.
- Millar, CM, and M Laffan. 2015. "Hemostatic Changes in Normal Pregnancy." In *Disorders of Thrombosis and Hemostasis in Pregnancy.pdf*, edited by Hannah. Cohen and Patrick O'Brien, 2nd ed., 1–13. London: Springer-Verlag London. doi:10.1007/978-3-319-15120-5.
- Ming, Z, W Chao, Y Jian, and P Shiqi. 2000. "Synthesis of RGD Containing Peptides and Their Vasodilation Effect." *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 30 (3): 247–56. doi:10.1080/10826060008544962.
- Miriyala, S, MCG Nieto, C Mingone, D Smith, S Dikalov, DG Harrison, and H Jo. 2006. "Bone Morphogenetic Protein-4 Induces Hypertension in Mice Role of Noggin , Vascular NADPH Oxidases , and Impaired Vasorelaxation." *Circulation* 113 (24): 2818–25. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.611822.
- Mitchell, JA, B Ahmetaj-Shala, NS Kirkby, WR Wright, LS Mackenzie, DM Reed, and N Mohamed. 2014. "Role of Prostacyclin in Pulmonary Hypertension." *Global Cardiology Science & Practice* 2014 (4): 382–93. doi:10.5339/gcsp.2014.53.
- Mogford, JE, GE Davis, and GA Meininger. 1997. "RGDN Peptide Interaction with Endothelial $\alpha_5\beta_1$ Integrin Causes Sustained Endothelin-Dependent Vasoconstriction of Rat Skeletal Muscle Arterioles." *The Journal of Clinical Investigation* 100 (6): 1647–53. doi:10.1172/JCI119689.
- Mogford, JE, GE Davis, SH Platts, and GA Meininger. 1996. "Vascular Smooth Muscle $\alpha_v\beta_3$ Integrin Mediates Arteriolar Vasodilation in Response to RGD Peptides." *Circulation Research* 79 (4): 821–26.
- Morikawa, M, K Cho, T Kojima, K Chiba, S Ishikawa, T Umazume, K Nakagawa, T Yamada, T Yamada, and H Minakami. 2017. "Risk Factors for Central Serous Chorioretinopathy in Pregnant Japanese Women." *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 43 (5): 866–72. doi:10.1111/jog.13289.
- Moutquin, JM, C Rainville, L Giroux, P Raynauld, G Amyot, R Bilodeau, and N Pelland. 1985. "A Prospective Study of Blood Pressure in Pregnancy: Prediction of Preeclampsia."

- American Journal of Obstetrics and Gynecology* 151 (2): 191–96. doi:10.1016/0002-9378(85)90010-9.
- Müller-Deile, J, and M Schiffer. 2014. "Preeclampsia from a Renal Point of View: Insides into Disease Models, Biomarkers and Therapy." *World Journal of Nephrology* 3 (4): 169–81. doi:10.5527/wjn.v3.i4.169.
- Müller-Deile, J, and M Schiffer. 2017. "Podocytes from the Diagnostic and Therapeutic Point of View." *European Journal of Physiology* 469 (7–8). Pflügers Archiv - European Journal of Physiology: 1007–15. doi:10.1007/s00424-017-1993-z.
- Muller, JM, WM Chilian, and MJ Davis. 1997. "Integrin Signaling Transduces Shear Stress--Dependent Vasodilation of Coronary Arterioles." *Circulation Research* 80 (3): 320–26.
- Munaut, C, S Lorquet, C Pequeux, S Blacher, S Berndt, F Frankenne, and JM Foidart. 2008. "Hypoxia Is Responsible for Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (VEGFR-1) but Not for Soluble Endoglin Induction in Villous Trophoblast." *Human Reproduction* 23 (6): 1407–15. doi:10.1093/humrep/den114.
- Nakanishi, T, N Suzuki, T Kuragano, Y Nagasawa, and Y Hasuike. 2014. "Current Topics in Therapeutic Plasmapheresis." *Clinical and Experimental Nephrology* 18 (1): 41–49. doi:10.1007/s10157-013-0838-0.
- Neal, CR, AJ Hunter, SJ Harper, PW Soothill, and DO Bates. 2004. "Plasma from Women with Severe Pre-Eclampsia Increases Microvascular Permeability in an Animal Model in Vivo." *Clinical Science (London, England: 1979)* 107: 399–405. doi:10.1042/CS20040018.
- Nemeckova, I, A Serwaczak, B Oujo, K Jezkova, J Rathouska, P Fikrova, M Varejckova, et al. 2015. "High Soluble Endoglin Levels Do Not Induce Endothelial Dysfunction in Mouse Aorta." *PloS One* 10 (3): e0119665. doi:10.1371/journal.pone.0119665.
- Nilsson, E, H Salonen Ros, S Cnattingius, and P Lichtenstein. 2004. "The Importance of Genetic and Environmental Effects for Pre-Eclampsia and Gestational Hypertension: A Family Study." *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 111 (3): 200–206. doi:10.1111/j.1471-0528.2004.00042x.x.
- Niwa, H, KI Yamamura, and JI Miyazaki. 1991. "Efficient Selection for High-Expression Transfectants with a Novel Eukaryotic Vector." *Gene* 108 (2): 193–99.
- O'Brien, WF, HI Saba, RA Knuppel, JC Scerbo, and GR Cohen. 1986. "Alterations in Platelet Concentration and Aggregation in Normal Pregnancy and Preeclampsia." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 155 (3): 486–90. doi:10.1016/0002-9378(86)90260-7.
- O'Riordan, MN, and JR Higgins. 2003. "Haemostasis in Normal and Abnormal Pregnancy." *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* 17 (3): 385–96. doi:10.1016/S1521-6934(03)00019-1.
- Oguogho, A, CP Aloamaka, and AB Ebeigbe. 1996. "Depressed Endothelium-Dependent

- Relaxation Responses to Acetylcholine and Histamine in Isolated Human Epigastric Arteries from Pre-Eclamptic Women." *Clinical Automic Reseach* 6 (3): 153–55.
- Oian, P, JM Maltau, H Noddeland, and HO Fadnes. 1986. "Transcapillary Fluid Balance in Pre-Eclampsia." *British Journa of Obstetrics and Gynaecology* 93 (3): 235–39. doi:10.1111/j.1471-0528.1986.tb07899.x.
- Oujo, B, C Bernabeu, and JM Lopez-Novoa. 2013. "Membrane and Soluble Forms of Endoglin in Preeclampsia." *Current Molecular Medicine* 13 (8): 1345–57.
- Ouzounian, JG, and U Elkayam. 2012. "Physiologic Changes During Normal Pregnancy and Delivery." *Cardiology Clinics* 30 (3). Elsevier Inc: 317–29. doi:10.1016/j.ccl.2012.05.004.
- Pabst, R, and RB Sterzel. 1983. "Cell Renewal of Glomerular Cell Types in Normal Rats. An Autoradiographic Analysis." *Kidney International* 24 (5). Elsevier Masson SAS: 626–31.
- Page, EW, and R Christianson. 1976. "The Impact of Mean Arterial Pressure in the Middle Trimester upon the Outcome of Pregnancy." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 125 (6): 740–46. doi:10.1016/0002-9378(76)90839-5.
- Paller, MS. 1984. "Mechanism of Decreased Pressor Responsiveness to ANG II, NE, and Vasopressin in Pregnant Rats." *The American Journal of Physiology* 247 (1): 100–108.
- Palm, M, L Frankenberg, M Johansson, and E Jalkestén. 1997. "Evaluation of Coagulation Tests in Mouse Plasma." *Comparative Haematology International* 7 (4): 243–46. doi:10.1007/BF02658697.
- Palta, A, and P Dhirman. 2016. "Thrombocytopenia in Pregnancy." *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 36 (2): 146–52. doi:10.3109/01443615.2015.1041893.
- Park, S, TA DiMaio, W Liu, S Wang, CM Sorenson, and N Sheibani. 2013. "Endoglin Regulates the Activation and Quiescence of Endothelium by Participating in Canonical and Non-Canonical TGF-Signaling Pathways." *Journal of Cell Science* 126 (6): 1392–1405. doi:10.1242/jcs.117275.
- Paternoster, DM, A Stella, P Simioni, A Girolami, and D Snijders. 2002. "Activated Protein C Resistance in Normal and Pre-Eclamptic Pregnancies. Gynecol." *Gynecol Obstet Invest* 54: 145–49. doi:10.1159/000067878.
- Penning, ME, KWM Bloemenkamp, T van der Zon, M Zandbergen, JM Schutte, J Bruijn, IM Bajema, and HJ Baelde. 2014. "Association of Preeclampsia with Podocyte Turnover." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 9 (8): 1377–85. doi:10.2215/CJN.12811213.
- Pennington, KA, JM Schlitt, DL Jackson, LC Schulz, and DJ Schust. 2012. "Preeclampsia: Multiple Approaches for a Multifactorial Disease." *Disease Models & Mechanisms* 5 (1): 9–18. doi:10.1242/dmm.008516.
- Peraçoli, MT, FT Menegon, VT Borges, RA de Araújo Costa, IA Thomazini-Santos, and JC Peraçoli. 2008. "Platelet Aggregation and TGF-beta1 Plasma Levels in Pregnant Women

- with Preeclampsia." *Journal of Reproductive Immunology* 79 (1): 79–84. doi:10.1016/j.jri.2008.08.001.
- Pérez-Gómez, E, N Eleno, JM López-Novoa, J Ramón Ramirez, B Velasco, M Letarte, C Bernabéu, and M Quintanilla. 2005. "Characterization of Murine S-Endoglin Isoform and Its Effects on Tumor Development." *Oncogene* 24 (27): 4450–61. doi:10.1038/sj.onc.1208644.
- Perez-Roque, L. 2017. "Papel de La Endoglina Soluble En La Fisiopatología de La Preeclampsia." Universidad de Salamanca.
- Piazzze, J, S Gioia, L Maranghi, and M Anceschi. 2006. "Mean Platelet and Red Blood Cell Volume Measurements to Estimate the Severity of Hypertension in Pregnancy." *Journal of Perinatal Medicine* 34 (3): 246–47. doi:10.1515/JPM.2006.044.
- Piering, WF, JG Garancis, CG Becker, JA Beres, and J Lemann. 1993. "Preeclampsia Related to a Functioning Extrauterine Placenta: Report of a Case and 25-Year Follow-Up." *American Journal of Kidney Diseases* 21 (3). National Kidney Foundation, Inc.: 310–13. doi:10.1016/S0272-6386(12)80751-7.
- Pijnenborg, R, L Vercruyssen, and M Hanssens. 2006. "The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies." *Placenta* 27 (9–10): 939–58. doi:10.1016/j.placenta.2005.12.006.
- Pinheiro, MB, KB Gomes, and LM Dusse. 2013. "Fibrinolytic System in Preeclampsia." *Clinica Chimica Acta* 416. Elsevier B.V.: 67–71. doi:10.1016/j.cca.2012.10.060.
- Pirani, BB, DM Campbell, and I Macgillivray. 1973. "Plasma Volume in Normal First Pregnancy" 80 (October): 884–87. doi:10.1111/j.1471-0528.1973.tb02146.x.
- Podjarny, E, A Mandelbaum, and J Bernheim. 1994. "Does Nitric Oxide Play a Role in Normal Pregnancy and Pregnancy-Induced Hypertension?" *Nephrology Dialysis Transplantation* 9: 1527–29.
- Poli, G, F Biasi, and G Leonarduzzi. 2013. "Oxysterols in the Pathogenesis of Major Chronic Diseases." *Redox Biology* 1. Elsevier: 125–30. doi:10.1016/j.redox.2012.12.001.
- Possomato-Vieira, JS, and RA Khalil. 2016. "Mechanism of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia." *Advances in Pharmacology* 77 (7503): 361–431. doi:https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.04.008.
- Poston, L, AL Briley, PT Seed, FJ Kelly, and AH Shennan. 2006. "Vitamin C and Vitamin E in Pregnant Women at Risk for Pre-Eclampsia (VIP Trial): Randomised Placebo-Controlled Trial." *Lancet* 367 (9517): 1145–54. doi:10.1016/S0140-6736(06)68433-X.
- Powe, CE, RJ Levine, and SA Karumanchi. 2011. "Preeclampsia, a Disease of the Maternal Endothelium: The Role of Antiangiogenic Factors and Implications for Later Cardiovascular Disease." *Circulation* 123 (24): 2856–69. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.853127.

- Pries, AR, TW Secomb, M Sperandio, and P Gaehtgens. 1998. "Blood Flow Resistance during Hemodilution: Effect of Plasma Composition." *Cardiovascular Research* 37 (1): 225–35. doi:10.1016/S0008-6363(97)00226-5.
- Prisco, D, G Ciuti, and M Falciani. 2009. "Hemostatic Changes in Normal Pregnancy." *Hematology Meeting Reports (Formerly Haematologica Reports)* 1 (10): 1–5. doi:10.4081/HMR.V1I10.340.
- Pritchard, JA. 1965. "Changes in the Blood Volume during Pregnany and Delivery." *Anesthesiology* 26: 393–99.
- Pritchard, JA, OD Ratnoff, and R Weisman. 1954. "Hemostatic Defects and Increased Red Cell Destruction in Pre- Eclampsia and Eclampsia." *Obstetric and Gynecology* 4 (2): 159–64.
- Quintanilla, M, E Pe, D Romero, J Ramo, C Bernabe, M Letarte, JM Lo, et al. 2003. "Expression of the TGF-Beta Coreceptor Endoglin in Epidermal Keratinocytes and Its Dual Role in Multistage Mouse Skin Carcinogenesis." *Oncogene* 22 (38): 5976–85. doi:10.1038/sj.onc.1206841.
- Rafikov, R, FV Fonseca, S Kumar, D Pardo, C Darragh, S Elms, D Fulton, and SM Black. 2011. "eNOS Activation and NO Function: Structural Motifs Responsible for the Posttranslational Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity." *Journal of Endocrinology* 210 (3): 271–84. doi:10.1530/JOE-11-0083.
- Rakozci, I, F Tallian, S Bagdany, and I Gati. 1979. "Plateler Life-Span in Normal Pregnancy and Pre-Eclampsia as Determined by a Non-Radioisotope Technique." *Thrombosis Research* 15: 553–56.
- Ramsay, M, FB PlpkInt, and P Rubin. 1992. "Comparative Study of Pressor and Heart Rate Responses to Angiotensin II and Noradrenaline in Pregnant and Non-Pregnant Women." *Clinical Science* 82 (2): 157–62. doi:10.1042/cs0820157.
- Rana, S, WT Schenettler, CE Powe, J Wenger, S Salahuddin, AS Cerdeira, S Verlohren, et al. 2013. "Clinical Characterization and Outcomes of Preeclampsia with Normal Angiogenic Profile." *Hypertens Pregnancy* 32 (2): 189–201. doi:doi:10.3109/10641955.2013.784788.
- Rao, AK, K Daniels, YY El-Sayed, MK Moshesh, and AB Caughey. 2006. "Perinatal Outcomes among Asian American and Pacific Islander Women." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 195 (3): 834–38. doi:10.1016/j.ajog.2006.06.079.
- Rasmussen, PE, and FR Nielsen. 1988. "Hydronephrosis during Pregnancy: A Literature Survey." *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 27 (3): 249–59. doi:10.1016/0028-2243(88)90130-X.
- Rathouska, J, P Fikrova, A Mrkvicova, K Blazickova, M Varejckova, E Dolezelova, I Nemeckova, et al. 2017. "High Soluble Endoglin Levels Do Not Induce Changes in Structural Parameters of Mouse Heart." *Heart and Vessels* 32 (8): 1013–24. doi:10.1007/s00380-017-0976-5.

- Rathouska, J, K Jezkova, I Nemeckova, and P Nachtigal. 2015. "Soluble Endoglin, Hypercholesterolemia and Endothelial Dysfunction." *Atherosclerosis*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.003.
- Redman, CW, J Bonnar, and L Beilin. 1978. "Early Platelet Consumption in Pre-Eclampsia." *British Medical Journal* 1 (61111): 467–69. doi:10.1136/bmj.1.6111.467.
- Redman, CW, and IL Sargent. 2009. "Placental Stress and Pre-Eclampsia: A Revised View." *Placenta* 30 (SUPPLA). IFPA and Elsevier Ltd: 38–42. doi:10.1016/j.placenta.2008.11.021.
- Reese, JA, JD Peck, JJ Mcintosh, SK Vesely, and JN George. 2017. "Platelet Counts in Women with Normal Pregnancies: A Systematic Review." *American Journal of Hematology* 92 (11): 1224–32. doi:10.1002/ajh.24829.
- Remuzzi, G, D Marchesi, C Zoja, D Muratore, G Mecca, R Misiani, E Rossi, et al. 1980. "Reduced Umbilical and Placental Vascular Prostacyclin in Severe Pre-Eclampsia." *Prostaglandins* 20 (1): 105–10. doi:10.1016/0090-6980(80)90010-6.
- Rigol, O. 2004a. "Anemia Y Embarazo." In *Obstetricia Y Ginecología*, primera, 121–26. La Habana: Editorial Ciencias Medicas.
- Rigol, O. 2004b. "Hipertensión Y Embarazo." In *Obstetricia Y Ginecología*, primera, 127–36. La Habana: Editorial Ciencias Medicas.
- Rigol, O. 2004c. "Semiología Obstétrica." In *Obstetricia Y Ginecología*, Primera, 54–72. La Habana: Editorial Ciencias Medicas.
- Rius, C, JD Smith, N Almendro, C Langa, LM Botella, DA Marchuk, CP Vary, and C Bernabeu. 1998. "Cloning of the Promoter Region of Human Endoglin, the Target Gene for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 1." *Blood* 92 (12): 4677–90.
- Roberts, James M, Martin E Edep, Alan Goldfien, and Robert N Taylor. 1992. "Sera From Preeclamptic Women Specifically Activate Human Umbilical Vein Endothelial Cells In Vitro: Morphological and Biochemical Evidence." *American Journal of Reproductive Immunology* 27 (3–4): 101–8. doi:10.1111/j.1600-0897.1992.tb00735.x.
- Roberts, JM, and C Escudero. 2012. "The Placenta in Preeclampsia." *Pregnancy Hypertension* 2 (2): 72–83. doi:10.1016/j.preghy.2012.01.001.
- Roberts, JM, G Pearson, J Cutler, and M Lindheimer. 2003. "Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension during Pregnancy." *Hypertension* 41 (3 1): 437–45. doi:10.1161/01.HYP.0000054981.03589.E9.
- Roberts, JM, and F Von Versen-Hoeynck. 2007. "Maternal Fetal/placental Interactions and Abnormal Pregnancy Outcomes." *Hypertension* 49 (1): 15–16. doi:10.1161/01.HYP.0000251523.44824.02.
- Romero, R, JK Nien, J Espinoza, D Todem, W Fu, H Chung, JP Kusanovic, et al. 2008. "A Longitudinal Study of Angiogenic (Placental Growth Factor) and Anti-Angiogenic (Soluble Endoglin and Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1) Factors

- in Normal Pregnancy and Patients Destined to Develop Preeclampsia and Deliver a Small for." *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 21 (1): 9–23. doi:10.1080/14767050701830480.
- Rossi, E, M Pericacho, C Bachelot-Loza, D Pidard, P Gaussem, S Poirault-Chassac, FJ Blanco, et al. 2017. "Human Endoglin as a Potential New Partner Involved in Platelet-endothelium Interactions." *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing. doi:10.1007/s00018-017-2694-7.
- Rossi, E, F Sanz-Rodriguez, N Eleno, A Düwell, FJ Blanco, C Langa, LM Botella, C Cabañas, JM Lopez-Novoa, and C Bernabeu. 2013. "Endothelial Endoglin Is Involved in Inflammation: Role in Leukocyte Adhesion and Transmigration." *Blood* 121 (2): 403–15. doi:10.1182/blood-2012-06-435347.
- Rossi, E, DM Smadja, E Boscolo, C Langa, MA Arevalo, M Pericacho, L Gamella-Pozuelo, et al. 2016. "Endoglin Regulates Mural Cell Adhesion in the Circulatory System." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 73 (8): 1715–39. doi:10.1007/s00018-015-2099-4.
- Roy, C, C Saussine, C Jahn, Y Le Bras, G Steichen, B Delepaul, M Campos, J Chambron, and D Jacqmin. 1995. "Fast Imaging MR Assessment of Ureterohydronephrosis during Pregnancy." *Magnetic Resonance Imaging* 13 (6): 767–72.
- Ruiz-Llorente, L, E Gallardo-Vara, E Rossi, DM Smadja, LM Botella, and C Bernabeu. 2017. "Endoglin and alk1 as Therapeutic Targets for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21 (10). Taylor & Francis: 933–47. doi:10.1080/14728222.2017.1365839.
- Sachs, N, and A Sonnenberg. 2013. "Cell-matrix Adhesion of Podocytes in Physiology and Disease." *Nature Reviews Nephrology* 9 (4). Nature Publishing Group: 200–210. doi:10.1038/nrneph.2012.291.
- Sadler, JE. 1998. "Biochemistry and Genetics of von Willebrand Factor." *Annual Review of Biochemistry* 67: 395–424.
- Sahai, K, S Saraswathy, TP Yadav, D Arora, and M Krishnan. 2017. "Pre-Eclampsia: Molecular Events to Biomarkers." *Medical Journal Armed Forces India* 73 (2). Director General, Armed Forces Medical Services: 167–74. doi:10.1016/j.mjafi.2016.09.001.
- Sainio, S, R Kekomäki, S Riikonen, and K Teramo. 2000. "Maternal Thrombocytopenia at Term: A Population-Based Study." *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 79 (Dic): 744–49. doi:10.1034/j.1600-0412.2000.079009744.x.
- Saita, E, K Miura, N Suzuki-Sugihara, K Miyata, N Ikemura, R Ohmori, Y Ikegami, Y Kishimoto, K Kondo, and Y Momiyama. 2017. "Plasma Soluble Endoglin Levels Are Inversely Associated With the Severity of Coronary Atherosclerosis—Brief Report Highlights." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37 (1): 49–52. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308494.
- Saito, T, M Bokhove, R Croci, S Zamora-Caballero, L Han, M Letarte, D De Sanctis, and L

- Jovine. 2017. "Structural Basis of the Human Endoglin-BMP9 Interaction: Insights into BMP Signaling and HHT1." *Cell Reports* 19 (9): 1917–28. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.011.
- Salahuddin, S, Y Lee, M Vadnais, BP Sachs, SA Karumanchi, and KH Lim. 2007. "Diagnostic Utility of Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 and Soluble Endoglin in Hypertensive Diseases of Pregnancy." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 197 (28): e21-26.
- Sánchez-Aranguren, LC, CE Prada, CE Riaño-Medina, and M Lopez. 2014. "Endothelial Dysfunction and Preeclampsia: Role of Oxidative Stress." *Frontiers in Physiology* 5 (OCT): 1–11. doi:10.3389/fphys.2014.00372.
- Sánchez-Elsner, T, LM Botella, B Velasco, C Langa, and C Bernabéu. 2002. "Endoglin Expression Is Regulated by Transcriptional Cooperation between the Hypoxia and Transforming Growth Factor- β Pathways." *Journal of Biological Chemistry* 277 (46): 43799–808. doi:10.1074/jbc.M207160200.
- Santibañez, JF, A Letamendia, F Perez-barriocanal, C Silvestri, M Saura, CP Vary, JM Lopez-Novoa, L Attisano, and C Bernabeu. 2007. "Endoglin Increases eNOS Expression by Modulating Smad2 Protein Levels and Smad2-Dependent TGF- β Signaling." *Journal of Cellular Physiology* 210: 456–68. doi:10.1002/jcp.
- Santibañez, JF, M Quintanilla, and C Bernabeu. 2011. "TGF- β /TGF- β Receptor System and Its Role in Physiological and Pathological Conditions." *Clinical Science* 121 (6): 233–51.
- Sasan, SB, F Zandvakili, N Soufizadeh, and E Baybordi. 2009. "Clinical Study The Effects of Vitamin D Supplement on Prevention of Recurrence of Preeclampsia in Pregnant Women with a History of Preeclampsia." *Obstetric and Gynecology International* 2017: 8249264. doi:10.1155/2017/8249264.
- Scholten, RR, FK Lotgering, MT Hopman, A Van Dijk, M Van De Vlugt, MC Janssen, and ME Spaanderman. 2015. "Low Plasma Volume in Normotensive Formerly Preeclamptic Women Predisposes to Hypertension." *Hypertension* 66 (5): 1066–72. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05934.
- Schrey-Petersen, S, and H Stepan. 2017. "Anti-Angiogenesis and Preeclampsia in 2016." *Current Hypertension Reports* 19 (1). Current Hypertension Reports: 6. doi:10.1007/s11906-017-0706-5.
- Schrier, RW, and V Briner. 1991. "Peripheral Arterial Vasodilation Hypothesis of Sodium and Water Retention in Pregnancy: Implications for Pathogenesis of Preeclampsia-Eclampsia." *Obstetrics & Gynecology* 77 (4): 632–39.
- Shaamash, AH, ED Elsnosy, M Makhlof, MM Zakhari, OA Ibrahim, and HM EL-dien. 2000. "Maternal and Fetal Serum Nitric Oxide (NO) Concentrations in Normal Pregnancy, Pre-Eclampsia and Eclampsia." *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 68 (3): 207–14. doi:10.1016/S0020-7292(99)00213-1.

- Sharma, SK, J Philip, CW Whitten, UB Padakandla, and DF Landers. 1999. "Assessment of Changes in Coagulation in Parturients with Preeclampsia Using Thrombelastography.pdf." *Anesthesiology* 90: 385–90. doi:10.1097/00000542-199902000-00009.
- Shattil, SJ, and PJ Newman. 2017. "Integrins: Dynamic Scaffolds for Adhesion and Signaling in Platelets." *Blood* 104 (6): 1606–16. doi:0.1182/blood-2004-04-1257.
- Shen, J, X Ma, F Yi, A Rasul, M Cui, and T Ma. 2013. "Increased Expression Levels of Vitronectin in the Maternal-Fetal Interface of Placenta in Early-Onset Severe Preeclampsia." *Molecular Medicine Reports* 7 (1): 53–58. doi:10.3892/mmr.2012.1141.
- Shovlin, CL. 2010. "Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment." *Blood Reviews* 24 (6). Elsevier: 203–19. doi:10.1016/j.blre.2010.07.001.
- Sibai, BM, and KH Coppage. 2004. "Diagnosis and Management of Women with Stroke during Pregnancy/postpartum." *Clinics in Perinatology* 31 (4): 853–68. doi:10.1016/j.clp.2004.06.003.
- Sibai, BM, G Dekker, and M Kupfermanc. 2005. "Pre-Eclampsia" 365: 785–99. doi:10.1016/S0140-6736(05)17987-2.
- Signore, C, JL Mills, C Qian, KF Yu, S Rana, SA Karamanchi, and RJ Levine. 2008. "Circulating Soluble Endoglin and Placental Abruptio." *Prenatal Diagnosis* 28: 852–58. doi:10.1002/pd.2065.
- Sill, PR, T Lind, and W Walker. 1985. "Platelet Values during Normal Pregnancy." *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 92 (5): 480–83.
- Simon, M, HJ Grone, O Jöhren, J Kullmer, KH Plate, W Risau, and E Fuchs. 1995. "Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Human Renal Ontogenesis and in Adult Kidney." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 268 (2): F240–50.
- Speer, PD, RW Powers, MP Frank, G Harger, N Markovic, and JM Roberts. 2008. "Elevated Asymmetric Dimethylarginine Concentrations Precede Clinical Preeclampsia, but Not Pregnancies with Small-for-Gestational-Age Infants." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 198 (1): 1–7. doi:10.1016/j.ajog.2007.05.052.
- Spiezia, L, G Bogana, E Campello, S Maggiolo, E Pelizzaro, CD Carbonare, MT Gervasi, and P Simioni. 2015. "Whole Blood Thromboelastometry Profiles in Women with Preeclampsia." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 53 (11): 1793–98. doi:10.1515/cclm-2014-1128.
- St-Jacques, S, M Forte, SJ Lye, and M Letarte. 1994. "Localization of Endoglin, a Transforming Growth Factor-Beta Binding Protein, and of CD44 and Integrins in Placenta during the First Trimester of Pregnancy." *Biology of Reproduction* 51 (3): 405–13. doi:10.1095/biolreprod51.3.405.

- Stahls, PF, DJ Lightell, SC Moss, CK Goldman, and TW Cooper. 2014. "Elevated Serum Bone Morphogenetic Protein 4 in Patients with Chronic Kidney Disease and Coronary Artery Disease." *Journal of Cardiovascular Translation Research* 6 (2): 232–38. doi:10.1007/s12265-012-9429-9.Elevated.
- Steinert, JR, AW Wyatt, L Poston, R Jacob, and GE Mann. 2002. "Preeclampsia Is Associated with Altered Ca²⁺ Regulation and Nitric Oxide Production in Human Fetal Venous Endothelial Cells." *The FASEB Journal* 16 (7): 721–23. doi:10.1096/fj.01-0916fje.
- Stirling, Y, L Woolf, WR North, MJ Seghatchian, and TW Meade. 1984. "Haemostasis in Normal Pregnancy." *Thrombosis and Haemostasis* 52 (2): 176–82.
- Sugimoto, H, Y Hamanog, D Charytan, D Cosgrove, M Kieran, A Sudhakar, and R Kalluri. 2003. "Neutralization of Circulating Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by Anti-VEGF Antibodies and Soluble VEGF Receptor 1 (sFlt-1) Induces Proteinuria." *Journal of Biological Chemistry* 278 (15): 12605–8. doi:10.1074/jbc.C300012200.
- Tang, Y, SW Qian, MY Wu, J Wang, P Lu, X Li, HY Huang, et al. 2016. "BMP 4 Mediates the Interplay between Adipogenesis and Angiogenesis during Expansion of Subcutaneous White Adipose Tissue." *Journal of Molecular Cell Biology* 8 (4): 302–12. doi:10.1093/jmcb/mjw019.
- Taylor, RN, CJ de Groot, YK Cho, and KH Lim. 1998. "Circulating Factors as Markers and Mediators of Endothelial Cell Dysfunction in Preeclampsia." *Seminars in Reproductive Endocrinology* 16 (1): 17–31. doi:10.1055/s-2007-1016249.
- Thadhani, R, H Hagmann, W Schaarschmidt, B Roth, T Cingoz, SA Karumanchi, J Wenger, et al. 2016. "Removal of Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 by Dextran Sulfate Apheresis in Preeclampsia." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 27 (3). American Society of Nephrology: 903–13. doi:10.1681/ASN.2015020157.
- Thadhani, R, T Kisner, H Hagmann, V Bossung, S Noack, W Schaarschmidt, A Jank, et al. 2011. "Pilot Study of Extracorporeal Removal of Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 in Preeclampsia." *Circulation* 124 (8): 940–50. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.034793.
- Thadhani, RI, RJ Johnson, and SA Karumanchi. 2005. "Hypertension during Pregnancy: A Disorder Begging for Pathophysiological Support." *Hypertension* 46 (6): 1250–51. doi:10.1161/01.HYP.0000188701.24418.64.
- The American College of Obstetricians and Gynecologists, Task, and Force on Hypertension in Pregnancy. 2013. "Hypertension in Pregnancy." *Obstetrics & Gynecology* 122 (5): 1122–31. doi:10.1016/j.ccl.2012.04.005.
- Thornton, P, and J Douglas. 2010. "Coagulation in Pregnancy." *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* 24 (3). Elsevier Ltd: 339–52. doi:10.1016/j.bpobgyn.2009.11.010.
- Tominaga, T, H Abe, O Ueda, C Goto, N Kuniyoshi, M Taichi, T Matsubara, et al. 2011. "Activation of Bone Morphogenetic Protein 4 Signaling Leads to Glomerulosclerosis

- That Mimics Diabetic Nephropathy." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (22): 20109–16. doi:10.1074/jbc.M110.179382.
- Tomsin, K, T Mesens, G Molenberghs, L Peeters, and W Gyselaers. 2013. "Characteristics of Heart, Arteries, and Veins in Low and High Cardiac Output Preeclampsia." *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 169 (2). Elsevier Ireland Ltd: 218–22. doi:10.1016/j.ejogrb.2013.03.016.
- Tong, S, TJ Kaitu'u-Lino, K Onda, S Beard, R Hastie, NK Binder, L CTuohey, et al. 2015. "Heme Oxygenase-1 Is Not Decreased in Preeclamptic Placenta and Does Not Negatively Regulate Placental Soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1 or Soluble Endoglin Secretion." *Hypertension* 66 (5): 1073–81. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05847.
- Tresguerres, JAF, C Ariznavarreta, V Cachofeiro, D Cardinali, E Escrich, P Gil-Loyzaga, V Lahera, F Mora, M Romano, and J Tamargo. 2010. "Fisiología de La Gestación. Adaptaciones Fisiológicas de La Mujer Embarazada." In *Fisiología Humana*, Cuarta Edi, 1087–90. Mc Graw Hill.
- Trimarchi, H. 2017. "Podocyturia: Potential Applications and Current Limitations." *World Journal of Nephrology* 6 (5): 221–28. doi:10.5527/wjn.v6.i4.168.
- Troisi, R, K Braekke, NK Harsem, M Hyer, RN Hoover, and AC Staff. 2008. "Blood Pressure Augmentation and Maternal Circulating Concentrations of Angiogenic Factors at Delivery in Preeclamptic and Uncomplicated Pregnancies." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 199 (6): 1–10. doi:10.1016/j.ajog.2008.06.030.
- Tseng, WP, SN Yang, CH Lai, and CH Tang. 2010. "Hypoxia Induces BMP-2 Expression via ILK, Akt, mTOR, and HIF-1 Pathways in Osteoblasts." *Journal of Cellular Physiology* 223 (3): 810–18. doi:10.1002/jcp.22104.
- Tual-Chalot, S, KR Allinson, M Fruttiger, and HM Arthur. 2013. "Whole Mount Immunofluorescent Staining of the Neonatal Mouse Retina to Investigate Angiogenesis in Vivo." *Journal of Visualized Experiments*, no. 77: e50546. doi:10.3791/50546.
- Umazume, T, T Yamada, M Morikawa, S Ishikawa, I Furuta, T Koyama, K Matsuno, and H Minakami. 2015. "Platelet Aggregation in Citrated Whole Blood of the First Trimester of Pregnancy." *Clinica Chimica Acta* 448. Elsevier B.V.: 60–64. doi:10.1016/j.cca.2015.06.011.
- Umazume, T, T Yamada, M Morikawa, S Ishikawa, I Furuta, T Koyama, K Matsuno, and H Minakami. 2016. "Platelet Reactivity in Twin Pregnancies." *Thrombosis Research* 138. Elsevier Ltd: 43–48. doi:10.1016/j.thromres.2015.12.019.
- v17.proteinatlas.com. 2017. "Tissue Expression of BMP4 - Summary - The Human Protein Atlas." <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000125378-BMP4/tissue>.
- Valbuena-Diez, AC, FJ Blanco, B Oujo, C Langa, M Gonzalez-Nunez, E Llano, A Pendas, et al. 2012. "Oxysterol-Induced Soluble Endoglin Release and Its Involvement in Hypertension." *Circulation* 126 (22): 2612–24. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.101261.

- Valensise, H, D Lo Presti, G Gagliardi, GM Tiralongo, I Pisani, GP Novelli, and B Vasapollo. 2016. "Persistent Maternal Cardiac Dysfunction after Preeclampsia Identifies Patients at Risk for Recurrent Preeclampsia." *Hypertension* 67 (4): 748–53. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06674.
- Valensise, H, B Vasapollo, G Gagliardi, and GP Novelli. 2008. "Early and Late Preeclampsia: Two Different Maternal Hemodynamic States in the Latent Phase of the Disease." *Hypertension* 52 (5): 873–80. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.117358.
- Varejckova, M, E Gallardo-Vara, M Vicen, B Vitverova, P Fikrova, E Dolezelova, J Rathouska, et al. 2017. "Soluble Endoglin Modulates the pro-Inflammatory Mediators NF- κ B and IL-6 in Cultured Human Endothelial Cells." *Life Sciences* 15 (175): 52–60. doi:10.1016/j.lfs.2017.03.014.
- Vedernikov, Y, GR Saade, and RE Garfield. 1999. "Vascular Reactivity in Preeclampsia." *Seminars in Perinatology* 23 (1): 34–44.
- Venkatesha, S, M Toporsian, C Lam, JI Hanai, T Mammoto, YM Kim, Y Bdolah, et al. 2006. "Soluble Endoglin Contributes to the Pathogenesis of Preeclampsia." *Nature Medicine* 12 (6): 642–49. doi:10.1038/nm1429.
- Vilchez, G, M Lagos, K Kumar, and P Argoti. 2017. "Is Mean Platelet Volume a Better Biomarker in Pre-Eclampsia?" *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 43 (6): 982–90. doi:10.1111/jog.13312.
- von Dadelszen, P, LA Magee, and JM Roberts. 2003. "Subclassification of Preeclampsia." *Hypertension in Pregnancy* 22 (2): 143–48. doi:10.1081/PRG-120021060.
- Wallenburg, HC, and PH van Kessel. 1978. "Platelet Lifespan in Normal Pregnancy as Determined by a Nonradioisotopic Technique." *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 85: 33–36. doi:10.1111/j.1471-0528.1978.tb15821.x.
- Walshe, TE, VS Dole, ASR Maharaj, IS Patten, DD Wagner, and PA D'Amore. 2009. "Inhibition of VEGF or TGF- β Signaling Activates Endothelium and Increases Leukocyte Rolling." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (8): 1185–92. doi:10.1161/ATVBAHA.109.186742.
- Walshe, TE, M Saint-Geniez, ASR Maharaj, E Sekiyama, AE Maldonado, and PA D'Amore. 2009. "TGF- β Is Required for Vascular Barrier Function, Endothelial Survival and Homeostasis of the Adult Microvasculature." *PLoS ONE* 4 (4): 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0005149.
- Wang, J, X Dong, HY Wu, N Wu, XJ Zhang, X Wang, and LX Shang. 2016. "Relationship of Liver X Receptors α and Endoglin Levels in Serum and Placenta with Preeclampsia." *PLoS ONE* 11 (10): 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0163742.
- Wang, Y, Y Gu, DN Granger, JM Roberts, and JS Alexander. 2002. "Endothelial Junctional Protein Redistribution and Increased Monolayer Permeability in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Isolated during Preeclampsia." *American Journal of Obstetrics and*

- Gynecology* 186 (2): 214–20. doi:10.1067/mob.2002.119638.
- Wang, Y, Y Gu, S Loyd, X Jia, and LJ Groome. 2015. "Increased Urinary Levels of Podocyte Glycoproteins, Matrix Metalloproteinases, Inflammatory Cytokines, and Kidney Injury Biomarkers in Women with Preeclampsia." *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 309 (12): F1009-1017. doi:10.1152/ajprenal.00257.2015.
- Welschoff, J, M Matthey, and D Wenzel. 2014. "RGD Peptides Induce Relaxation of Pulmonary Arteries and Airways via β 3-Integrins." *FASEB Journal* 28 (5): 2281–92. doi:10.1096/fj.13-246348.
- Wheeler, AP, and D Gailani. 2016. "The Intrinsic Pathway of Coagulation as a Target for Antithrombotic Therapy." *Hematology/Oncology Clinics of North America* 30 (5): 1099–1114. doi:10.1016/j.hoc.2016.05.007.
- Whitesall, SE, JB Hoff, AP Vollmer, and LG D'Alecy. 2004. "Comparison of Simultaneous Measurement of Mouse Systolic Arterial Blood Pressure by Radiotelemetry and Tail-Cuff Methods." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 286: H2408–15. doi:10.1152/ajpheart.01089.2003.
- Winnier, G, M Blessing, P Labosky, and B Hogan. 1995. "Bone Morphogenetic Protein-4 Is Required for Mesoderm Formation and Patterning in the Mouse." *Genes & Development* 9: 2105–16. doi:10.1101/gad.9.17.2105.
- Wong, WT, XY Tian, Y Chen, FP Leung, L Liu, HK Lee, CF Ng, et al. 2010. "Function Through Oxidative Stress – Dependent Implications on Hypertension." *Circulation Research* 107 (8): 984–91. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.222794.
- Wong, WT, XY Tian, and Y Huang. 2013. "Endothelial Dysfunction in Diabetes and Hypertension: Cross Talk in RAS, BMP4, and ROS-Dependent COX-2-Derived Prostanoids." *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 61 (3): 204–14. doi:10.1097/FJC.0b013e31827fe46e.
- Wozney, JM, V Rosen, AJ Celeste, LM Mitscock, MJ Whitters, RW Kriz, RM Hewick, and EA Wang. 1988. "Novel Regulators of Bone Formation: Molecular Clones and Activities." *Science* 242 (4885): 1528–34.
- Wu, T, QY Ling, C Zhong, TX Wang, LL Wang, XY Wang, and ZL Su. 2015. "Expression of BMP4 in Myocardium and Vascular Tissue of Obese Mice." *Journal of Inflammation (London)* 12: 4–9. doi:10.1186/s12950-015-0047-6.
- Xi, G, B Best, B Mania-Farnell, CD James, and T Tomita. 2017. "Therapeutic Potential for Bone Morphogenetic Protein 4 in Human Malignant Glioma." *Neoplasia* 19 (4). The Authors: 261–70. doi:10.1016/j.neo.2017.01.006.
- Xiao, YT, LX Xiang, and JZ Shao. 2007. "Bone Morphogenetic Protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362 (3): 550–53. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.045.

- Yee Khong, T, IH Sawyer, and AR Heryet. 1992. "An Immunohistologic Study of Endothelialization of Uteroplacental Vessels in Human Pregnancy—Evidence That Endothelium Is Focally Disrupted by Trophoblast in Preeclampsia." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 167 (3): 751–56. doi:10.1016/S0002-9378(11)91583-X.
- Yip, KP, and DJ Marsh. 1997. "An Arg-Gly-Asp Peptide Stimulates Constriction in Rat Afferent Arteriole." *The American Journal of Physiology* 273 (5 Pt 2): F768–776.
- Yokoyama, Y, T Watanabe, and Y Tamura. 2017. "Autocrine BMP-4 Signaling Is a Therapeutic Target in Colorectal Cancer." *Cancer Research* 77 (15): 4026–38. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0112.
- Youn, JY, J Zhou, and H Cai. 2015. "Bone Morphogenetic Protein 4 Mediates NOX1-Dependent eNOS Uncoupling, Endothelial Dysfunction, and COX2 Induction in Type 2 Diabetes Mellitus." *Molecular Endocrinology* 29 (8): 1123–33.
- Zemel, MB, PC Zeme, S Berry, G Norman, C Kowalaczyk, RJ Sokol, PR Standley, MF Walsh, and JR Sowers. 1990. "Altered Platelet Calcium Metabolism as an Early Predictor of Increased Peripheral Vascular Resistance and Preeclampsia in Urban Black Women." *The New England Journal of Medicine* 323 (7): 434–38.
- Zhai, T, I Furuta, R Akaishi, S Ishikawa, M Morikawa, T Yamada, T Koyama, and H Minakami. 2016. "Alteration of Podocyte Phenotype in the Urine of Women with Preeclampsia." *Scientific Reports* 6: 24258. doi:10.1038/srep24258.
- Zhang, Y, Y Gu, H Li, MJ Lucas, and Y Wang. 2003. "Increased Endothelial Monolayer Permeability Is Induced by Serum from Women with Preeclampsia but Not by Serum from Women with Normal Pregnancy or That Are Not Pregnant." *Hypertension in Pregnancy* 22 (1): 99–108. doi:10.1081/PRG-120017008\120017008 [pii].
- Zhao, Y, PM Vanhoutte, and SW Leung. 2015. "Vascular Nitric Oxide: Beyond eNOS." *Journal of Pharmacological Sciences* 129 (2). Elsevier Ltd: 83–94. doi:10.1016/j.jphs.2015.09.002.
- Zhou, CC, RA Irani, Y Zhang, SC Blackwell, T Mi, J Wen, H Shelat, et al. 2010. "Angiotensin Receptor Agonistic Autoantibody-Mediated Tumor Necrosis Factor- α Induction Contributes to Increased Soluble Endoglin Production in Preeclampsia." *Circulation* 121 (3): 436–44. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.902890.
- Zhou, K, X Shi, J Huo, W Liu, D Yang, T Yang, T Qin, and C Wang. 2017. "Bone Morphogenetic Protein 4 Is Overexpressed in and Promotes Migration and Invasion of Drug-Resistant Cancer Cells." *International Journal of Biological Macromolecules* 101 (Supplement C): 427–37. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.064.
- Zhu, Y, Y Sun, L Xie, K Jin, N Sheibani, and DA Greenberg. 2003. "Hypoxic Induction of Endoglin via Mitogen-Activated Protein Kinases in Mouse Brain Microvascular Endothelial Cells." *Stroke* 34 (10): 2483–88. doi:10.1161/01.STR.0000088644.60368.ED.
- Zimmerman, LB, JM De Jesús-Escobar, and RM Harland. 1996. "The Spemann Organizer Signal Noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4." *Cell* 86 (4): 599–

606. doi:10.1016/S0092-8674(00)80133-6.

Zou, MS, J Yu, JH Zhou, GM Nie, DS Ding, LM Luo, HT Xu, and WS He. 2010. "1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ Ameliorates Podocytopenia in Rats with Adriamycin-Induced Nephropathy." *Internal Medicine* 49 (5): 2677–86. doi:10.2169/internalmedicine.49.4174.