

Universidad del Bío-Bío
Facultad de Ciencias
Departamento de Ciencias Básicas



Regulación de la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular por el $A_{2A}AR$
de adenosina

Jesenia Acurio Jacome

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas

Profesor Guía Dr. Carlos Escudero O.

CHILLAN 2015

A mis padres, por inculcar en mi este deseo infinito de superación

A mis hijos, por ser mi universo y mi inspiración cada día

Agradecimientos

A la Universidad del Bío-Bío, Programa de Postgrado y Dirección de Investigación por el apoyo otorgado durante esta etapa de formación.

A la Dra. Marcela Vidal, Directora del Magister en Ciencias Biológicas, por su confianza, empatía y apoyo constante.

Al Dr. Carlos Escudero, Jefe del Laboratorio de Fisiología Vascul ar, por su continua labor en guiar cada uno de los pasos en este proceso.

A los proyectos Fondecyt Regular 1140586, Fondecy p EQM140104, DIUBB GI153109/EF y GI 152920/EF, por el financiamiento brindado para la realización de la presente tesis.

A los miembros del Laboratorio de Fisiología Vascul ar, por su ayuda incondicional en la realización de los experimentos y por sus valiosos aportes en la discusión de resultados.

A mi familia por ser siempre el motor que me impulsa cada día, por su inmenso amor y confianza.

A Carlos mi esposo, amigo, compañero y confidente por todos estos años de paciencia y apoyo incondicional.

Índice

Resumen	1
Introducción	3
Marco Teórico	
Células endoteliales	6
Angiogénesis	7
Adenosina como regulador pleiotrópico	10
Receptores de adenosina	11
A ₁ AR	11
A _{2A} AR	12
A _{2B} AR	13
A ₃ AR	13
Expresión de receptores de adenosina y angiogénesis	13
Los receptores de adenosina y vías intracelulares durante la angiogénesis	16
Vía A _{2A} -NO-VEGF en células endoteliales humanas	16
Pre-eclampsia	21
Angiogénesis en la placenta de embarazos pre-eclámpticos	23
Alteraciones de la vía A _{2A} -NO-VEGF en pre-eclampsia	24
Hipótesis	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
Materiales y Métodos	27

Selección de pacientes y muestras	28
Uso de agonistas/antagonistas de receptores de adenosina	30
Cultivo de células endoteliales microvasculares de placenta humana (hPMEC)	31
Cultivo de células endoteliales de la vena umbilical Humana (HUVEC)	32
Cultivo de línea célula endotelial	32
Proliferación celular	32
Inmunocitoquímica	33
Extracción de RNA y transcripción reversa	34
PCR no cuantitativo	34
Cuantificación de AMP cíclico	34
Niveles de nitritos y nitratos	35
Cuantificación de tubos	35
RNA de interferencia para receptor de adenosina A_{2A} (shRNA- A_{2A})	36
Sobreexpresión del receptor de adenosina A_{2A}	36
Obtención de fracciones nuclear y citoplasmática	37
Células expuestas a hipoxia	38
Análisis estadístico	38
Resultados	
Pacientes	40
Caracterización de la vía A_{2A} -NO en HUVEC	40

Efecto del shRNA A _{2A} en la proliferación de HUVEC	
pre-eclámpticas	42
Ensayos de ganancia y pérdida del A _{2A} y niveles de mRNA para VEGF en HUVEC	42
Vía A _{2A} -NO-VEGF en endotelio de la microcirculación placentaria	44
Translocación nuclear de HIF-1 α inducido por CGS-21680	44
Discusión	45
Grupos de estudio y modelos experimentales	46
Adenosina durante el embarazo normal y pre-eclámptico	49
Adenosina y embarazo normal	49
Adenosina y pre-eclampsia	52
Receptores de adenosina en la pre-eclampsia	53
Vía A _{2A} -NO-VEGF en células normales y pre-eclámpticas	55
Referencias	61
Tablas	
Receptores de Adenosina	73
Secuencia de los partidores utilizados	74
Características clínicas de las pacientes incluidas	75
Factores que influyen en el proceso de angiogénesis	76
Figuras	
Vasos sanguíneos y función de células endoteliales	78
Proceso de angiogénesis y la importancia de factores	

proangiogénicos	79
Regulación del nivel extracelular de adenosina	80
La inhibición de NO revierte la expresión de VEGF mediada por A _{2A}	81
La expresión de VEGF inducida por la vía de señalización A _{2A} -NO puede involucrar a HIF	82
A _{2A} regula la expresión de VEGF en pre-eclampsia	83
A _{2A} y NO estimulan la proliferación celular	84
Caracterización de RNA de interferencia para el A _{2A} AR	85
Formación de tubos en presencia de RNA de interferencia para el receptor de adenosina A _{2A}	86
Proliferación celular en embarazos normales y pre-eclámpicos	87
Efecto de la ausencia del receptor A _{2A} AR sobre los niveles de VEGF	88
Caracterización de sobreexpresión del A _{2A} AR	89
Ensayos de ganancia y pérdida de A _{2A} y expresión de VEGF en hipoxia	90
Caracterización de la vía A _{2A} -NO-VEGF en células de la microcirculación de embarazos normales y pre-eclámpicos	91
Fraccionamiento celular y translocación nuclear de HIF-1 α	92
La expresión de VEGF inducida por la vía de señalización A _{2A} -NO puede involucrar a HIF-1 α	94

Anexos

Consentimiento Informado	96
Abreviaturas	98

Resumen

Antecedentes: Estudios farmacológicos sugieren que la activación del receptor de adenosina A_{2A} ($A_{2A}AR$) vía generación de óxido nítrico (NO) aumenta la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) provenientes de embarazos normales o con pre-eclampsia. Por otro lado, el factor inducido por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) regula la expresión de VEGF y además es sensible a cambios en los niveles de NO intracelular.

Objetivos: Comprobar si la presencia funcional del $A_{2A}AR$ es necesaria para regular expresión de VEGF en células provenientes de embarazos normales y pre-eclámpicos; e, investigar si el aumento de la expresión de VEGF mediada por $A_{2A}AR$ involucra la participación de HIF-1 α .

Metodología: Cultivos primarios de HUVEC, así como de células endoteliales de la microcirculación placentaria (hPMEC) de embarazos normales (n=10) y pre-eclámpicos (n=8) fueron utilizados en este estudio. Además, en experimentos puntuales de hipoxia (i.e., 2% oxígeno, como modelo de pre-eclampsia) se utilizó una línea celular de HUVEC. Las células fueron incubadas (12 o 24 h) con el agonista selectivo del $A_{2A}AR$, CGS-21680 ($10^{-8}M$) en ensayos de pérdida y ganancia de la expresión funcional del $A_{2A}AR$, para posteriormente medir los niveles de mRNA de VEGF por PCR semicuantitativo, proliferación celular y ensayos de angiogénesis en matrigel. En experimentos paralelos, el donador de óxido nítrico, SNAP ($10^{-9}M$) fue co-incubado con CGS-21680 en ensayos de represión de la expresión de $A_{2A}AR$. Estudios de translocación de HIF-1 α fueron realizados en células expuestas a CGS-21680, utilizando histona 3 como marcador de extracción nuclear.

Resultados: La estimulación con CGS-21680 (24 h) aumenta la proliferación celular en forma dosis respuesta ($LogEC_{50}$ $10^{-9.6}$ M), la cual fue inhibida por su antagonista selectivo SCH-58261. Además, similar a CGS-21680, SNAP aumentó la proliferación celular en forma dosis respuesta ($LogEC_{50}$ $10^{-9.2}$ M). Posteriormente, HUVEC expuestas a un RNA de interferencia (siRNA) para $A_{2A}AR$, mostraron una reducción en el nivel de mRNA (~94%) y de proteína (~83%) para $A_{2A}AR$ respecto a la condición control sin siRNA; lo cual se asoció a una significativa reducción en la respuesta a CGS-21680, estimada por los niveles de AMP cíclico intracelular (AMPc), y nitritos, (i.e., metabolitos NO), así como por una reducida capacidad de formación de tubos en matrigel, sin afectar la sobrevivencia celular. En estas condiciones experimentales, se encontró que el donador de NO, SNAP, recuperó parcialmente la proliferación celular y la capacidad de formación de tubos de las células provenientes de embarazos normales expuestas a siRNA para $A_{2A}AR$. En otra serie de experimentos se encontró que CGS-21680 incrementó significativamente (~1.5 veces) el nivel de mRNA para VEGF en células de embarazos normales, pero no así, en HUVEC de pre-eclampsia. Adicionalmente, en comparación con células no transfectadas, la transfección con

siRNA para A_{2A}AR generó una disminución (~30%) del nivel de mRNA para VEGF en embarazo normal y preeclampsia, un efecto que fue revertido mediante la co-incubación con SNAP, únicamente en células de embarazos normales.

Por otro lado, en una línea celular de HUVEC en la cual se realizaron ensayos de ganancia y pérdida de expresión del A_{2A}AR mediante la utilización del vector CVM-flag A_{2A} y del siRNA A_{2A}, respectivamente; se encontró que CGS-21680 no fue capaz de aumentar significativamente los niveles de mRNA para VEGF tanto en condición normoxia como hipoxia. Sin embargo, la represión del A_{2A}AR redujo significativamente (~32%) los niveles de mRNA para VEGF en condición normoxia; no así en hipoxia, en donde hubo una reducción parcial del 18% en relación al control. Paradójicamente, la sobre-expresión del A_{2A}AR también redujo el nivel de VEGF tanto en normoxia (~62%, p<0.05) como en hipoxia (~56%, p=NS).

Además, se mostró la presencia de la vía A_{2A}-NO-VEGF en hPMEC de embarazos normales y pre-eclámpicos. Así, en estas células, CGS-21680 aumentó la proliferación celular en forma dosis respuestas mostrando una logEC₅₀ de 10^{-8.7} M. CGS-21680 (10⁻⁸ M x 12 h) aumentó el nivel de proteína VEGF tanto en células de embarazos normales (~1.5 veces) como pre-eclámpicas (~1.2 veces). Este aumento, fue bloqueado por el antagonista del A_{2A}AR, ZM-241385 (10⁻⁵ M) y por el inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME, en células de ambas condiciones estudiadas. Adicionalmente, ZM-241385 o L-NAME, en forma independiente, redujeron (40 y 80%, respectivamente) la abundancia de proteína VEGF en células de embarazos normales. Por su parte en pre-eclampsia, también se evidenció una reducción con estas dos moléculas alcanzando ~50 y ~15% de reducción, respectivamente, en relación a la condición basal sin tratamiento.

Finalmente, los estudios de translocación mostraron que CGS-21680 indujo un aumento significativo en el nivel de proteína HIF-1α en la fase nuclear en células de embarazos normales, pero no en aquellas provenientes de pre-eclampsia.

Conclusiones: La presencia de A_{2A}AR es necesaria para inducir la expresión de VEGF, por una vía que involucraría óxido nítrico y translocación del HIF-1α al núcleo. La vía A_{2A}-NO-VEGF estaría presente en forma transversal en endotelio de la micro y la macrocirculación ya sea de embarazos normales o pre-eclámpicos. Sin embargo, en HUVEC de pre-eclampsia, es posible que la señalización vía NO esté alterada. La sobre-expresión de A_{2A}AR desencadena un efecto compensatorio de limitación de la expresión de VEGF.

Palabras clave: Adenosina, A_{2A}AR, angiogénesis, pre-eclampsia, óxido nítrico, VEGF

I. Introducción

El endotelio está formado por una monocapa de células que recubre el interior de los vasos sanguíneos, capilares y linfáticos y que cumple múltiples funciones tales como: vasodilatación, vasoconstricción, angiogénesis, fluidez sanguínea, coagulación, intercambio de nutrientes, desarrollo de órganos, remodelamiento vascular, entre otras (Deanfield, Donald et al. 2005). Estas células tienen un alto grado de especialización según el tejido en el cual se encuentren. Así por ejemplo, múltiples evidencias han mostrado que el endotelio presente en vasos de pequeño calibre (microcirculación) tiene características funcionales distintas a aquellas presentes en vasos de mediano o gran calibre (macrocirculación)(Lyll and Greer 1996; Dye, Lawrence et al. 2004; Sobrevia, Abarzua et al. 2011). Sin perjuicio de ello, también es claro que estas células guardan ciertas similitudes funcionales, que en caso necesario les permitirán responder al unísono.

Por otro lado, adenosina, un nucleósido que proviene del metabolismo del ATP, el cual es capaz de señalizar al interior celular, a través de la estimulación de una familia de proteínas de membrana conocidas como receptores de adenosina (AR); cuyos miembros son A_1AR , $A_{2A}AR$, $A_{2B}AR$, y A_3AR (Fredholm, AP et al. 2001). La señalización intracelular que emiten estos receptores es de interés, debido a la importancia que cumple adenosina en procesos tales como: control del tono vascular, inhibición de la agregación plaquetaria, reducción de moléculas pro-inflamatorias, regulación de la conducción eléctrica cardíaca, control del proceso de angiogénesis entre muchas otras (Jacobson and Gao 2006).

Precisamente, es de interés para esta tesis, estudiar la vía de señalización intracelular de adenosina a través de la estimulación del A_{2A}AR y la importancia de su activación en procesos tales como aumento en la síntesis de factores pro angiogénicos tales como el factor de crecimiento endotelial (VEGF). En este contexto, estudios previos han caracterizado farmacológicamente la interacción entre A_{2A}AR, generación de óxido nítrico (NO) y VEGF en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), loo cual ha sido definida como la vía A_{2A}-NO-VEGF (Escudero, Bertoglia et al. 2013). Los mecanismos por los cuales el NO generado por activación de A_{2A} pueden controlar la expresión de VEGF, son menos conocidos. Sin embargo, estudios moleculares indican que A_{2A}AR aumenta la actividad transcripcional del promotor de VEGF, y en particular un segmento asociado a la regulación por el factor inducido por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) (Feoktistov, Goldstein et al. 2002). Por otro lado, otro grupo de evidencias señalan que la translocación nuclear de HIF-1 α , a su vez puede ser controlado por NO (Riano, Ortiz-Masia et al. 2011). Así, es posible que HIF-1 α sea una proteína intermediaria asociada a la vía A_{2A}-NO-VEGF.

Por otro lado, en pre-eclampsia, una condición caracterizada por disfunción de las células endoteliales (Maynard and Karumanchi 2011); se ha mostrado elevación de los niveles extracelulares de adenosina cuyas causas y efectos son poco conocidas (Spaans, Vos et al. 2014). Estudios anteriores han mostrado que las HUVEC provenientes de embarazos pre-eclámpticos que ocurren posterior a las 35 semanas de gestación (o conocida como pre-eclampsia de inicio tardío) muestran un aumento basal de la vía A_{2A}-NO-VEGF, caracterizada por elevación en la síntesis de NO así como en

la abundancia de la proteína VEGF asociada a activación basal de $A_{2A}AR$ (Escudero, Bertoglia et al. 2013).

En esta tesis se busca confirmar la regulación de la expresión de VEGF mediada por $A_{2A}AR$ como un mecanismo de regulación transversal en células endoteliales de la micro y macrocirculación de embarazos normales y pre-eclámpicos. Así como también, investigar si la translocación nuclear HIF-1 α estaría asociado con el control de la expresión de VEGF mediado por $A_{2A}AR$ en células de embarazos normales y pre-eclámpicos.

II. Marco Teórico

II.1. Células endoteliales

Las células endoteliales limitan la superficie interna de los vasos sanguíneos y linfáticos, además de jugar un importante rol en el desarrollo y el remodelamiento vascular, en la mantención del tono vascular, fluidez sanguínea, coagulación, intercambio de nutrientes y el desarrollo de los órganos (Chi, Chang et al. 2003). El endotelio es también responsable de la generación de nuevos vasos a través del proceso de angiogénesis (Shibuya 2006; Escudero, Puebla et al. 2009). Todas estas funciones del endotelio están asociadas con la habilidad de sintetizar y liberar moléculas vasodilatadoras como óxido nítrico (NO), prostaglandina I₂ (prostaciclina), o adenosina (Moncada and Higgs 1993; Casanello, Escudero et al. 2007), así como vasoconstrictores tales como endotelina y angiotensina (Walters and Boura 1991; Ajne, Ahlborg et al. 2005) (ver Figura 1).

El endotelio derivado de la microcirculación difiere en relación al endotelio derivado de macrocirculación (Chi, Chang et al. 2003). Por ejemplo, en términos de la capacidad de síntesis de NO se conoce que las células de la microcirculación placentaria humana (hPMEC) generan menor cantidad de NO que el endotelio macrovascular de vena umbilical humana HUVEC (Dye, Lawrence et al. 2004). En el campo de la angiogénesis mediada por receptores de adenosina, las células de la microcirculación sintetizan una mayor cantidad de VEGF posterior a la activación de dichos receptores, en particular del A_{2B}AR, que aquellas de la macrocirculación (Feoktistov, Goldstein et al. 2002). Además, a diferencia de las células de la

macrocirculación, aquellas provenientes de la microcirculación son más sensibles a la estimulación con VEGF (Bartoli, Platt et al. 2003). Pese a estas importantes diferencias, es también necesario resaltar que las células endoteliales de cualquier tejido tienen también funciones comunes. En el caso particular, en cultivo mantienen capacidad de formación de estructuras tubulares en matrigel, sugiriendo la presencia de mecanismos de regulación conservados en estas células independiente de su origen. En esta tesis, se busca caracterizar la presencia de la vía A_{2A} -NO-VEGF en células de la micro y macrocirculación.

II.2. Angiogénesis.

La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forma un nuevo vaso sanguíneo a partir de otros preexistentes (Shibuya 2006). El endotelio participa en la angiogénesis a través de varios procesos, que incluyen la proliferación celular / migración, la formación de tubos; así como la síntesis y liberación de factores pro-angiogénicos, tales como VEGF (Shibuya 2013) y factores anti-angiogénico incluyendo el receptor soluble de VEGF (sFlt-1) (George et al., 2010).

La angiogénesis es un proceso ontológicamente diferente de la vasculogénesis, la que a su vez constituye la formación de vasos sanguíneos *de novo*. La angiogénesis es un proceso complejo impulsado por señales endoteliales y dependiente de tejido; en el que al menos tres etapas secuenciales pueden ser identificados: 1) quiescencia, 2) activación y 3) resolución (Carmeliet and Jain 2011). Estos procesos han sido resumidos por el grupo del Prof. Peter Carmeliet (Carmeliet and Jain 2011), quienes describieron que durante la *quiescencia*, las células endoteliales están en reposo y tienen una larga vida media. Además, durante esta etapa, las células endoteliales están

protegidas contra procesos que alteran su funcionalidad, gracias a la acción autocrina de varias señales de mantenimiento entre las cuales se encuentra VEGF, angiopoyetina-1 (ANG-1), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la vía de señalización dependiente de Notch. Así como también, durante esta etapa el endotelio recibe señales paracrinas de los pericitos (tipo de célula que cubre los vasos sanguíneos maduros), los cuales liberan señales de sobrevida y de inhibición de la proliferación celular a través del VEGF o ANG-1 (Carmeliet and Jain 2011). Entonces, en un adulto sano, las células endoteliales exhiben una monocapa no proliferativa con larga vida media y cubierta de pericitos.

Una vez que las señales proangiogénicas liberadas por el tejido (que incluyen el VEGF, ANG-2, FGF, quimiocinas, mediadores inflamatorios y tumorales) son percibidas por las células endoteliales, se inicia la segunda etapa o de *activación* de la angiogénesis. En esta segunda etapa, los pericitos se separan de la pared vascular y se liberan de la membrana basal la cual es a su vez degradada por enzimas proteolíticas. Luego, las células endoteliales se desacoplan de sus uniones, lo cual es acompañado por vasodilatación, llevando a un aumento de la permeabilidad vascular y la extravasación proteica. Por lo tanto, los exudados de proteína forman una matriz extracelular (ECM) que constituye un andamio provisional que sirve como plataforma para la migración de células endoteliales y la formación de nuevos vasos (Carmeliet and Jain 2011).

Para construir, además, un nuevo vaso sanguíneo y evitar la migración endotelial en una forma caótica, se requiere un proceso por el cual algunas células endoteliales, conocidas como las "células punta", son seleccionadas para dirigir la

migración celular en presencia de señales proangiogénicas, mientras que las células vecinas asumen posiciones subsidiarias que forman las "células del tallo". La especialización en células punta y del tallo no es un proceso aleatorio, las células se seleccionan de acuerdo a la expresión de VEGF y sus receptores (VEGFR), en la que el VEGFR tipo 2 (VEGFR2) está presente principalmente en "células punta", mientras VEGFR1 están en "células del tallo" (Suchting, Freitas et al. 2007). Además, las células punta están equipadas con filopodios para detectar las señales de orientación del medio ambiente tales como efrinas y semaforinas, mientras las células del tallo liberan moléculas tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGFL7) en la matriz extracelular para entregar información sobre la posición a células vecinas, lo cual a su vez sirve para la posterior elongación del vaso sanguíneo (Carmeliet and Jain 2011; Carmeliet and Ruiz de Almodovar 2013). Con el fin de establecer un puente anastomótico entre el vaso que se está formando y otro distante, otros tipos celulares deben entrar en acción. Así, se conoce la participación de células mieloides, fibroblastos, y los mismos pericitos, los cuales permiten establecer una comunicación funcional y estable entre vasos vecinos (ver figura 2).

El paso final en este proceso incluye la formación de los vasos funcionales convirtiéndose en un tubo estable en el que el flujo de sangre pasa en forma permanente, luego de lo cual las células endoteliales tienen que volver al estado de reposo y ser cubiertas de pericitos, proceso que se conoce como *resolución*. Este proceso también es un fenómeno activo en el cual se requieren varias señales, incluyendo: el factor de crecimiento derivado de las plaquetas B (PDGF-B), ANG-1, factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), ephrin-B2 y la vía de señalización de

Notch, entre las principales (Carmeliet and Jain 2011). Los inhibidores de proteasa también participan permitiendo la estabilización de la membrana basal, lo cual además contribuye para que las células endoteliales permanezcan juntas a través de uniones estrechas evitando así la extravasación de plasma y asegurar el flujo sanguíneo óptimo en el tejido adyacente (Carmeliet and Jain 2011) (ver Figura 2).

II. 3. Adenosina como regulador pleiotrópico

La adenosina es un nucleósido purínico derivado del metabolismo del adenosin trifosfato (ATP), difosfato (ADP) o monofosfato (AMP) (Desai, Victor-Vega et al. 2005) o por hidrólisis de la S-adenosin-homocisteína (Broch and Ueland 1980). Los niveles extracelulares de adenosina son finamente controlados por una serie de mecanismos fisiológicos que incluye enzimas que sintetizan o degradan esta molécula, así como transportadores equilibrativos o concentrativos (ver Figura 3).

Adenosina es una molécula pleiotrópica que interviene en el control del tono vascular, inhibición de la agregación plaquetaria y de monocitos, reducción de moléculas pro-inflamatorias, control del proceso de angiogénesis, regulación de la conducción eléctrica cardíaca y la función de bomba del corazón; a nivel del sistema nervioso central es la molécula encargada de la inducción del sueño, está asociada al control de los movimientos involuntarios, participa en el control de adiciones entre otras múltiples funciones en el organismo humano (Olah and Stiles 2000; Chen, Eltzhig et al. 2013) Todas estas funciones las cumple a través de la activación de receptores de membrana conocidos como receptores de adenosina (AR). En la siguiente sección analizaremos en detalle estas proteínas.

II. 4. Receptores de adenosina

La adenosina ejerce sus efectos biológicos mediante la activación de receptores de membrana (Olah and Stiles 2000). A la fecha se ha identificado cuatro tipos de receptores de adenosina: A₁AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR, A₃AR, (Tabla 1) (Fredholm, Irenius et al. 2001; Schulte and Fredholm 2003). Los receptores A₁ y A₃ se encuentran acoplados a proteínas G_{i/o} cuya activación disminuye el cAMP intracelular, mientras que los receptores A₂, acoplados a proteínas G_s, aumentan los niveles intracelulares de este segundo mensajero (Sexl, Mancusi et al. 1997; Thilakarathna, Rupasinghe et al. 2013). Los efectos fisiológicos de la activación de este grupo de receptores se traducen principalmente en mecanismos moleculares involucrados en la regulación del tono vascular (Wyatt, Steinert et al. 2002), angiogénesis (Feoktistov, Goldstein et al. 2002; Feoktistov, Ryzhov et al. 2004), proliferación (Grant, Davis et al. 2001), permeabilidad endotelial, inflamación (Olah and Stiles 2000), protección celular al daño inducido por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Headrick, Ashton et al. 2013), entre otros.

II.4.1 A₁AR.

El gen que codifica para el receptor de adenosina A₁ ha sido localizado en el cromosoma 1q32.1 (Chen, Eltzhig et al. 2013), cuyo transcrito es un polipéptido con un peso molecular de ~34 kDa. El A₁AR es el subtipo del receptor de adenosina más conservado entre las especies (Fredholm, Irenius et al. 2001) y es expresada ampliamente en todo el cuerpo, es así como podemos encontrar en nervios, corazón, tejido del riñón y tejido adiposo. Sin embargo, los niveles más altos de este receptor se

encuentran en el cerebro, especialmente en las terminaciones nerviosas excitatorias (Daly and Padgett 1992).

II.4.2 A_{2A}AR

El gen que codifica para el receptor de adenosina A_{2A} ha sido localizado en el cromosoma 22q11.23 (MacCollin, Peterfreund et al. 1994). Los receptores de adenosina A_{2A} presentan un peso molecular de ~45 kDa (409 aminoácidos) y comparten homología del 45% con el A_{2B}AR (Olah and Stiles 2000). El dominio intracelular en el A_{2A}AR, a diferencia de los otros receptores, forma una prolongación de 122 aminoácidos que puede interactuar con otras proteínas intracelulares (Gsandtner, Charalambous et al. 2005) dependientes (Schulte and Fredholm 2003) e independientes de cAMP (Gsandtner, Charalambous et al. 2005). Dentro de las proteínas más estudiadas están la protein kinasa A (PKA) y proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK) (específicamente ERK1/2) (Sobrevia and Mann 1997; Wyatt, Steinert et al. 2002). Se ha informado que la activación de A_{2A}AR aumenta la síntesis de NO a través de la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) (Escudero, Bertoglia et al. 2013) lo cual a su vez es dependiente de activación de ERK1/2 (Wyatt, Steinert et al. 2002) y transporte de L-arginina mediado por el sistema y⁺ en HUVEC (Sobrevia and Mann 1997). Precisamente la presente tesis busca abordar esta vía de activación de la síntesis de NO por A_{2A}AR, como un mecanismo necesario en el control de la expresión de la proteína proangiogénica VEGF.

II.4.3 A_{2B}AR

El gen que codifica A_{2B}AR ha sido localizado en el cromosoma 17p12-11.2 (Jacobson, Johnson et al. 1995), el cual codifica una proteína con un peso molecular calculado de 36-37 kDa (Feoktistov and Biaggioni 1997). Este receptor, al igual que el A_{2A}AR está presente prácticamente en todas las células y por tanto ampliamente distribuido en el organismo; sin embargo, su nivel de expresión es muy bajo comparado con la expresión del A_{2A}AR (Feoktistov and Biaggioni 1997).

II.4.4 A₃AR.

El gen que codifica para el receptor de adenosina A₃ ha sido localizado en el cromosoma 1p13.2, cuya proteína tiene un peso molecular de ~43 kDa. Hay una variación considerable en la farmacología, distribución y por lo tanto función de los receptores A₃ entre las especies. A pesar del bajo nivel de expresión del A₃AR en la mayoría de células y tejidos, su expresión es autorregulada en las células de sangre de pacientes con patologías como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn (Ochaion, Bar-Yehuda et al. 2009) y cáncer de colon (Gessi, Cattabriga et al. 2004).

II.5. Expresión de receptores de adenosina y angiogénesis

Básicamente, todos los receptores de adenosina han sido implicados en la modulación de la angiogénesis (ver Escudero, Roberts et al. 2014). Brevemente, la estimulación de A₁AR en células progenitoras endoteliales (EPCs) embrionarias

promueve su adherencia al endotelio vascular, lo que sugiere un papel importante para este subtipo de receptor en la vasculogénesis (Ryzhov, Solenkova et al. 2008). También se ha informado que A₁AR aumenta la expresión de VEGF en monocitos lo cual promueve la angiogénesis (Clark, Youkey et al. 2007).

Por otro lado, dependiendo del tejido o célula estudiada, A_{2A}AR y A_{2B}AR pueden desempeñar un papel dominante en la regulación de factores angiogénicos. Por ejemplo, el A_{2B}AR incrementa la expresión de factores proangiogénicos incluyendo, VEGF, bFGF, factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), e interleucina 8 (IL-8) en células endoteliales microvasculares humanas (Grant, Tarnuzzer et al. 1999; Feoktistov, Goldstein et al. 2002). Mientras que el A_{2A}AR aumenta la expresión de VEGF en los macrófagos y células endoteliales (Leibovich, Chen et al. 2002; Pinhal-Enfield, Ramanathan et al. 2003). Además, se ha mostrado también que la estimulación de A_{2A}AR en una línea celular de endotelio microvascular (HMEC-1) es capaz de inhibir la liberación del factor antiangiogénico como trombospondina 1, proporcionando otro mecanismo por el cual adenosina pudiera regular positivamente el proceso de angiogénesis (Desai, Victor-Vega et al. 2005). Por otro lado, la estimulación de A₃AR en mastocitos y en algunos tumores puede resultar también en la regulación positiva de factores pro-angiogénicos como una vía complementaria a la acción del A_{2B}AR (Feoktistov, Ryzhov et al. 2003).

Además, se ha mostrado la expresión funcional de A_{2A} AR y A_{2B}AR en distintos tipos de células endoteliales, los cuales han sido asociados con aumento de la proliferación celular en endotelio de retina (Grant, Tarnuzzer et al. 1999; Grant, Davis et al. 2001), HUVEC (Feoktistov, Ryzhov et al. 2004; Escudero, Bertoglia et al. 2013), o

células arteriales coronarias de porcinos y endoteliales de aorta de rata (Dubey, Gillespie et al. 2002). Sin embargo, no queda claro si A₁AR y A₃AR se expresan funcionalmente en endotelio, debido a que se han reportado resultados contradictorios (Wyatt, Steinert et al. 2002; Schaddelee, Voorwinden et al. 2003).

II.5.1 Los receptores de adenosina y vías intracelulares durante la angiogénesis

Aunque algunos datos sugieren que el AMPc puede jugar un papel en los efectos pro-angiogénicos de la adenosina en ciertas células (Takagi, King et al. 1996), otros estudios muestran que la regulación positiva de factores angiogénicos está mediada a través del acoplamiento a Gq, posiblemente con la participación de MAPK (Grant, Tarnuzzer et al. 1999; Grant, Davis et al. 2001; Feoktistov, Goldstein et al. 2002; Ryzhov, Biktasova et al. 2014).

Un reciente estudio (Ryzhov, Biktasova et al. 2014) utilizando HMEC-1, demostró que el aumento de la expresión de VEGF mediada por activación del A_{2B}AR se asocia con un aumento en la actividad transcripcional del promotor de VEGF involucrando la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor transcripción JunB (JunB). Otro estudio en HUVEC, informó que la activación de ERK mediada por adenosina puede implicar la siguiente cascada de señalización: proteína Gα_s-activación de la adenilil ciclasa-aumento de cAMP intracelular-activación de Epac 1-RapGTPase, B-Raf, y finalmente ERK (Fang and Olah 2007), lo que ejemplifica lo complejo de la señalización de este receptor en el control de la expresión de proteínas pro-angiogénicas.

Además de estas vías señaladas, se ha mostrado también que la activación de receptores A_{2A}AR y/o A_{2B}AR en células endoteliales activarían ERK y p38 MAPK, lo

cual llevaría a activación del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) y síntesis de óxido nítrico (NO) (Escudero, Roberts et al. 2014). Así por ejemplo, usando macrófagos cargados de colesterol (foam cells) generadas *in vitro*, Gessi y sus colaboradores (Gessi, Fogli et al. 2010) encontraron que la activación de A₃AR, A_{2B}AR, y en menor medida de A_{2A}AR, se asoció con un aumento en la producción de VEGF inducida por adenosina e hipoxia. Este último efecto fue dependiente de la activación de ERK, p38 MAPK, Akt y HIF-1 α .

Además, varios reportes sugieren que adenosina puede aumentar la síntesis del modulador angiogénico óxido nítrico (NO) en cultivos de células endoteliales (Sobrevia, Nadal et al. 1996; Li, Fenton et al. 1998; 2002; Wyatt, Steinert et al. 2002). En la siguiente sección profundizaremos esta vía de interés para la presente tesis.

II.6. Vía A_{2A}-NO-VEGF en células endoteliales humanas

El rol pro-angiogénico del A_{2A}AR se debe en parte a una inducción en la síntesis y liberación de NO y VEGF desde las células endoteliales. En este sentido, estudios iniciales de Takagi y colaboradores (Takagi, King et al. 1996) utilizando células endoteliales retinales de bovinos mostraron que la estimulación de los receptores A₂ (A_{2A}AR y A_{2B}AR) se asoció con un aumento (2 veces) en la cantidad de mRNA para VEGF luego de 4.5 horas de incubación con agonistas como DPMA, NECA o CGS-21680. En estudios paralelos mostraron también que el aumento de mRNA para VEGF evidenciado en células expuestas a hipoxia fue significativamente reducido en células incubadas con un inhibidor selectivo del A_{2A}AR. Con estos resultados los autores

concluyen que el A_{2A}AR en estas células era capaz de regular la expresión de uno de los factores más importantes en el proceso de angiogénesis como el VEGF.

Posteriormente, Feoktistov y colaboradores (Feoktistov, Goldstein et al. 2002) utilizando dos líneas diferentes de células endoteliales, HUVEC y HMEC-1 (esta última de microcirculación), encontraron que las HUVEC expresan preferencialmente el A_{2A}AR, en contraposición con la preponderancia del A_{2B}AR en HMEC-1. Esta diferencia de expresión, según los autores tiene un interés funcional, ya que serían las células microvasculares las que evidencian una respuesta muy marcada en la elevación de la expresión de factores pro-angiogénicos, incluido VEGF. Así, mientras las células HMEC-1 aumentan en al menos 4 veces, las HUVEC únicamente alcanzan cerca de 1.5 veces de aumento en el nivel de mRNA para VEGF posterior a la incubación con el agonista no selectivo para AR, NECA, por 6 horas. Con estos resultados, los autores además caracterizaron que el aumento en mRNA y de proteína VEGF posterior a la incubación con NECA, y que fue asociado a activación del A_{2B}AR en HMEC-1, se relacionó con un aumento en la actividad transcripcional del promotor de este factor de crecimiento, y más específicamente de la actividad del elemento de respuesta para hipoxia HIF-1 α , presente en dicho promotor (Feoktistov, Ryzhov et al. 2004). Por otro lado, este mismo grupo ha mostrado que HUVEC expuestas a hipoxia (4.6% oxígeno), presentan un aumento en la expresión del A_{2B}AR (Feoktistov, Ryzhov et al. 2004). En estas condiciones, y no en normoxia (21% oxígeno), los autores reportan que NECA, fue capaz de inducir la expresión de VEGF. En conjunto estos resultados sugieren que la expresión de VEGF inducida por NECA estaría asociada a la activación del A_{2B}AR en células endoteliales.

También en HUVEC cultivadas en normoxia (21% oxígeno), nuestro grupo ha mostrado que la activación del A_{2A}AR (Escudero, Bertoglia et al. 2013) y del A_{2B}AR (Acurio 2014) se asocia a un aumento en la abundancia de VEGF. Así, inicialmente encontramos que CGS-21680 aumentó aproximadamente 1.7 veces el nivel de proteína VEGF en comparación con la condición control, lo cual fue bloqueado cuando las células fueron co-incubadas con el antagonista selectivo para el A_{2A}AR, ZM-241385 (Escudero, Bertoglia et al. 2013). En forma similar, NECA indujo un aumento en la cantidad de VEGF, que fue revertido parcialmente con el inhibidor del A_{2B}AR, MRS-1754. Por consiguiente estos resultados sugieren que bajo nuestras condiciones experimentales, ambos receptores estarían participando en la expresión de VEGF. Estos resultados difieren parcialmente de lo reportado por Feoktistov y colaboradores 2003 y/o 2004, en donde atribuyen un rol preponderante a la expresión de A_{2B}AR en el control de la síntesis de VEGF; sin embargo, hay que enfatizar que las células que utilizamos en nuestros experimentos son cultivos primarios a diferencia de la línea celular utilizada por el grupo de Feoktistov. Otra reflexión importante de estos hallazgos es el hecho de que hipoxia, una condición presente en la placenta pre-ecláptica (ver más abajo), parece ser una condición que incrementa el rol de los receptores de adenosina, en particular A_{2B}AR, sobre el control de la expresión de VEGF. Por ello, el modelo de hipoxia, será también utilizado en la presente tesis.

Además, otros datos obtenidos en el laboratorio han dado indicios de la vía de regulación que controlaría la expresión de VEGF en HUVEC. Así, la estimulación del A_{2A}AR con CGS-21680 llevó a un aumento en la fosforilación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en la serina 1177 (i.e., indicador de activación de esta enzima), con

el consecuente aumento en los niveles de nitritos (i.e., metabolitos finales de óxido nítrico, NO) y de nitrotirosina (producto de la reacción entre NO y residuos tirosina); más aún, como se muestra en la Figura 4, el aumento en los niveles de mRNA y de proteína VEGF inducido por CGS-21680 fue revertido en células co-incubadas con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS), L-NAME. Así, estos resultados sugieren que la estimulación de A_{2A} AR, vía NO, controlaría la expresión de VEGF. En forma paralela se encontró también que el efecto estimulador de NECA sobre la expresión de VEGF en HUVEC, fue parcialmente bloqueado por L-NAME, y completamente abolido en células co-incubados con MRS-1754 y L-NAME en forma simultánea (Acurio 2014), sugiriendo la presencia de una vía dependiente y otra independiente de la síntesis de NO en el aumento de VEGF mediado por el A_{2B} AR.

Considerando todos estos resultados, es posible sugerir que la estimulación del A_{2A} AR y/o A_{2B} , utilizando vías dependientes e independientes de NO, estarían regulando la expresión de VEGF. Si bien, estos resultados farmacológicos permitieron sugerir un mecanismo, son necesarios más estudios moleculares que permitan discernir de mejor forma los procesos regulatorios involucrados en este fenómeno. Precisamente, esta tesis, pretende abordar esta problemática, y confirmar la presencia de la vía A_{2A} -NO-VEGF.

Sin perjuicio de lo anterior, se conoce también que el receptor de adenosina A_{2A} AR, es capaz de activar otras ruta metabólicas como ERK-MAPK-HIF-1 α (Schieke, Briviba et al. 1999), lo cual podría regular también la expresión de VEGF, o ser inclusive una misma vía metabólica vista en momentos distintos. Por otro lado, no está claro tampoco cuál sería el mecanismo, por el que NO podría estar regulando la

expresión de VEGF. Una hipótesis abordada en esta tesis apunta a la participación de HIF-1 α y la consecuente unión al promotor de VEGF como un potencial blanco a estudiar.

II.7. HIF-1 α como regulador de la expresión de VEGF: rol de la vía A_{2A}-NO

El HIF 1, está constituido por dos subunidades, la alfa (α) y la beta (β). El HIF-1 β , es constitutivo, mientras que el HIF-1 α es modulable en forma oxígeno dependiente. Así, en condiciones de normoxia, es hidroxilado en los residuos de prolina 564 y 402 vía proliil-hidroxilasas. Posteriormente es reconocido por la proteína de von Hippel-Lindau (VHL) la cual a su vez es señal para formar un complejo de ubiquitilación, que es indicativa de degradación por proteosomas (Safran and Kaelin 2003). Adicionalmente, se reconoce una tercera hidroxilación en el residuo asparagina 803 que impide su acoplamiento a proteínas nucleares involucradas en la transcripción de genes regulados por HIF (Lando, Peet et al. 2002) . Sin embargo, en condiciones de hipoxia, las hidroxilasas dejan de modificar al HIF-1 α y este se acopla al HIF-1 β para ser traslocado al núcleo donde funciona como factor de transcripción (Safran and Kaelin 2003; Emerling, Plataniias et al. 2005). Al momento existen varias publicaciones demostrando una incrementada concentración de HIF durante el proceso de placentación normal y patológica (Caniggia, Mostachfi et al. 2000).

Por otro lado, el efecto pro-angiogénico de NO se asocia con la reducción de la actividad del promotor de factores anti-angiogénicos (como, trombospondina 2) (MacLauchlan, Yu et al. 2011), o aumento en la actividad del promotor de factores pro-angiogénicos (como, VEGF) (Kimura, Ogura et al. 2002; Feoktistov, Ryzhov et al.

2004). En particular, se ha mostrado que el aumento de la actividad del promotor de VEGF mediada por NO, requiere de la presencia de HIF-1 α (Kimura, Ogura et al. 2002). De hecho, se ha informado de que tanto el sitio de unión a HIF-1 α y la secuencia de HIF-auxiliares situados en -975 a -956 pb río arriba del codón inicial en el promotor de VEGF son necesarios para la expresión de VEGF mediada por la estimulación NO (Kimura, Weisz et al. 2000). Además, tanto el efecto pro-angiogénica de NO (Kimura, Weisz et al. 2000; MacLauchlan, Yu et al. 2011) como su efecto estimulador sobre la actividad del promotor de VEGF (Kimura, Weisz et al. 2000) son independientes de la activación de la vía canónica a través de guanosín monofosfato cíclico (cGMP).

Adicionalmente, se ha descrito que NO puede modificar residuos tirosina (fenómeno conocido como nitración) presente en prácticamente todas las proteínas, incluyendo por supuesto HIF (Riano, Ortiz-Masia et al. 2011). Sin embargo, en el caso de HIF-1 α no se conoce qué impacto podría tener la reacción entre NO y residuos tirosina sobre la modulación de la expresión de genes blanco, como VEGF. Por lo dicho, es posible suponer que la expresión de VEGF inducida por la A_{2A}AR podría involucrar nitración de residuos tirosina en HIF-1 α (ver Figura 5).

II.8. Pre-eclampsia

La pre-eclampsia ha sido definida como un síndrome caracterizado por la aparición de hipertensión y proteinuria después de 20 semanas de gestación (Roberts, Taylor et al. 1989). La pre-eclampsia puede ser subdividida de acuerdo a la severidad del cuadro patológico como pre-eclampsia moderada (presión arterial $\geq 140/90$ mmHg, proteinuria ≥ 300 mg/24 hrs) o pre-eclampsia severa (presión arterial $\geq 160/110$ mmHg,

proteinuria ≥ 5 g/24 hrs) (Roberts, Bodnar et al. 2005; Duley, Meher et al. 2006; Habli, Levine et al. 2007). En general, si el diagnóstico de pre-eclampsia en base a los parámetros clínicos y bioquímicos es tardío (>35 semanas de gestación) se asocia a una pre-eclampsia moderada (LOPE), mientras que cuando el diagnóstico surge antes de las 34 semanas de gestación se asocia con pre-eclampsia severa (EOPE) (Duley, Meher et al. 2006; Villar, Carroli et al. 2006).

Pre-eclampsia es la mayor causa de morbi-mortalidad materna e infantil a nivel mundial (Xiong, Demianczuk et al. 2002; Duley 2009). Así por ejemplo, la muerte fetal es más común en embarazos con pre-eclampsia y un tercio de niños que nacen de embarazos con pre-eclampsia padecen de restricción de crecimiento. Por otra parte, pre-eclampsia es responsable del 8% de los nacimientos prematuros, lo cual también contribuye a una mayor tasa de morbilidad y mortalidad neonatal (Sibai, Dekker et al. 2005; Villar, Carroli et al. 2006).

La fisiopatología de la pre-eclampsia sugiere que el deterioro en la invasión de las células trofoblásticas en el lecho vascular materno conduce a una falta en la transformación de las arterias espirales presentes en el endometrio materno en grandes vasos de capacitancia (Burton, Charnock-Jones et al. 2009; Burton, Woods et al. 2009). Esto reduce el flujo de sangre materna a la placenta, genera una isquemia relativa y un aumento en la velocidad de la sangre al entrar en el espacio intervelloso, con el consecuente aumento del estrés de fricción que lesiona el trofoblasto en las vellosidades placentarias (Burton, Woods et al. 2009), lo cual a su vez conduce a daño celular, desprendimiento, y la liberación de fragmentos de células en la circulación materna (Tannetta, Dragovic et al. 2013). Estos fragmentos contienen elementos que

pueden perjudicar la función endotelial materna y feto-placentaria generando un círculo vicioso que afecta crónicamente la función endotelial en la tríada madre-placenta-feto.

Entre moléculas liberadas de la placenta pre-ecláptica que compromete la función endotelial materna se encuentra el receptor soluble del VEGF o sFlt-1. Este factor soluble tiene el potencial para atenuar las respuestas pro-angiogénicas mediadas por VEGF, e interesantemente, está aumentado en la sangre de mujeres antes de y durante el apareamiento de la sintomatología clínica de pre-eclampsia. Al momento docenas de publicaciones a nivel mundial, incluyendo Chile, muestran que una elevación de sFlt-1 podría ser utilizado como herramienta pronóstica de pre-eclampsia (Romero, Nien et al. 2008; Powers, Jeyabalan et al. 2010).

11.8.1 Angiogénesis en la placenta de embarazos pre-eclápticos

Las evidencias disponibles sobre marcadores de formación y función de vasos sanguíneos en la placenta de embarazos pre-eclápticos es contradictoria (Mayhew, Ohadike et al. 2003; Mayhew, Wijesekara et al. 2004; Escudero and Sobrevia 2008). Por ejemplo, en un estudio en el que las pacientes fueron agrupadas según la edad gestacional de diagnóstico en aquellas que cursaban con embarazos pre-eclápticos de inicio temprano (<34 semanas, EOPE) o de inicio tardío (> 34 semanas, LOPE), se encontró que en LOPE la formación de vasos sanguíneos en la placenta está mínimamente comprometida comparado con sus respectivos controles pareados por edad gestacional (Egbor, Ansari et al. 2006). Estos autores también muestran que EOPE estuvo asociada con una reducción significativa en el peso placentario, así como el volumen, superficie y área cubierta de vasos sanguíneos en las vellosidades

terminales de la placenta sobre todo en aquellos casos en los que la pre-eclampsia severa cursaba además con retardo de crecimiento intrauterino (RCIU). Estos autores muestran también que en el grupo de pre-eclampsia de inicio temprano que cursaba con RCIU, al menos 60% de los niños, mostró además alteración en el flujo sanguíneo placentario. En contraposición a lo encontrado por este último grupo, estudios en el laboratorio (Escudero, Celis et al. 2014) han mostrado un aumento en el número de vasos sanguíneos por vellosidad coriónica, en particular en la microcirculación placentaria, en LOPE o EOPE.

En este escenario, estudio previos muestran que la expresión (Akerca, Cirpan et al. 2008; Groten, Gebhard et al. 2010; Moyes, Maldonado-Perez et al. 2011; Andraweera, Dekker et al. 2012; Kim, Park et al. 2012) y/o acción de VEGF (Ahmad, Hewett et al. 2011; Escudero, Celis et al. 2014) estaría alterada en placentas de embarazos pre-eclámpicos, mostrando nuevamente resultados contradictorios en ese tema.

Pese a esta controversia, se ha sugerido que en la pre-eclampsia existiría una alteración de la angiogénesis (Escudero, Puebla et al. 2009; Escudero, Celis et al. 2014) y probablemente de la neovasculogénesis feto-placentaria (Kwon, Maeng et al. 2007; Xia, Zhou et al. 2007; Monga, Buck et al. 2012), lo cual a su vez sería el resultado de la disfunción endotelial generado por el desequilibrio de factores pro y anti-angiogénicos (Escudero, Roberts et al. 2014).

II.8.2 Alteraciones de la vía A_{2A} -NO-VEGF en pre-eclampsia.

La expresión de A_{2A}AR en pre-eclampsia ha mostrado estar elevada en placenta total (von Versen-Hoynck, Rajakumar et al. 2009) con una localización preponderante en los vasos sanguíneos. Sin embargo, en células en cultivo, se ha mostrado una reducida expresión en células endoteliales de la microcirculación placentaria (hPMEC) (Escudero, Casanello et al. 2008) o HUVEC (Salsoso, Guzman-Gutierrez et al. 2015). En estas últimas células, nuestro grupo ha mostrado una expresión diferencial del A_{2A}AR según la edad gestacional de presentación de pre-eclampsia. Así, mientras en las HUVEC provenientes de LOPE el nivel de A_{2A}AR no estaría afectado, en aquellas células provenientes de embarazos con EOPE estaría significativamente reducido (Escudero, Bertoglia et al. 2013).

En cuanto a la síntesis de NO mediado por el A_{2A}AR en pre-eclampsia, la información es escasa. Inicialmente, nuestro grupo mostró que la activación basal (i.e., en ausencia de agonistas) de A_{2A}AR en HUVEC provenientes de LOPE llevaría a un aumento en la actividad de eNOS (i.e., fosforilación en serina 1177), mayor síntesis de NO y de nitrotirosina, asociado a aumento en la abundancia de la VEGF. Por otro lado, en HUVEC de EOPE, existiría una reducción en esta vía metabólica caracterizado por disminución de la expresión de A_{2A}AR; así como de la actividad de eNOS, de la síntesis de NO y de nitrotirosina, asociado a reducción en el nivel de VEGF. Pese a estas diferencias, los resultados muestran que en presencia del inhibidor selectivo para A_{2A}AR, ZM-241385, las células de embarazos normales o provenientes de LOPE o EOPE responden reduciendo significativamente la abundancia de VEGF (ver Figura 6), con lo cual se sugiere que este receptor participaría en la regulación de VEGF en HUVEC ya sea normales o de pre-eclampsia.

Concomitante con estos hallazgos, Salsoso y colaboradores (Salsoso, Guzman-Gutierrez et al. 2015), mostraron que HUVEC provenientes de LOPE presentan un aumento en el transporte de L-arginina (i.e., sustrato para la síntesis de NO) y de la activación de eNOS, así como una reducida respuesta vasodilatadora de insulina en anillos de vena umbilical, lo cual fue revertido en presencia ZM-241385. Estos hallazgos confirman por un lado que la activación de $A_{2A}AR$ se asocia a mayor síntesis de NO, y por otro, que LOPE mostraría una actividad aumentada de la síntesis de NO mediado por $A_{2A}AR$.

En resumen, la evidencia mostrada hasta el momento sugiere que $A_{2A}AR$ vía generación de NO controlaría la expresión de VEGF en HUVEC de embarazos normales. Que esta vía metabólica estaría alterada en pre-eclampsia según la condición clínica de la enfermedad, así mientras en LOPE habría un aumento basal de la misma, en EOPE estaría reducida. Sin embargo, quedan varias preguntas por resolver. En primera instancia, dado la controversia existente en el tema, son necesarios estudios moleculares más directos, es decir de ganancia y pérdida de función por ejemplo, en los cuales se pueda confirmar la presencia y funcionalidad de la vía A_{2A} -NO-VEGF tanto en células de embarazos normales como pre-eclámpicos. Parte de esta confirmación también debería considerar distintos modelos celulares, ya sea de micro o microcirculación, ya que las células endoteliales de la microcirculación son más reactivas a las señales pro-angiogénicas. Por otro lado, es necesario ahondar en el mecanismo mediante el cual NO proveniente de la activación de $A_{2A}AR$, controlaría la expresión de VEGF. En particular, que efecto tendría A_{2A} -NO en la

translocación nuclear de HIF y la actividad transcripcional del mismo en el promotor de VEGF (ver Figura 5).

Hipótesis

En células endoteliales de embarazos normales y pre-eclámpticos el receptor A_{2A} de adenosina aumenta la expresión del factor de crecimiento endotelial.

Objetivo general

Comprobar si la presencia funcional del receptor A_{2A} de adenosina es necesaria para regular la expresión del factor de crecimiento endotelial en células provenientes de embarazos normales y pre-eclámpticos.

Objetivos específicos

Los siguientes objetivos serán realizados en células endoteliales de la circulación feto-placentaria de embarazos normales y pre-eclámpticos

1. Determinar el rol pro-angiogénico de $A_{2A}AR$ mediante ensayos de ganancia o pérdida de expresión en células endoteliales.
2. Comprobar la regulación de VEGF por $A_{2A}AR$ mediante ensayos de ganancia o pérdida de expresión de $A_{2A}AR$ en células endoteliales.
3. Indagar si la regulación de VEGF por el receptor de adenosina $A_{2A}AR$ involucra óxido nítrico y translocación al núcleo del factor inducido por hipoxia.

III. Materiales y Métodos

III.1 Selección de pacientes y muestras

Este estudio incluye embarazadas que asistieron para atención del parto al Hospital Clínico Herminda Martín de la ciudad de Chillán (HCHM). Todas las mujeres incluidas en el estudio fueron voluntarias, mayores de edad, y dieron su consentimiento para la participación de este estudio (ver carta de consentimiento en el Anexo 1).

Se utilizaron los siguientes criterios de inclusión:

Embarazo normal

- Atención del parto en el HCHM.
- Voluntaria.
- Embarazos con feto único.
- Parto normal o por cesárea electiva.
- Presión arterial <140/90 mmHg.
- Sin antecedentes personales de enfermedad cardiovascular o endocrina.
- Sin antecedentes de utilización de medicamentos tales como antibióticos o antiinflamatorios (AINES).
- Sin complicaciones obstétricas como diabetes gestacional, ruptura prematura de membranas, placenta previa o atípica.
- Sin cuadros de infección al momento del parto.
- Sin antecedentes de consumo de alcohol, drogas o fumadoras crónicas.
- Sin evidencias clínicas en los fetos de alteraciones neurológicas, malformaciones congénitas o retardo de crecimiento intrauterino.

Embarazo pre-eclámpsico

- Atención del parto en el HCHM.
- Voluntaria
- Embarazos con feto único.
- Parto normal o por cesárea electiva.
- Sin antecedentes personales de enfermedad cardiovascular o endocrina.
- Sin antecedentes de utilización de medicamentos tales como antibióticos o antiinflamatorios (AINES).
- Sin complicaciones obstétricas como diabetes gestacional, ruptura prematura de membranas, placenta previa o atípica.
- Sin cuadros de infección al momento del parto.

- Sin antecedentes de consumo de alcohol, drogas o fumadoras crónicas.
- Sin evidencias clínicas en los fetos de alteraciones neurológicas, malformaciones congénitas.
- Diagnóstico de pre-eclampsia (Presión arterial $\geq 140/90$ mmHg y Proteinuria ≥ 300 mg/24 horas) posterior a las 35 semanas de gestación.

Las placentas y sus respectivos cordones fueron recolectadas luego del nacimiento bajo condiciones de asepsia por personal calificado en el Servicio de Ginecología del HCHM. Las muestras fueron seleccionadas en concordancia con el manejo clínico aprobado en el HCHM y con criterios diagnósticos establecidos (Sibai, Dekker et al. 2005; Duley, Meher et al. 2006). Las placentas y cordones fueron trasladados en condiciones estériles y manteniendo la cadena de frío hasta el Laboratorio de Fisiología Vascular, en el Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad del Bío Bío.

Para el cálculo muestral se utilizó la fórmula de comparación de las medias (Fernandez 1996) para determinar el número de mujeres a ser incluidas por grupo, utilizando la variación en el nivel de adenosina en plasma de sangre extraída de vena umbilical humana encontrado en embarazos pre-eclámpicos (Espinoza, Espinoza et al. 2011) (Espinoza et al., 2012).

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot S^2}{d^2}$$

donde:

n = sujetos de estudio

$Z\alpha$ = valor de Z correspondiente al riesgo deseado para test unilateral (1.645)

$Z\beta$ = valor de Z correspondiente al poder estadístico del 90% (1.2820)

S^2 = varianza del grupo control (0.27)

d^2 = valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (0.86)

así,

$$n = \frac{2(1.645 + 1.2820)^2 \cdot 0.27^2}{0.86^2}$$

De esta manera, se debe incluir al menos 6 muestras por grupo de embarazos normales y pre-eclámpticos por análisis para determinar diferencias en relación a los distintos tratamientos.

III.2 Uso de agonistas/antagonistas de receptores de adenosina

Para la activación de $A_{2A}AR$ se utilizó el agonista específico CGS-21680 (2-(p-(2-carbonil-etil)-feniletilamino)-50-N-etilcarboxamidoadenosina) a una concentración máxima de 10^{-8} M ($K_d \sim 10$ nM)(Ahmad, Ahmad et al. 2009). Para inhibir los receptores de adenosina $A_{2A}AR$ se utilizaron los antagonistas específicos ZM-241385 (4-(2-(7-amino-2-(2-furil)-(1,2,4)triazolo(2,3-a){1,3,5}triazin-5-il-amino)etil)fenol) a una concentración final de 10^{-5} M (K_i aparente ~ 1.4 nM)(Desai, Victor-Vega et al. 2005) y SCH-58261 7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-(4,3-e)-1,2,4-triazolo(1,5-c)pyrimidina a una concentración final de 10^{-14} M (Dionisotti, Ongini et al. 1997) . Se utilizó el éster N ω -nitro-arginina metil éster (L-NAME), como antagonista de la síntesis de óxido nítrico, a una concentración de 10^{-5} M (K_i aparente ~ 3.1 μ M) (Rees, Palmer et al. 1990).

III.3 Cultivo de células endoteliales microvasculares de placenta humana (hPMEC)

Para aislar hPMEC se utilizó la metodología previamente descrita por (Escudero and Sobrevia 2008). En breve, luego de eliminar la lámina superficial de ~0.5 cm de espesor de la cara materna de la placenta, se tomó muestras (~1 cm³) correspondientes a las vellosidades coriónicas para luego ser lavadas en solución buffer fosfato (PBS (mM): NaCl 13.7, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 0.9, KH₂PO₄ 1.8, pH 7.4, 4°C). Estas muestras fueron cortadas en solución de Hanks libre de Ca⁺² y Mg⁺² (HSS (mM): NaCl 136.9, KCl 5.4, Na₂HPO₄ 0.3, KH₂PO₄ 0.4, D-glucosa 5.6, NaHCO₃ 4.2, pH 7.4, 4°C) conteniendo gentamicina (100 µg/ml). Las muestras fueron expuestas a digestión enzimática con tripsina/EDTA (0.25/0.2%) por 20 minutos y colagenasa (0.1 mg/ml) en medio 199 (M199) a 37°C por 2 horas. El producto de la digestión fue filtrado a través de una malla Nylon (poro 55 µm) y la suspensión celular correspondiente al filtrado fue resuspendida en M199 conteniendo 40% de suero bovino fetal (SBF) y sembradas en placas de cultivo de 25 cm² de superficie (T₂₅) previamente tratadas con gelatina al 1% hasta alcanzar confluencia celular 100%.

Una vez en monocapa las células fueron tripsinizadas (tripsina/EDTA = 0.25/0.2%, 2-4 min, 37°C) y la suspensión fue sometida a inmunoselección positiva utilizando microesferas magnéticas recubiertas con el anticuerpo *anti-CD31*, el cual reconoce PCAM-1 (platelet endotelial cell adhesión molecule 1)(Dynal, Noruega), en una proporción 48 x10³ esferas/µl suspensión celular (20 min, 4°C). Las células fueron cultivadas en condiciones estándar para este tipo celular (5% O₂, 37°C), como ha sido

publicado para HUVEC (Casanello, Torres et al. 2005; Farias, San Martín et al. 2006). Los experimentos fueron realizados en cultivos celulares en pasaje 3 previa incubación en medio de cultivo primario (PCM) con 2% SBF por un período de 12 horas.

III.4 Cultivo de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC)

Las células endoteliales se aislaron a partir la vena umbilical humana por digestión con colagenasa (0,25 mg / ml) después se cultivaron (37°C, 5% CO₂) en medio 199 (M199) suplementado con sueros fetal y de recién nacido como se describe anteriormente (Casanello, Torres et al. 2005). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado, después de la privación de suero durante la noche.

III.5 Cultivo de línea célula endotelial

Línea celular de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)(C-003-5C, Invitrogen, USA) se descongelaron según indicaciones del fabricante y se cultivaron en condiciones de 37°C, 5% CO₂ en medio 200 (M200) suplementado con Large Vessel Endothelial Supplement (LVES 50X, Invitrogen, USA). Las células descongeladas fueron sembradas en placa petri de 100mm de diámetro, la cual fue previamente tratada con gelatina 1X (Gelatin from bovine skin, Sigma). Las células se cultivaron con 10ml de medio 200 suplementado, por 6 días. Posterior a ello, fueron expandidas a 3 placas de 100 mm de diámetro. Una vez confluentes, se procedió a plaquear según ensayos a realizar. Al igual que las células de cultivo primario, antes de la experimentación se procedió a deprivar de suplemento por toda la noche.

III.6 Proliferación celular

Las células endoteliales extraídas de embarazos normales y pre-eclámpicos, (hPMEC o HUVEC) fueron cultivadas en las condiciones antes descritas. Se procedió a plaquear en placa de 96 pocillos, incluyendo 7×10^3 células en M199 suplementado con 20% suero bovino, las células se mantuvieron en crecimiento a 37°C, 5% CO₂ por 12 horas. Posterior a ello se inició la deprivación de suero en M199, 2% SBF, que incluyó además Adenosine Deaminasa (ADA) en concentración de 0,001 U/ml, y reactivo de marcaje (Kit 5-bromo-2-deoxyuridine BrdU/ ELISA). En este medio, las células fueron incubadas en ausencia o presencia de agonistas o antagonistas durante 24 horas, para finalmente determinar la incorporación del marcaje según indicaciones del fabricante y reportado previamente por Maghni (Maghnie, Genovese et al. 1998).

III.7 Inmunocitoquímica

El análisis inmunocitoquímico fue realizado en HUVEC previamente electroporadas con el vector para sobre expresión del receptor de adenosina A_{2A}AR; o transfectadas con RNA de interferencia para este receptor (shRNA-A_{2A}) (ver metodología abajo), o células control. Posterior a los respectivos tratamientos, las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, para posteriormente ser permeabilizadas con Triton 0.5% en Tris-PBS por 10 minutos (Valdes, Germain et al. 2001). La peroxidación endógena fue bloqueada con la utilización de H₂O₂ al 10% durante 10 minutos y la unión inespecífica del anticuerpo fue prevenida mediante el uso de solución de bloqueo (DakoCytomation, California, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente (rango 22–30°C). Posteriormente, las preparaciones fueron

incubadas con anticuerpo anti-A_{2A}R dilución (1:500, Milipore 05-717, USA). La identificación de dichos anticuerpos fue realizada utilizando un anticuerpo secundario de acuerdo a la especie donde fue diseñado el primario, acoplado al sistema biotina-estreptavidina-peroxidasa (DakoCytomation), utilizando di-amino-bencidina (DAB, Sigma) como sustrato.

III.8 Extracción de RNA y transcripción reversa

El RNA total fue aislado utilizando trizol (Invitrogen, USA). El RNA fue cuantificado por espectrofotometría (A_{260nm}) y su integridad fue evaluada por la relación A_{260nm}/A_{280nm} y visualización en gel de agarosa (2%). Alícuotas de 1 μ g de RNA total fueron utilizadas en la reacción de transcripción reversa usando oligo dT, *random primers* y la enzima MMLV-RT (Moloney Murine Leukaemia Virus-Reverse Transcriptasa, Promega, USA) en un ciclo de transcripción reversa a 37°C (Casanello, Torres et al. 2005; Farias, San Martin et al. 2006).

III.9 PCR no cuantitativo

El nivel de mRNA para A_{2A}AR, VEGF y del control de carga 18S fueron determinados por PCR semicuantitativo (RT-PCR) (Casanello, Torres et al. 2005; Farias, San Martin et al. 2006). Los parámetros de la secuencia de temperaturas utilizadas para la reacción fueron definidos de acuerdo al tamaño del producto esperado y a la temperatura de alineación de los partidores utilizados (ver Tabla 2).

III.10 Cuantificación de AMP cíclico

La cuantificación del nivel de cAMP fue realizada mediante un kit comercialmente disponible (Arbor Assay, USA). El kit se basa en el uso de un anticuerpo policlonal que reconoce cAMP de las muestras o una molécula análoga de cAMP que ha sido covalentemente ligada a fosfatasa alcalina. La reacción de la enzima fue detenida mediante la adición de una solución de tri-sodio fosfato como lo indica el productor. El color generado (amarillo) fue cuantificado a 405 nm. La participación del A_{2A}AR en la formación de cAMP estimulada por CGS-21680 (10⁻⁸ M) fue estimada utilizando RNA de interferencia para este receptor (shRNA-A_{2A}).

III.11 Niveles de nitritos y nitratos

Los niveles de nitritos en medio de cultivo fueron cuantificados mediante un kit comercialmente disponible que utiliza la reacción de Griess (Cayman, Chemical, USA) y como fuera previamente reportado por nuestro grupo (Escudero et al., 2013). En breve, 150 µL de medio de cultivo fue mezclado con el 75 µL de reactivo cada uno de los componentes del reactivo de Griess (N-(1-naftil) etilenediamina, 1% (Componente A) y ácido sulfanilico 1% en ácido fosfórico 5% (Componente B), esta mezcla fue leída a 540 nm (Salh, Wagey et al. 1998).

III.12 Angiogénesis in vitro

HUVEC expuestas o no al RNA de interferencia para el receptor de adenosina A_{2A} (shRNA-A_{2A}) (ver metodología abajo) fueron utilizadas para ensayos de angiogénesis en matrigel. En breve, HUVECs (4 x10⁴) previamente expuestas o no al

shRNA-A_{2A} se cultivaron en una placa de 96 pocillos recubierta con 40 µL Matrigel Sótano Matrix Membrana (Corning, MA, EE.UU.). En estas condiciones las células fueron además estimuladas con CGS-21680 (10⁻⁸M) o el donador de óxido nítrico S-nitroso-N-acetil-penicilamida (SNAP, 10⁻⁹M) e incuban en condiciones estándar (37 °C y 5% CO₂) por 6 horas. Posterior a ello, se cuantificó la longitud del tubo usando el "analizador de angiogénesis" plugin desde el software ImageJ (NIH, USA).

III.13 RNA de interferencia para receptor de adenosina A_{2A} (shRNA- A_{2A})

Las HUVEC provenientes de embarazos normales o pre-eclámpticos fueron cultivadas en las condiciones antes descritas. Para la transfección, se colocó en cada placa de cultivo (60mm) el RNA de interferencia para el A_{2A}AR (0.1 µg/µl) (Santa Cruz Biotechnology, USA) en presencia de medio de transfección de los mismos fabricantes, y luego fueron incubadas por 4 horas. Posterior a ello, se procedió a cambiar el medio de transfección por PCM y se las dejó creciendo por 48 horas en condiciones estándar. Trascurrido ese tiempo se procedió con los ensayos planificados y la incubación de las moléculas respectivas.

III.14 Sobreexpresión del receptor de adenosina A_{2A}

Para la sobreexpresión A_{2A}AR se utilizó el vector pCMV- flag 2B-A_{2A}, que fue una donación del profesor Igor Feoktistov de la Universidad de Vanderbilt. Este vector tiene un peso de 5569 pb, posee el promotor del citomegalovirus (CMV) que le da la característica de replicación rápida una vez que se apodera de la maquinaria celular, como factor de selección tiene resistencia al antibiótico ampicilina, y un sector multicorte

para enzimas de restricción BamHI (715), EcoRI (733), EcoRV(741), HindIII (745), XhoI (2011), PaeI (2036), PaeI (2040). Para introducir la secuencia del gen para el receptor de adenosina A_{2A}AR se realizaron cortes con enzimas BamHI y XhoI, y se procedió a introducir el inserto que tiene un peso 1239 pb correspondiente al marco de lectura abierto para dicho receptor.

Para caracterizar el vector se realizó el proceso de transformación, colocando el DNA en bacterias *Escherichia Coli* 5 α , por 16 horas a 37°C, luego se realizó el proceso de purificación con el kit de extracción Wizard plus minipreps DNA purification system (A 7510, USA). El DNA fue cuantificado por espectrofotometría (A_{260nm}) y su integridad fue evaluada por la relación A_{260nm}/A_{280nm} .

Para introducir este vector purificado a las células, se utilizó varias técnicas de transfección ya sea mediante uso de buffer de transfección o de electroporación. Esta última, fue la técnica más conveniente y se realizó en todos los experimentos de sobre expresión. Para ello, se usó el equipo Neon® System (Invitrogen, USA), en el cual las células fueron sometidas a un pulso de 1350 volts en presencia de una alícuota de 5 μ g de DNA y un número de 10^6 células (HUVEC). Posterior al pulso de electroporación, las HUVEC se dejaron crecer por 48 horas bajo condiciones estándar y posteriormente fueron usadas para experimentación.

III.15 Obtención de fracciones nuclear y citoplasmática

Para extraer las fracciones nucleares y citoplasmáticas a partir de un cultivo celular se utilizó el protocolo previamente descrito (Roislien, Skare et al. 2009) modificado a pequeña escala. Se utilizaron células crecidas en placas de 100 mm; una

vez que éstas llegaron a un estado confluyente se retiró el medio y se lavaron dos veces con 2 mL de PBS. Las células fueron resuspendidas en 1,5 mL de PBS y centrifugadas a 5400 rpm durante 6 min a 4° C. Se retiró el sobrenadante y se agregó de 10-20 µl de buffer A (Hepes 20 mM pH: 7,9, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,5 mM, 20mM NEM). La mezcla se pasó 15 veces por una jeringa de 1 mL (aguja de 25 gauge). El lisado fue centrifugado por 2 minutos a 14000 rpm a 4°C. El sobrenadante, correspondiente a la fracción citoplasmática, se transfirió a un tubo nuevo y se guardó a -20° C. Los restos celulares se resuspendieron en 20 µL de buffer C (Hepes 20 mM pH: 7,9, NaCl 0,42 M, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, glicerol 25% v/v, DTT 0,5 mM, PMSF 0,5 mM, 20mM NEM). La mezcla se pasó 3 veces por la punta de una micropipeta de 1 mL y se dejó agitando a 4° C durante 20 min. Posteriormente, los restos celulares se centrifugaron a 14000 rpm por 20 min a 4° C y el sobrenadante, correspondiente a la fracción nuclear, se traspasó a un tubo nuevo para ser guardado a -20° C hasta su utilización.

III.16 Células expuestas a hipoxia

Las células de línea celular de HUVEC cultivadas en condiciones estándares fueron previamente tratadas con shRNA-A_{2A} o electroporadas con vector A_{2A} (ver metodología arriba), posterior a ello, las células fueron plaqueadas en frascos de cultivo (25 mm), y deprivadas durante toda la noche, seguidamente se colocaron las moléculas respectivas para la experimentación, posterior a ello las células fueron colocadas en cámara de hipoxia (ProOX model 110 BioSpherix, USA), en condiciones 2% oxígeno, y a 37 °C como se describe en (Casanello, Krause et al. 2009), por 24

horas para luego ser extraídas según metodología descrita. En paralelo, células cultivadas en condiciones estándares a 21% oxígeno fueron utilizadas como control.

III.17 Análisis estadístico.

Las variables cuantitativas son expresadas en promedios y error estándar de la media. Para el análisis estadístico y comparación de los resultados entre los grupos estudiados (normal y pre-eclampsia) se empleó el análisis no paramétrico de Kruskal y Wallis, y en aquellos casos en los cuales existían diferencias significativas, la prueba de Mann Whitney. El nivel nominal de significancia estadística (P) fue establecido en menor a 0.05 ($P < 0.05$). Todos los datos fueron ingresados en una base electrónica en Microsoft Excel[®] y el posterior análisis fue realizado con el software GraphPad Prism 6.0.

IV. Resultados

IV.1 Pacientes.

El estudio incluye un total de 18 mujeres (normotensas, n=10; pre-eclampsia, n=8). En la Tabla 3, se incluyen las características clínicas de las mujeres estudiadas. Según los criterios de inclusión, se observó que las mujeres con pre-eclampsia presentan una elevación significativa ($p < 0.002$) de la presión arterial sistólica y diastólica en comparación con mujeres normotensas. Igualmente, las mujeres pre-eclámpicas tuvieron proteinuria (260.0 ± 60.0 mg/dL) mientras que este análisis no pudo encontrarse en la ficha clínica de la mujeres normotensas. No se encontraron otras variaciones estadísticamente significativas en variables maternas, o del recién nacido y de la placenta.

IV.2. Caracterización de la vía A_{2A} -NO en HUVEC.

Se realizaron ensayos de proliferación celular mediante incorporación de bromouridina en células expuestas a CGS-21680 en forma dosis respuesta (Figura 7A), identificando una LogEC_{50} $10^{-9.6}$ M (95%IC 10^{-10} a $10^{-9.2}$ M). Por tanto, el resto de experimentos fueron realizados utilizando una dosis máxima de CGS-21680 10^{-8} M. El efecto estimulador de CGS-21680 (10^{-8} M) se bloqueó en forma dosis respuesta con el inhibidor SCH-58261, encontrándose una LogIC_{50} 10^{-14} M (95%IC 10^{-15} a 10^{-13} M) (Figura 7B). En forma paralela, HUVEC fueron expuestas al donador de NO, SNAP, como se muestra en la Figura 7C. Se encontró una LogEC_{50} $10^{-9.2}$ M (95%IC 10^{-10} a 10^{-8} M).

8.2 M) para SNAP, la cual fue similar a la encontrada con CGS-21680 (LogEC_{50} $10^{-9.9}$ M (95%IC 10^{-11} a $10^{-8.8}$ M) en esta serie de experimentos en paralelo.

En la Figura 8 se muestra la caracterización funcional del silenciamiento del A_{2A} AR de adenosina. Inicialmente, HUVEC fueron transfectadas con shRNA A_{2A} en una dosis de 1, 0.6 y 0.3 μg , encontrándose en todas ellas una disminución del nivel de mRNA mensajero para A_{2A} (67, 89 y 94%, respectivamente) respecto a la condición control sin transfección (Figura 8A). En consecuencia en experimentos posteriores se utilizó la dosis de 0.3 μg de RNA de interferencia. Mediante ensayos de inmunohistoquímica para estimar la presencia del A_{2A} AR, se encontró una evidente disminución de la intensidad del marcaje, la cual estuvo presente únicamente en 17% de células expuestas al RNA de interferencia, mientras que la señal estuvo presente en el 100% de las células no expuestas (Figura 8B). La transfección con RNA de interferencia no modificó la sobrevivencia de las células (Figura 8C).

En ensayos funcionales, se encontró que respecto a la condición basal, CGS-21680 incrementó 31.5 veces el nivel de AMPc; mientras que en presencia del RNA de interferencia este aumento fue de solo 7.8 veces (Figura 8D). En forma similar, el nivel de aumento de nitritos fue de 2.6 veces en presencia de CGS-21680, lo cual fue revertido cuando las células fueron expuestas al RNA de interferencia (Figura 8E). Complementando estos resultados, CGS-21680 aumentó la formación de tubos en células control; mientras que en células expuestas al RNA de interferencia se encontró una reducción en la capacidad de formar tubos en ensayos de matrigel en ausencia o presencia de CGS-21680 (Figura 9). Es notable, que el donador de NO, SNAP, fue

capaz de revertir parcialmente la reducida capacidad de formación de tubos en células expuestas al RNA de interferencia.

IV.3 Efecto del shRNA A_{2A} en la proliferación de HUVEC pre-eclámpticas.

La incubación con CGS-21680 (10^{-8} M) en células normales, en presencia o ausencia de SNAP (10^{-9} M por 24 h) aumentó la proliferación celular (~1.5 veces) (Figura 10). Por su parte, este efecto estimulador de CGS-21680 no fue evidenciado en células trasfectadas con el RNA de interferencia para el A_{2A}AR; sin embargo bajo estas últimas condiciones experimentales la co-incubación de SNAP y CGS-21680 recuperó parcialmente este efecto inhibitorio del RNA de interferencia, aumentando (~1.2 veces) la proliferación celular (Figura 10). En forma similar, en células de pre-eclampsia, la presencia del RNA de interferencia bloquea el aumento en la proliferación celular mediada por CGS-21680; pero contrariamente a lo observado en células normales; SNAP, ya sea en presencia o ausencia del RNA de interferencia no fue capaz de modificar la proliferación de estas células en forma significativa (Figura 10).

IV.4 Ensayos de ganancia y pérdida del A_{2A} y niveles de mRNA para VEGF en HUVEC.

El aumento (~1.5 veces) en el nivel de mRNA para VEGF inducido por CGS-21680 (12 h) en células control, fue revertido en aquellas expuestas al RNA de interferencia para A_{2A}AR (Figura 11). Similar a lo observado en proliferación celular, la co-incubación de SNAP y CGS-21680, fue capaz de recuperar parcialmente el efecto inhibitorio del RNA de interferencia. Por otro lado, en células de pre-eclampsia, se

evidenció una tendencia similar a todo lo observado en células control, aunque dichas diferencias no alcanzaron significancia estadística.

Luego de estandarizar las condiciones para la sobre-expresión y represión del A_{2A}AR en una línea celular de HUVEC expuestas o no a hipoxia (Figura 13 y Figura 14), se realizaron ensayos de PCR semicuantitativo para estimar los niveles de mRNA de VEGF. En estos experimentos la sobreexpresión del A_{2A}AR fue de 4.8 y 4.1 veces más alta respecto a la condición control en HUVEC cultivadas en normoxia o hipoxia, respectivamente. Por su parte, los ensayos de represión mostraron una reducción significativa del 24 y 28% en el nivel de mRNA para este receptor respecto a las respectivas condiciones controles (Figura 13A y 13B).

En ensayos paralelos, se encontró que CGS-21680 en estas células no fue capaz de aumentar significativamente los niveles de mRNA para VEGF tanto en condición normoxia como hipoxia. Sin embargo, la represión del A_{2A}AR redujo significativamente (32%, $p < 0.05$) los niveles de mRNA para VEGF en condición normoxia; no así en hipoxia, en donde hubo una reducción parcial del 18% ($p = \text{NS}$) en relación al control. Paradójicamente, la sobre-expresión del A_{2A}AR también redujo el nivel de VEGF tanto en normoxia (60%, $p < 0.05$) como en hipoxia (56%, $p = 0.3$) (Figura 13C).

IV.5 Vía A_{2A}-NO-VEGF en endotelio de la microcirculación placentaria.

Células endoteliales de la microcirculación placentaria fueron utilizadas para determinar la transversalidad de la vía A_{2A}-NO-VEGF en endotelio humano. En estas células, CGS-21680 aumenta la proliferación celular en forma dosis respuestas mostrando una logEC₅₀ de 10^{-8.7} M (95%IC 10^{-9.3} a 10^{-8.2} M) (Figura 14 A). En estas células, CGS-21680 aumentó el nivel de proteína VEGF tanto en células provenientes de embarazos normales (~1.5 veces) como pre-eclámpticas (~1.2 veces). Este aumento, fue bloqueado en células co-incubadas con el antagonista del A_{2A}AR, ZM-241385 (10⁻⁵ M) o con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME, en células de ambas condiciones estudiadas. En estas células, ZM-241385 o L-NAME redujeron (40 y 80%, respectivamente) la abundancia de proteína VEGF en células de embarazos normales. Por su parte en pre-eclampsia, también se evidenció una reducción con estas dos moléculas alcanzando 50% y 15% de reducción, respectivamente, en relación a la condición basal sin estimulación.

IV.6 Translocación nuclear de HIF-1 α inducido por CGS-21680

En experimentos utilizando fracciones nucleares y citoplasmáticas de HUVEC normales y provenientes de pre-eclampsia, se encontró que CGS-21680 aumenta (~1.9 veces) la abundancia de HIF-1 α a nivel nuclear en células normales, mientras que no tuvo efecto en células de pre-eclampsia (Figura 15)

V. Discusión

En esta tesis hemos profundizado nuestros previos estudios (Escudero, Bertoglia et al. 2013; Acurio, Celis et al. 2014) en los que caracterizamos la presencia de la vía de señalización A_{2A} -NO-VEGF en HUVEC de embarazos provenientes de pre-eclampsia. En estos estudios confirmatorios de pérdida y ganancia de la expresión funcional del A_{2A} AR hemos encontrado que en células de embarazos normales, la represión del A_{2A} AR reduce los niveles de mRNA para VEGF, y junto con ello, la proliferación celular y la capacidad de formación de estructuras tubulares en matrigel inducido por el agonista selectivo CGS-21680; lo cual resalta la relevancia de este receptor durante estos pasos iniciales de angiogénesis. Bajo estas condiciones experimentales, la incubación de las células con el donador de NO, SNAP, revierte parcialmente todos estos efectos inhibitorios inducidos por la represión de este receptor. En pre-eclampsia, también se observa que la represión del A_{2A} AR bloquea la proliferación inducida por CGS-21680, y genera una reducción en el nivel de mRNA para VEGF en forma basal (i.e, sin estimulación con CGS-21680); sin embargo a diferencia de las células normales, SNAP, no logra revertir estos fenómenos. Por otro lado, la sobre-expresión del A_{2A} AR, genera una paradójica reducción del nivel de mRNA para VEGF, tanto en condiciones de normoxia o hipoxia (i.e., simulando pre-eclampsia), dando cuenta probablemente de un mecanismo de retroalimentación entre A_{2A} y VEGF. Es interesante además resaltar, que nuestros resultados sugieren que la vía de señalización A_{2A} -NO-VEGF, estaría presente tanto en células de la macrocirculación (HUVEC) o de la microcirculación (hPMEC); lo cual es un hecho relevante ya que habla de su transversalidad funcional en el endotelio. Los resultados

sugieren además que la regulación de la expresión de VEGF mediado por A_{2A} en HUVEC de embarazos normales, pero no en pre-eclampsia, estaría asociado a un aumento en la translocación nuclear de HIF-1 α . En conclusión, los resultados confirman la funcionalidad de la vía A_{2A} -NO-VEGF en HUVEC de embarazos normales y pre-eclámpicos; y sugieren que en las células patológicas la biodisponibilidad de NO generado por la activación del A_{2A} AR, estaría alterada, complicando su función regulatoria sobre VEGF y con ello su capacidad pro-angiogénica.

V.1 Grupos de estudio y modelos experimentales

En esta primera sección analizaremos algunas características de las pacientes y los modelos experimentales utilizados, a fin de dar un contexto general para comparaciones más puntuales que se abordarán en secciones posteriores.

Así, respecto al grupo de pacientes, este es un estudio experimental de casos y controles en el que incluimos muestras de embarazos normales y pre-eclámpicos. Este último grupo, se trata de embarazos con pre-eclampsia de inicio tardío (LOPE), en el cual previamente hemos reportado un aumento en la funcionalidad en forma basal de la vía A_{2A} -NO-VEGF. Los resultados presentados en la tesis, apoyan esta elevación basal (i.e., en ausencia de agonistas) en LOPE.

Desde el punto de vista clínico en LOPE, la presencia de complicaciones tanto en la madre como en el recién nacido son menores que aquellos embarazos pre-eclámpicos que se desarrollan antes de las 34 semanas (von Dadelszen, Magee et al. 2003; Bertoglia P, Navarrete et al 2010; Young, Levine et al. 2010; Parra-Cordero, Rodrigo et al. 2012; Soto, Romero et al. 2012), lo cual también fue evidenciado en este

pequeño grupo de mujeres, ya que no hubo diferencias significativas en cuanto a las variables como peso del recién nacido entre ambos grupos estudiados. Esta evidencia sugiere que probablemente mecanismos adaptativos se encienden y son capaces de mantener una gestación sin mayores complicaciones, a pesar de la hipertensión materna. Esta tesis, contribuye a comprender mejor uno de estos procesos adaptativos como el aumento en la funcionalidad de la vía A_{2A} -NO-VEGF. Como condición experimental, hemos estandarizado todas las comparaciones con la conducción basal respectiva, por consiguiente el efecto basal de pre-eclampsia es anulado en el análisis estadístico; pero puede notarse por ejemplo en las figuras representativas del nivel de mRNA para VEGF (Figura 11 y 13), tal como fuera mostrado anteriormente (Escudero, Bertoglia et al. 2013) .

En otro punto respecto a los modelos experimentales utilizados, se ha mostrado que las células de la microcirculación (i.e, hPMEC) son más reactivas a las señales pro-angiogénicas que el endotelio macrovascular (i.e., HUVEC) (Feoktistov, Goldstein et al. 2002; Dye, Lawrence et al. 2004; Escudero, Bertoglia et al. 2013). En este sentido, los resultados muestran que la estimulación del A_{2A} AR con CGS-21680, aumentó la proliferación celular en hPMEC con una EC_{50} ligeramente mayor que en HUVEC ($\log EC_{50}$ de $10^{-8.7}$ M vs $\log EC_{50}$ $10^{-9.6}$ M, respectivamente, $p=NS$). Además, CGS-21680 aumentó también la expresión de VEGF en hPMEC, lo cual fue revertido con el antagonista selectivo para este receptor, ZM-241385, o con el inhibidor de NOS, L-NAME tanto en células normales como en pre-eclampsia. Es más, los resultados sugieren que existiría una activación “basal” de esta vía, ya que ambos inhibidores

reducen el nivel de VEGF aún en ausencia de CGS-21680. Por tanto, en esta tesis se sugiere que la vía A_{2A} -NO-VEGF estaría también presente en hPMEC.

Además, utilizamos un modelo de hipoxia (2% oxígeno), el cual ha sido mostrado incrementar el nivel de adenosina en otros estudio (Bodin and Burnstock 1995; Loffler, Morote-Garcia et al. 2007; Ryzhov, McCaleb et al. 2007). En ese sentido, es conocido que la placenta pre-ecláptica muestra signos de hipoxia (Rolfo, Many et al. 2010), por tanto en esta tesis fue utilizado como una condición “similar” a pre-eclampsia. Sin embargo, como cualquier modelo presenta varias desventajas, dentro de ellas, relevante para la tesis, es el hecho de que hipoxia *per se* estimula la expresión de VEGF (Forsythe, Jiang et al. 1996). Pero también, es importante rescatar que parte de este efecto regulatorio de hipoxia sobre el nivel de VEGF, ha sido asociado a la actividad de los receptores de adenosina (George, Cockrell et al. 2010), lo cual también fue confirmado en nuestros resultados. En este sentido, las evidencias mostradas en esta tesis, sugieren que tanto la represión como la sobreexpresión del A_{2A} AR reducen los niveles de VEGF en condiciones de normoxia (y quizá también en hipoxia). Los mecanismos moleculares de por qué existiría esta autorregulación, no fueron abordados en esta tesis. Sin embargo, es posible suponer una intrincada comunicación en la expresión de ambas proteínas, A_{2A} y VEGF, cuya expresión es regulada por el factor inducido por hipoxia (HIF) (Forsythe, Jiang et al. 1996; Gulati, Keitel et al. 2007; Ahmad, Ahmad et al. 2009)(ver más abajo).

Con estos dos últimos modelos, hPMEC e hipoxia, se sugiere que el A_{2A} AR es capaz de regular los niveles de mRNA para VEGF en forma transversal en distintos

tipos de células endoteliales o condiciones patológicas (pre-eclampsia) o experimentales (hipoxia).

V.2 Adenosina durante el embarazo normal y pre-ecláptico

V.2.1 Adenosina y embarazo normal

Los niveles extracelulares de adenosina aumentan en el tercer trimestre de los embarazos normales (Yoneyama, Suzuki et al. 2000), lo que se asocia con cambios inmunológicos y cardiovascular producto de la adaptación fisiológica durante esta etapa. Así por ejemplo, si se comparan los niveles de adenosina en mujeres no embarazadas con embarazadas normales, se observa un incremento en la síntesis, pero un reducido catabolismo de adenosina (Yoneyama, Suzuki et al. 2000; Lee, Hwang et al. 2007). Yoneyama y colaboradores en varias publicaciones (Yoneyama, Suzuki et al. 2000; Yoneyama, Suzuki et al. 2000; Meybohm, Zacharowski et al. 2012) mostraron que las mujeres embarazadas normales que se encuentran en el tercer trimestre de gestación tienen mayor concentración plasmática de adenosina (~ 0,5 μM) que las mujeres no embarazadas (~ 0,2 μM), lo cual ha sido recientemente también confirmado por nuestro grupo (Badillo P, et al., en revisión).

Las causas y consecuencias de la elevación en los niveles plasmáticos de adenosina en embarazos normales no se conocen. Sin embargo, algunos reportes sugieren que la elevación de adenosina estaría relacionada con un aumento “fisiológico” en la agregación plaquetaria presente en el embarazo normal (Yoneyama, Suzuki et al. 2000; Yoneyama, Suzuki et al. 2000), o mayor liberación de ATP (Malek, Miller et al. 1995), uno de los principal sustrato para la síntesis de adenosina.

Complementariamente una alta actividad sérica de 5'-nucleotidasa (es decir, de la enzima que cataliza la conversión de AMP a adenosina) se ha reportado también en el embarazo normal respecto a los controles no embarazadas (Yoneyama, Suzuki et al. 2000). Otros estudios muestran que los niveles elevados de adenosina en el embarazo, podrían estar asociados a disminución en la actividad de la enzima encargada de degradar esta molécula, la adenosina deaminasa (ADA) (Yoneyama, Suzuki et al. 2000).

Por otro lado, y considerando que los niveles plasmáticos de adenosina aumentan durante la gestación, se ha pensado también que podrían estar relacionados con el crecimiento de la placenta y la función vascular placentaria. En este sentido, los niveles plasmáticos de adenosina son más altos en los embarazos de gemelos (Suzuki, Yoneyama et al. 2000), una condición asociada a elevado tamaño de la placenta. También se ha reportado que embarazos con diabetes gestacional, en la cual también se observa generalmente una elevación de la masa placentaria, presentan también niveles altos de adenosina plasmática (Salomon, Westermeier et al. 2012). Más recientemente, hemos encontrado altos niveles de adenosina en mujeres embarazadas con sobrepeso/obesidad (Badillo P et al., en revisión), contribuyendo a la discusión de que múltiples factores pueden generar una elevación “fisiológica” de adenosina.

La funcionalidad de esta molécula en el embarazo normal aún no es del todo claro; sin embargo, a fin de poder contextualizar los resultados en esta tesis nos abocaremos a analizar la información en la circulación feto-placentaria. Al momento, no está claro si la adenosina presente en la circulación materna tiene algún rol en la regulación de la circulación placentaria, o viceversa. Evidencias indirectas han descrito

una correlación negativa entre los niveles de adenosina en plasma materno y el índice de pulsatilidad de la arteria uterina (PI), lo que sugiere que la adenosina podría dar lugar a una reducción de la resistencia a vascular en el lado materno de la placenta (Broch, Imerlund et al. 1984).

Adenosina puede inducir vasodilatación o vasoconstricción del lecho placentario, dependiendo del calibre del vaso analizado, y más específicamente del tipo de receptor presente en vasos de la macro o microcirculación (Read, Boura et al. 1993; Westermeier, Salomon et al. 2011). Por ejemplo, en vasos de macrocirculación (vena umbilical), cuyas células endoteliales expresan preferencialmente $A_{2A}AR$ sobre los otros tipos de receptores (Feoktistov, Goldstein et al. 2002) se ha reportado que adenosina genera vasodilatación por una vía asociada a la síntesis de NO (Westermeier, Salomon et al. 2011); mientras que en vasos de mediano calibre como los vasos coriónicos placentarios, los cuales expresan preferencialmente $A_{2B}AR$, adenosina genera vasoconstricción por una vía dependiente de la síntesis de tromboxanos (Donoso, Lopez et al. 2005).

Adenosina no solo controlaría el tono de los vasos sanguíneos a nivel placentario sino la formación misma de dichos vasos (Escudero, Puebla et al. 2009). Por ejemplo, Iriyama y colaboradores (Fernandez-Real, Penarroja et al. 2003) han descrito que la elevación de los niveles de adenosina en la placenta de ratones estaría vinculado con la formación anormal de los vasos sanguíneos en la placenta. Por desgracia, este último estudio no midió los niveles plasmáticos de adenosina en la circulación materna, pero se sugiere que la elevación suprafisiológica de los niveles plasmáticos de adenosina puede tener efectos nocivos sobre el sistema vascular de la

madre y la circulación feto-placenta. En la siguiente sección analizaremos en más detalle el rol de adenosina en la formación de vasos sanguíneos en la placenta pre-ecláptica.

V.2.2 Adenosina y pre-eclampsia

Varios estudios han mostrado elevación de los niveles de adenosina en la circulación materna y fetoplacentaria durante embarazos con pre-eclampsia (Yoneyama, Sawa et al. 1996; Takeuchi, Yoneyama et al. 2001; Yoneyama, Sawa et al. 2002; Yoneyama, Suzuki et al. 2002; Yoneyama, Suzuki et al. 2002; Escudero, Casanello et al. 2008; Escudero 2009; Espinoza, Espinoza et al. 2011). En forma similar al embarazo normal, las causas y consecuencias de esta elevación no se conocen con certeza; sin embargo evidencias indirectas sugieren que podrían estar asociados a la hipoxia placentaria presente en este tipo de embarazos (George, Cockrell et al. 2010), reducción en la captación de adenosina a través de los transportadores de membrana (Escudero, Casanello et al. 2008), reducción en la actividad de ADA (Yoneyama, Sawa et al. 2002; Yoneyama, Sawa et al. 2002; Kafkasli, Karabulut et al. 2006), aumento en la liberación de ATP hacia el extracelular (Spaans, Vos et al. 2014), entre otras posibles causas (Escudero 2009).

La importancia de esta elevación de adenosina en el desarrollo de un embarazo pre-ecláptico fue mostrado recientemente por Iriyama y colaboradores (Iriyama, Sun et al. 2014) quienes utilizando un modelo animal en el cual se generó una elevación placentaria del nivel de adenosina, lograron generar en el ratón las características clínicas de la enfermedad. En consecuencia, como ha sido resaltado recientemente

(Escudero, Myatt et al. 2015) estos hallazgos son muy relevantes ya que por primera vez se mostró en un modelo *in vivo* que altos niveles de adenosina en la placenta pueden generar pre-eclampsia, e importante para esta tesis, adenosina controlaría la formación de vasos sanguíneos placentarios.

V.2.3 Receptores de adenosina en la pre-eclampsia

La expresión de los A_{2A}AR y A_{2B}AR ha sido bien caracterizada en placenta (Donoso, Lopez et al. 2005) y en HUVEC de cultivo primario o líneas celulares (Wyatt, Steinert et al. 2002; Feoktistov, Ryzhov et al. 2004; Ryzhov, McCaleb et al. 2007). Por otra parte, en pre-eclampsia, inicialmente se reportaron niveles altos de todos los receptores de adenosina en homogenados de placentas con LOPE (von Versen-Hoynck, Rajakumar et al. 2009); posteriormente, una elevación de A_{2A}AR también fue encontrada mediante ensayos de inmunohistoquímica en placentas pre-eclámpicas (i.e., LOPE) comparado con controles (Kurlak, Williams et al. 2015). En cambio, en cultivo primario de hPMEC se han reportado bajos niveles del A_{2A}AR (Escudero, Casanello et al. 2008), así como en HUVEC de embarazos con LOPE (Salsoso, Guzman-Gutierrez et al. 2015). En la presente tesis, se incluyeron muestras de mujeres con LOPE, en donde se encontró una elevación del nivel de mRNA para A_{2A}AR (Figura 11), pero no analizamos la cantidad de proteína en esta serie de ensayos. Sin embargo, de resultados previos, utilizando también células extraídas de LOPE no encontramos diferencias significativas en la expresión, pero si en la funcionalidad de este receptor (Escudero, Bertoglia et al. 2013); contrariamente en embarazos pre-eclámpicos de inicio temprano (EOPE) la expresión y funcionalidad de este receptor

fue menor. Precisamente, esta fue la razón para realizar ensayos de pérdida de expresión de $A_{2A}AR$ en células de LOPE.

Además en HUVEC provenientes de LOPE se ha encontrado altos niveles de $A_{2B}AR$ en relación a sus respectivos controles (Acurio, Troncoso et al. 2014). En esta misma línea, Irayama y colaboradores (Iriyama, Sun et al. 2014) encontraron elevación en el mRNA del $A_{2B}AR$, sin cambio en los otros receptores, en las placentas de animales con características similares a pre-eclampsia.

No hemos estudiado los mecanismos vinculados con esas diferencias en la expresión de los receptores de adenosina, sin embargo, se ha reportado que hipoxia mantenida por al menos 24 horas, incrementa la expresión de $A_{2A}AR$ en explantes de placenta (von Versen-Hoynck, Rajakumar et al. 2009) y células endoteliales (Ahmad, Ahmad et al. 2009; Brown, Reyes et al. 2011); mientras que hipoxia por tiempos cortos reduciría la expresión de este gen (Feoktistov, Ryzhov et al. 2004).. Relacionando estas evidencias en hipoxia y pre-eclampsia, es posible que las diferencias observadas en la expresión de A_{2A} en EOPE y LOPE pudieran sugerir una capacidad diferente a la respuesta a la hipoxia en esas condiciones (Rolfo, Many et al. 2010).

Reforzando esto último se conoce que hipoxia regula la expresión de receptores de adenosina en forma diferencial (Bshesh, Zhao et al. 2002; Eltzschig, Ibla et al. 2003; Feoktistov, Ryzhov et al. 2004). Así, mientras el promotor del $A_{2B}AR$ contiene sitios de unión para HIF-1 α (Kong, Westerman et al. 2006), lo cual ha sido asociado a aumento de la expresión de este receptor en endotelio micro (Eltzschig, Ibla et al. 2003), y macrovascular (HUVEC) (Feoktistov, Ryzhov et al. 2004); el $A_{2A}AR$ es regulado por HIF-2 α en células endoteliales pulmonares (Ahmad, Ahmad et al. 2009), sugiriendo

también que el grado de hipoxia, tal como ocurriría en LOPE vs EOPE, puede diferencialmente afectar la expresión de estos genes. Más aún, esta diferenciación en la expresión de los receptores $A_{2A}AR$ y $A_{2B}AR$, podría tener efectos funcionales en cuanto a la regulación de la expresión de VEGF (ver más abajo).

Por tanto, el análisis de la expresión de los receptores en pre-eclampsia debe considerar tipo de tejido o célula utilizada, así como la característica clínica de la patología. En resumen diremos que salvo alguna discrepancia (Salsoso, Guzman-Gutierrez et al. 2015), parece ser que la expresión y/o funcionalidad de los receptores $A_{2A}AR$ y $A_{2B}AR$ estarían aumentadas en HUVEC de LOPE, mientras que en EOPE, al menos la de $A_{2A}AR$ estaría notablemente disminuida.

V.3 Vía A_{2A} -NO-VEGF en células normales y pre-eclámpticas

Varias evidencias (Wyatt, Steinert et al. 2002; Vasquez, Sanhueza et al. 2004) sugieren que adenosina, vía $A_{2A}AR$, es capaz de incrementar la síntesis de NO en células endoteliales, lo cual también ha sido confirmado por nuestro grupo (Escudero, Bertoglia et al. 2013). Estos hallazgos han sido inicialmente relacionados con un efecto vasodilatador de adenosina en condiciones normales o estrés celular. Sin embargo, es posible, como lo muestra esta tesis, que el aumento de NO mediado por $A_{2A}AR$, podría estar involucrado en cambios adaptativos vasculares a más largo plazo, como angiogénesis.

En pre-eclampsia, una serie de evidencias muestran que existe una disminución en la biodisponibilidad (síntesis, vida media, actividad, etc) de NO (ver detalles en Myatt 2010). En la relación A_{2A} -NO en pre-eclampsia y endotelio, únicamente hemos

encontrado dos reportes (Salsoso, Guzman-Gutierrez et al. 2015) en el tema. En el primero, se encontró que la estimulación del $A_{2A}AR$ con CGS-21680, aumenta la síntesis de NO, mientras que en el segundo la inhibición de este receptor con un antagonista selectivo ZM-241385, bloquea el transporte del aminoácido L-arginina (i.e., sustrato de NO) inducido por insulina. Por tanto, ambos resultados, sugieren que el $A_{2A}AR$, aumentaría la síntesis de NO en HUVEC.

En forma similar múltiples evidencias señalan que los receptores de adenosina, y en particular el $A_{2A}AR$, regula la expresión de VEGF en células endoteliales (ver Tabla 4), lo cual también fue corroborado en esta tesis. Así se encontró que la elevación en el nivel de mRNA para VEGF inducido por CGS-21680 fue revertida cuando las células fueron expuestas a un RNA de interferencia para el $A_{2A}AR$, tanto en condiciones normales donde la reducción fue estadísticamente significativa, como en pre-eclampsia en donde se mostró una clara tendencia a la baja ($p=0.12$). Estos resultados, se complementan con lo encontrado en hipoxia, en donde también la ausencia del $A_{2A}AR$ se asocia con reducción en los niveles de VEGF. En este último caso, se ha mostrado en HUVEC expuestas a normoxia (21% oxígeno), situación en la que la expresión de $A_{2A}AR$ supera a la expresión de $A_{2B}AR$, adenosina incrementa (1.5 veces) la expresión de VEGF; pero en hipoxia cuando ocurre un aumento en la expresión de $A_{2B}AR$ y una concomitante reducción de $A_{2A}AR$, adenosina es capaz de incrementar significativamente (8 veces) la expresión y liberación de VEGF (Feoktistov, Ryzhov et al. 2004). Nuestros resultados, difieren en varios aspectos metodológicos respecto a lo reportado por estos últimos autores. Partiendo de la línea celular utilizada para los experimentos de hipoxia, ya que provienen de dos compañías

distintas. Diferencias adicionales incluyen por ejemplo, el hecho de que en nuestro estudio los niveles de mRNA para A_{2A} AR estimados por PCR semicuantitativo no se modificaron significativamente en hipoxia (2% oxígeno, 24 h); sin embargo Feoktistov y su grupo reportaron niveles bajos del nivel de mRNA cuantificados por tiempo real, para este receptor tras 1 o 3 horas de incubación en 4.6% oxígeno. En este contexto, como ya se ha dicho, las HUVEC, responde en forma diferencial al nivel de hipoxia. Además, nuestros resultados, a diferencia de lo reportado por Feoktistov, utilizan un agonista selectivo para A_{2A} AR, CGS-21680 por tiempos más largos de incubación (12 h); mientras que estos autores utilizaron un agonista no selectivo y por menos tiempo (NECA, por 3 h). Por consiguiente, estas y otras diferencias metodológicas hacen inviable una comparación directa entre ambos estudios.

En otro aspecto, pero siguiendo con los resultados en la línea de HUVEC utilizada, se encontró que en normoxia (e igualmente con una clara tendencia en hipoxia), la sobreexpresión del A_{2A} AR redujo significativamente el nivel de mRNA para VEGF. Este resultado, podría reforzar el hecho de que A_{2A} AR estaría controlando la expresión de VEGF en HUVEC, y sugeriría la presencia de una autorregulación estrecha entre ambas proteínas.

Otra arista no resuelta en esta tesis, pero que es interesante continuar estudiando, es cómo ocurriría la regulación de la expresión de VEGF por A_{2A} . Estudios previos muestran que la estimulación de receptores de adenosina con el agonista no selectivo NECA incrementa la actividad transcripcional del promotor de VEGF humano (Feoktistov, Ryzhov et al. 2004) o de ratón (Liavag, Roland et al. 1972; Ryzhov, Biktasova et al. 2014), un efecto que ha sido asociado a la presencia de elementos de

respuesta para hipoxia (HRE) en el dichos promotores. En este escenario, se ha mostrado que el HRE ubicado entre -985 a -939 pb río arriba del inicio de la transcripción, y que es activado por HIF-1 α , es necesario para la regulación de la expresión de VEGF humano (Forsythe, Jiang et al. 1996). Así, no es sorpresa que uno de los factores de transcripción asociado a la regulación de la expresión VEGF mediada por NECA sea precisamente HIF-1 α (Feoktistov, Goldstein et al. 2002). Nosotros, quisimos también abordar estos mecanismos de regulación, así en primera instancia, los resultados indican que la estimulación del A_{2A}AR con CGS-21680 en HUVEC de embarazos normales se asocia a translocación nuclear de HIF-1 α ; un efecto que no pudo evidenciarse en células de pre-eclampsia. Desconocemos, si esta movilización es responsable del aumento de VEGF mediado por A_{2A}AR; por lo que estudios del promotor del VEGF, ligación de HIF-1 α a este promotor, y su efecto transcripcional son necesarios tanto en HUVEC de embarazos normales como de pre-eclampsia.

Por otro lado, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que el aumento en los niveles de mRNA y proteína para VEGF, inducidos por CGS-21680, fueron bloqueados cuando las células se co-incubaron con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME (Escudero, Bertoglia et al. 2013). En esta misma línea, los resultados mostrados en la presente tesis confirman estos hallazgos, utilizando herramientas moleculares y el donador de NO, SNAP (Figura 11), indicando además el orden molecular de los acontecimientos resumido en la vía A_{2A}-NO-VEGF.

En pre-eclampsia, a pesar de que la estimulación del A_{2A}AR, estaría asociada a un aumento de la expresión de VEGF; existiría una desregulación río abajo en el

efector NO. Esto se observa, en el hecho de que en presencia del RNA de interferencia para el $A_{2A}AR$, el nivel del mRNA para VEGF se reduce, lo cual, a diferencia de las células del embarazo normal no pudo ser revertido por el donador de NO en células de pre-eclampsia. Compatible con estos hallazgos, se observó también que la proliferación de HUVEC de pre-eclampsia tuvo un comportamiento similar a lo encontrado con VEGF (Figura 10). Las causas para esta desregulación de NO en la vía A_{2A} -NO-VEGF observada en pre- eclampsia no se abordaron en esta tesis; sin embargo, dado que es ampliamente conocido el aumento en el estrés oxidativo en endotelio de esta patología (Myatt and Webster 2009; Myatt 2010), es posible suponer que el NO generado tras activación del $A_{2A}AR$, o exógenamente entregado vía donador el donador SNAP, pudiera ser secuestrado por radicales de oxígeno en pre-eclampsia.

De lo discutido en esta tesis, se plantean varias interrogantes que requieren ser analizadas, tales como los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de receptores de adenosina en hipoxia; o aquellos asociados a reducción en la biodisponibilidad de NO generado por el $A_{2A}AR$; así como también, los mecanismos que estarían controlando la movilización y actividad de HIF inducida por adenosina; y como estos estarían controlando la expresión de VEGF. Otras interrogantes, incluyen por ejemplo, cómo VEGF podría regular $A_{2A}AR$; y que impacto tendría este último proceso en el control de angiogénesis. Finalmente, todas interrogantes debieran también abordarse en la condición pre-eclampsia en donde la evidencia mostrada sugiere alteraciones en quizá todos estos procesos regulatorios. Por consiguiente más estudios son necesarios en este campo.

En conclusión, esta tesis permitió comprobar mediante ensayos moleculares el nexo regulatorio entre A_{2A} y VEGF, el cual a su vez incluiría proteínas intermediarias como eNOS (para la síntesis de NO) y probablemente HIF-1 α . Se demostró que esta vía A_{2A} -NO-VEGF, regularía además la proliferación celular en HUVEC, así como estaría también presente en otros tipos endoteliales como hPMEC o línea celular de HUVEC. En pre-eclampsia de inicio tardío, es decir la condición clínica menos severa de la patología, la vía estaría disfuncional. Así, si bien existen algunos vestigios regulatorios de esta vía, en relación a la proliferación y niveles de mRNA para VEGF asociados directa o parcialmente a la presencia de A_{2A} AR, respectivamente; es posibles que en pre-eclampsia, el efecto intermediario vía NO, estaría aún más alterado, lo cual quizá podría afectar otros efectores como HIF-1 α . Finalmente, resultados en esta tesis también sugieren la presencia de un mecanismo autoregulatorio de A_{2A} AR por VEGF (Figura 16). Creemos que los resultados entregados en esta tesis contribuyen a la comprensión de los procesos adaptativos en la circulación feto-placentaria de embarazos con pre-eclampsia de inicio tardío.

VI. Referencias

- (2002). "ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002." Obstetrics and gynecology **99**(1): 159-167.
- Acurio, J., C. Celis, et al. (2014). "Acoustic parameters and salivary IL-6 levels in overweight and obese teachers." Journal of voice : official journal of the Voice Foundation **28**(5): 574-581.
- Acurio, J., F. Troncoso, et al. (2014). "Potential role of A2B adenosine receptors on proliferation/migration of fetal endothelium derived from preeclamptic pregnancies." BioMed research international **2014**: 274507.
- Acurio, J. T., F. Bertoglia, P. Salomon, C. Aguayo C. Sobrevia, L. Escudero, C. (2014). "Potential role of A2B adenosine receptors on proliferation/migration of fetal endothelium derived from pre-eclamptic pregnancies. BioMedical Research International. In press." BioMed Research International: In press.
- Afzal, A., L. C. Shaw, et al. (2003). "Reduction in preretinal neovascularization by ribozymes that cleave the A2B adenosine receptor mRNA." Circulation research **93**(6): 500-506.
- Ahmad, A., S. Ahmad, et al. (2009). "Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2alpha in pulmonary endothelial cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(26): 10684-10689.
- Ahmad, S., P. W. Hewett, et al. (2011). "Autocrine activity of soluble Flt-1 controls endothelial cell function and angiogenesis." Vascular cell **3**(1): 15.
- Ajne, G., G. Ahlborg, et al. (2005). "Contribution of endogenous endothelin-1 to basal vascular tone during normal pregnancy and preeclampsia." American journal of obstetrics and gynecology **193**(1): 234-240.
- Akercan, F., T. Cirpan, et al. (2008). "The immunohistochemical evaluation of VEGF in placenta biopsies of pregnancies complicated by preeclampsia." Archives of gynecology and obstetrics **277**(2): 109-114.
- Andraweera, P. H., G. A. Dekker, et al. (2012). "Placental expression of VEGF family mRNA in adverse pregnancy outcomes." Placenta **33**(6): 467-472.
- Bartoli, M., D. Platt, et al. (2003). "VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **17**(11): 1562-1564.
- Bertoglia P, R. A., Navarrete P, Castro L, Acurio J, Escudero C. (2010). "Resultados clínicos y perinatales de los embarazos con hipertensión arterial en un hospital de referencia de la VIII región de Chile. ." Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología. **75**(3): 162-171.
- Bodin, P. and G. Burnstock (1995). "Synergistic effect of acute hypoxia on flow-induced release of ATP from cultured endothelial cells." Experientia **51**(3): 256-259.
- Broch, H., O. Imerslund, et al. (1984). "Imerslund-Grasbeck anemia. A long-term follow-up study." Acta paediatrica Scandinavica **73**(2): 248-253.
- Broch, O. J. (1975). "[Pharmacological aspects of blood-brain barrier]." Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke **95**(26): 1460-1463.
- Broch, O. J. and P. M. Ueland (1980). "Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the adult rat brain." Journal of neurochemistry **35**(2): 484-488.

- Brown, S. T., E. P. Reyes, et al. (2011). "Chronic hypoxia upregulates adenosine 2a receptor expression in chromaffin cells via hypoxia inducible factor-2alpha: role in modulating secretion." Biochemical and biophysical research communications **412**(3): 466-472.
- Bshesh, K., B. Zhao, et al. (2002). "The A2A receptor mediates an endogenous regulatory pathway of cytokine expression in THP-1 cells." Journal of leukocyte biology **72**(5): 1027-1036.
- Burton, G. J., D. S. Charnock-Jones, et al. (2009). "Regulation of vascular growth and function in the human placenta." Reproduction **138**(6): 895-902.
- Burton, G. J., A. W. Woods, et al. (2009). "Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy." Placenta **30**(6): 473-482.
- Caniggia, I., H. Mostachfi, et al. (2000). "Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3)." The Journal of clinical investigation **105**(5): 577-587.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." Nature **473**(7347): 298-307.
- Carmeliet, P. and C. Ruiz de Almodovar (2013). "VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration." Cellular and molecular life sciences : CMLS **70**(10): 1763-1778.
- Casanello, P., C. Escudero, et al. (2007). "Equilibrative nucleoside (ENTs) and cationic amino acid (CATs) transporters: implications in foetal endothelial dysfunction in human pregnancy diseases." Current vascular pharmacology **5**(1): 69-84.
- Casanello, P., B. Krause, et al. (2009). "Reduced l-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells from intrauterine growth restriction pregnancies is not further altered by hypoxia." Placenta **30**(7): 625-633.
- Casanello, P., A. Torres, et al. (2005). "Equilibrative nucleoside transporter 1 expression is downregulated by hypoxia in human umbilical vein endothelium." Circulation research **97**(1): 16-24.
- Chen, J. F., H. K. Eltzschig, et al. (2013). "Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges?" Nature reviews. Drug discovery **12**(4): 265-286.
- Chi, J. T., H. Y. Chang, et al. (2003). "Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(19): 10623-10628.
- Clark, A. N., R. Youkey, et al. (2007). "A1 adenosine receptor activation promotes angiogenesis and release of VEGF from monocytes." Circulation research **101**(11): 1130-1138.
- Daly, J. W. and W. L. Padgett (1992). "Agonist activity of 2- and 5'-substituted adenosine analogs and their N6-cycloalkyl derivatives at A1- and A2-adenosine receptors coupled to adenylate cyclase." Biochemical pharmacology **43**(5): 1089-1093.
- Deanfield, J., A. Donald, et al. (2005). "Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension." Journal of hypertension **23**(1): 7-17.
- Desai, A., C. Victor-Vega, et al. (2005). "Adenosine A2A receptor stimulation increases angiogenesis by down-regulating production of the antiangiogenic matrix protein thrombospondin 1." Molecular pharmacology **67**(5): 1406-1413.

- Dionisotti, S., E. Ongini, et al. (1997). "Characterization of human A2A adenosine receptors with the antagonist radioligand [3H]-SCH 58261." British journal of pharmacology **121**(3): 353-360.
- Donoso, M. V., R. Lopez, et al. (2005). "A2B adenosine receptor mediates human chorionic vasoconstriction and signals through arachidonic acid cascade." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(5): H2439-2449.
- Dubey, R. K., D. G. Gillespie, et al. (2002). "A(2B) adenosine receptors stimulate growth of porcine and rat arterial endothelial cells." Hypertension **39**(2 Pt 2): 530-535.
- Duley, L. (2009). "The global impact of pre-eclampsia and eclampsia." Seminars in perinatology **33**(3): 130-137.
- Duley, L., S. Meher, et al. (2006). "Management of pre-eclampsia." BMJ **332**(7539): 463-468.
- Dye, J., L. Lawrence, et al. (2004). "Distinct patterns of microvascular endothelial cell morphology are determined by extracellular matrix composition." Endothelium : journal of endothelial cell research **11**(3-4): 151-167.
- Egbor, M., T. Ansari, et al. (2006). "Morphometric placental villous and vascular abnormalities in early- and late-onset pre-eclampsia with and without fetal growth restriction." BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology **113**(5): 580-589.
- Eltzschig, H. K., J. C. Ibla, et al. (2003). "Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors." The Journal of experimental medicine **198**(5): 783-796.
- Emerling, B. M., L. C. Plataniias, et al. (2005). "Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling." Molecular and cellular biology **25**(12): 4853-4862.
- Ernens, I., F. Leonard, et al. (2010). "Adenosine up-regulates vascular endothelial growth factor in human macrophages." Biochemical and biophysical research communications **392**(3): 351-356.
- Escudero, C., P. Bertoglia, et al. (2013). "Impaired A2A adenosine receptor/nitric oxide/VEGF signaling pathway in fetal endothelium during late- and early-onset preeclampsia." Purinergic Signalling **9**(2): 215-226.
- Escudero, C., P. Casanello, et al. (2008). "Human equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 may be differentially modulated by A2B adenosine receptors in placenta microvascular endothelial cells from pre-eclampsia." Placenta **29**(9): 816-825.
- Escudero, C., C. Celis, et al. (2014). "Increased placental angiogenesis in late and early onset pre-eclampsia is associated with differential activation of vascular endothelial growth factor receptor 2." Placenta **35**(3): 207-215.
- Escudero, C., L. Myatt, et al. (2015). "Letter by Escudero et al Regarding Article, "Elevated Placental Adenosine Signaling Contributes to the Pathogenesis of Preeclampsia"." Circulation **132**(18): e221.
- Escudero, C., C. Puebla, et al. (2009). "Potential cell signalling mechanisms involved in differential placental angiogenesis in mild and severe pre-eclampsia." Current vascular pharmacology **7**(4): 475-485.
- Escudero, C., J. M. Roberts, et al. (2014). "Impaired adenosine-mediated angiogenesis in preeclampsia: potential implications for fetal programming." Frontiers in pharmacology **5**: 134.

- Escudero, C. and L. Sobrevia (2008). "A hypothesis for preeclampsia: adenosine and inducible nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelium." Placenta **29**(6): 469-483.
- Escudero, C., Sobrevia, L (2009). "Understanding physiological significance of high extracellular adenosine levels in feto-placental circulation in preeclamptic pregnancies." Membrane Transporters and Receptors in Disease **1**: 27-51.
- Escudero, C. G., M; Acurio, J; Valenzuela, F; Sobrevia, L (2013). "The role of placenta in the fetal programming associated to gestational diabetes." Gestational Diabetes - Causes, Diagnosis and Treatment **1**(7): 135-162.
- Espinoza, J., A. F. Espinoza, et al. (2011). "High fetal plasma adenosine concentration: a role for the fetus in preeclampsia?" American journal of obstetrics and gynecology **205**(5): 485 e424-487.
- Fang, Y. and M. E. Olah (2007). "Cyclic AMP-dependent, protein kinase A-independent activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 following adenosine receptor stimulation in human umbilical vein endothelial cells: role of exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1)." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **322**(3): 1189-1200.
- Farias, M., R. San Martin, et al. (2006). "Nitric oxide reduces adenosine transporter ENT1 gene (SLC29A1) promoter activity in human fetal endothelium from gestational diabetes." Journal of cellular physiology **208**(2): 451-460.
- Feoktistov, I. and I. Biaggioni (1997). "Adenosine A2B receptors." Pharmacological reviews **49**(4): 381-402.
- Feoktistov, I., A. E. Goldstein, et al. (2002). "Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation." Circulation research **90**(5): 531-538.
- Feoktistov, I., S. Ryzhov, et al. (2003). "Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors." Circulation research **92**(5): 485-492.
- Feoktistov, I., S. Ryzhov, et al. (2004). "Hypoxia modulates adenosine receptors in human endothelial and smooth muscle cells toward an A2B angiogenic phenotype." Hypertension **44**(5): 649-654.
- Fernandez, P. (1996). "[Determination of sample size]." Cad Aten Primaria **3**: 138-141.
- Fernandez-Real, J. M., G. Penarroja, et al. (2003). "G protein beta3 gene variant, vascular function, and insulin sensitivity in type 2 diabetes." Hypertension **41**(1): 124-129.
- Forsythe, J. A., B. H. Jiang, et al. (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." Molecular and cellular biology **16**(9): 4604-4613.
- Fredholm, B. B., I. J. AP, et al. (2001). "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors." Pharmacological reviews **53**(4): 527-552.
- Fredholm, B. B., E. Irenius, et al. (2001). "Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells." Biochemical pharmacology **61**(4): 443-448.
- George, E. M., K. Cockrell, et al. (2010). "Regulation of sFlt-1 and VEGF secretion by adenosine under hypoxic conditions in rat placental villous explants." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology **299**(6): R1629-1633.

- Gessi, S., E. Cattabriga, et al. (2004). "Elevated expression of A3 adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **10**(17): 5895-5901.
- Gessi, S., E. Fogli, et al. (2010). "Adenosine modulates HIF-1{alpha}, VEGF, IL-8, and foam cell formation in a human model of hypoxic foam cells." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **30**(1): 90-97.
- Grant, M. B., M. I. Davis, et al. (2001). "Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A(2B) adenosine receptor stimulation." Investigative ophthalmology & visual science **42**(9): 2068-2073.
- Grant, M. B., R. W. Tarnuzzer, et al. (1999). "Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells." Circulation research **85**(8): 699-706.
- Groten, T., N. Gebhard, et al. (2010). "Differential expression of VE-cadherin and VEGFR2 in placental syncytiotrophoblast during preeclampsia - New perspectives to explain the pathophysiology." Placenta **31**(4): 339-343.
- Gsandtner, I., C. Charalambous, et al. (2005). "Heterotrimeric G protein-independent signaling of a G protein-coupled receptor. Direct binding of ARNO/cytohesin-2 to the carboxyl terminus of the A2A adenosine receptor is necessary for sustained activation of the ERK/MAP kinase pathway." The Journal of biological chemistry **280**(36): 31898-31905.
- Gulati, U., W. A. Keitel, et al. (2007). "Increased antibodies against unfolded viral antigens in the elderly after influenza vaccination." Influenza and other respiratory viruses **1**(4): 147-156.
- Habli, M., R. J. Levine, et al. (2007). "Neonatal outcomes in pregnancies with preeclampsia or gestational hypertension and in normotensive pregnancies that delivered at 35, 36, or 37 weeks of gestation." American journal of obstetrics and gynecology **197**(4): 406 e401-407.
- Headrick, J. P., K. J. Ashton, et al. (2013). "Cardiovascular adenosine receptors: Expression, actions and interactions." Pharmacology & therapeutics.
- Hocker, J., B. Raitschew, et al. (2010). "Differences between bispectral index and spectral entropy during xenon anaesthesia: a comparison with propofol anaesthesia." Anaesthesia **65**(6): 595-600.
- Iriyama, T., K. Sun, et al. (2014). "Elevated Placental Adenosine Signaling Contributes to the Pathogenesis of Preeclampsia." Circulation.
- Jacobson, K. A. and Z. G. Gao (2006). "Adenosine receptors as therapeutic targets." Nature reviews. Drug discovery **5**(3): 247-264.
- Jacobson, M. A., R. G. Johnson, et al. (1995). "Cloning and chromosomal localization of the human A2b adenosine receptor gene (ADORA2B) and its pseudogene." Genomics **27**(2): 374-376.
- Kafkasli, A., A. B. Karabulut, et al. (2006). "Clinical correlation between adenosine deaminase activity and pre-eclampsia severity." The Journal of international medical research **34**(3): 247-255.
- Kim, S. C., M. J. Park, et al. (2012). "Decreased expressions of vascular endothelial growth factor and visfatin in the placental bed of pregnancies complicated by preeclampsia." The journal of obstetrics and gynaecology research **38**(4): 665-673.

- Kimura, H., T. Ogura, et al. (2002). "Effects of nitric oxide donors on vascular endothelial growth factor gene induction." Biochemical and biophysical research communications **296**(4): 976-982.
- Kimura, H., A. Weisz, et al. (2000). "Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide." Blood **95**(1): 189-197.
- Kong, T., K. A. Westerman, et al. (2006). "HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **20**(13): 2242-2250.
- Kurlak, L. O., P. J. Williams, et al. (2015). "Placental expression of adenosine A(2A) receptor and hypoxia inducible factor-1 alpha in early pregnancy, term and pre-eclamptic pregnancies: interactions with placental renin-angiotensin system." Placenta **36**(5): 611-613.
- Kvam, E., J. Broch, et al. (1983). "Comparison between a zinc phosphate cement and a glass ionomer cement for cementation of orthodontic bands." European journal of orthodontics **5**(4): 307-313.
- Kwon, J. Y., Y. S. Maeng, et al. (2007). "Decreased endothelial progenitor cells in umbilical cord blood in severe preeclampsia." Gynecologic and obstetric investigation **64**(2): 103-108.
- Lando, D., D. J. Peet, et al. (2002). "Mammalian two-hybrid assay showing redox control of HIF-like factor." Methods in enzymology **353**: 3-10.
- Lee, S. J., H. S. Hwang, et al. (2007). "Changes in serum adenosine deaminase activity during normal pregnancy." Journal of Korean medical science **22**(4): 718-721.
- Leibovich, S. J., J. F. Chen, et al. (2002). "Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A(2A) receptor agonists and endotoxin." The American journal of pathology **160**(6): 2231-2244.
- Lennon, P. F., C. T. Taylor, et al. (1998). "Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation." The Journal of experimental medicine **188**(8): 1433-1443.
- Leonard, F., Y. Devaux, et al. (2011). "Adenosine modifies the balance between membrane and soluble forms of Flt-1." Journal of leukocyte biology **90**(1): 199-204.
- Li, J., R. A. Fenton, et al. (1998). "Adenosine A2a receptors increase arterial endothelial cell nitric oxide." The Journal of surgical research **80**(2): 357-364.
- Liavag, I., M. Roland, et al. (1972). "Gastric function after pylorus-preserving resection for gastric ulcer." Acta chirurgica Scandinavica **138**(5): 511-516.
- Loffler, M., J. C. Morote-Garcia, et al. (2007). "Physiological roles of vascular nucleoside transporters." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **27**(5): 1004-1013.
- Lyall, F. and I. A. Greer (1996). "The vascular endothelium in normal pregnancy and pre-eclampsia." Reviews of reproduction **1**(2): 107-116.
- MacCollin, M., R. Peterfreund, et al. (1994). "Mapping of a human A2a adenosine receptor (ADORA2) to chromosome 22." Genomics **20**(2): 332-333.
- MacLauchlan, S., J. Yu, et al. (2011). "Endothelial nitric oxide synthase controls the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin 2." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(46): E1137-1145.

- Maghnie, M., E. Genovese, et al. (1998). "Evolution of childhood central diabetes insipidus into panhypopituitarism with a large hypothalamic mass: is 'lymphocytic infundibuloneurohypophysitis' in children a different entity?" European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies **139**(6): 635-640.
- Malek, A., R. K. Miller, et al. (1995). "Continuous measurement of ATP by ³¹P-NMR in term human dually perfused placenta in vitro: response to ischemia." Journal of applied physiology **78**(5): 1778-1786.
- Mayhew, T. M., C. Ohadike, et al. (2003). "Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction." Placenta **24**(2-3): 219-226.
- Mayhew, T. M., J. Wijesekara, et al. (2004). "Morphometric evidence that villous development and fetoplacental angiogenesis are compromised by intrauterine growth restriction but not by pre-eclampsia." Placenta **25**(10): 829-833.
- Maynard, S. E. and S. A. Karumanchi (2011). "Angiogenic factors and preeclampsia." Seminars in nephrology **31**(1): 33-46.
- Merighi, S., A. Benini, et al. (2007). "Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and interleukin-8 expression in hypoxic human colon cancer cells." Molecular pharmacology **72**(2): 395-406.
- Merighi, S., C. Simioni, et al. (2009). "A(2B) and A(3) adenosine receptors modulate vascular endothelial growth factor and interleukin-8 expression in human melanoma cells treated with etoposide and doxorubicin." Neoplasia **11**(10): 1064-1073.
- Meybohm, P., K. Zacharowski, et al. (2012). "Remote ischaemic preconditioning for heart surgery. The study design for a multi-center randomized double-blinded controlled clinical trial--the RIPHeart-Study." European heart journal **33**(12): 1423-1426.
- Moncada, S. and A. Higgs (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway." The New England journal of medicine **329**(27): 2002-2012.
- Monga, R., S. Buck, et al. (2012). "Effect of preeclampsia and intrauterine growth restriction on endothelial progenitor cells in human umbilical cord blood." The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians **25**(11): 2385-2389.
- Moyes, A. J., D. Maldonado-Perez, et al. (2011). "Enhanced angiogenic capacity of human umbilical vein endothelial cells from women with preeclampsia." Reproductive sciences **18**(4): 374-382.
- Myatt, L. (2010). "Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta." Placenta **31 Suppl**: S66-69.
- Myatt, L. and R. P. Webster (2009). "Vascular biology of preeclampsia." Journal of thrombosis and haemostasis : JTH **7**(3): 375-384.
- Ochaion, A., S. Bar-Yehuda, et al. (2009). "The anti-inflammatory target A(3) adenosine receptor is over-expressed in rheumatoid arthritis, psoriasis and Crohn's disease." Cellular immunology **258**(2): 115-122.
- Olah, M. E. and G. L. Stiles (2000). "The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity." Pharmacology & therapeutics **85**(2): 55-75.
- Parra-Cordero, M., R. Rodrigo, et al. (2012). "Prediction of early and late pre-eclampsia from maternal characteristics, uterine artery Doppler and markers of vasculogenesis during the

- first trimester of pregnancy." Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.
- Pinhal-Enfield, G., M. Ramanathan, et al. (2003). "An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors." The American journal of pathology **163**(2): 711-721.
- Powers, R. W., A. Jeyabalan, et al. (2010). "Soluble fms-Like tyrosine kinase 1 (sFlt1), endoglin and placental growth factor (PlGF) in preeclampsia among high risk pregnancies." PloS one **5**(10): e13263.
- Read, M. A., A. L. Boura, et al. (1993). "Vascular actions of purines in the foetal circulation of the human placenta." British journal of pharmacology **110**(1): 454-460.
- Rees, D. D., R. M. Palmer, et al. (1990). "Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo." British journal of pharmacology **101**(3): 746-752.
- Riano, A., D. Ortiz-Masia, et al. (2011). "Nitric oxide induces HIF-1alpha stabilization and expression of intestinal trefoil factor in the damaged rat jejunum and modulates ulcer healing." Journal of gastroenterology **46**(5): 565-576.
- Roberts, J. M., L. M. Bodnar, et al. (2005). "Uric acid is as important as proteinuria in identifying fetal risk in women with gestational hypertension." Hypertension **46**(6): 1263-1269.
- Roberts, J. M., R. N. Taylor, et al. (1989). "Preeclampsia: an endothelial cell disorder." American journal of obstetrics and gynecology **161**(5): 1200-1204.
- Roislien, J., O. Skare, et al. (2009). "Simultaneous estimation of effects of gender, age and walking speed on kinematic gait data." Gait & posture **30**(4): 441-445.
- Rolfo, A., A. Many, et al. (2010). "Abnormalities in oxygen sensing define early and late onset preeclampsia as distinct pathologies." PloS one **5**(10): e13288.
- Rolland-Turner, M., E. Goretti, et al. (2013). "Adenosine stimulates the migration of human endothelial progenitor cells. Role of CXCR4 and microRNA-150." PloS one **8**(1): e54135.
- Romero, R., J. K. Nien, 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 gestational age neonate." The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians **21**(1): 9-23.
- Ryzhov, S., A. Biktasova, et al. (2014). "Role of JunB in adenosine A2B receptor-mediated vascular endothelial growth factor production." Molecular pharmacology **85**(1): 62-73.
- Ryzhov, S., J. L. McCaleb, et al. (2007). "Role of adenosine receptors in the regulation of angiogenic factors and neovascularization in hypoxia." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **320**(2): 565-572.
- Ryzhov, S., N. V. Solenkova, et al. (2008). "Adenosine receptor-mediated adhesion of endothelial progenitors to cardiac microvascular endothelial cells." Circulation research **102**(3): 356-363.
- Safran, M. and W. G. Kaelin, Jr. (2003). "HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway." The Journal of clinical investigation **111**(6): 779-783.
- Salh, B., R. Wagey, et al. (1998). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and p70 S6 kinases in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells: differential effects

- of rapamycin, Ly294002, and wortmannin on nitric oxide production." Journal of immunology **161**(12): 6947-6954.
- Salomon, C., F. Westermeier, et al. (2012). "Gestational diabetes reduces adenosine transport in human placental microvascular endothelium, an effect reversed by insulin." PloS one **7**(7): e40578.
- Salsoso, R., E. Guzman-Gutierrez, et al. (2015). "Insulin restores L-arginine transport requiring adenosine receptors activation in umbilical vein endothelium from late-onset preeclampsia." Placenta **36**(3): 287-296.
- San Martin, R. and L. Sobrevia (2006). "Gestational diabetes and the adenosine/L-arginine/nitric oxide (ALANO) pathway in human umbilical vein endothelium." Placenta **27**(1): 1-10.
- Schaddelee, M. P., H. L. Voorwinden, et al. (2003). "Functional role of adenosine receptor subtypes in the regulation of blood-brain barrier permeability: possible implications for the design of synthetic adenosine derivatives." European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences **19**(1): 13-22.
- Schieke, S. M., K. Briviba, et al. (1999). "Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation." FEBS letters **448**(2-3): 301-303.
- Schulte, G. and B. B. Fredholm (2003). "Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases." Cellular signalling **15**(9): 813-827.
- Sexl, V., G. Mancusi, et al. (1997). "Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells." The Journal of biological chemistry **272**(9): 5792-5799.
- Shibuya, M. (2006). "Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis." Journal of biochemistry and molecular biology **39**(5): 469-478.
- Shibuya, M. (2013). "Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases." Journal of biochemistry **153**(1): 13-19.
- Sibai, B., G. Dekker, et al. (2005). "Pre-eclampsia." Lancet **365**(9461): 785-799.
- Sobrevia, L., F. Abarzua, et al. (2011). "Review: Differential placental macrovascular and microvascular endothelial dysfunction in gestational diabetes." Placenta **32 Suppl 2**: S159-164.
- Sobrevia, L. and G. E. Mann (1997). "Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia." Experimental physiology **82**(3): 423-452.
- Sobrevia, L., A. Nadal, et al. (1996). "Activation of L-arginine transport (system y+) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells." The Journal of physiology **490 (Pt 3)**: 775-781.
- Soto, E., R. Romero, et al. (2012). "Late-onset preeclampsia is associated with an imbalance of angiogenic and anti-angiogenic factors in patients with and without placental lesions consistent with maternal underperfusion." The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians **25**(5): 498-507.
- Spaans, F., P. D. Vos, et al. (2014). "Danger Signals From ATP and Adenosine in Pregnancy and Preeclampsia." Hypertension.

- Suchting, S., C. Freitas, et al. (2007). "The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(9): 3225-3230.
- Suzuki, S., Y. Yoneyama, et al. (2000). "Relation between serum uric acid and plasma adenosine levels in twin pregnancies." Obstetrics and gynecology **96**(4): 507-510.
- Takagi, H., G. L. King, et al. (1996). "Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells." Investigative ophthalmology & visual science **37**(11): 2165-2176.
- Takeuchi, T., Y. Yoneyama, et al. (2001). "Regulation of platelet aggregation in vitro by plasma adenosine in preeclampsia." Gynecologic and obstetric investigation **51**(1): 36-39.
- Tannetta, D. S., R. A. Dragovic, et al. (2013). "Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of flt-1 and endoglin." PloS one **8**(2): e56754.
- Thilakarathna, S. H., H. P. Rupasinghe, et al. (2013). "Apple peel bioactive rich extracts effectively inhibit in vitro human LDL cholesterol oxidation." Food chemistry **138**(1): 463-470.
- Valdes, G., A. M. Germain, et al. (2001). "Tissue kallikrein and bradykinin B2 receptor in human uterus in luteal phase and in early and late gestation." Endocrine **16**(3): 207-215.
- Vasquez, G., F. Sanhueza, et al. (2004). "Role of adenosine transport in gestational diabetes-induced L-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelium." The Journal of physiology **560**(Pt 1): 111-122.
- Villar, J., G. Carroli, et al. (2006). "Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions?" American journal of obstetrics and gynecology **194**(4): 921-931.
- von Dadelszen, P., L. A. Magee, et al. (2003). "Subclassification of preeclampsia." Hypertension in pregnancy : official journal of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy **22**(2): 143-148.
- von Versen-Hoyneck, F., A. Rajakumar, et al. (2009). "Human placental adenosine receptor expression is elevated in preeclampsia and hypoxia increases expression of the A2A receptor." Placenta **30**(5): 434-442.
- Walters, W. A. and A. L. Boura (1991). "Regulation of fetal vascular tone in the human placenta." Reproduction, fertility, and development **3**(4): 475-481.
- Westermeier, F., C. Salomon, et al. (2011). "Insulin restores gestational diabetes mellitus-reduced adenosine transport involving differential expression of insulin receptor isoforms in human umbilical vein endothelium." Diabetes **60**(6): 1677-1687.
- Wyatt, A. W., J. R. Steinert, et al. (2002). "Early activation of the p42/p44MAPK pathway mediates adenosine-induced nitric oxide production in human endothelial cells: a novel calcium-insensitive mechanism." The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **16**(12): 1584-1594.
- Xia, L., X. P. Zhou, et al. (2007). "Decrease and dysfunction of endothelial progenitor cells in umbilical cord blood with maternal pre-eclampsia." The journal of obstetrics and gynaecology research **33**(4): 465-474.
- Xiong, X., N. N. Demianczuk, et al. (2002). "Impact of preeclampsia and gestational hypertension on birth weight by gestational age." American journal of epidemiology **155**(3): 203-209.

- Yoneyama, Y., R. Sawa, et al. (2002). "Relationship between plasma malondialdehyde levels and adenosine deaminase activities in preeclampsia." Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry **322**(1-2): 169-173.
- Yoneyama, Y., R. Sawa, et al. (2002). "Relation between adenosine deaminase activities and cytokine-producing T cells in women with preeclampsia." Clinical biochemistry **35**(4): 303-306.
- Yoneyama, Y., R. Sawa, et al. (1996). "The relationship between uterine artery Doppler velocimetry and umbilical venous adenosine levels in pregnancies complicated by preeclampsia." American journal of obstetrics and gynecology **174**(1 Pt 1): 267-271.
- Yoneyama, Y., S. Suzuki, et al. (2000). "Plasma adenosine levels increase in women with normal pregnancies." American journal of obstetrics and gynecology **182**(5): 1200-1203.
- Yoneyama, Y., S. Suzuki, et al. (2000). "Changes in plasma adenosine concentrations during normal pregnancy." Gynecologic and obstetric investigation **50**(3): 145-148.
- Yoneyama, Y., S. Suzuki, et al. (2002). "Increased plasma adenosine concentrations and the severity of preeclampsia." Obstetrics and gynecology **100**(6): 1266-1270.
- Yoneyama, Y., S. Suzuki, et al. (2002). "Relation between adenosine and T-helper 1/T-helper 2 imbalance in women with preeclampsia." Obstetrics and gynecology **99**(4): 641-646.
- Young, B. C., R. J. Levine, et al. (2010). "Pathogenesis of preeclampsia." Annual review of pathology **5**: 173-192.

VII. Tablas

Tabla 1. Receptores de Adenosina.

Tipo receptor	K_d para Adenosina (nM)	Agonista	K_d para NECA	Antagonista	K_i antagonista (nM)	Moléculas de señalización
A ₁	3-30	CPA, CCPA, NECA CGS-21680	11	DPCPX	0.69	PI3-K, PKC, MAPK, Akt
A _{2A}	1-20	ATL146e, CGS-21680 NECA	16	ZM-241385 DPCPX	30 502	cAMP, PKC, cGMP, MAPK, NO
A _{2B}	5.000-20.000	NECA	1700*	SCH-58261 MRS1754	0,5 1.97	cAMP cAMP, MAPK
A ₃	>1.000	IB-MECA, 2CI-IB-MECA, NECA	100-1000 [†]	MRS1220	300 [‡]	PI3-K, PKC, MAPK, Akt

CPA, *N*6-ciclopentiladenosina; CCPA, 2-cloro-*N*6-ciclopentiladenosina; NECA, 50-*N*-etil-carboxamidoadenosina; ATL146e, 4-{3-(6-amino-9-(5-etilcarbamoil-3,4-dihidroxi-tetrahydro-furan-2-il)-9H-purina-2-il)-prop-2-inil}-ácido ciclohexanecarbo-xílico metil éster; CGS-21680, 2-(p-(2-carbonil-etil)-feniletilamino)-50-*N*-etilcarboxamidoadenosina; IB-MECA, *N*6-(3-iodobenzil)adenosina-50-*N*-metiluronamida; DPCPX, 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina; ZM-241385, 4-(2-(7-amino-2-(2-furil)-(1,2,4)triazolo(2,3-a){1,3,5}triazin-5-il-amino)etil)fenol; MRS1754, N-(4-ciano-fenil)-2-(4-(2,6-dioxo-1,3-dipropil-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-purin-8-il)-fenoxi)acetamida. (Modificado de (San Martín and Sobrevia 2006).*(Broch 1975)); [†](Kvam, Broch et al. 1983); [‡](Jacobson and Gao 2006)

Tabla 2: Secuencia de los partidores utilizados

Nombre	Partidores	Producto (pb)
hA _{2A} R	S 5'-AGCTCCATCTTCAGTCTCCT-3' AS 5'-ACCGCAGTTGTTCCAACCTA-3'	174
VEGF	S 5'CTTGCCTTGCTGCTCTACCT 3' AS 5'AGGTAGAGCAGCAAGGCAAG 3'	489
18S	S 5'-TCAAGAACGAAAGCTGGAGG- 3' AS 5'GGACATCTAAGGGCATCACA- 3'	

hA_{2A}R: Receptor de adenosina humano tipo A_{2A}, VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, 18S: RNA ribosomal 18S (18S). S: Partidor sentido y AS: antisentido. Tamaño del producto esperado en pares de bases (pb).

Tabla 3. Características clínicas de las pacientes incluidas.

	Normal (n=10)	Pre-eclampsia (n=8)
<i>Características maternas</i>		
Edad, años	24.5 ± 1.9	22.5 ± 2.6
IMC ₁ , kg/m ²	27.0 ± 0.8	26.3 ± 1.4
IMC ₂ , kg/m ²	32.5 ± 0.7	33.3 ± 1.5
EGP, sem	38.9 ± 0.4	38.3 ± 0.6
PAS, mmHg	115.6 ± 3.7	146.1 ± 2.5*
PAD, mmHg	68.4 ± 2.7	90.9 ± 2.8*
Plaquetas, #*1000/ml	182.0 ± 13.0	197.0 ± 16.0
Hemoglobina, mg/dL	12.6 ± 0.2	12.3 ± 0.6
Hematocrito, %	36.0 ± 0.7	35.4 ± 1.3
Leucocitos, #*1000/ml	11.0 ± 0.7	13.0 ± 1.5
<i>Características Recién Nacido</i>		
Peso, gr	3291.0 ± 112.0	3365.0 ± 195.1
Talla, cm	48.7 ± 0.4	48.8 ± 0.8
PC, cm	34.3 ± 0.3	34.4 ± 0.7
<i>Características Placenta</i>		
Peso, gr	532.0 ± 32.6	547.5 ± 38.2
PRN/PP, gr	6.4 ± 0.4	6.3 ± 0.3

IMC₁, índice de masa corporal en el primer trimestre. IMC₂, índice de masa corporal al tercer trimestre. EGP, edad gestacional al parto. PAS, presión arterial sistólica. PAD, presión arterial diastólica. PC, perímetro cefálico. PRN/PP, razón entre peso del recién nacido y peso de la placenta. Todos los valores se expresan en promedio ± SEM. *P<0.0002.

Tabla 4. Factores que influyen en el proceso de angiogénesis*

AR	Proceso angiogénico	Tipo celular	Referencia
A _{2A}	↑ VEGF	Macrofagos	(Pinhal-Enfield, Ramanathan et al. 2003; Ernens, Leonard et al. 2010) (Desai, Victor-Vega et al. 2005) (Leonard, Devaux et al. 2011) (Leonard, Devaux et al. 2011) (Escudero, Bertoglia et al. 2013)
	↓ Thrombospondin	HMVEC	
	↓ sFlt-1	Macrofagos	
	↑ mFlt-1	Macrofagos	
	↑ Proliferación /migración y VEGF	HUVEC	
A _{2B}	↑ Permeabilidad		(Lennon, Taylor et al. 1998) (Ryzhov, Biktasova et al. 2014) (Afzal, Shaw et al. 2003) (Feoktistov, Goldstein et al. 2002) (Rolland-Turner, Goretti et al. 2013) (Gessi, Fogli et al. 2010) (Merighi, Benini et al. 2007; Merighi, Simioni et al. 2009) (Feoktistov, Ryzhov et al. 2004) (Feoktistov, Ryzhov et al. 2003) (Grant, Tarnuzzer et al. 1999; Grant, Davis et al. 2001)
	↑ VEGF	HUVEC-PMN	
	↑ Migración	HMVEC	
	↑ VEGF, IL-8 y bFGF	HREC	
	↑ Migración	HMEC-1	
	↑ VEGF y IL-8	EPC	
	↑ IL-8	Células espumosas	
	↑ VEGF	Melanoma, HT29	
	↑ VEGF y IL-8	HUVEC en hipoxia	
	↑	HMEC-1	
Proliferación/migración, formación de tubos, VEGF	HREC		

*Tabla modificada de (Escudero, Roberts et al. 2014).

VIII. Figuras

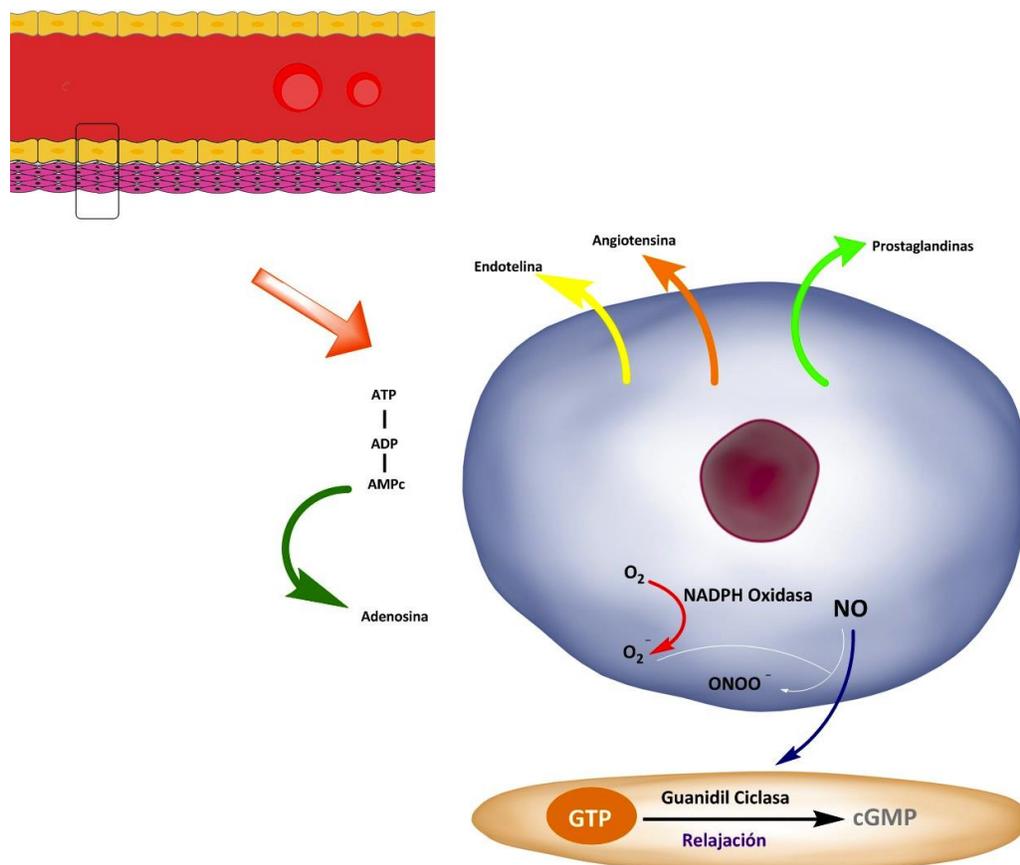


Figura 1. Vasos sanguíneos y función de células endoteliales: Los vasos sanguíneos son estructuras encargadas del transporte de nutrientes, gases, moléculas hormonas, sangre, etc. formados de una capa interna endotelial y rodeados de musculatura lisa. Las células endoteliales o recubrimiento interno, son capaces de sintetizar, sustancias vasodilatadoras (NO) y sustancias vasoconstrictoras (endotelina, angiotensina). La figura además muestra el metabolismo del ATP de donde se genera adenosina. También, el NO puede reaccionar con radicales libres de oxígeno como anión superóxido (O₂⁻) generado por múltiples vías, incluyendo la NADPH oxidasa. La reacción entre NO y O₂⁻ genera un compuesto altamente reactivo conocido como peroxinitrito (ONOO⁻). Fisiológicamente, el NO también reacciona con la guanilil ciclasa soluble en las células musculares, la cual a su vez transforma el guanosin trifosfato (GTP) en guanosin monofosfato cíclico (cGMP), encargado en último término de genera vasorelajación.

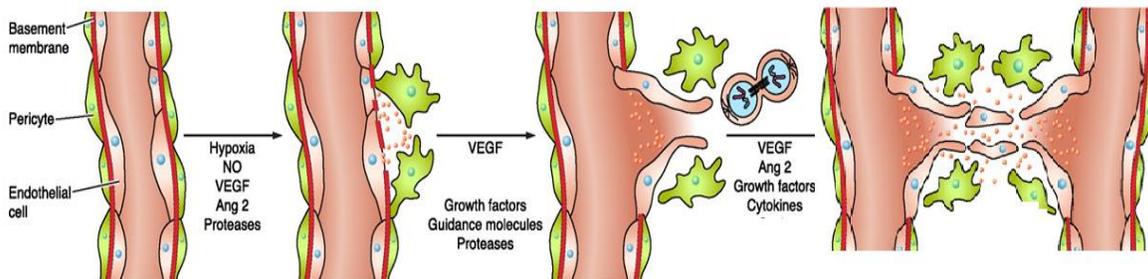


Figura 2. Proceso de angiogénesis y la importancia de factores proangiogénicos:

Los vasos sanguíneos recubiertos por células endoteliales y pericitos. En condiciones basales las células endoteliales producen óxido nítrico (NO), VEGF, Angiotensina 2 (Ang2) y proteasas. Cuando se altera la estructura de un vaso sanguíneo o se va a formar un nuevo vaso, se liberan sustancias como factores de crecimiento (VEGF), moléculas de orientación y proteasas. Estas moléculas hacen que las células de la punta migren, mientras que las células del tallo proliferen para formar una nueva estructura tubular, formando así un nuevo vaso sanguíneo. Ver detalles en el texto. Figura modificada de (Hocker, Raitschew et al. 2010).

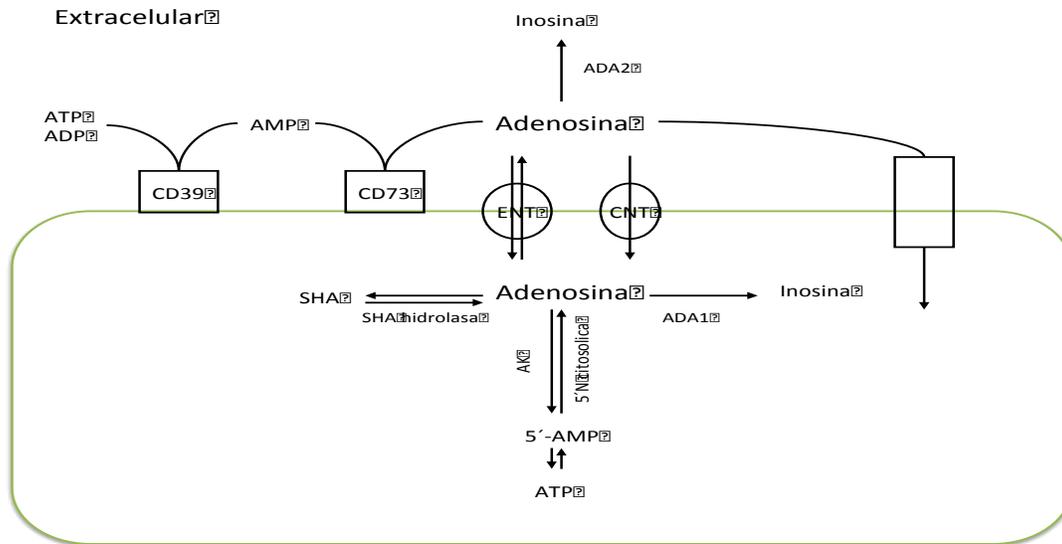


Figura 3: Regulación del nivel extracelular de adenosina. La biodisponibilidad extracelular de adenosina depende de la descomposición de los nucleótidos de adenina (di- adenosina y tri-fosfato) a través de nucleosidasa asociada a la membrana (CD39) que metaboliza a monofosfato de adenosina (AMP). AMP es sustrato para ecto-5'nucleotidase (CD73), que forma la adenosina. La adenosina presente en el extracelular puede activar una familia de receptor de adenosina (AR), acoplados a proteína G, o puede ser metabolizada por la adenosina deaminasa tipo 2 (ADA2) presente en el líquido extracelular y formar inosina, o ingresar pasivamente al espacio intracelular por los transportadores de nucleótidos equilibrador (ENT) o activamente a través de transportadores concentrativos de nucleótidos (CNT). La adenosina intracelular se sintetiza por nucleosidasas citosólicas (5'N citosólicas) y también por hidrólisis de S-adenosilhomocisteína (SHA) a través de SHA hidrolasa. La adenosina intracelular es metabolizada por adenosina quinasa (AK) en AMP, o por vía ADA tipo 1 (ADA1) que la transforma a inosina.

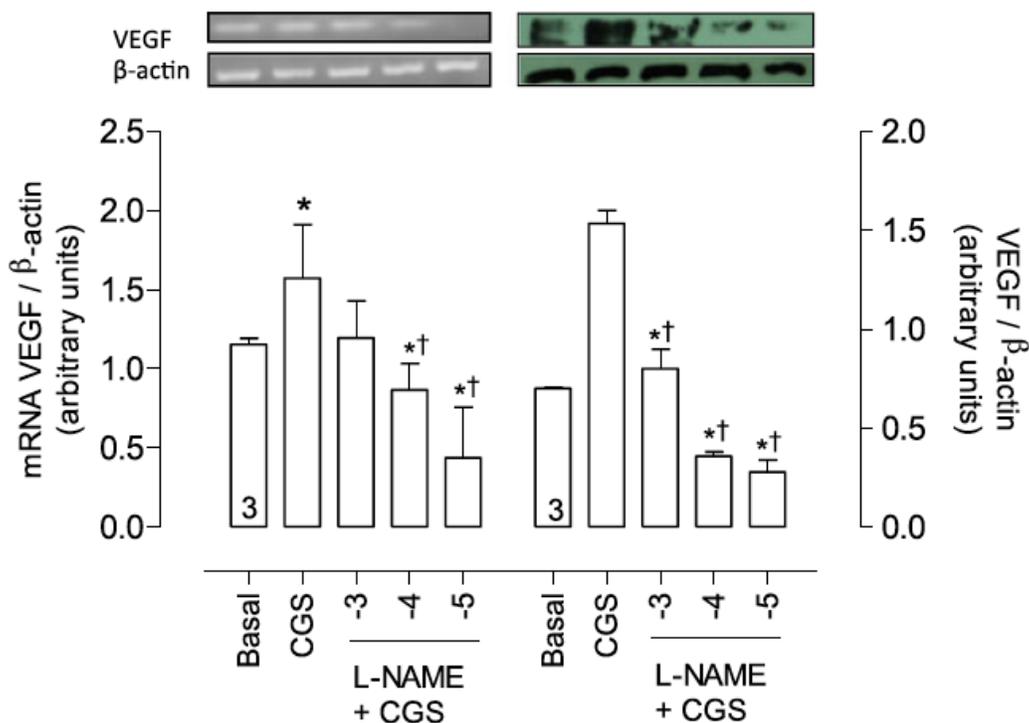


Figura 4. La inhibición de NO revierte la expresión de VEGF mediada por A_{2A}. Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) fueron incubadas por 12 horas con el agonista selectivo A_{2A}, CGS-21680 (100 nM) en ausencia (Basal y CGS) o presencia (L-NAME + CGS) del inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, L-NAME (10⁻³ a 10⁻⁵ M). Bajo estas condiciones se investigaron los niveles de mRNA y de proteína para VEGF. El panel superior muestra una figura representativa de 3 experimentos independientes según condición correlativa en el panel inferior. En el panel inferior la densitometría de mRNA VEGF/18S o VEGF/β actina. *p=0.05 vs basal. †p=0.05 vs CGS-21680. Figura tomada de (Escudero, Bertaglia et al. 2013).

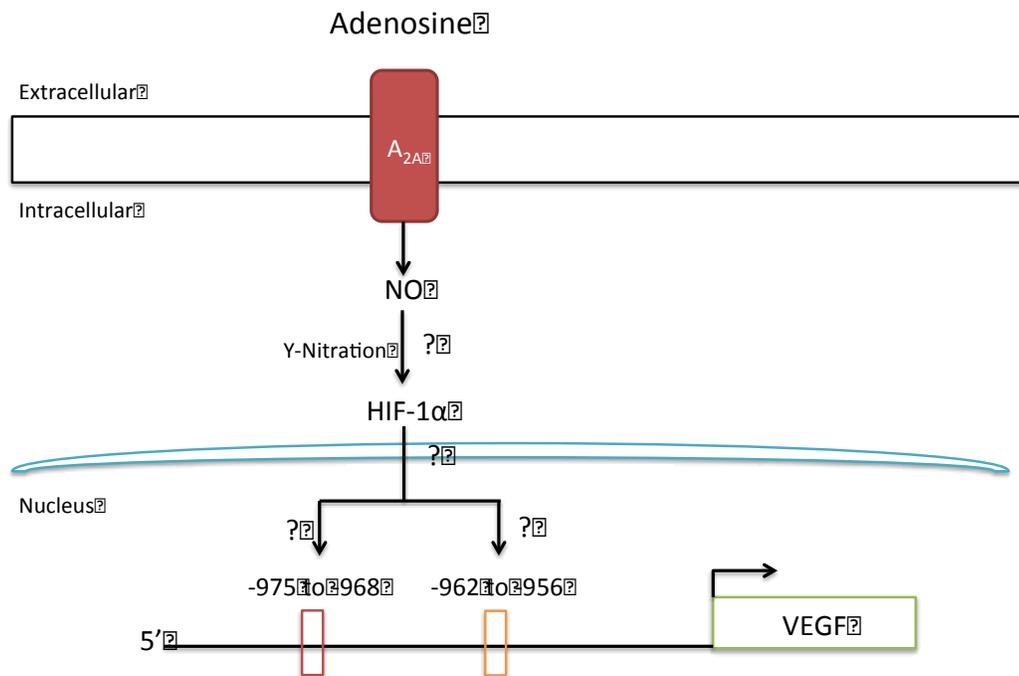


Figura 5. La expresión de VEGF inducida por la vía de señalización A_{2A}-NO puede involucrar a HIF. La estimulación del receptor A_{2A} de adenosina incrementa la expresión de VEGF, por una vía que involucra la síntesis de óxido nítrico (NO). (?) Mecanismo desconocido, que pretende estudiar el promotor de VEGF, y en particular los sitios de unión al factor inducido por hipoxia 1 alfa (HIF-1α) que se encuentran entre -975 a -968 pbs y entre -962 a -956 pbs río arriba del inicio de la transcripción usando células endoteliales derivadas de embarazos normales y pre-eclámpicos. Figura tomada de Escudero et al., 2014.

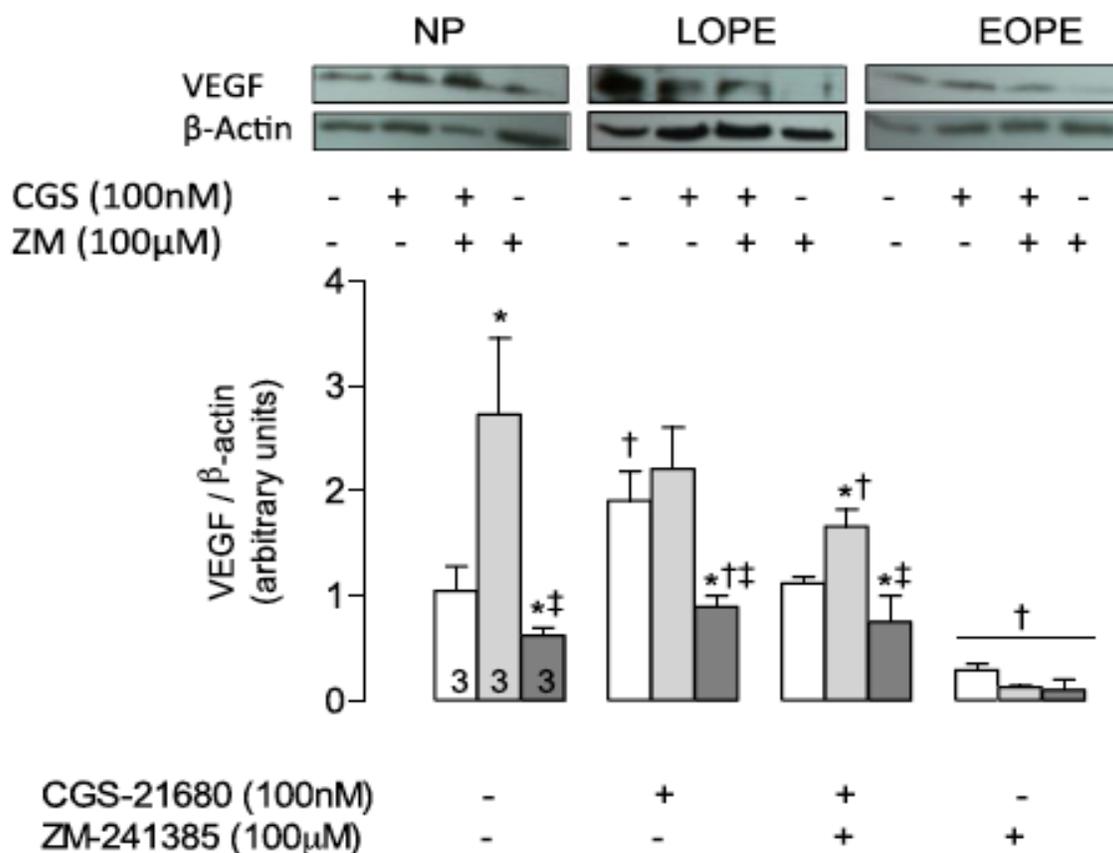


Figura 6. A_{2A} regula la expresión de VEGF en pre-eclampsia. Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) extraídas de embarazos normales (NP, barra blanca), o de pre-eclampsia de inicio tardío (LOPE, barra gris clara) o de pre-eclampsia de inicio temprano (EOPE, barra gris oscura) y expuestas a CGS-21680 (100 nM por 12 h, +) y/o ZM-241385 (100 uM, +) fueron utilizadas para identificar la presencia del factor de crecimiento endotelial (VEGF) mediante ensayos de Western blot. El panel superior muestra figuras representativas de VEGF y el control de carga β-actina. El panel inferior la densitometría de la razón entre VEGF/β-actina. *p=0.05 vs respectivo valor en NP. †p=0.05 vs respectivo valor en condición basal (i.e., sin estimulación). ‡p=0.05 vs respectivo valor en LOPE. Valores expresados en medias ± SEM. El n se expresa en barra respectiva. Figura tomada de (Escudero, Bertoglia et al. 2013)

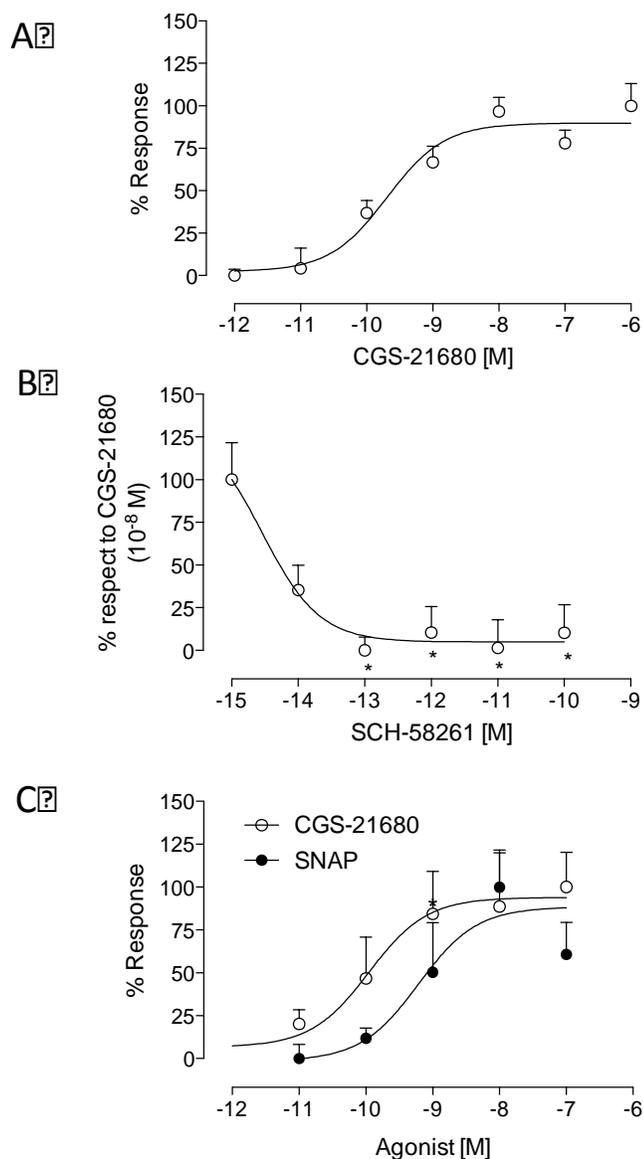


Figura 7. A_{2A} y NO estimulan la proliferación celular. Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) fueron aisladas de embarazos normales y se estimó la proliferación celular por incorporación de bromouridina como se describe en Métodos. Las células fueron incubadas por 24 horas con **A**) CGS-21680 (10^{-6} a 10^{-12} M), **B**) Co-incubadas con CGS-21680 (10^{-8} M, dosis máxima) y SCH-58261 en dosis respuesta (10^{-10} a 10^{-15} M), o **C**) CGS-21680 (10^{-7} a 10^{-12} M, círculos blancos) o con SNAP (10^{-7} a 10^{-11} M). Los resultados se expresan en media \pm SEM. En B, * $p < 0.05$ vs 100% respuesta. $n=5$ por cada ensayo en duplicado.

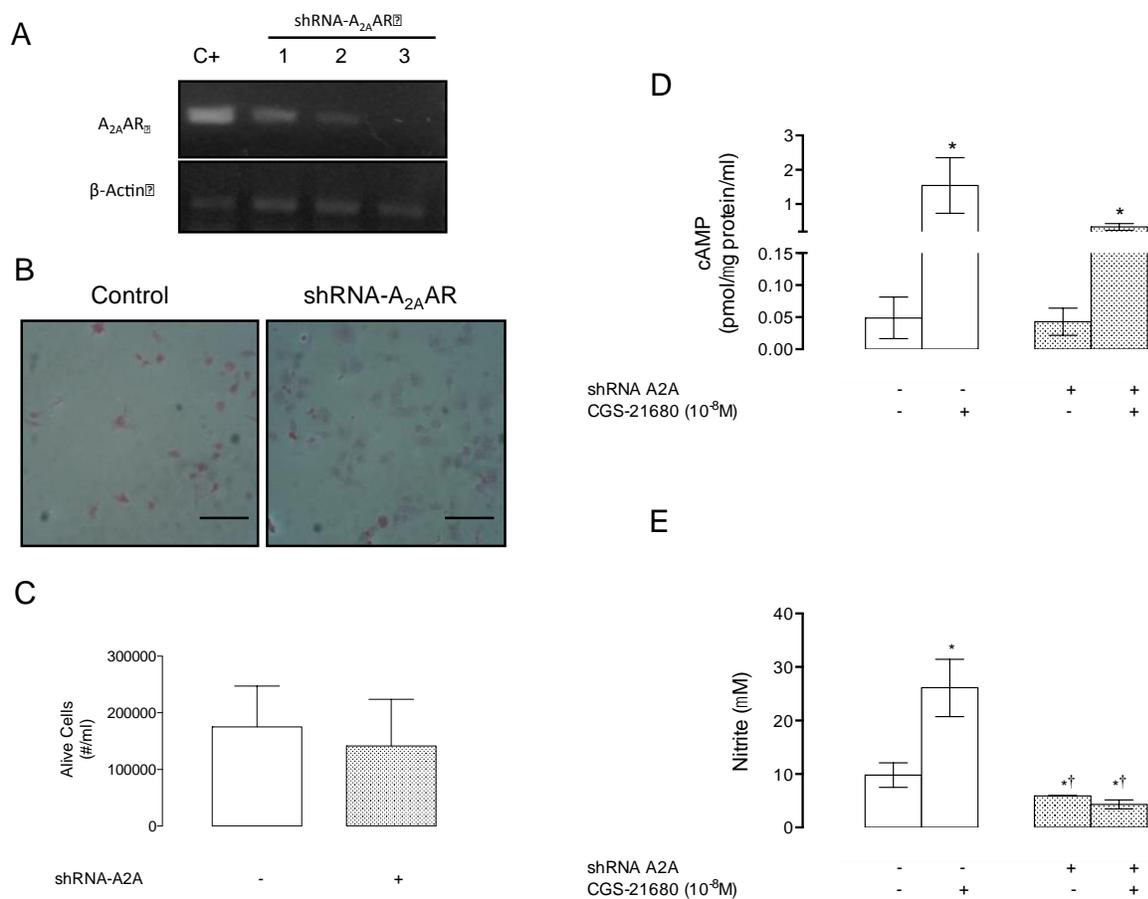


Figura 8. Caracterización de RNA de interferencia para el A_{2A}AR. Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) fueron aisladas de embarazos normales y expuestas al RNA de interferencia para el A_{2A}AR (shRNA-A_{2A}) por 48 horas como se describe en Métodos. **A)** Figura representativa de ensayos de PCR semicuantitativo para el A_{2A}AR (A_{2A}) y su respectivo control de carga β-actina. Control positivo (C+, HUVEC sin transfección). 1, 2 y 3 distintas dosis utilizadas de RNA de interferencia (0.3 a 1 μg/μl). **B)** Inmunocitoquímica de HUVEC para determinar la presencia de la proteína de A_{2A}, en ausencia (Control) o presencia de shRNA-A_{2A}. **C)** Ensayos de sobrevivencia determinado por conteo celular con azul tripán en ausencia (-) o presencia (+) de shRNA-A_{2A}. **D)** Cuantificación de AMPc intracelular en células HUVEC en ausencia (-, barra blanca) o presencia (+, barra achurada) de shRNA-A_{2A} y CGS-21680 (10⁻⁸M). **E)** Cuantificación de nitritos en medio de cultivo como se indica en D. Los resultados se expresan en media ± SEM. En B, barra negra representa 50 μm. En D, *p<0.05 vs respectivo control en ausencia de CGS-21680. En E, *p<0.05 en comparación con control sin CGS-21680 o shRNA A_{2A}. †p<0.05 vs células con CGS-21680 en ausencia shRNA A_{2A}. n=3-5 por cada ensayo en duplicado.

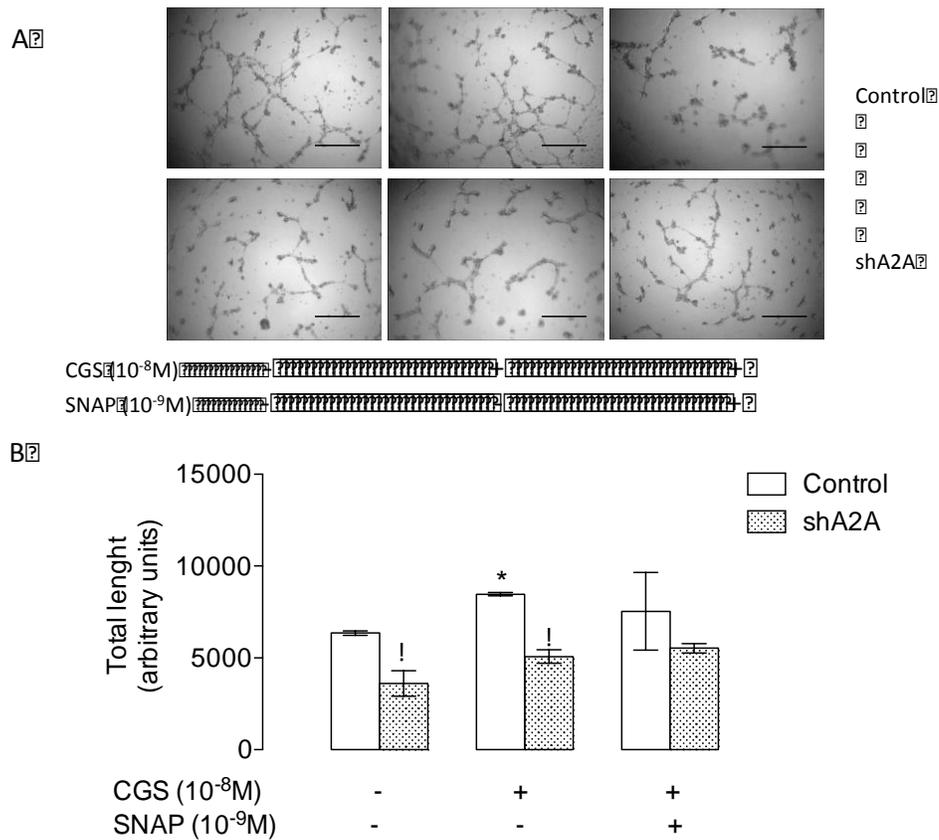


Figura 9. Formación de tubos en presencia de RNA de interferencia para el receptor de adenosina A_{2A} . Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) fueron aisladas de embarazos normales, para ensayos de formación de tubos como se describe en Métodos. **A)** Figura representativa de la formación de tubos, en presencia de CGS-21680 ($10^{-8}M$) y/o SNAP ($10^{-9}M$) en condiciones control o expuestas al RNA de interferencia para el receptor de adenosina (shRNA- A_{2A}). **B)** Cuantificación de la longitud de los tubos en condiciones basales (barra blanca) y en presencia de shRNA- A_{2A} (barra achurada). Los resultados se expresan en media \pm SEM. En B, * $p < 0.05$ vs basal. † $p < 0.05$ vs respectiva condición en células en ausencia shRNA A_{2A} , $n = 3$ por cada ensayo en duplicado.

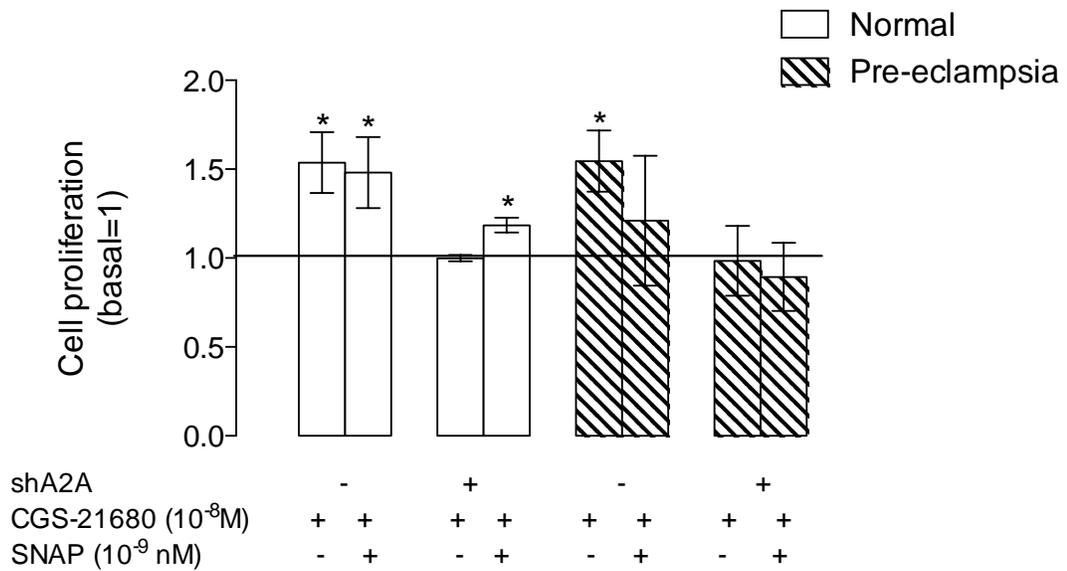


Figura 10. Proliferación celular en embarazos normales y pre-eclámpticos. Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) fueron aisladas de embarazos normales (barras blancas) y pre-eclámpticos (barras achuradas) para estimar la proliferación celular por incorporación de bromouridina. Las células fueron incubadas por 24 horas en ausencia (-) o presencia (+) de CGS-21680 (10⁻⁸ M), SNAP (10⁻⁹ M) y/o shRNA- A_{2A}. La línea señal 1 que corresponde al valor basal sin estimulación. Los resultados se expresan respecto al valor basal en media ± SEM. En B, *p<0.05 vs basal. n=3 por cada ensayo en duplicado.

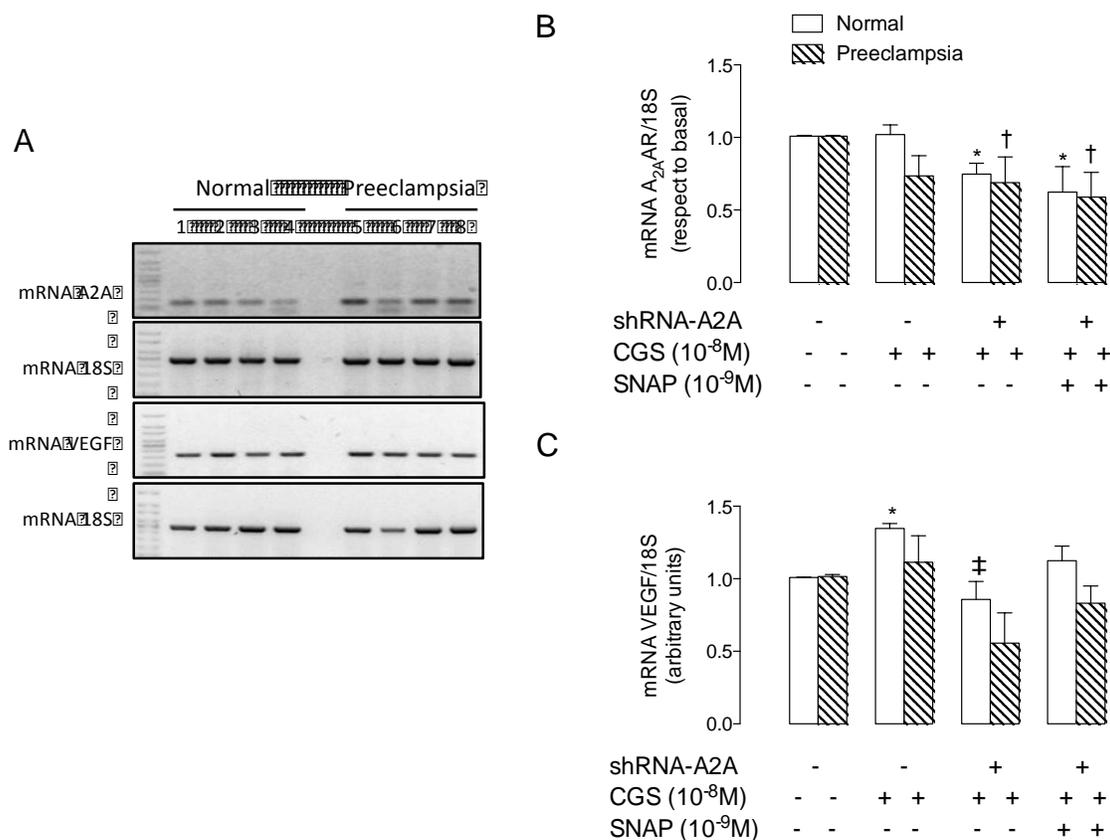


Figura 11. Efecto de la ausencia del receptor A_{2A}AR sobre los niveles de VEGF.

Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) fueron aisladas de embarazos normales y pre-eclámpticos. **A)** Figura representativa de PCR semicuantitativo para el A_{2A}AR, VEGF y sus respectivos controles de carga 18S. 1, 5, en ausencia de CGS-21680 o SNAP. 2 y 6, en presencia de CGS-21680. 3 y 7, en presencia de CGS-21680 y el shRNA-A_{2A}. 4 y 8, en presencia de CGS-21680, SNAP y shRNA-A_{2A}. Células provenientes de embarazos normales (1 a 4) y células de embarazos pre-eclámpticos (5 a 8). **B)** Densitometría de A_{2A}/18S, en células normales (barras blancas) y pre-eclámpticas (barras achuradas) que fueron co-incubadas con CGS y/o SNAP y/o shRNA-A_{2A}, cuya presencia (+) y/o ausencia (-) se marca con respectivos símbolos. **C)** Densitometría de VEGF/18S, en células normales y pre-eclámpticas como se describe en B. Los resultados se expresan en media ± SEM. En B, *p<0.05 vs basal sin tratamiento. †p<0.05 vs células de pre-eclampsia en condición basal. En C, *p<0.05 vs basal normal sin tratamiento. ‡p<0.05 vs CGS-21680 en embarazo normal. n=4 por cada ensayo.

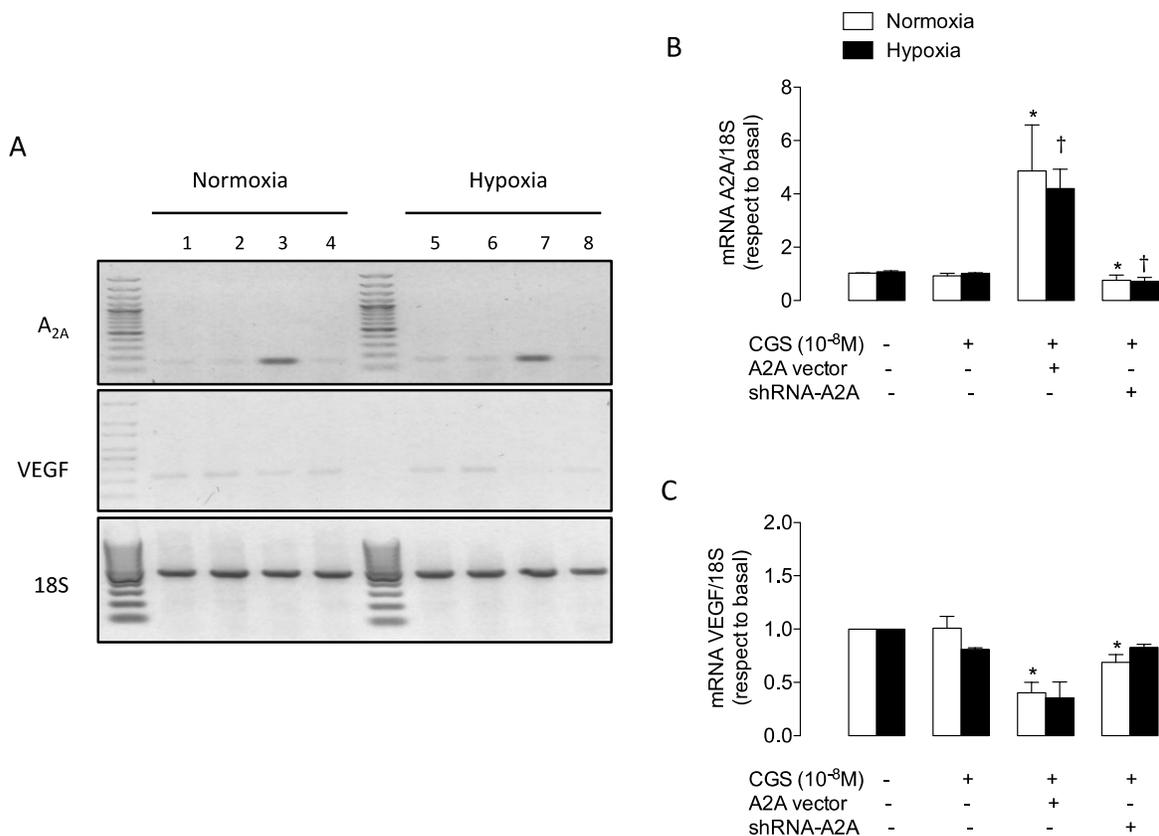


Figura 13. Ensayos de ganancia y pérdida de A_{2A} y expresión de VEGF en hipoxia: Línea celular de HUVEC fueron cultivadas en normoxia (21% oxígeno, barra blanca) e hipoxia (2% oxígeno, barra negra). **A)** Figura representativa de PCR semicuantitativo para A_{2A}AR, VEGF y sus respectivos controles de carga 18S. Los números 1,2,3,4 muestra células cultivadas en condiciones de normoxia (21%O) y 5,6,7,8 en condiciones de hipoxia (2%O). Línea 1 y 5 células control sin tratamiento. Línea 2 y 6, en presencia de CGS-21680. Línea 3 y 7, en presencia de CGS-21680 y el vector CMV-flag 2B-A_{2A}. Línea 4 y 8, en presencia de CGS-21860 y shRNA-A_{2A}. **B)** Densitometría de A_{2A}/18S en condiciones de normoxia e hipoxia e incubadas con CGS previo tratamiento de sobreexpresión o represión del receptor de adenosina A_{2A}. Se marca la presencia (+) y/o ausencia (-) de estos tratamientos. **C)** Densitometría de VEGF/18S como se describe en B. Los resultados se expresan en media ± SEM. En B, *p<0.05 vs basal en normoxia. †p<0.05 vs basal en hipoxia. En C, *p<0.05 vs basal en normoxia. n=4 por cada ensayo en duplicado.

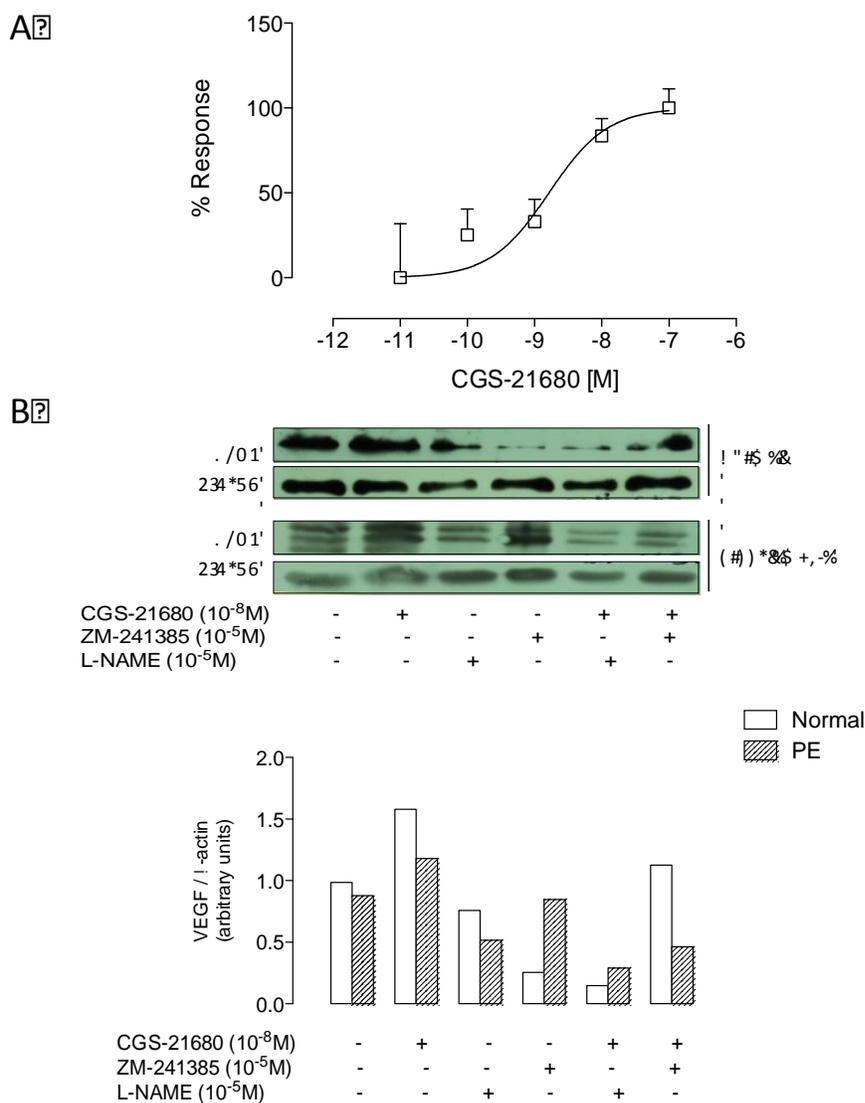


Figura 14. Caracterización de la vía A_{2A} -NO-VEGF en células de la microcirculación de embarazos normales y pre-eclámpticos. Células de la microcirculación extraídas de embarazos normales (barra blanca) y pre-eclámpticos (barra achurada) fueron extraídas como se describe en métodos. **A)** Proliferación celular cuantificada por incorporación de bromouridina en presencia de CGS-21896 (10^{-6} a 10^{-11} M). **B)** Panel superior, imagen representativa de análisis de western blot para VEGF y su respectivo control de carga, β -actina en presencia de CGS-21680 (10^{-8} M) y/o ZM-241385 (10^{-6} M) y/o L-NAME (10^{-5} M) en células provenientes de embarazos normales o pre-eclámpticos. En el panel inferior, densitometría de VEGF/ β -actina según tratamiento indicado en panel superior. La presencia de los fármacos se marca con (+) y la ausencia con (-). En A, n=4. En B, n=2 por grupo.

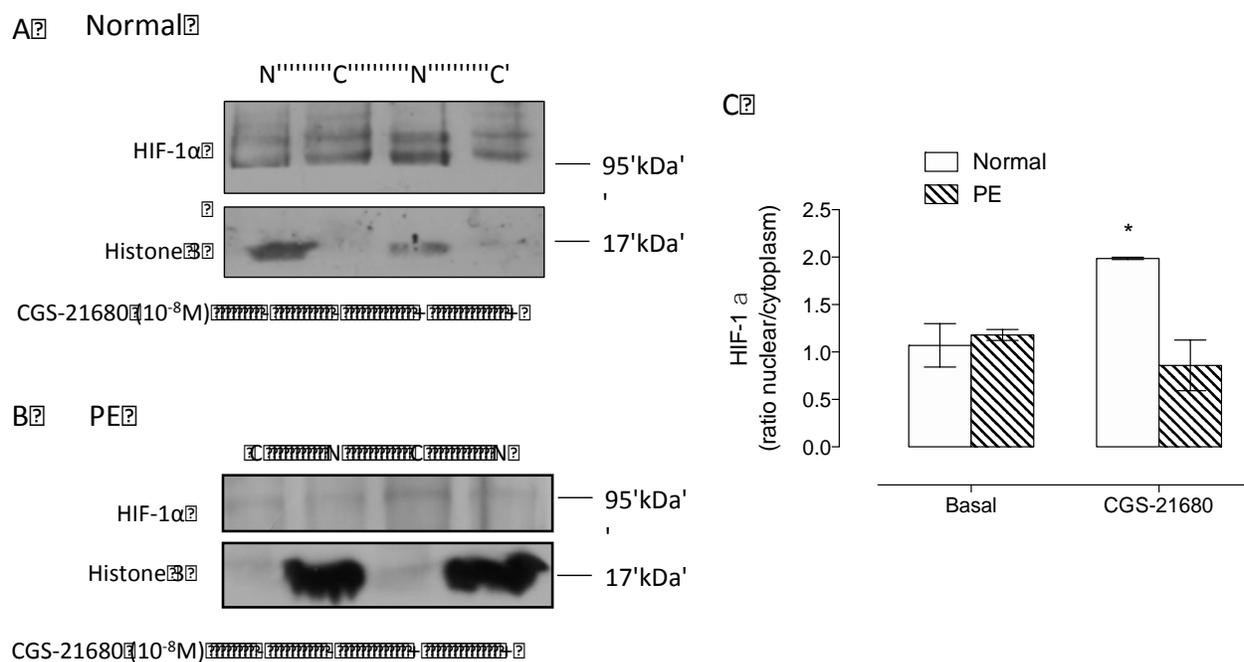
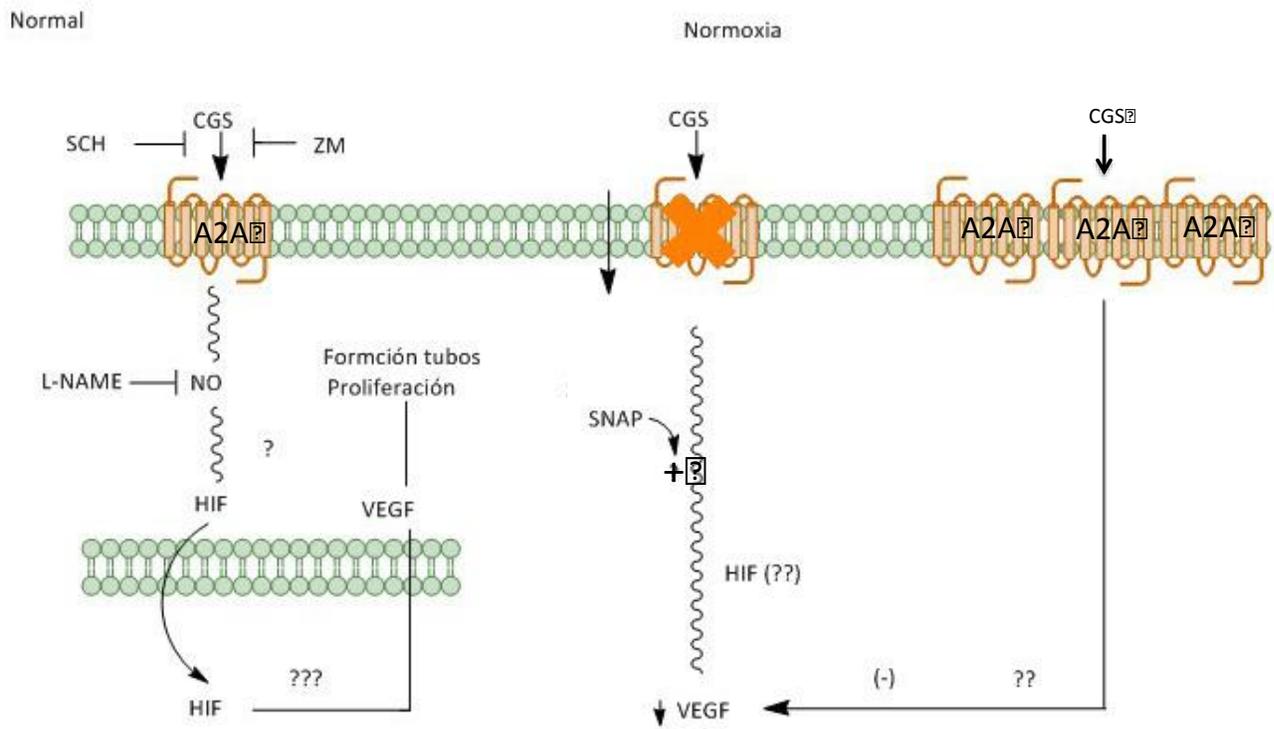


Figura 15. Fraccionamiento celular y translocación nuclear de HIF-1 α . Fraccionamiento celular en HUVEC de embarazos normales y pre-eclámpticos, fue realizado como se describe en métodos. **A)** HIF-1 α y su respectivo control Histona 3 en fracción celular citoplasmática (C) y nuclear (N), en condiciones basales (-) o previa estimulación con CGS-21680 (10⁻⁸M, 12h, +) en células de embarazos normales. **B)** Fraccionamiento celular de células pre-eclámpticas en similares condiciones como A. **C)** Razón de la fracción celular núcleo/citoplasma de HIF-1 α de embarazos normales (barras blancas) y embarazos pre-eclámpticos (barras achuradas), en condiciones basales y en presencia de CGS-21680. Los resultados se expresan en media \pm SEM. En C, *p<0.05 vs basal. n=3 por cada ensayo.

A



B

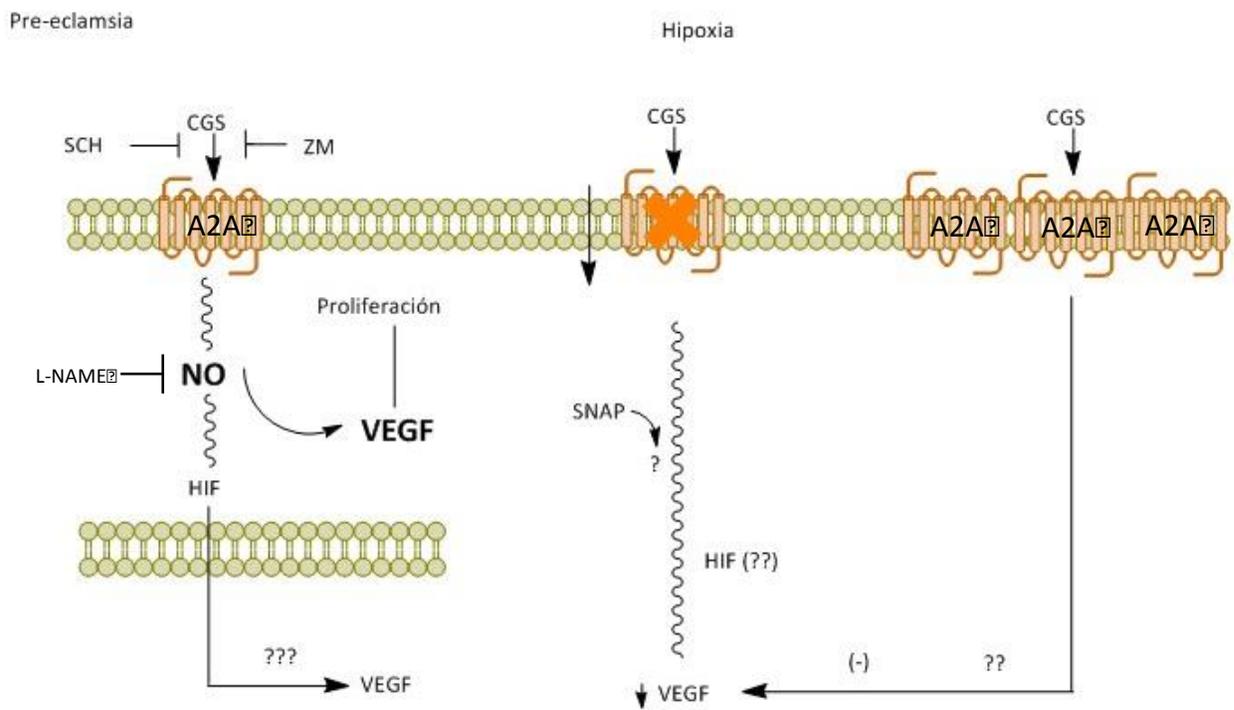


Figura 16. La expresión de VEGF inducida por la vía de señalización A_{2A} -NO puede involucrar a HIF-1 α . En células endoteliales de embarazos normales (HUVEC y hPMEC) cultivados en normoxia (21% oxígeno), la estimulación del receptor A_{2A} de adenosina incrementa la expresión de VEGF, por una vía que involucra la síntesis de óxido nítrico (NO). El incremento de este gas estimularía la translocación de HIF-1 α al núcleo, por una vía que aún no se conoce (?). A su vez, HIF-1 α estimularía la expresión de VEGF y esto produciría un aumento e la proliferación celular y la formación de tubos. En este escenario, en ausencia del receptor A_{2A} generado por un RNA de interferencia, se asocia a disminución de los niveles de VEGF, lo cual se recupera por el donador de NO, SNAP. Paradójicamente, sobreexpresión de A_{2A} AR también disminuye los niveles de mRNA de VEGF. Se desconoce (??) cual sería el mecanismo involucrado. En células endoteliales de pre-eclampsia de inicio tardío (LOPE) se aprecia un aumento basal de la vía A_{2A} -NO-VEGF (Escudero, Bertoglia et al., 2013), sin embargo, no se pudo apreciar si esta regulación involucra traslocación de HIF-1 α al núcleo. En estas células de LOPE, el donador de NO, SNAP, no logra revertir la reducción en los niveles de VEGF generado por el RNA de interferencia para A_{2A} . En hipoxia (2% oxígeno), tanto la represión de A_{2A} como la sobreexpresión del mismo, tienden a disminuir los niveles de VEGF.

IX. Anexos

Anexo 1: Consentimiento Informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Un grupo de investigadores de la Universidad del Bío-Bío y del Hospital Clínico Herminda Marín, se ha interesado en estudiar la capacidad que tienen las células que recubren internamente la vena umbilical (células endoteliales) para la formación de nuevos vasos sanguíneos, durante embarazos normales y en aquellos embarazos que presentan hipertensión arterial (conocida como pre-eclampsia). Como antecedente le podemos contar que la placenta es el tejido encargado de llevar los nutrientes y el oxígeno que el niño(a) requiere para crecer mientras está en el útero de su madre. En algunos casos, como la pre-eclampsia, existe una reducción en el aporte de sangre hacia el feto, por consiguiente la placenta trata de suplir esta deficiencia aumentando el número de vasos sanguíneos. Actualmente existen varios estudios que sugieren que esta adaptación en la formación y funcionamiento de los vasos sanguíneos que ocurre intraútero, podría por un lado contribuir en el normal desarrollo del niño(a) mientras este en útero; sin embargo al salir de este ambiente, podría constituirse en un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades de los mismos vasos sanguíneos (tales como hipertensión) cuando este niño(a) sea adulto.

El objetivo más amplio de nuestras investigaciones, es el de identificar posibles causas por las cuales los niños(as) nacidos de embarazos con pre-eclampsia tienen más riesgo de desarrollar enfermedades de los vasos sanguíneos y el corazón (incluida hipertensión arterial) que aquellos niños(as) nacidos de embarazos normales. Para realizar este estudio, combinaremos la información y resultados que consigamos de estudiar células endoteliales provenientes del cordón umbilical humano y datos clínicos de sus madres y de los niños(as) al nacimiento. Por ello, queremos a través de este consentimiento, solicitar su participación en este estudio y con ello su autorización para: **1) Tomar la placenta y cordón umbilical una vez ocurrido el parto y 2) Revisar su ficha clínica**, lo que permitirá tener los antecedentes patológicos personales y familiares.

El investigador responsable de este estudio es el Dr. Carlos Escudero, del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad del Bío-Bío. Si tiene alguna pregunta o requiere una información más amplia sobre la investigación, usted puede contactarse con el investigador responsable llamando al teléfono 42-2463256 (oficina) o al celular 09-65655127 o al correo electrónico cescudero@ubiobio.cl

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad del Bío-Bío y el Comité Ético Científico del Hospital Clínico Herminda Martín de Chillán, si usted tiene alguna duda sobre sus derechos en este proyecto o si quiere denunciar alguna irregularidad, usted puede contactarse con el Dr. Sergio Acuña, Director de Investigaciones de la Universidad del Bío-Bío, al teléfono 41-273 1633 o con el Dr. Raul Franco, Presidente del Comité Ético Científico del Hospital, al teléfono 42-586594, anexo Minsal 426594.

Es importante que usted sepa que en este estudio:

1. Este consentimiento y su autorización se tomará antes de iniciar cualquier tipo de ensayo o análisis durante nuestro estudio.
2. La selección de las pacientes que serán invitadas a participar en el proyecto será realizada por los profesionales (Médicos y Matronas) que trabajan en la Maternidad del Hospital Herminda Martín.
3. Las placentas y muestras de sangre de cordón umbilical serán obtenidas después del parto (normal o cesárea). Una vez nacido su hijo/hija, y cuando la placenta haya sido expulsada del útero (alumbamiento).

Sede Concepción

Avda. Collao N°1202 Casilla 5-C Fonos: (56-41)731200 Fono/Fax: (56-41)731040 - VIII Región - Chile

Sede Chillán

Avda. Andrés Bello s/n Casilla 447 Fono/Fax: (56-42)253000 - VIII Región - Chile

E-mail: ubb@ubiobio.cl

www.ubiobio.cl



UNIVERSIDAD DEL BÍO-BÍO



4. Después del alumbramiento la placenta no presta ninguna función por tanto la utilización de su placenta en este estudio no involucra ningún riesgo para su hijo/hija o para usted, ya que la placenta es un tejido que normalmente se desecha después del parto.
5. Después de obtener las células endoteliales de la placenta, que son de interés para este estudio, el tejido que no sea utilizado será desechado con el resto del material biológico de acuerdo a normas de bioseguridad de la Universidad. El material desechado no será usado en estudios genéticos.
6. Si decide participar en esta investigación, no tendrá ningún costo ni beneficio económico para usted. Todos los costos de esta investigación serán asumidas por el proyecto a cargo del grupo de investigadores.
7. Su participación en este estudio no la beneficiará directamente a usted ni a su hijo/hija. Sin embargo la donación de su placenta ayudará a los investigadores a conocer aspectos importantes de la función de la placenta en embarazos normales o con pre-eclampsia que hasta la fecha se desconocen.
8. Es importante que quede claro que sus antecedentes clínicos y personales serán confidenciales. Esta información sólo la conocerá el equipo de profesionales que trabaja en este proyecto. Además, toda su información será codificada en donde se excluirán cualquier dato que pueda servir para su identificación. La información recogida en la investigación será utilizada en la generación de reportes de investigación.
9. Usted es completamente libre de decidir si participa o no en este proyecto de investigación o aceptar participar y luego cambiar de opinión, sin que esa decisión perjudique la atención médica que usted reciba de parte de los profesionales de esta unidad. Si usted retira su consentimiento el material obtenido no será usado y será eliminado. Su información médica tampoco será usada.
10. Si considera conveniente, Usted puede consultar con alguna otra persona antes de decidir aceptar definitivamente su participación.
11. Este documento se firmara en dos ejemplares, uno para usted y otro para archivos del proyecto.

Yo, _____ después de recibir la información
(escriba su nombre con letra clara)
necesaria y de aclarar todas mis dudas, autorizo la revisión de mi ficha clínica y el uso de mi placenta para los fines de este proyecto de investigación.

RUT: _____ FIRMA: _____ FECHA: _____

Investigador Responsable FIRMA: _____ FECHA: _____

Comité de Bioética FIRMA: _____ FECHA: _____

Sede Concepción
Avda. Collao N°1202 Casilla 5-C Fonos: (56-41)731200 Fono/Fax: (56-41)731040 - VIII Región - Chile

Sede Chillán
Avda. Andrés Bello s/n Casilla 447 Fono/Fax: (56-42)253000 - VIII Región - Chile

E-mail: ubb@ubiobio.cl
www.ubiobio.cl

Anexo 2: Abreviaturas

ADA: adenosina deaminasa	IL-1 β : interleuquina 1 β
ADMA: dimetil arginina asimético	LOPE: Embarazo pre-eclámpticos de inicio tardío
AINES: anti-inflamatorios no esteroideos	LDH: lactato deshidrogenasa
AK: adenosina kinasa	L-NAME: L-nitro-arginina metil ester
ATL146e: 4-(3-(6-amino-9-(5-etilcarbamoil-3,4-dihidroxi-tetrahydro-furan-2-il)-9H-purina-2-il)-prop-2-inil)-ácido ciclohexanecarboxilico metil éster	LPS: lipopolisacáridos
B1R: receptores de cininas B1	MAPK: Protein kinasa activada de mitogénico
cAMP: adenosin monofosfato cíclico	MRS1754: N-(4-ciano-fenil)-2-(4-(2,6-dioxo-1,3-dipropil-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-purin-8-il)-fenoxi)acetamida.
CCPA: 2-cloro-N6-ciclopentiladenosina	NBTI: nitrobenziltioinosina riboosido
CD39: enzimas 5' - nucleotidasa o ecto-apirastas.	NECA: 50-N-etil-carboxamidoadenosina;
CD73: 5' - nucleosidasa	NF- κ B: factor nuclear kappa de linfocitos B.
cGMP: guanosin monofosfato cíclico.	nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal
CGS-21680: 2-(p-(2-carbonil-etil)-feniletilamino)-50-N-etilcarboxamidoadenosina;	NO: óxido nítrico
DPMA: N6-(2-(3,5--Dimetoxifenil)-)-2-(metilfenil)etil) adenosina	NOS: óxido nítrico sintasa
EOPE: Embarazo pre-eclámptico de inicio temprano	ONOO-: peroxinitrito
ERK: Proteína cinase ativada por señales extracelulares	PAD: presión arterial diastólica
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial	PAM: presión arterial media
hA2AR: receptor de adenosina humano tipo A2A	PAS: presión arterial sistólica
hA2BR: receptor de adenosina humano tipo A2B	PCAM-1: molécula de adhesión de plaquetas y endotelio tipo 1
HUVEC: Endotelio de vena umbilical humano	PCM: medio de cultivo primario
HC-HMC: Hospital Clínico Herminda Martin Chillán	shRNA: RNA de interferencia
HMEC-1: endotelio microvascular de la piel humana	SNAP: S-nitroso-N-acetilpenicilina
HIF: Factor inducible por hipoxia	VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
	ZM-241385: 4-(2-(7-amino-2-(2-furil)-(1,2,4)triazolo(2,3-a){1,3,5}triazin-5-il-amino)etil)fenol;

