

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE FARMACIA**



**Tesis para optar al Grado de Magíster en Bioquímica Clínica  
e Inmunología**

**EI ESTRÉS OXIDATIVO Y LA iNOS PROMUEVEN UNA  
DISMINUCIÓN DE ELEMENTOS ASOCIADOS A  
CARDIOPROTECCIÓN EN EL CORAZON FETAL DE UN  
MODELO DE CONEJO CON RETARDO DE  
CRECIMIENTO INTRAUTERINO (RCIU)**

**LISSET MARLENNE PUENTES TOLEDO**

**TUTORES**

**Dr. Cristóbal Alvarado Livacic**  
(Facultad de Medicina,  
Universidad Católica de la Santísima  
Concepción)

**Dr. Carlos E. Irarrázabal**  
(Laboratorio de Fisiología Integrativa  
Molecular, Universidad de los Andes)

**PATROCINANTE**

**Dr. Claudio Aguayo Tapia**  
Dpto. Bioquímica Clínica e  
Inmunología  
Facultad de Farmacia Universidad de  
Concepción

**CONCEPCIÓN-CHILE  
(2019)**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi sostenedor y refugio durante todo este proceso que trajo muchos aprendizajes. A mi familia nuclear quienes siempre han tenido las palabras oportunas para ayudarme a cumplir mis metas. En especial a mi madre que cuidó de mi pequeña con amor y ternura para que yo trabajara con tranquilidad y confianza. A mi padre, que no cesó de acompañarme emocionalmente y en sus oraciones. A mi amado esposo, quien es mi apoyo incondicional en todo y es mi ejemplo de constancia para concretar mis sueños. A mi pequeña hija Maite, quien me acompañó desde el vientre al realizar mis experimentos y me brindó sus continuas “pataditas” que me decían: ¡Vamos mamá, tu puedes!. A mi familia extendida y hermanos en Cristo por sus oraciones y palabras de fortaleza constantes. A mi abuelita y sus dulces palabras y consejos que siempre me han instado a luchar por mis sueños. A mis amigas y colegas Soraya Villaseca y Bárbara Alarcón quienes me brindaron su constante apoyo y no dudaron en tenderme la mano cuando más lo necesite. A los académicos de la Facultad de Química y Farmacia, Claudio Aguayo y Felipe Zuñiga por su buena voluntad para colaborar y por resolver mis dudas. A Dra. Paula Aracena por acompañarme desde el área técnica Redox, por transmitirme su experiencia y experticia con gentileza. A Dr. Cristóbal Alvarado por su apoyo, por sus gestiones y acompañamiento durante este amplio proceso y por resolver todas las dudas que surgieron en el camino con mucha disposición. A Dr. Carlos Irrázabal y su equipo de trabajo, quienes me recibieron con amabilidad y compañerismo durante mi estadía en Santiago. Quisiera cerrar con el versículo que me acompañó y ayudó a mantener mi foco en la meta: “Todo lo que hagan, hacedlo para la Gloria de Dios” (1 Corintios 10:31).

## ÍNDICE GENERAL

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
Abreviaturas	I
Índice de figuras	II
Índice de tablas	III
1) Resumen	7
2) Abstract	11
3) Introducción	
3.1) Marco Teórico:	15-27
- RCIU e impacto en la vida adulta	15
-RCIU y la reprogramación fetal	16
- Modelo de RCIU en el conejo	17
-Estrés oxidativo, HIF-1 $\alpha$ e iNOS	19
-Marcadores de cardioprotección	24
3.2) Problema y Pregunta de Investigación	28
3.3) Hipótesis	29
3.4) Objetivos	30
4) Materiales y metodología	31-40
5) Resultados	41-59
6) Discusión	60-63
7) Conclusiones y Proyecciones	64-65
8) Anexo	66-68
9) Bibliografía	69-78



## ABREVIATURAS

**3-NT:** 3-nitrotirosina

**AKT:** proteína quinasa específica  
serina/treonina

**BCA:** ácido bicinónico

**BH4:** factor tetrahidrobiopterina

**CBP/p300:** proteína de unión a CREB

**cGMP:** guanosinmonofosfato cíclico

**Ciclo TCA:** ciclo del ácido  
Tricarboxílico

**COX-2:** cicloxigenasa-2

**DTNB:** ácido 2-nitrobenzoico

**eNOS:** Oxido nítrico sintasa endotelial

**EPO:** eritropoyetina

**ERK:** proteína Kinasa regulada por  
señal extracelular

**GLUT-1:** Transportador de glucosa 1

**GR:** glutatión reductasa

**GSH:** Glutatión

**GSSG:** Glutatión oxidado

**HIF-1 $\alpha$ :** factor 1-alfa inducido por  
hipoxia

**HO-1:** hemoxigenasa-1

**HSP70:** Proteína de choque térmico  
70

**IL-1beta:**interleuquina 1 beta

**iNOS:** Oxido nítrico sintasa inducible

**IUGR:**Intrauterinegrowthrestriction

**KLF-2:** factor de transcripción  
Krüppel

**MEF:** células fibroblastos  
embrionarios de ratón

**MMP:**metaloproteinasas

**NF-kb:** factor de transcripción nuclear  
kappa beta

**nNOS:** Oxido nítrico sintasa neuronal

**NO:** oxido nítrico

**PHD:**Prolyl-hidroxilación

**PI3Kp110 $\alpha$ :** fosfatidilinositol-3  
quinasa subunidad p110 alfa

**RCIU:** Restricción de crecimiento  
intrauterino

**RCUP:** Restricción de la circulación  
uteroplacentaria

**ROS:** especies reactivas a nitrógeno

**SDS-PAGE:** gel de poliacrilamida con  
dodecilsulfato de sodio

**TBARS:** sustancias reactivas al  
ácido-2 tiobarbitúrico

**TLR-4:**Tolllike receptor 4

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  
alfa

**Valor CT:** ciclo umbral

**VEGF:** Factor de crecimiento  
endotelio vascular

## INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PAGINA
<b>Figura 1.</b> Gráfico Conc. GSH total v/s grupos de estudio	42
<b>Figura 2.</b> Gráfico Conc. GSH reducido v/s grupos de estudio	42
<b>Figura 3.</b> Gráfico Conc. GSH oxidado v/s grupos de estudio	43
<b>Figura 4.</b> Gráfico GSH/GSSG v/s grupos de estudio	43
<b>Figura 5.</b> Gráfico Potencial reducido por GSH/GSSG v/s grupo de estudio	44
<b>Figura 6.</b> Gráfico Conc. TBARS v/s grupos de estudio	44
<b>Figura 7.</b> Formación de 3-nitrotirosina	45
<b>Figura 8.</b> Expresión de proteínas 3-NT en corazones RCIU y controles	46
<b>Figura 9.</b> Tinción Azul de Comassie en gel SDS-PAGE	48
<b>Figura 10.</b> Prueba anticuerpo secundario	48
<b>Figura 11.</b> Western Blot anti-GLUT-1 en corazones RCIU y controles	48
<b>Figura 12.</b> Expresión de proteínas AKT en corazones RCIU y controles	51
<b>Figura 13.</b> Western Blot anti-PI3Kp110 $\alpha$ en corazones RCIU y controles	52
<b>Figura 14.</b> Expresión de proteínas ERK 1/2 en corazones RCIU y controles	53
<b>Figura 15.</b> Expresión de proteínas HSP70 en corazones RCIU y controles	54
<b>Figura 16.</b> Expresión de proteínas TLR-4 en corazones RCIU y controles	56
<b>Figura 18.</b> $\Delta\Delta$ CT del gen IL-1beta en corazones RCIU y controles	59

## INDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PAGINA
<b>Tabla 1.</b> Anticuerpos utilizados para Western Blot	37
<b>Tabla 2.</b> Primers	39
<b>Tabla 3.</b> Protocolo Power SYBR Green PCR Master Mix	39
<b>Tabla 4.</b> Valores CT de gen IL-1beta y 18S	57



## RESUMEN

**INTRODUCCION.** La restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), es una condición que se caracteriza por una disminución del potencial de crecimiento genético a nivel fetal que puede ocasionar mayor predisposición a enfermedades en el estado adulto tales como diabetes, hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares e hipertensión. Esta condición puede ser explicada mediante la “hipótesis de Barker”; que establece que durante este estado se produce una reprogramación genética a nivel fetal como respuesta a distintas noxas (preeclamsia, malnutrición, hipoxia) en el ambiente intrauterino del desarrollo fetal. Los cambios en la expresión génica durante la vida fetal, pueden implicar un desarrollo anormal de los tejidos durante la vida intrauterina, afectando la correcta formación y maduración de órganos como el cerebro, riñón, hígado y el corazón. En la actualidad, se ha demostrado que el RCIU produce reprogramación cardíaca a nivel fetal, produciendo alteraciones en la fisiología y la estructura del sistema cardiovascular en la vida adulta. Estudios recientes han indicado que la hipoxia fetal durante el embarazo promueve un aumento de la postcarga cardíaca fetal, llevando a un engrosamiento de la pared ventricular y aórtica, concomitantemente con un aumento de los niveles de proteínas modificadas por estrés oxidativo (nitrosilación de residuos de tirosina de proteínas, 3-NT) y de la expresión de la proteína de choque térmico 70 (**HSP70**). Usando un modelo de restricción de crecimiento intrauterino en conejas, mediante la restricción de la circulación uteroplacentaria (RCUP), hemos observado por análisis histológico del corazón fetal, regiones con congestión vascular. Adicionalmente, observamos que la forma endotelial de la oxido nítrico sintasa (eNOS) experimentó un aumento de la expresión proteica y activación (fosforilación en Ser-1177) en los

corazones de fetos con RCUP. Interesantemente, observamos un aumento de la expresión de hem oxigenasa 1(HO-1) y la forma inducible de NOS (iNOS) en relación a los fetos sin RCUP de la misma madre. Estos datos sugieren que el corazón fetal con RCUP está experimentando cambios en los niveles de óxido nítrico (ON) y estrés oxidativo, ambiente que podría promover la remodelación cardíaca fetal en respuesta a la hipoxia en el modelo RCIU. Adicionalmente, se ha descrito que la hipoxia promueve estrés oxidativo en el corazón fetal, activando la vía MAPK/ERK lo que conlleva a la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-kB) que promueve la producción de citoquinas proinflamatorias (**IL-1beta**, TNF- $\alpha$ ). Estos mediadores inflamatorios así como NO inducen la expresión del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , que también puede ser activado vía receptor tipo toll-4 (**TLR-4**). El resultado de la activación de HIF-1 $\alpha$  desencadena en una serie de respuestas adaptativas a través de la activación transcripcional de genes inducibles por hipoxia como el factor de crecimiento endotelio vascular (**VEGF**) que promueve angiogénesis y el transportador de glucosa-1 (**GLUT-1**), dos procesos controlados por la señalización **PI3K/Akt**. Nuestro estudio es pionero en describir un conjunto de marcadores moleculares (**PI3K/Akt, ERK, HSP70, TLR-4 y IL-1beta**) en el corazón de fetos de conejas y el efecto de un modelo de restricción de la circulación uteroplacentaria.



## **OBJETIVO.**

Describir los cambios entre la expresión de Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS), el estrés oxidativo, HIF-1 $\alpha$  y los elementos cardioprotectores (PI3Kp110 $\alpha$ / AKT, ERK 1/2, TLR-4, IL-1b, HSP70) en el corazón fetal usando un modelo de RCIU en conejas.

## **METODOLOGÍA.**

La restricción de la circulación uroplacentaria en conejas se realizó mediante la ligadura de 40-50% de los vasos útero-placentarios en el día 25 de gestación (83% de la gestación total, 30 días del proceso normal de gestación). Se analizó corazones fetales de controles y con RCIU (n=10 muestras total), en los cuales se evaluó los niveles de GSH, GSSG y TBARS mediante espectrofotometría. Adicionalmente, por Western Blot (n=14 muestras total) se estudió los niveles de proteínas modificadas (3-nitrotirosinas). Adicionalmente, se midieron los genes blancos de HIF-1 $\alpha$  asociados a angiogénesis (VEFG) y transporte de glucosa (GLUT-1). Finalmente, se estableció la expresión de elementos asociados a cardioprotección (AKT, HSP70, ERK) y asociados a inflamación (TLR-4 e IL-1beta).

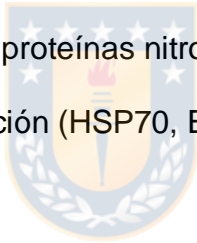
## **RESULTADOS.**

El modelo de RCIU produce una disminución del tamaño de los fetos expuestos a esta condición comparados con los fetos controles. Los corazones fetales de RCIU fueron más pequeños que los controles, pero no se observaron diferencias en la razón peso corazón/ peso fetal. No observamos cambios en los niveles de la razón de GSH/GSSG en los corazones fetales con RCIU en comparación con controles. Sin embargo, interesantemente encontramos un aumento significativo en los niveles de

lipoperoxidación en los corazones fetales con RCIU (TBARS; \*,p <0,0001). Adicionalmente, se registró un aumento en la expresión de proteínas nitrosiladas (3-NT) en los corazones fetales con RCIU. No se observaron diferenciación en los niveles de HSP70, AKT, y ERK1/2 en los corazones fetales asociados a RCIU. Finalmente, tampoco se observaron cambios significativos en la expresión de mediadores de inflamación (TLR-4 e IL-1beta).

### **CONCLUSIONES.**

Durante la restricción de la circulación uteroplacentaria al final de la gestación, el corazón fetal sufre un aumento del estrés oxidativo caracterizado por un incremento de la lipoperoxidación de membranas y proteínas nitrosiladas, sin cambios en la expresión de factores asociados a cardioprotección (HSP70, ERK 1/ 2, AKT) o inflamación (TLR-4/ IL-1β).



## ABSTRACT

Intrauterine growth restriction (IUGR) is a condition that is characterized by a decrease in the potential for genetic growth at the fetal level that may cause a greater predisposition to diseases in the adult state such as diabetes, hypercholesterolemia, cardiovascular diseases, and hypertension. This condition can be explained by the "Barker hypothesis"; which establishes that during this state a genetic reprogramming occurs at the fetal level in response to different noxious (preeclampsia, malnutrition, hypoxia) of the intrauterine environment of fetal development. Changes in gene expression during fetal life may involve abnormal tissue development during intrauterine life, affecting proliferation, differentiation in organs such as the brain, kidney, liver, and heart. At present, the IUGR has been shown to produce cardiac reprogramming at the fetal level, causing alterations in the physiology and structure of the cardiovascular system in adulthood. Recent studies have indicated that fetal hypoxia during pregnancy promotes an increase in fetal cardiac afterload, leading to a thickening of the ventricular and aortic wall, concomitantly with an increase in the levels of proteins modified by oxidative stress (nitrosylation of tyrosine residues of proteins, 3-NT) and the expression of heat shock protein 70 (HSP70).

Using an intrauterine growth restriction model in rabbits, through restriction of the uteroplacental circulation (RCUP), we have observed by histological analysis of the fetal heart, regions with vascular congestion. In addition, we observed that the endothelial form of nitric oxide synthase (eNOS) experienced an increase in protein expression and activation (phosphorylation in Ser-1177) in fetuses hearts with RCUP. Interestingly, we observed an increase in the expression of heme oxygenase 1 (HO-1) and the inducible form of NOS (iNOS) in relation to fetuses without RCUP of the same wood. These data

suggest that the fetal heart with RCUP is experiencing changes in nitric oxide (NO) levels and oxidative stress, an environment that would promote fetal cardiac remodeling in response to hypoxia in the RCIU model. In addition, it has been described that hypoxia promotes oxidative stress in the fetal heart, activating the MAPK / ERK pathway which leads to the activation of the nuclear transcription factor kappa B (NF-kB) that promotes the production of proinflammatory cytokines (IL- 1 beta, TNF- $\alpha$ ). These inflammatory mediators as well as NO induce the expression of the transcription factor HIF-1 $\alpha$ , which can also be activated via a toll-4 receptor (TLR-4). The result of the activation of HIF-1 $\alpha$  triggers in a series of adaptive responses through transcriptional activation of hypoxia-inducible genes such as vascular endothelial growth factor (VEGF) that promotes angiogenesis and glucose-1 transporter (GLUT - 1), two processes controlled by PI3K / Akt signaling. Our study is a pioneer in describing a set of molecular markers (PI3K / Akt, ERK, VEGF, GLUT-1, and IL-1beta) in the heart of rabbit fetuses and the effect of a restriction model of the uteroplacental circulation.

#### **OBJECTIVE.**

Describe the changes between the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), oxidative stress, HIF-1 $\alpha$  and cardioprotective elements (PI3Kp110 $\alpha$  / AKT, ERK 1/2, TLR-4, IL-1b, HSP70) in the fetal heart using an RCIU model in rabbits.

## **METHODOLOGY.**

The restriction of uteroplacental circulation in rabbits is performed by ligation of 40-50% of the uterus-placental vessels on the 25th day of gestation (83% of the total gestation, 30 days of the normal gestation process). Fetal control hearts and RCIU were analyzed (n = 10 samples in total), in which the levels of GSH, GSSG, and TBARS were evaluated by spectrophotometry. In addition, by Western blot (n = 14 samples in total) the levels of modified proteins (3-nitrotyrosine) were studied. In addition, the white HIF-1 $\alpha$  genes associated with angiogenesis (VEFG) and glucose transport (GLUT-1) were measured. Finally, the expression of elements associated with cardioprotection (AKT, HSP70, ERK) and associated with inflammation (TLR-4 and IL-1beta) was detected.

## **RESULTS.**

The RCIU model produces a decrease in the size of fetuses affected to this condition compared to fetus controls. The RCIU fetal hearts were smaller than the controls, but no differences were observed in the heart weight / fetal weight ratio. There are no changes in the levels of the GSH / GSSG ratio in fetal hearts with RCIU compared to controls. However, we found a significant increase in lipoperoxidation levels in fetal hearts with RCIU (TBARS; \*, p <0.0001). In addition, an increase in the expression of nitrosylated (3-NT) proteins in fetal hearts with RCIU was added. No differentiation is observed in the levels of HSP70, AKT, and ERK1 / 2 in the fetal hearts associated with RCIU. Finally, no significant changes were observed in the expression of inflammation mediators (TLR-4 and IL-1beta).

## CONCLUSIONS

During the restriction of the uteroplacental circulation at the end of pregnancy, the fetal heart suffers an increase in oxidative stress characterized by an increase in lipoperoxidation of membranes and nitrosilated proteins, without changes in the expression of factors associated with cardioprotection (HSP70, ERK 1 / 2, AKT) or inflammation (TLR-4 / IL-1 $\beta$ ).



## MARCO TEÓRICO

### Retardo de Crecimiento IntraUterino e impacto en la vida adulta

La restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), es una condición en la que se produce una disminución del crecimiento, relativo a su potencial de crecimiento genético, que se ha asociado a una mayor predisposición a enfermedades en el estado adulto. Dicha condición ha sido propuesta con la “hipótesis de Barker”; que describe el fenómeno de programación genética desadaptativa del feto inducida por estímulos o noxas del ambiente intrauterino durante las fases críticas del desarrollo fetal (1,2). Se ha descrito que las condiciones que afectan la salud materna (afectada malnutrición) y el desarrollo placentario (modificado por patologías tales como preclampsia) durante el embarazo pueden inducir el RCIU. Esta condición ocurre en alrededor del 6% de todos los embarazos y se asocia con un mayor riesgo de complicaciones neonatales (3,4), muerte fetal (4,5), hipoxia al nacimiento (4) y desarrollo neurológico alterado (5,6). Además, numerosos estudios sugieren una asociación entre el RCIU y las enfermedades crónicas del adulto, tales como diabetes mellitus (7), hipercolesterolemia (8), enfermedades cardiovasculares e hipertensión (9). Los lactantes humanos con RCIU que pesan menos de 2,5 Kg al nacer, poseen 30 veces más mortalidad en la vida adulta, y los que pesan <1,5 Kg tienen 100 veces más mortalidad que los nacimientos normales (10). Las complicaciones asociadas al RCIU y el aumento de la mortalidad, podrían explicarse por la “hipótesis de Barker” a través de la reprogramación fetal

### **RCIU y la reprogramación fetal:**

La “hipótesis de Barker” plantea que el ambiente intrauterino puede alterar la expresión del genoma fetal con consecuencias a lo largo de la vida (11). Los cambios en la expresión génica durante la vida fetal, pueden implicar un desarrollo anormal de los tejidos durante la vida intrauterina, afectando la proliferación, diferenciación y expresión génica en órganos como el cerebro (12), riñón, corazón (13,14) e hígado (13). Nuestro grupo de investigación utilizando un modelo de restricción de la circulación uteroplacentaria en conejas, ha encontrado cambios en la expresión génica en el riñón fetal (15,16). El término reprogramación describe el proceso en el que los estímulos o condiciones ambientales negativas durante las fases críticas de desarrollo embrionario generan cambios permanentes en la fisiología o metabolismo del organismo. Se postula que el feto en un ambiente de desnutrición e hipoxia está en una condición de restricción calórica, caracterizado por un aumento en la deposición de grasa, y posiblemente una disminución de la producción de energía (17,19). Al momento de nacer, frente a un aumento en la disponibilidad de calorías y oxígeno, estos individuos desarrollan obesidad y otras manifestaciones del síndrome metabólico en el estado adulto, debido a alteraciones en los mecanismos reguladores homeostáticos (20).

En la actualidad, se ha demostrado que el RCIU afecta la reprogramación fetal del corazón, produciendo alteraciones en la fisiología y la estructura del sistema cardiovascular en la vida adulta. Estudios recientes han indicado que usando un modelo de ratas en preñez expuestas a hipoxia (en cámaras con 13% de oxígeno desde el día 6



a 20 de gestación), experimentan un aumento de la postcarga cardiaca fetal, llevando a un engrosamiento de la pared ventricular y aórtica en conjunto con un aumento de la señal de nitrotirosina en la pared de la aorta y un aumento de la proteína de shock térmico 70 (HSP70) en tejido cardiaco (21). Además, los corazones fetales desarrollados bajo hipoxia en un modelo de ratas, fueron más sensibles a la lesión por isquemia-reperfusión y demostraron disfunción endotelial en la vida adulta (22). La gestación en condiciones de hipoxia induce alteraciones cardiacas fetales a pesar del hecho que durante la isquemia fetal, el corazón es selectivamente perfundido a expensas de los otros órganos.

### **Modelo Retardo de Crecimiento IntraUterino en conejo**

Para evaluar los cambios en el corazón fetal asociados a RCIU, usamos un modelo de restricción de la circulación uteroplacentaria en conejas. El modelo experimental de RCIU en conejo propuesto en el presente proyecto, es un modelo animal estandarizado y reproducible en nuestro laboratorio y en otros centros de investigación internacionales (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Barcelona, España y en el Instituto Nacional de Medicina Perinatal National, Mexico), que presenta características que pueden conferir algunas ventajas en comparación con otros modelos utilizados para investigar la restricción del crecimiento fetal, como en rata o en oveja. De hecho la placenta del conejo es discoide, villosa y hemochorial (23), similar a la placenta humana. Además, los conejos se asemejan a los seres humanos más estrechamente que otras especies en términos de la sincronización de la maduración de la materia blanca

del cerebro perinatal (18). Además, el modelo experimental utilizado es un modelo graduable de restricción del crecimiento fetal basado en la ligadura selectiva de vasos uteroplacentarios en la placenta de la coneja. Previamente, nuestro grupo demostró que los fetos de conejos sometidos al modelo de RCIU son significativamente más pequeños que los animales controles, asociados a una significativa reducción en el tamaño de la placenta (Anexo Figura 1SB)(16). También, previamente reportamos un aumento significativo en el diámetro vascular del corazón fetal bajo el modelo de RCIU (24). Adicionalmente, hemos mostrado aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  y las vías de producción de óxido nítrico en el riñón y en el corazón fetal con RCIU (16,24). En el análisis histológico de corazones fetales observamos regiones con congestión vascular leve a severa, lo que sugiere alteración cardíaca fetal por el RCIU. Adicionalmente, observamos un incremento en la expresión de proteína y activación de eNOS (fosforilación de eNOS en Ser-1177), sugiriendo un fenómeno compensatorio en el corazón fetal en respuesta a la condición de restricción de la circulación uteroplacentaria. Adicionalmente, se observó aumento de la expresión génica de iNOS en corazones fetales (24), sugiriendo un aumento tisular asociado a niveles de NO no fisiológicos. Interesantemente, la interacción entre HIF-1 $\alpha$  y la vías de señalización de NO en el modelo RCIU en corazones fetales de conejo aún no ha sido estudiado.

## **Estrés oxidativo, HIF-1 $\alpha$ e iNOS**

Como se mencionó anteriormente, la hipoxia crónica durante la gestación en el corazón fetal promueve estrés oxidativo y aumento la señal de nitrotirosina en aorta (25). Específicamente, se ha reportado que niños de 8 a 13 años de edad expuestos a una condición de RICU, exhiben mayores niveles de peroxidación lipídica en plasma y tienen presiones sanguíneas más altas comparadas con niños de peso normal al nacer (26). También se ha reportado que lactantes que experimentaron un retardo de crecimiento restringido aumentaron los niveles séricos tanto de estado oxidativo (peroxidación lipídica y daño al ADN) como en los índices antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) (27). Usando nuestro modelo de RCIU en conejos, hemos evaluado indirectamente el estrés oxidativo mediante la determinación de los niveles de proteínas carboniladas. Nuestros datos previos muestran un incremento significativo en los corazones fetales con RCIU respecto de los corazones controles (24). Además, en condición de hipoxia se ha descrito una fuerte asociación entre estrés oxidativo y el factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), que es clave en la organización de eventos necesarios para la adaptación a la hipoxia (28). HIF-1 es un factor transcripcional heterodimérico que se regula principalmente a nivel de su subunidad alfa que es sensible a oxígeno. La subunidad beta esta constitutivamente expresada en el núcleo (29). HIF-1 promueve la transcripción de una amplia gama de genes que pueden ayudar a las células a adaptarse a un bajo suministro de oxígeno, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eritropoyetina (EPO), varias enzimas glicolíticas, transportadores de glucosa (GLUT-1, GLUT-3), heme oxigenasa-1 (HO-1) y la forma

inducible de óxido nítrico sintasa (iNOS) (30). La evidencia acumulada durante los últimos años sugiere un papel crítico para HIF-1 $\alpha$  en los fenómenos de cardioprotección (31).

Durante la hipoxia, el sistema PHD (prolil-hidroxilasa)/HIF adapta las células a la privación de oxígeno mediante la reprogramación de su metabolismo. Esta reprogramación metabólica implica que las células no utilicen la vía metabólica dependiente del oxígeno, como el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). En lugar de ello, las células cambian a la vía metabólica independiente del oxígeno, y comienzan a usar la glicólisis como mecanismo principal de la producción de ATP (32). Por ello, muchos genes implicados en la captación de glucosa y la glicólisis han sido identificados como genes blancos de HIF-1(33).

Se ha demostrado que diversos factores, incluyendo marcadores asociados a estrés oxidativo, pueden regular a HIF-1 $\alpha$ . Existe evidencia de que los cambios en la proporción intracelular de GSH/GSSG pueden regular la inducción de HIF-1 $\alpha$  durante la hipoxia (34). Varios estudios han demostrado la inducción de HIF por oxidantes (como el arsenito que induce potentemente la producción de especies reactivas de oxígeno ROS) (35) o por electrófilos celulares como 15-deoxi- $\Delta$ 12,14-prostaglandina-J2 (15d-PGJ2) o acroleína (36). Además, la actividad de HIF-1 puede ser regulada por mecanismos transcripcionales y post-traduccionales. La síntesis de proteínas HIF-1 $\alpha$  puede ser regulada a nivel transcripcional a través de mediadores inflamatorios y factores de crecimiento que interactúan con su receptor tirosina quinasa específico, lo que conduce a la activación de las vías PI3K/AKT/mTOR y MAPK/ERK (37) (Imagen 1).

Se ha descrito también que TNF- $\alpha$  y IL-1  $\beta$  (38), adenosina (39), así como óxido nítrico (NO) (40), inducen la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  a través de este mecanismo (39,40).

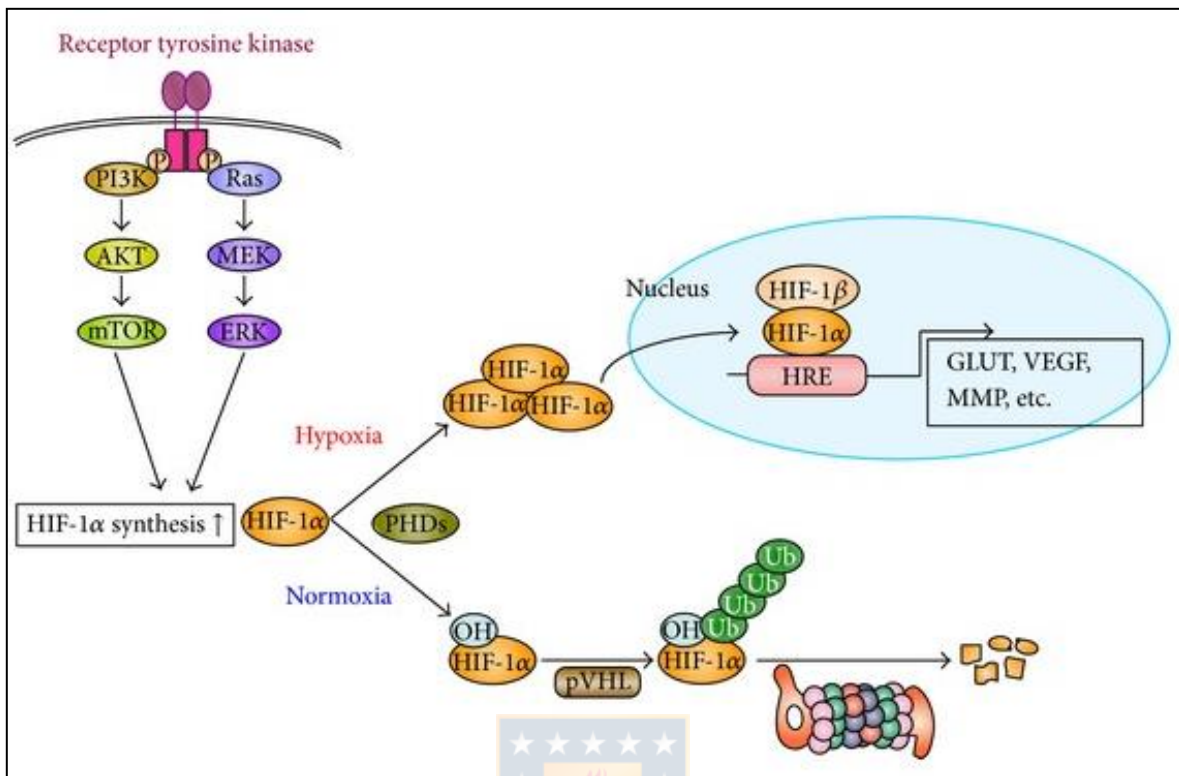
También se ha reportado la activación del receptor tipo Toll -4 (TLR-4), que utilizando la vía NF-kB, induce la expresión de HIF-1 $\alpha$  (41). Dentro de la regulación post-traducciona se reconoce activación de HIF-1 por fosforilación mediada por p42/p44 MAPK (42). Existe amplia evidencia de que en condición de normoxia e hipoxia la actividad de HIF-1 $\alpha$  puede ser regulada por NO mediante S-nitrosilación en sus residuos tioles reactivos, a los que se une covalentemente (43, 44). La S-nitrosilación de cisteína-533 en el dominio de degradación de oxígeno estabiliza HIF-1 $\alpha$  inhibiendo su unión a la proteína de von-Hippel Lindau permitiendo que HIF-1 $\alpha$  interactúe con HIF-1 $\beta$  y experimente acumulación nuclear (45). También se ha demostrado que la S-nitrosilación de otra cisteína sensible al redox (C800) localizada dentro del dominio de activación C-terminal, aumenta la actividad de HIF-1, en este caso facilitando la unión de HIF-1 $\alpha$  al elemento de respuesta de CBP/p300 (46). En este contexto se ha demostrado que la activación de HIF-1 $\alpha$  mediada por NO conduce a la inducción de la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) en varios tipos celulares y que el NO derivado de la actividad de iNOS puede regular el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  en un mecanismo de retroalimentación (47).

La iNOS constituye una de las 3 isoformas de NO sintasas (NOS) que sintetizan el óxido nítrico (NO), un reconocido regulador del tono vascular y la función cardiovascular a través de mecanismos dependientes e independientes cGMP (48). Las 3 isoformas (eNOS, nNOS e iNOS) están expresadas en el tejido del corazón; eNOS se expresa de forma constitutiva en cardiomiocitos (49), nNOS se puede encontrar en todas las células cardíacas, incluido el sistema nervioso autónomo que inerva el corazón, la aorta y la pulmonar. Las arterias, la arteria coronaria y el miocardio auricular y ventricular (50), e iNOS se pueden inducir en células lisas vasculares cardíacas en respuesta a la

inflamación (51,52). Los NOS son homodiméricos, con propiedad oxidorreductasa, cuyo sustrato es la L-arginina, su cofactor es la tetrahidrobiopterina (BH4) y posee una agrupación hemo y un dominio reductasa. Las reacciones catalizadas por NOS requieren Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleótido (FAD), y mononucleótido de flavina (FMN). En cada reacción NOS cataliza la conversión de L-arginina a NO y L-citrulina (53).

iNOS es una proteína codificada por el gen NOS2, ubicada en el cromosoma 17 en la posición 17q11.2-q12. iNOS está formada por 1153 aminoácidos y pesa 130 kDa (54). A diferencia de eNOS y nNOS, la actividad de iNOS es independiente del calcio (55). Una vez activo, el dímero iNOS tiene una actividad catalítica que es 100-1000 veces mayor que la de eNOS y nNOS, por lo tanto, el aumento de su actividad genera altos niveles de NO hasta el agotamiento del sustrato y los cofactores o su degradación enzimática (56). La elevada generación de NO lleva a la formación de peroxinitrito, lo que aumenta los niveles de expresión de las metaloproteinasas (MMP) y el colágeno, induciendo fibrosis (57).

Estudios recientes han demostrado que bajo condiciones RCIU hay estrés oxidativo y también un aumento en la expresión de factores proinflamatorios en la placenta como el TNF-alfa, IL-1beta y Cox2 (58-61). Tanto los mediadores de inflamación como el estrés oxidativo favorecen la inducción de iNOS (62,63). Estos elementos en conjunto pueden actuar como gatillantes de un proceso de remodelación cardíaca.



**Imagen 1. Mecanismo regulador de la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF-1).** La estimulación del factor de crecimiento induce la síntesis de proteínas de la subunidad HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) activando las vías PI3K / Akt / mTOR y Ras / MEK / ERK quinasa. En condiciones normóxicas, el HIF-1 $\alpha$  se hidroxila por las prolina hidroxilasas (PHD), lo que desencadena su interacción con la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL), lo que conduce a su poliubiquitinación y posterior degradación proteasómica. Por el contrario, en condiciones hipóxicas, HIF-1 $\alpha$  se mantiene estable, ingresa al núcleo y, junto con HIF-1 $\beta$ , se une a los elementos sensibles a la hipoxia (HRE), regulando al alza la expresión de genes diana como los transportadores de glucosa (GLUT), vasculares factores de crecimiento endotelial (VEGF) y metaloproteinasas de matriz (MMP) (Extraído de *Masashi Ueda. Scientific World Journal. 2014*)

## **Rol cardioprotector de los marcadores ERK 1/2, PI3K/AKT, TLR-4, IL-1 $\beta$ y HSP70.**

### **ERK 1 / 2**

La ruta de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) es una ruta de señalización compuesta de proteínas quinasas de acción secuencial que participan en la regulación del crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación, la supervivencia, la transformación, la apoptosis y otros procesos (64) . Se han descrito tres ramas principales de la vía de señalización MAPK: quinasas reguladas por señal extracelular (ERK) 1/2, p38 quinasas y quinasas N-terminales c-Jun (JNK). Los ERK1 y ERK2 humanos tienen 84% de identidad en secuencia y se cree que comparten la mayoría de las funciones (65). En el miocito cardíaco, la cascada de señalización de ERK se inicia clásicamente en la membrana celular mediante la activación de la pequeña proteína G Ras, lo que conduce al reclutamiento y activación de diversas proteínas quinasas que tiene como objetivo terminal la fosforilación de numerosos objetivos citoplasmáticos y la translocación de ERK en el núcleo seguido de la activación de factores de transcripción como Elk-1, c-FOS, p53, GATA4 y Ets1 / 2, HIF-1 $\alpha$  (65).

Se ha reconocido el rol cardioprotector de ERK en respuesta a isquemia/reperfusión, estrés oxidativo, hipoxia, estimulación  $\beta$ -adrenérgica y exposición a antraciclina. Varios estudios han demostrado que la vía ERK puede ser protectora contra la apoptosis (66). Por ejemplo, la activación de ERK en corazón isquémico/reperfusión en rata, resultó tener efectos antiapoptóticos (caspasa 3,  $p < 0.01$ ), y la recuperación funcional cardíaca mejorada ( $p < 0.01$ ) (67).



## **PI3K/AKT**

La vía de señalización intracelular de fosfoinositida 3-quinasa / proteína quinasa B (PI3K / Akt), está implicada en la regulación de la supervivencia celular y puede conferir protección contra lesiones de isquemia / reperfusión en varios órganos, así como en el corazón (68). Akt es un objetivo de fosforilación corriente abajo de PI3K y, por lo tanto, es un mediador importante de la supervivencia celular. Al igual que ERK ½ las cascadas PI3K / Akt como MAPK / ERK1 / 2 son activadas en modelos de isquemia y reperfusión en corazones de ratas mejorando la eficiencia cardíaca (69). Además se reconoce el rol de esta vía de señalización, así como la vía de ERK ½ en la activación de HIF-1 $\alpha$ , importante factor de transcripción inducido en condición de hipoxia (70).



## **TLR-4 e IL-1 beta**

Los receptores tipo Toll (TLR) son una familia de receptores de reconocimiento de patrones involucrados en enfermedades cardiovasculares. En particular, numerosos estudios han demostrado que TLR4 (cuyo nivel de expresión en el corazón es más alto en comparación con otros TLR) activa la expresión de varios genes de citoquinas proinflamatorias que juegan un papel fundamental en la inflamación para la defensa del huésped contra el daño y la reparación del tejido (71). La activación de TLR4 se inicia cuando receptores de reconocimiento de patrones (PRR), reconocen y responden a los patrones moleculares asociados al daño (DAMP), incluidos los patrones moleculares asociados a patógenos exógenos (PAMP) que son estructuras conservadas de los microorganismos patógenos y alarmas endógenas que se liberan en respuesta al estrés o al daño tisular (72). El resultado de la activación de TLR-4 es la activación de muchos

factores de transcripción, como el factor nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), que posteriormente induce la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (73).

Varios estudios han proporcionado evidencia de que RCIU se acompaña de alteraciones estructurales tempranas en los vasos sanguíneos lo que favorece el desarrollo de la aterosclerosis, condición que involucra la participación de marcadores proinflamatorios (74).

### **HSP70**

Las proteínas de choque térmico (HSP) son una familia de proteínas endógena que pueden sobreexpresarse en diversas situaciones de estrés, como la hipertermia, el estrés hemodinámico causado por enfermedades del corazón, el ejercicio físico, entre otros. Estas Proteínas se clasifican de acuerdo a sus pesos moleculares. HSP70 ha tomado importante interés en su rol cardioprotector. Hay diversos estudios que muestran protección miocárdica por HSP70 en respuesta a daño isquémico (75). Algunos estudios relacionan la expresión de HSP70 con disminución en el área infartada (76), con recuperación de la lesión post-isquemia / reperfusión, recuperación de la función endotelial sistólica y coronaria (77).

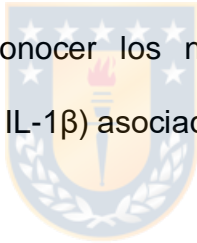
Comprender la relación entre estrés oxidativo, iNOS, HIF-1 $\alpha$  y factores cardioprotectores, y cómo participan en la remodelación cardíaca en un modelo de restricción de crecimiento intrauterino, es un desafío no resuelto. Su importancia recae en que la comprensión de los mecanismos subyacentes al desarrollo del fenotipo RCIU, inicialmente en una etapa aguda, puede proporcionar objetivos potenciales para

intervenciones terapéuticas dirigidas a prevenir el daño cardiovascular observado en los recién nacidos con RCIU.



## PROBLEMÁTICA

Nuestro trabajo preliminar utilizando un modelo de retardo de crecimiento intrauterino (RCIU) mediante la restricción de la circulación uteroplacentaria en conejas ha permitido establecer que en el corazón fetal se observa congestión vascular, caracterizada con un aumento en la expresión de enzimas que sintetizan óxido nítrico (eNOS, iNOS), elevados niveles de estrés oxidativo e incrementada expresión del factor inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ). En este modelo experimental de RCIU no existe información respecto de las vías de transducción de señales que regulan la expresión de genes cardioprotectores (PI3K/AKT, ERK 1 / 2), como tampoco de los genes blancos de HIF-1 $\alpha$  (VEGF, GLUT-1). Adicionalmente, es necesario conocer los niveles de expresión de los factores cardioprotectores (HSP70, TLR-4, IL-1 $\beta$ ) asociados a la respuesta cardíaca fetal durante la restricción del crecimiento.



## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La inducción de los factores cardioprotectores logrará compensar el daño cardíaco observado en los corazones fetales sometidos a RCIU a expensas de estrés oxidativo y al aumento de expresión de la enzima iNOS?

## HIPÓTESIS

El aumento de la expresión de la Oxido Nítrico Sintasa inducible y el estrés oxidativo en el retardo de crecimiento intrauterino aumenta el riesgo de daño cardíaco fetal compensado por el aumento de la expresión de elementos asociados a cardioprotección.



## OBJETIVO GENERAL

Describir los cambios entre la expresión de Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS), el estrés oxidativo, HIF-1 $\alpha$  y los elementos cardioprotectores (PI3Kp110 $\alpha$ / AKT, ERK 1/2, TLR-4, IL-1b, HSP70) en el corazón fetal usando un modelo de RCIU en conejas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Estandarizar ensayos de estrés oxidativo cardiaco fetal, midiendo los niveles de GSH/GSSG y TBARS mediante espectrofotometría.



2) Determinar niveles de 3-nitrotirosina en corazones fetales sometidos a RCIU mediante Western blot.

3) Conocer si el aumento de la expresión HIF-1 alfa en corazones fetales sometidos a RCIU se relaciona con un aumento de su actividad, evaluando la expresión de genes blancos en angiogénesis (VEFG) y metabolismo de glucosa (GLUT-1).

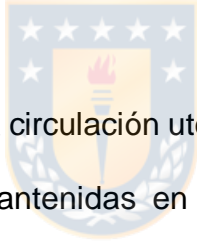
4) Evaluar la expresión de factores cardioprotectores en corazones fetales sometidos a RCIU. Para ello mediremos vía qPCR y/o western blot la expresión de i) AKT ii) PI3Kp110 $\alpha$  iii) ERK y iv) TLR-4 v) IL-1 $\beta$  vii) HSP 70.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Consideraciones éticas

- El Comité de Ética de la Universidad de los Andes aprobó el proyecto de investigación en el contexto del estudio año 2016 (16) de nuestro equipo de trabajo " *Nitric oxide synthase and changes in oxidative stress levels in embryonic kidney observed in a rabbit model of intrauterine growth restriction*". Nosotros trabajamos con las muestras procesadas en este proyecto.
- El bienestar animal fue supervisado por un médico veterinario en conformidad con los Lineamientos de la Universidad de los Andes.

### Modelo Animal



Para el modelo de restricción de la circulación uteroplacentaria se utilizaron conejos New Zealand. Las hembras fueron mantenidas en jaulas separadas y expuestas por un periodo de 8 hrs con el macho reproductor. Los animales fueron sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 12/12h, con acceso a agua y comida estándar (dieta de conejo de laboratorio 5321; Lab Supply, TX, EE. UU.). Las hembras preñadas fueron sometidas a cirugía a los 25 días de gestación. Antes de la cirugía, se administró 0,9 mg / kg de progesterona por vía intramuscular para inducir la tocolisis. Se colocó un catéter venoso periférico y se administró la profilaxis antibiótica (Penicillin G 300.000 UI). Se administró ketamina y xilazina (35 y 5 mg / kg, respectivamente) intramuscularmente para inducción anestésica y se mantuvieron con una mezcla inhalada de isoflurano al 1-5% y oxígeno de 1-1,5 L / min. Se realizó una laparotomía de la línea media abdominal, se expuso la placenta y se seleccionó uno de los cuernos para realizar la ligadura del 40 al 50% de los

vasos uteroplacentarios de cada feto (Anexos: Figura 1SA). El cuerno contralateral se utilizó para generar los fetos controles. Las ligaduras se realizaron con suturas de seda (4/0). Después del procedimiento, el abdomen se cerró en dos capas con una única sutura de seda (3/0). Los animales se mantuvieron bajo una manta de calentamiento hasta que estuvieron despiertos y activos, y recibieron meloxicam intramuscular 0,4 mg/kg/24h durante 48 h, como analgesia postoperatoria. Los animales fueron alojados, y un control de bienestar se hizo cada día. Después de 5 días de la cirugía se obtuvieron los fetos vivos por cesárea. Los fetos fueron medidos, pesados y eutanizados por decapitación. Se extrajeron los corazones, fueron pesados y almacenados a -80°C.

### **Universo**

- Se trabajó con 6 muestras controles y 4 muestras de RCIU de corazones fetales para los experimentos con estrés oxidativo mediante espectrofotometría.

Se trabajó con 7 muestras controles y 7 muestras con RCIU de corazones fetales para el estudio de expresión génica por Western blot y qRT-PCR.

## **METODOLOGÍA DE ENSAYOS DE ESTRÉS OXIDATIVO**

### **Preparación de muestras**

Los corazones de gazapos que estaban almacenados a -80°C, fueron lavados con PBS 1X estéril (3 veces). Para la homogeneización se agregaron 2 mL de NaCL 0,9% y se homogeneizó con Politron en hielo a tiempos cortos de 3 segundos seguido de



centrifugación a 20.000 g durante 1 hora. Por cada corazón se obtuvieron 2 ml de homogeneizado los que fueron alicuotados en:

-500 uL para GSH reducido (Alquilación con vinil-piridina)

- 500 uL para GSH total

-1mL para TBARS

### **Determinación de glutatión total**

La determinación de contenido de glutatión total en homogeneizado de corazón fue llevado a cabo mediante un procedimiento de reciclaje enzimático en la que se oxida secuencialmente por 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) y es reducido por glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH. El ensayo detecta el glutatión (GSH), glutatión disulfuro (GSSG) y posiblemente el glutatión en unión disulfuro con otros tioles solubles (78).

El protocolo consistió en mezclar un volumen adecuado de homogeneizado de corazón con buffer fosfato salino (100 Mm pH 6,5, 200  $\mu$ L de DTNB), agregar glutatión reductasa y su cofactor NADPH 20Mm. La cinética de la reacción se determinará a la longitud de onda igual a 412 nm.

### **Determinación de GSSG**

El glutatión disulfuro se determinó selectivamente por el enmascaramiento del glutatión con 2-vinilpiridina. Se utiliza 2-vinilpiridina ya que no inhibe significativamente la glutatión reductasa (79). El protocolo para la medición de GSH alquilado siguió los mismos pasos descritos para la determinación de glutatión total.

### **Determinación de GSH**

La concentración de GSH se calculó matemáticamente por la diferencia entre la concentración de glutatión total y la de GSSG.

$$GSH \text{ reducido} = Pool \text{ GSH total} - GSH \text{ oxidado}$$

### **Determinación de la razón GSH/GSSG**

La razón GSH/GSSG se determinó matemáticamente utilizando las concentraciones de GSH y GSSG obtenidas.

### **Determinación de TBARS**

Para la determinación se mezcló 1 mL de homogeneizado de corazón con buffer fosfato salino 100 Mm pH 6,5 y se añadió a la mezcla ácido tricloroacético (TCA) 0,24 M. La solución se incubó durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se añadió la mezcla 1 mL de ácido tiobarbitúrico 35 mM, más 500 µL de NaOH 1N y se incubó durante 30 minutos a 50°C. La absorbancia de las muestras fue medida a 532 nm usando como blanco buffer fosfato (80).

## **METODOLOGÍA DE INMUNOENSAYO (WESTERN BLOT)**

### **Preparación de muestras**

Las muestras de tejido cardiaco fueron lavadas en buffer fosfato salino (PBS) 1x frío y posteriormente lisadas en un volumen 5 veces superior al peso del tejido en Buffer de Lisis pH 7,4 [4mM HEPES, 320 mM Sacarosa, 5 mM EDTA, Protease inhibitor cocktail (complete, EDTA-free, Roche :1 pastilla/10mL)] La homogeneización se logró con ayuda de un politron Ultraturrex a 1 rpm por tiempos cortos de 3 segundos (8 pasadas), seguido de una centrifugación a 2000xg por 10 min en hielo. Se guardó el sobrenadante **(S1)** y al pellet se le agregó Buffer de lisis para recuperar proteínas de membrana. El pellet se homogeneizó con Politron seguido de centrifugación (bajo las mismas condiciones anteriormente descritas) y se obtuvo un nuevo sobrenadante **(S2)**. Se juntaron los sobrenadantes **S1+S2** en un tubo y se sonicaron en hielo durante 30 min. Posteriormente, las proteínas fueron cuantificadas por método de ácido bicinconínico (BCA) a 562 nm en espectrofotómetro UV/visible TECAN. La base de éste método es la capacidad de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu<sup>2+</sup> en medio alcalino (reacción de Biuret). Para la cuantificación de proteínas construimos una curva de calibración con albúmina como estándar y preparamos nuestras muestras por triplicado.

### **Cultivo celular para generar control positivo**

Las células fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) (Figura 4S, Anexo) fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (With High glucose, with L-glutamine), 10% suero

bovino fetal, 1% Antibiotic-Antimycotic (100x, Thermo Fisher Scientific) en un ambiente de 5% CO<sub>2</sub>; 37°C hasta alcanzar 90% de confluencia. Se utilizó como condición de hipoxia 1% de O<sub>2</sub> por desplazamiento de gases utilizando gas mezcla 95% N<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> (Indura). Las células MEF fueron incubadas durante 16 horas en cámara de hipoxia y luego fueron cosechadas para generar extractos de proteínas totales.

### **Protocolo Western blot**

El protocolo de Western blot se realizó de acuerdo con las condiciones estándar. Una determinada cantidad de proteínas (de acuerdo a estandarización realizada para cada anticuerpo) fue cargada en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) a 120 V durante 1 hora aproximadamente. Un gel fue teñido con Azul de Coomassie tipo Bio-Safe (Bio-Rad Laboratories) para evaluación de la integridad de proteínas y el otro gel continuó con transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia semiseca de proteínas (sistema Transblot SD semi-dry Transfer cell, BIORAD) fue realizada a 300 mA durante 25 min. Luego, las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente, fueron bloqueadas con OdysseyBlocking Buffer para evitar la unión no específica del anticuerpo. Posterior a ello, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con respectivo anticuerpo: mAb anti-AKT de ratón, mAb anti-HSP70 de ratón, mAb anti-ERK de ratón, mAb anti-TLR4 de ratón, mAb anti-GLUT-1 de ratón, mAb anti-VEGF de ratón. Luego de 3 lavados con Tween-20 al 0,1% en PBS1X, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario Goat anti-mouse 800 (LICOR)(dilución 1: 15000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los análisis de blots se realizaron por imagenología infrarroja Odyssey CLx (LICOR). La normalización de

todos los Western blot se realizó por proteínas totales mediante Tinción de Azul de Coomassie. El análisis densitométrico de los niveles de expresión de todas las proteínas evaluadas por Western blot se realizó utilizando Software Image Studio Versión 4.

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Marca y código</b>	<b>Peso molecular esperado (uniprot)</b>	<b>Dilución Ac. 1<sup>o</sup></b>	<b>Dilución Ac. 2<sup>o</sup></b>	<b>Control +</b>
<b>AKT (pan)</b>	R&D RD.MAB2055 (*)	63 Kd	1/2000	1/15000	células MEF expuestas a 16 hrs hipoxia
<b>ERK 1/2</b>	Santa Cruz Sc-135900	43 Kd	1:500	1/15000	células MEF expuestas a 16 hrs hipoxia
<b>PI3Kp110<math>\alpha</math></b>	Santa Cruz Sc-293172	110 Kd	1:100- 1:1000	1/15000	células MEF expuestas a 1 hr hipoxia
<b>VEGF</b>	Sigma- Aldrich SAB1402390	39 Kd	C= 2,5 ug/mL	1/15000	Células HUVEC
<b>GLUT1</b>	R&D RD.MAB1418	60-70 Kd	1:250	1/15000	Lisado de eritrocitos
<b>TLR4</b>	Santa Cruz Sc-293072	95-120Kd	1:500	1/15000	células MEF expuestas a 16 hrs hipoxia
<b>HSP70</b>	Abcam Ab2787	70-78 Kd	1:1000	1/15000	Células HUVEC
<b>3-NT</b>	(Millipore, AB5411)	Inespecífico	1:500	1/15000	células MEF expuestas a 16 hrs hipoxia

## **METODOLOGÍA DE PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)**

Para cuantificar la expresión de IL-1beta, el ARN total se aisló usando RNeasy, mini Kit (Qiagen). La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) y la integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel. El ADNc se preparó a partir de ARN total (0,5 \ mug) usando un sistema de transcripción inversa (Improm II Reverse Transcriptase System, Promega). 70 ng de cDNA fueron mezclados como se indica en tabla 3. El Real-Time PCR se realizó en un termociclador Corbett (Qiagen 6000 Real Time PCR system). El sistema de detección registra el número de ciclos de PCR (Ct) requeridos para producir una cantidad de producto igual a un valor de umbral, que es una constante. A partir de los valores de Ct, se calculará la abundancia de mRNA utilizando el gen 18S como normalizador (gen constitutivo) y la ecuación de  $\Delta Ct$ . El análisis de  $\Delta CT$  del gen IL-1 $\beta$  se realizó con el software Rotor Gene 6000.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como la media aritmética de cada población  $\pm$  DE. La significancia ( $p < 0,05$ ) de las diferencias en cada parámetro obtenido fueron evaluadas mediante ANOVA para poblaciones no paramétricas, con test *post-hoc* de Kruskal-Wallis.

**Tabla 2. Primers**

<b>Gen de interés</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Tm</b>
IL-1 $\beta$	5' GGA TGA CGC CCT GAG AAC TTA 3'	5' CTT TCA GCT CAT ACG TGC CAT 3'	59,1°C
18S (constitutivo)	5' GCC GCT AGA GGT GAA ATT CTT GGA 3'	5' ATC GCC AGT CGG CAT CGT TTA T 3'	59,1°C

**Tabla 3. Protocolo de Power SYBR Green PCR Master Mix**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen (uL)</b>
PCR Master mix	25
Forward Primer 5 uM	2,5
Reverse Primer 5 uM	2,5
Template 70 ng de cDNA	0,5
Deionized Water	19,5
Total Volume	50

## Protocolo q-PCR

Se realizó un protocolo convencional para q-PCR, teniendo en consideración ajustar las temperaturas de alineamiento de acuerdo a  $T_m$  de los cebadores.

El primer paso fue la **INICIACIÓN** para activar por medio de shock térmico la ADN polimerasa AmpliTaq Gold, que se realizó a 95°C durante 10 min.

El segundo paso fue la **DESNATURALIZACIÓN** de la doble hebra que se realizó a 95°C durante 15 segundos. Finalmente, los primers se unieron a la secuencia complementario en el DNA molde en el paso **ALINEAMIENTO/EXTENSIÓN**, etapa que se realizó a la temperatura de 59,1°C (tanto para IL-1 $\beta$  y 18S, ya que presentaron  $T_m$  idénticas) durante 1 min.

Para la obtención de producto final se realizaron 40 ciclos, y el volumen final de muestra fue de 50 uL.





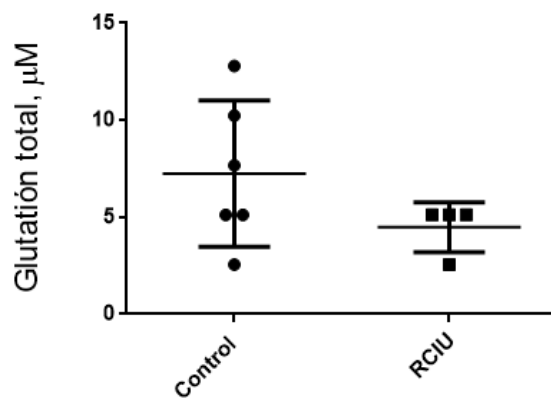
## RESULTADOS

### 1) **Evaluación de los niveles de estrés oxidativo en el corazón fetal sometido a RCIU.**

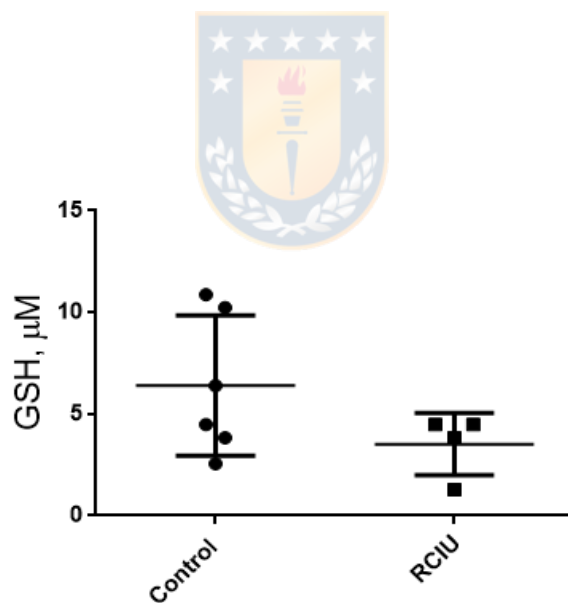
En nuestro modelo de conejos de retardo de crecimiento intrauterino (RCIU), mediante la restricción de circulación uteroplacentaria, hemos publicado los datos de tamaño fetal y tamaño del corazón (16) de las muestras que analizamos en la presente Tesis. Los datos establecen que los fetos con RCIU poseen menor tamaño de placenta y menor tamaño corporal al nacer (Anexos: Figura 1SB y 1SC). Adicionalmente, el peso corporal (Anexos: Tabla 1) y el peso del corazón (16) fueron menores en los fetos con RCIU que los controles. Sin embargo, la razón peso corazón /peso corporal es similar entre ambos grupos (16).



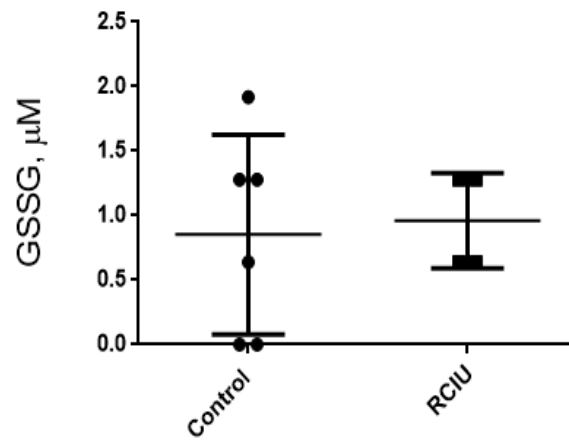
Los marcadores de estrés oxidativo en corazones de gazapos se resumieron en las mediciones del pool de glutatión total, glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), la razón entre la forma reducida y oxidada de glutatión GSH/GSSG, así como también del potencial reducido de GSH-GSSG. Los análisis indicaron que no existen diferencias significativas entre grupo control y grupo con restricción de crecimiento intrauterino en ninguno de los marcadores estudiados (Figuras de 1-5). Muy interesantemente, los niveles de peroxidación lipídica fueron significativamente mayores en los corazones de fetos sometidos a retardo de crecimiento intrauterino comparados con los controles (aproximadamente 10 veces; \*,  $p < 0,0001$ ) (Figura 6).



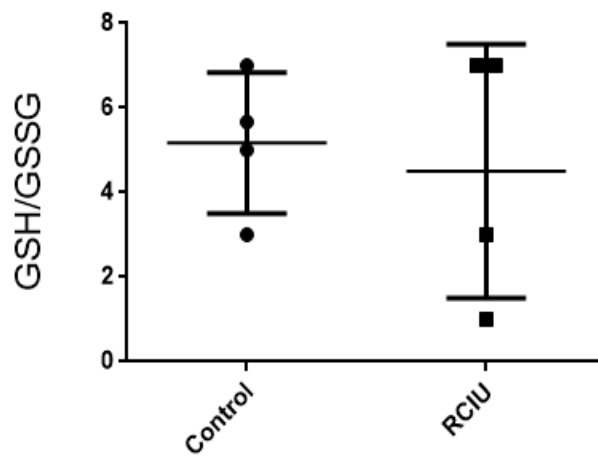
**Figura 1.** Concentración de Glutación total ( $\mu\text{M}$ ) en corazón de fetos controles y con retardo de crecimiento intrauterino (RCIU).



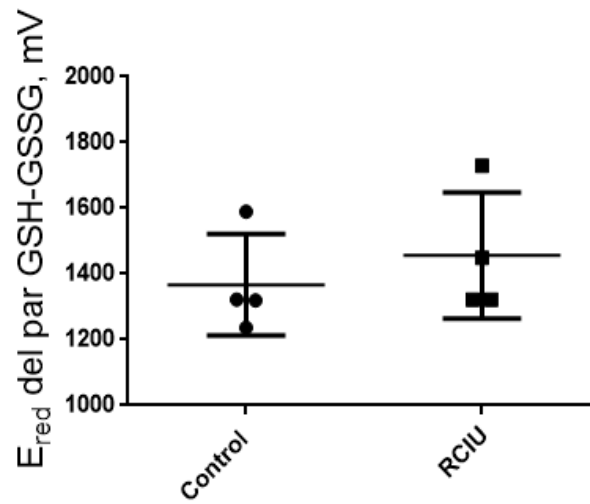
**Figura 2.** Concentración de Glutación reducido ( $\mu\text{M}$ ) en corazón de fetos controles y con retardo de crecimiento intrauterino (RCIU).



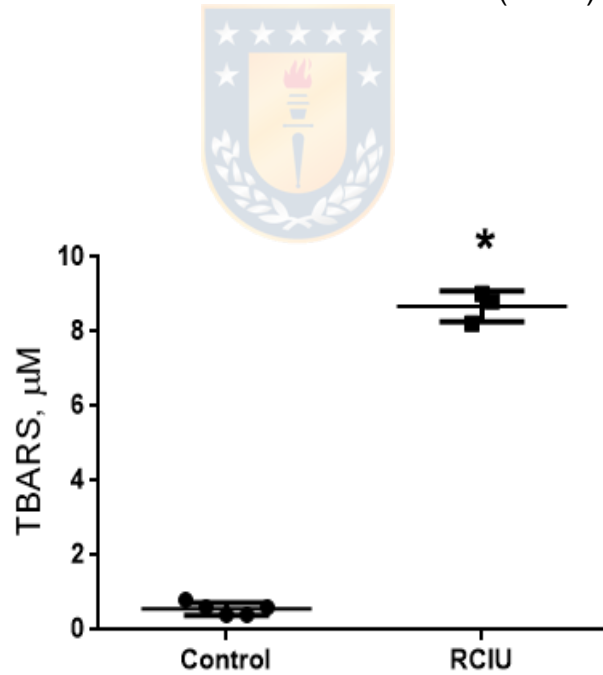
**Figura 3.** Concentración de Glutati6n oxidado ( $\mu\text{M}$ ) en coraz6n de fetos controles y con retardo de crecimiento intrauterino (RCIU).



**Figura 4.** Gráfico relaci6n GSH/GSSG en coraz6n de fetos controles y con retardo de crecimiento intrauterino (RCIU).



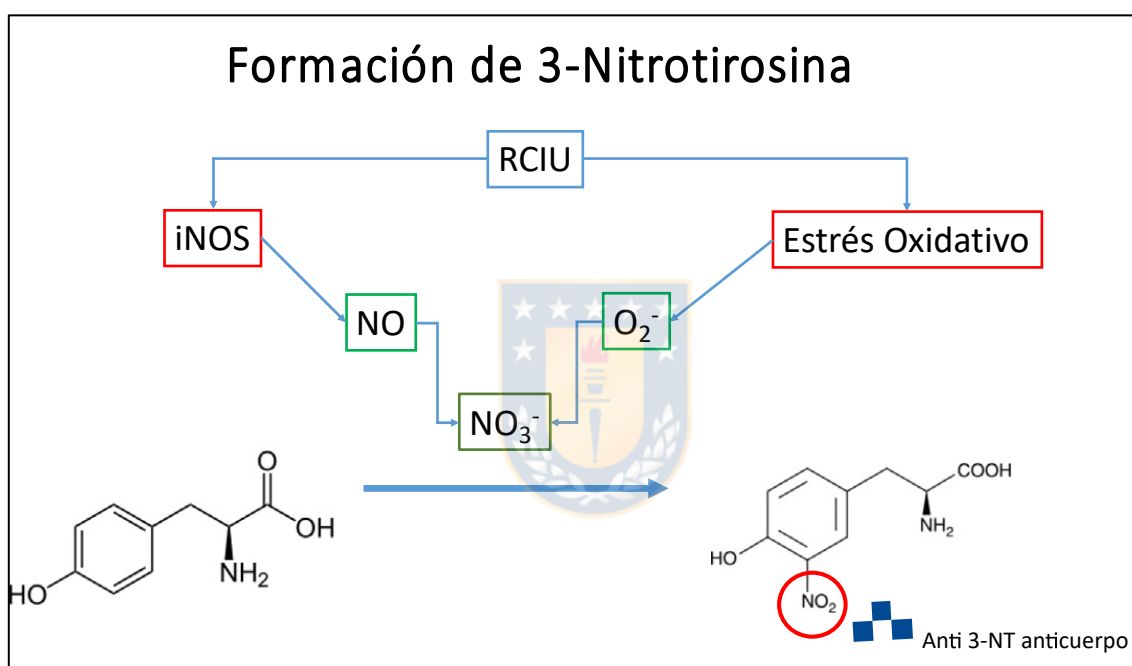
**Figura 5.** Gráfico potencial reducido de par GSH/GSSG en corazón de fetos controles y con retardo de crecimiento intrauterino (RCIU).



**Figura 6.** Gráfico concentración de TBARS en corazón de fetos controles y con retardo de crecimiento intrauterino (RCIU), (\*,  $p < 0,0001$  ).

## 2. Determinación de niveles de nitrosilación de proteínas mediante la evaluación de 3-nitrotirosina en corazones de gazapos controles y sometidos a RCIU.

La determinación de proteínas nitrosiladas se realizó por técnicas de Western blot utilizando el anticuerpo que reconoce la forma nitrosilada de los residuos de aminoácido de tirosina ( $\alpha$ -nitrotirosina, 3-NT) como se muestra en la figura 7.

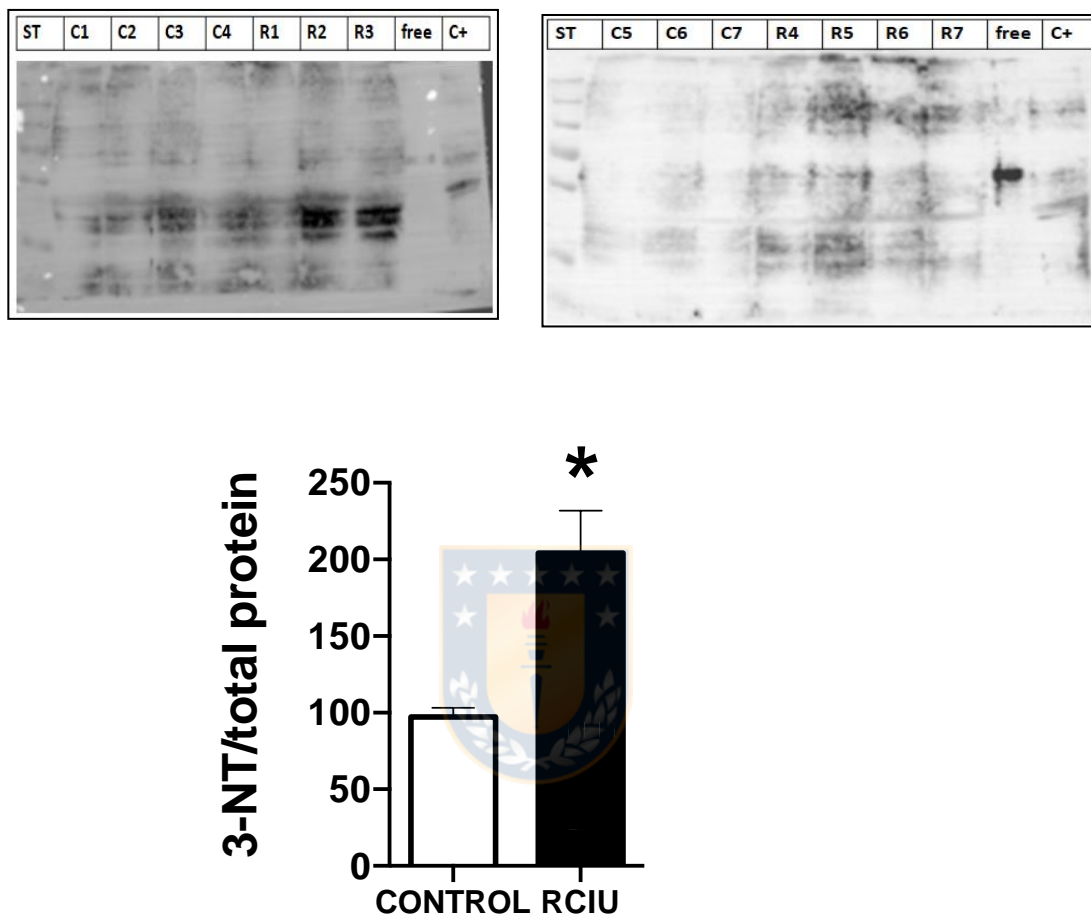


**Figura 7.** Representación esquemática de la nitrosilación de residuos de tirosina de proteínas. Oxido nítrico (NO), forma inducible de oxido nítrico sintasa (iNOS), especie reactiva de oxígeno (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), ion Nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

El análisis de los niveles de 3-NT se realizó en las mismas muestras anteriormente utilizadas (16). Los análisis densitométricos de éste biomarcadores establecen que los corazones de fetos con RCIU poseen un mayor nivel de proteínas nitrosiladas respecto

del grupo control (Control:  $97,11 \pm 16,17$  (n= 7); RCIU:  $204,06 \pm 61,67$  (n= 5); \* $p < 0,05$ )

(Figuras 8).

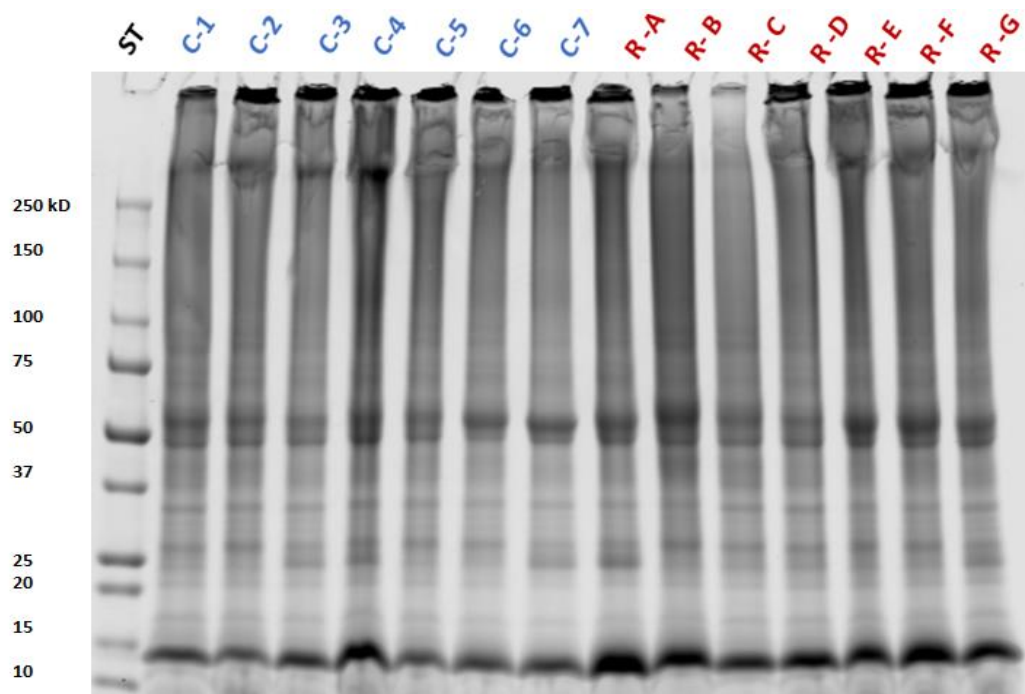


**Figura 8. Expresión de proteínas 3-NT en corazones de fetos RCIU y controles.**

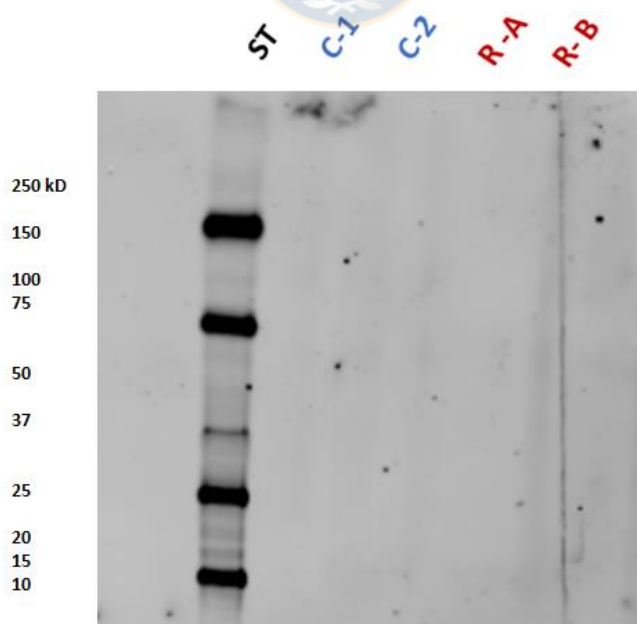
Anticuerpo 3-NT evaluado en corazones controles (C1-C7;  $97,11 \pm 16,17$ , n= 7) y con RCIU (R1-R7;  $204,06 \pm 61,67$ ; n= 5). \*,  $p < 0,05$ . Se cargaron 50 ug de proteínas totales por pocillo y se utilizó como control positivo células MEF expuestas a 16 horas de hipoxia (Anexos: Figura 4S).

### **3. Evaluación de genes blancos de HIF-1 $\alpha$ involucrados en angiogénesis (VEFG) y metabolismo (GLUT-1) mediante Western blot.**

Nuestro grupo de estudio previamente estableció que el RCIU produce un aumento de la expresión de mRNA y proteína del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  en corazones fetales (24). Razón por la cual se decidió evaluar los niveles de dos genes blancos de HIF-1alpha (VGEF y Glut-1). En primera instancia, se evaluó la integridad de proteínas de la muestras por medio de geles de integridad (electroforesis en SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie). Los resultados de gel de 14 muestras revelaron bandas bien definidas que indican buena integridad de proteínas desde 75 kDa hacia abajo (Figura 9). Sin embargo, sobre 75kDa se observa una condición que no permite establecer la integridad de proteínas. Se considerará esta situación en los Western blot que se analicen. Nuestro segundo control, antes de realizar análisis mediante Western blot, fue la evaluación de la prueba de secundario, que se llevó a cabo con: 2 muestras controles y 2 muestras RCIU. El anticuerpo secundario Donkey Ab mouse 800 no mostró señal alguna, por tanto, no generó inespecificidad para nuestros ensayos (figura 10).



**Figura 9.** Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Cada carril fue cargado con 50 ug de proteínas. (n=14, Controles=7, RCIU =7)

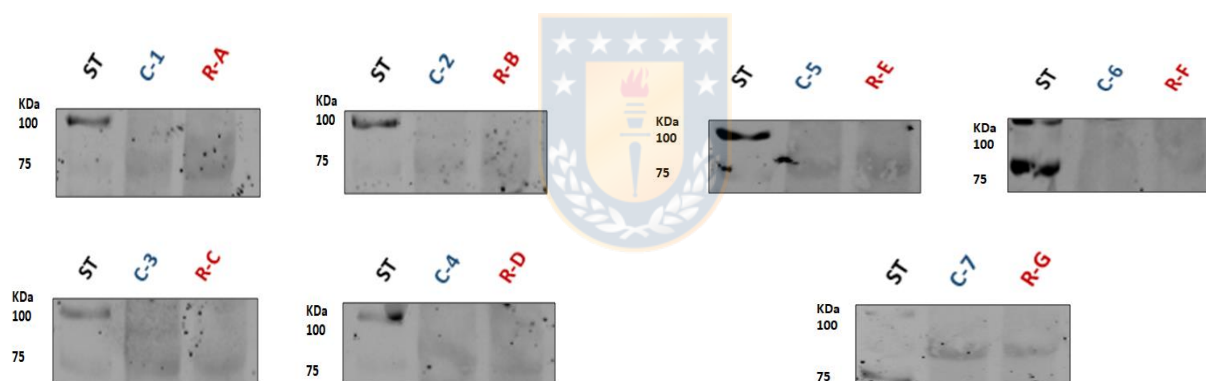


**Figura 10.** Prueba de anticuerpo secundario Donkey Ab mouse 800 (LICOR) Cada carril fue cargado con 50 ug de proteínas. (n= 4, Controles: 2 RCIU: 2)



Las estandarizaciones de los Western blot de VEGF, utilizando el anticuerpo anti-VEGF (SAB1402390) produjo un patrón altamente inespecífico, razón por lo cual no se pudo obtener información con este anticuerpo (Anexos: Figura 2S).

La estandarización del Western blot de GLUT-1 establece que el anticuerpo produce una adecuada señal para este anticuerpo (Anexos: Figura 3S). Sin embargo, el análisis por Western blot de GLUT-1 de las muestras analizadas no permitió una señal adecuada para evaluar el efecto del modelo de RCIU sobre la expresión de GLUT-1 a nivel del corazón fetal (Figura 11).

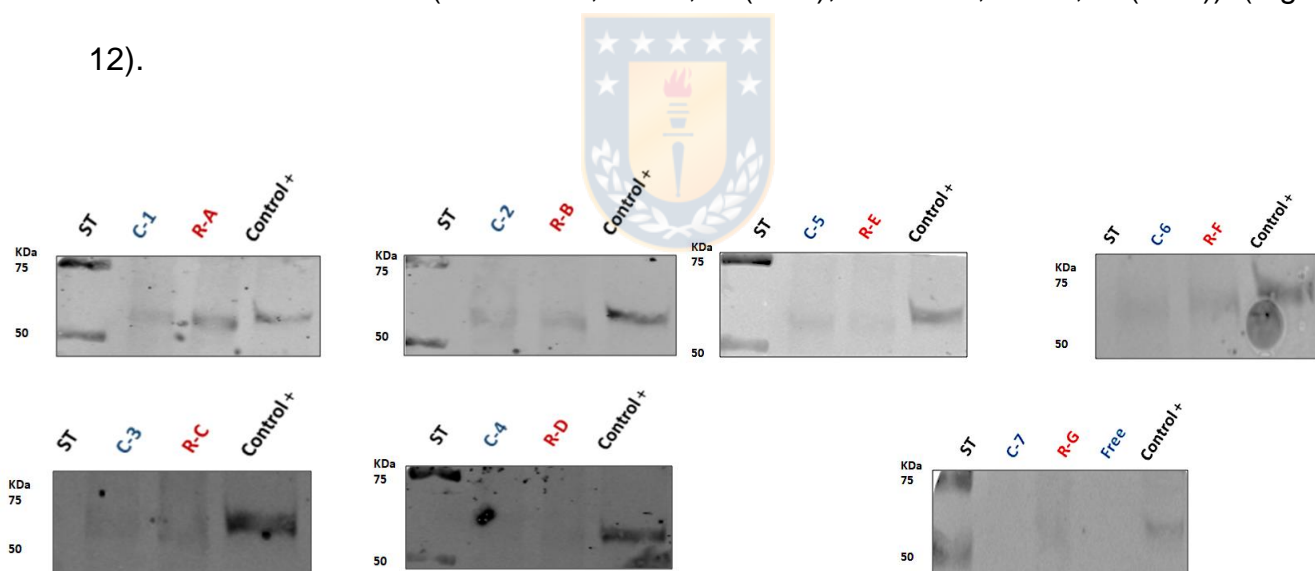


**Figura 11.** Anticuerpo anti-GLUT evaluado en 7 muestras controles (C1-C7) y 7 muestras RCIU (R1-R7) mediante Western blot. Se cargaron 100 ug de proteínas totales de lisados de corazón por pocillo.

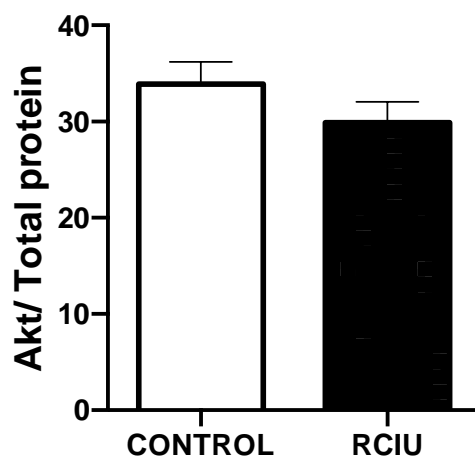
#### 4) Evaluación de la expresión de elementos asociados a cardioprotección en corazones fetales sometidos a RCIU (PI3Kp110 $\alpha$ , AKT , ERK , HSP70) e inflamación (TLR-4 e IL-1beta)

Las vías de transducción de señales involucradas en cardioprotección son asociadas las vías de las PI3-K, ERK y HSP70. La vía de señalización fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) / Akt, ha sido identificada como clave en la supervivencia/proliferación de células progenitoras (67).

Los niveles de AKT en corazón fetal no experimentó cambios asociados a retardo de crecimiento intrauterino (control:  $33,88 \pm 6,21$  (n= 7); RCIU:  $29,88 \pm 5,75$  (n= 7)) (Figura 12).

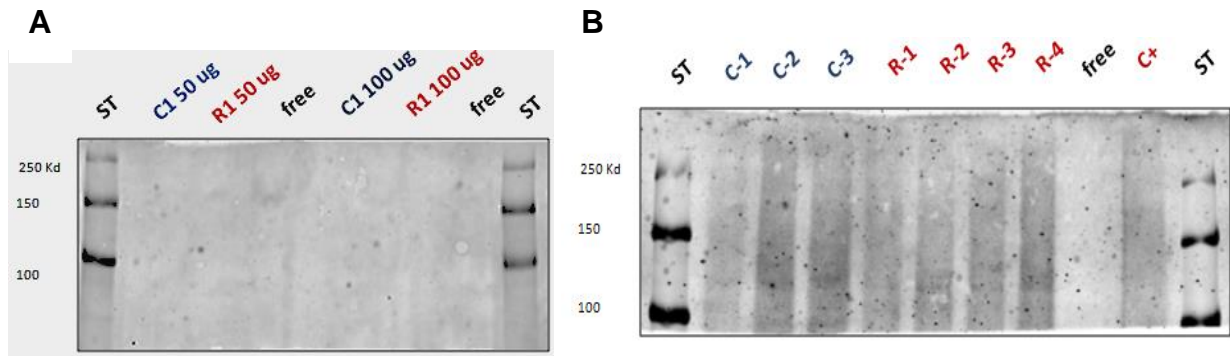


Western blot de anticuerpo anti-AKT evaluado en 7 muestras controles (C1-C7) y 7 muestras RCIU (R1-R7) mediante Western blot. Se cargaron 50 ug por pocillo. Control positivo: células MEF expuestas a 16 horas de hipoxia.



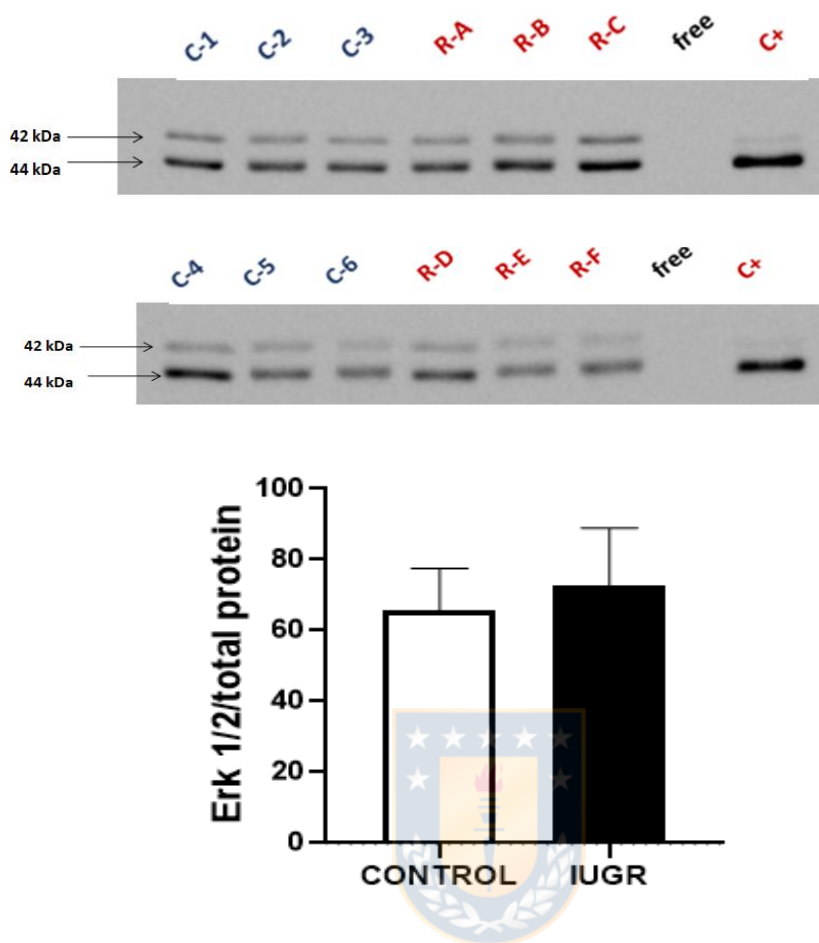
**Figura 12. Expresión de proteínas AKT en corazones fetales de controles y RCIU.** (Control:  $33,88 \pm 6,21$  (n= 7); RCIU:  $29,88 \pm 5,75$  (n= 7)).

Con respecto a la estandarización de anticuerpo anti-PI3Kp110 $\alpha$ , se realizaron diversas pruebas y cambios en las condiciones de Western blot. Sin embargo, no obtuvimos resultados satisfactorios para éste anticuerpo aún cuando se evaluó cargando 150 ug de proteínas por pocillo (Figura 13).



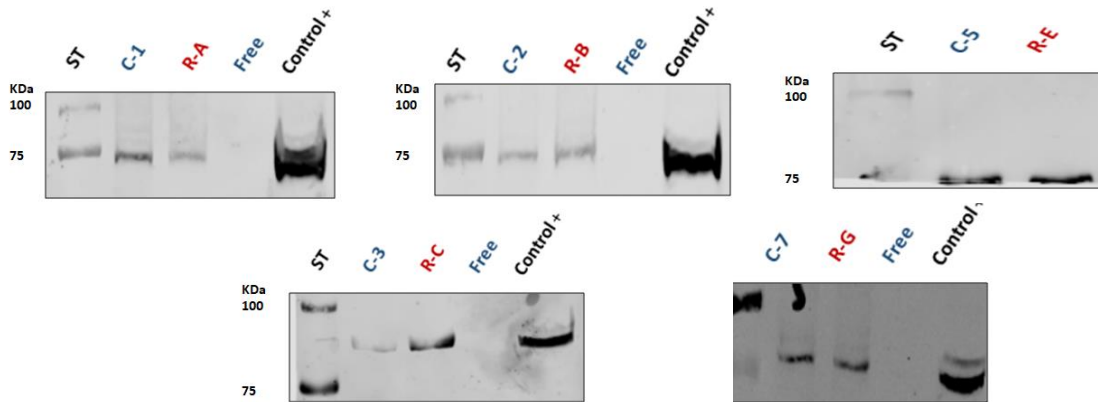
**Figura 13. Determinación de los niveles de PI3Kp110α en corazones fetales de controles y RCIU.** Se estudió la expresión de PI3Kp110α en un grupo control (C1 y C3) y con RCIU (R1 y R4) mediante Western Blot. **A** se muestra estandarización con 50 y 100 µg de proteínas. **B** se cargó 150 µg de proteínas por pocillo. Control positivo: células MEF expuestas a 16 horas de hipoxia.

Otra importante vía de señalización involucrada en procesos de cardioprotección es la vía de ERK. Nosotros evaluamos la expresión proteica de ERK 1/ 2. Nuestro anticuerpo detectó las dos isoformas a las alturas 44 kDa (Erk 1) y 42 kDa (Erk 2) tanto en corazones restrictos como en controles. No se hallaron diferencias significativas en la expresión de estas proteínas en corazones fetales con RCIU ( $51,44 \pm 10,19$ ;  $n= 6$ ) y controles ( $47,06 \pm 9,33$ ;  $n= 6$ ) (Figura 14).

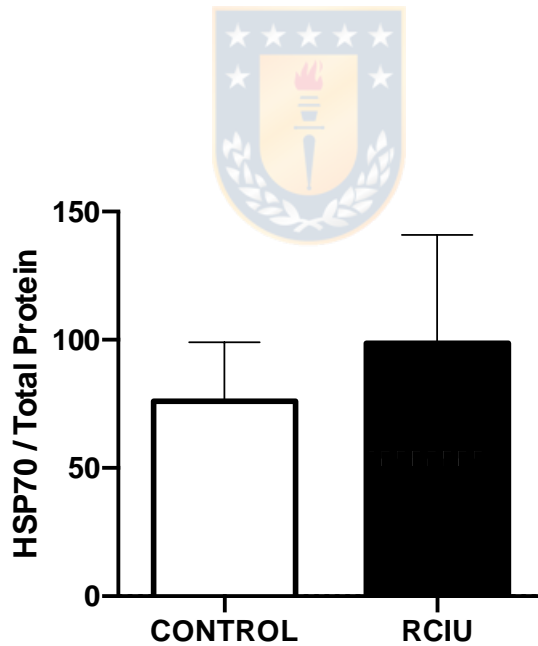


**Figura 14.** Los niveles de ERK 1 / 2 no se modifican en los corazones fetales de RCIU. Se evaluaron 6 muestras controles (C1-C6) y 6 muestras RCIU (R1-R6) mediante Western blot. (Control: 47,06 ± 9,33 (n= 6); RCIU: 51,44 ± 10,19 (n= 6)). Se cargaron 50 ug por pocillo. Control positivo: células MEF expuestas a 16 horas de hipoxia.

En la evaluación de anti-HSP70 observamos una tendencia al alza (Figura 15), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Control: 86,90 ± 55,5 (n=6); RCIU: 113,62 ± 108,2 (n=6)).



Anticuerpo anti HS70. Los niveles de expresión de la proteína HSP70 no cambian en el corazón fetal de RCIU. Se evaluó en 7 muestras controles (C1-C7) y 7 muestras RCIU (R1-R7) mediante Western blot. Se cargaron 50 ug por pocillo. Control positivo: células Huvec.

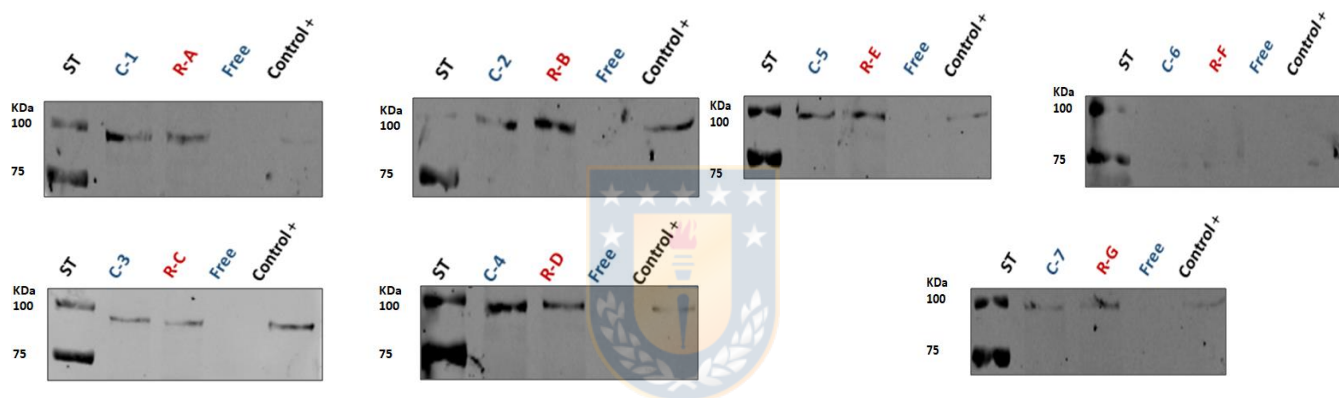


**Figura 15. Expresión de proteínas HSP 70 en corazones RCIU y controles.**

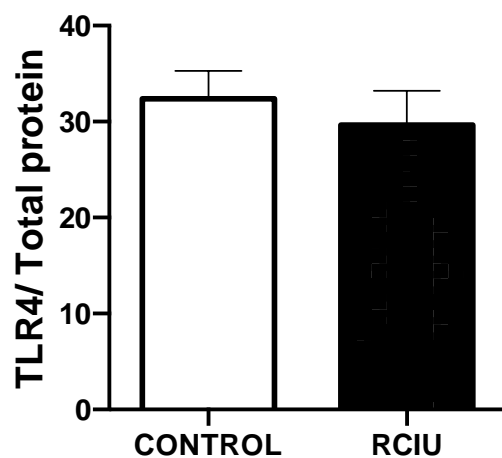
(Control: 86,90 ± 55,5 (n=6); RCIU:113,62 ± 108,2 (n=6)).

Finalmente, evaluamos marcadores de inflamación tales como TLR-4 y la citoquina proinflamatorio IL-1b. No observamos cambios en la expresión de proteínas asociadas a TLR4 (control  $32,38 \pm 7,70$  (n=7): RCIU  $29,64 \pm 9,51$  (n=7)) (Figura 16).

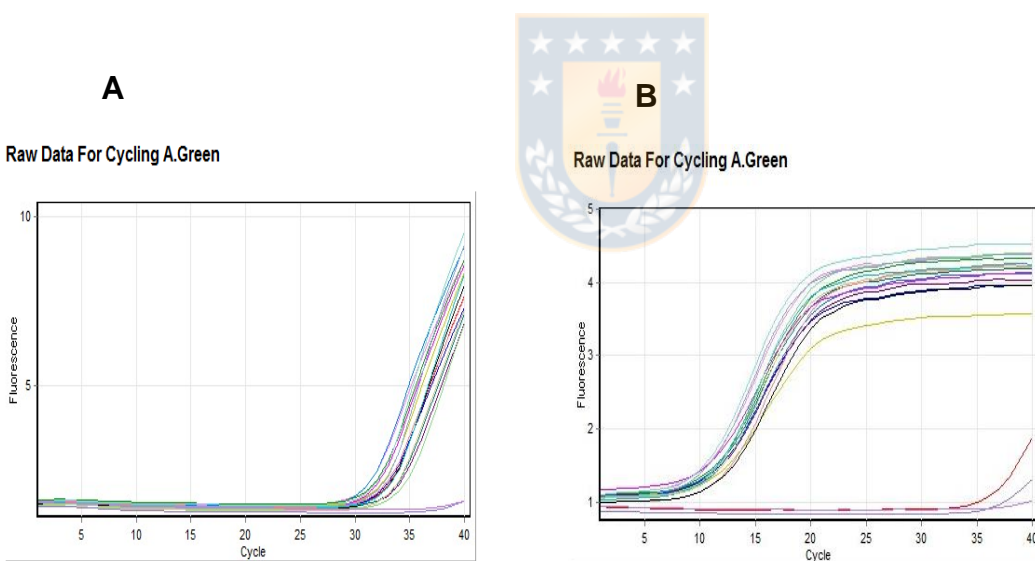
Adicionalmente, no observamos cambios en la expresión mRNA del gen IL-1beta evaluado mediante q-PCR (control:  $17,53 \pm 0,79$  (n= 4); RCIU:  $18,15 \pm 0,82$  (n= 4)) (Figura 17 y Tabla 4). La abundancia relativa de mRNA de IL-beta fue igual a 0,65 para ambos grupos (Figura 18).



Western blot de TLR4 evaluados en 7 muestras controles (C1-C7) y 7 muestras RCIU (R1-R7). Se cargaron 50 ug por pocillo. Control positivo: células MEF expuestas a 16 horas de hipoxia.



**Figura 16.** Expresión de proteínas TLR-4 en corazones controles y RCIU. ( $32,38 \pm 7,70$  n=7 control,  $29,64 \pm 9,51$  n=7 RCIU).



**Figura 17.** qRT-PCR de IL-1beta. **A** mRNA de IL-1b. **B** mRNA de 18S.



**Tabla 4. Valores CT de gen IL-1beta y 18S**

A la izquierda se muestra tabla con los valores CT de gen 18S evaluado en 8 muestras (C1-4 controles, RA-D RCIU). A la derecha se muestra tabla con los valores CT de gen IL-1b evaluado en 8 muestras (C1-4 controles, RA-D RCIU).

No.	Colour	Name	Type	Ct
1	Red	C1	Unknown	30,25
2	Yellow	C1	Unknown	29,50
3	Blue	C2	Unknown	29,83
4	Purple	C2	Unknown	31,08
5	Pink	C3	Unknown	28,40
6	Light Blue	C3	Unknown	28,32
7	Teal	C4	Unknown	30,76
8	Light Red	C4	Unknown	29,87
9	Green	RA	Unknown	29,03
10	Magenta	RA	Unknown	28,94
11	Black	RB	Unknown	30,10
12	Cyan	RB	Unknown	30,22
13	Olive	RC	Unknown	30,50
14	Light Green	RC	Unknown	31,37
15	Light Cyan	RD	Unknown	29,06
16	Blue-Gray	RD	Unknown	29,61
17	Dark Purple	negativo	Unknown	39,06
18	Light Purple	negativo	Unknown	

No.	Colour	Name	Type	Ct
1	Red	C3	Unknown	37,14
2	Yellow	C3	Unknown	12,79
3	Blue	C4	Unknown	12,05
4	Purple	C4	Unknown	12,28
5	Pink	C5	Unknown	11,31
6	Light Blue	C5	Unknown	12,11
7	Teal	C6	Unknown	12,06
8	Light Red	C6	Unknown	12,37
9	Green	RA	Unknown	11,86
10	Magenta	RA	Unknown	11,88
11	Black	RB	Unknown	12,68
12	Cyan	RB	Unknown	11,48
13	Olive	RC	Unknown	12,00
14	Light Green	RC	Unknown	11,63
15	Light Cyan	RD	Unknown	11,06
16	Blue-Gray	RD	Unknown	11,07
17	Dark Purple	negativo	Unknown	39,62
18	Light Purple	negativo	Unknown	

### Determinación del valor $\Delta\Delta CT$ del gen IL-1 $\beta$

En primer lugar se calculó la diferencia entre el promedio del CT de las muestras controles para el gen de interés y el promedio del CT de las muestras controles para el gen de referencia.

$$\Delta CT_{Control} = \text{promedio CT IL-1}\beta - \text{promedio CT 18S}$$

De igual modo se calculó el  $\Delta CT$  para la condición de estudio RCIU

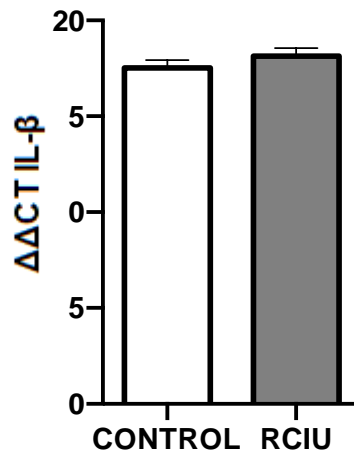
$$\Delta CT_{RCIU} = \text{promedio CT IL-1}\beta - \text{promedio CT 18S}$$

Posteriormente se calculó el RATIO de acuerdo a la siguiente fórmula:

Donde:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{RCIU} - \Delta CT_{Control}$$

Nuestros resultados arrojaron que la expresión de IL-1 $\beta$  en corazones fetales RCIU fue 0,65 veces más alto que en los corazones controles, por tanto, no se observan cambios en la expresión de éste gen.



**Figura 18. Expresión de RNAm de IL-1beta en corazones RCIU y controles.**

(Control: 17,53 ± 0,79 (n= 4); RCIU: 18,15 ± 0,82 (n= 4)).



## DISCUSIÓN

El estrés oxidativo asociado con las complicaciones del embarazo puede ser un factor contribuyente en las consecuencias postnatales del neonato. De hecho, el rol del estrés oxidativo en la programación fetal ha sido considerado en estudios epidemiológicos, indicando una asociación entre los niveles de oxidantes, bajo peso al nacer, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular (82). Nosotros hemos medido parámetros asociados a la fracción soluble celular (medición de glutatión) y fracción asociada a membranas biológicas (TBARS). No hemos encontrado cambios ni en pool de glutatión total (Figura 1), glutatión reducido (Figura 2) y oxidado (Figura 3), por consecuencia no se observaron diferencias en la relación GSH/GSSG (Figura 4) y su potencial reducido (Figura 5). Sin embargo, hemos encontrado un aumento evidente y estadísticamente significativos en los niveles de peroxidación lipídica en corazones de gazapos con RCIU comparados con corazones controles (aproximadamente 10 veces; \*,  $p < 0,0001$ ) (Figura 6). La evaluación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es un indicador de la cantidad de especies electrofílicas generadas a partir de las membranas biológicas como lo son los productos finales de la lipoperoxidación de membranas celulares, las que incluyen al malondialdehído (MDA) (83). El MDA es un aldehído reactivo y es una de las muchas especies electrofílicas reactivas que causan estrés tóxico en las células a través de la formación de aductos con proteínas mediante unión covalente. Nuestros hallazgos constituyen la primera notificación que muestra el daño asociado a lipoperoxidación de membranas biológicas que experimenta el corazón fetal en un proceso de restricción de la circulación uteroplacentaria.

Interesantemente, se ha demostrado que índices de lipoperoxidación están elevados en el plasma o suero de mujeres con fetos con RCIU (27). Otros antecedentes revelan que niños de 8 a 13 años de edad, con crecimiento restringido, exhiben mayores niveles de peroxidación lipídica en plasma y tienen presiones sanguíneas más altas comparadas con niños de peso normal al nacer (26). Buonocore et al (84) demostraron que los hidroperóxidos lipídicos totales de la sangre del cordón umbilical aumentan en los recién nacidos prematuros después de la hipoxia fetal.

Con respecto a los biomarcadores de daño cardíaco, inflamación y cardioprotección evaluados por Western blot o qPCR, encontramos un aumento de los niveles de proteínas nitrosiladas en residuos tirosina (3-NT), que es un indicador de la formación de peroxinitrito (Figura 8). Estos datos sugieren que el aumento de 3-NT puede ser una consecuencia del aumento de la expresión de iNOS, que hemos previamente descrito en corazones con RCIU (24), debido a que la sobreexpresión de ésta enzima induce generación excesiva de NO con la consecuente formación de peroxinitrito (56). Un estudio realizado en corazones fetales de cobaya que fueron sometidos a hipoxia materna (10,2% de O<sub>2</sub>) mostró niveles incrementados de 3-NT (85). Mediante estudio proteómico se ha identificado que las proteínas que sufren nitración en residuos tirosina en corazones bajo condición de estrés oxidativo, incluyen las proteínas responsables de la producción de energía y el metabolismo y la integridad estructural de las células (86). Mediante esta misma técnica otro estudio realizado en placentas de mujeres con preeclampsia observó un aumento significativo de nitrosilación en cisteínas (SNO) (87). Con respecto a nuestros resultados de HSP70, no hemos observado un aumento en el corazón fetal asociado a RCIU (figura 15). Un estudio señala un aumento de expresión

proteica en plasma (88) y placentas de mujeres con RCIU o preeclampsia (89). También en ratas preñadas sometidas a hipoxia, se ha reportado engrosamiento aórtico aumento en la expresión cardíaca de HSP70 (90).

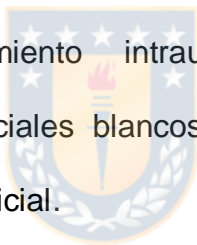
Por otra parte, evaluamos marcadores de inflamación a través de la medición de la expresión de proteínas: TLR-4 (figura 16) y la citoquina proinflamatoria IL-1beta (figura 18). Nuestros resultados muestran que no hay cambios al comparar corazones restringidos y controles. Es adecuado señalar que el peso molecular de la proteína TLR-4 fue 95 kDa, por tanto, considerando la integridad de proteínas de las muestras analizadas (figura 9), estas proteínas estarían dentro del rango de baja definición de bandas. Sería interesante repetir este resultado con nuevas muestras.

Con respecto a PI3Kp110 $\alpha$ , reconocido como un biomarcador de supervivencia/proliferación celular, hemos evaluamos distintas cantidades de proteínas y diluciones de anticuerpo. Sin embargo, no logramos resultados satisfactorios para interpretar el papel del RCIU sobre p110alpha (Figura 13). La kinasa PI3K se expresa en 4 isoformas distintas en el sistema cardiovascular que presentan patrones de expresión particulares y la isoforma PI3K $\alpha$  se expresa y se enriquece de forma ubicua en los cardiomicitos (91). Por tanto, sería interesante probar estos ensayos con un nuevo anticuerpo primario. Nuestros hallazgos de expresión de proteínas totales en las vías de supervivencia AKT y ERK1/2 en corazones restringidos no reflejan cambios significativos en la expresión de estas proteínas. Sin embargo, no hemos evaluado su actividad o su

activación que se ha descrito por métodos de fosforilación (p-AKT, p-ERK 1/2), donde probablemente existan cambios entre ambos grupos de animales.

La evaluación de anti-GLUT-1 y anti-VEGF, ambos genes blancos de HIF-1 $\alpha$ , deberán ser evaluados con nuevos anticuerpos (nuevos proveedores, nueva estandarización) debido a que con los anticuerpos ensayados no fue posible obtener información.

Es importante señalar, que existe poca investigación específicamente en corazones fetales sometidos a restricción de crecimiento intrauterino, por tanto, nuestros resultados son novedosos. Comprender la asociación entre estrés oxidativo, iNOS, HIF-1 $\alpha$  y elementos de cardioprotección, y cómo participan en la remodelación cardiaca en un modelo de restricción de crecimiento intrauterino sigue siendo información muy importante para proponer potenciales blancos terapéuticos. Sin embargo, nuestros hallazgos constituyen un aporte inicial.



## CONCLUSIONES

- 1) Hemos encontramos un aumento significativo en lipoperoxidación evaluada por TBARS (n=5 controles, n=3 RCIU\*,  $p < 0,0001$ ). Sin embargo, no hemos encontrado cambios en las mediciones de glutatión en corazones de gazapos RCIU y controles.
- 2) Hemos encontrado un aumento en la expresión de proteínas nitrosiladas (3-NT) al comparar nuestro grupo de estudio con grupo control (Control  $97,11 \pm 16,17$  (n= 7); RCIU  $204,06 \pm 61,67$  (n= 5) \* $p < 0,05$ ).
- 3) No observamos cambios significativos a nivel de proteínas en marcadores de inflamación (TLR-4/IL-1beta) y cardioprotección (HSP70). Tampoco hemos observado cambios significativos a nivel de proteínas en marcadores de supervivencia y diferenciación celular (AKT y ERK1/2),
- 4) Los Western blot de GLUT-1 y VEGF no nos entregaron información.

En resumen, durante la restricción de la circulación uteroplacentaria al final de la gestación, el corazón fetal sufre un aumento del estrés oxidativo caracterizado por un incremento de la lipoperoxidación de membranas y proteínas nitrosiladas, sin cambios en la expresión de factores asociados a cardioprotección (HSP70, ERK 1/ 2, AKT) o inflamación (TLR-4/ IL-1 $\beta$ ).

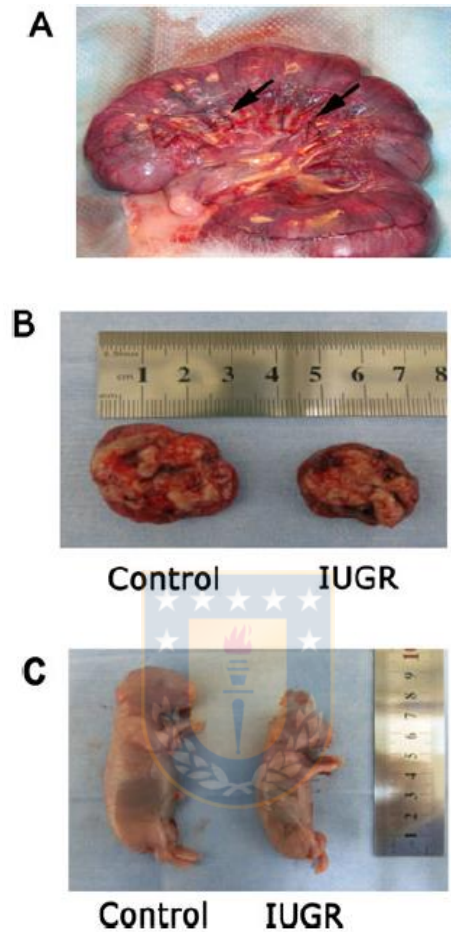


## PROYECCIONES

1. Evaluar marcadores de estrés oxidativo con un número de muestras más amplio.
2. Evaluar niveles de proteínas de S-nitrosilación de HIF-1 $\alpha$  en corazones restringidos y controles.
3. Evaluar la activación de proteínas involucradas en señales de supervivencia (p-AKT, p-ERK 1/2) en el grupo de estudio.
4. Desarrollar un estudio de dosis-respuesta de los inhibidores farmacológicos de HIF1 $\alpha$  e iNOS mediante la medición de los genes HIF-1 $\alpha$ -target (VEGF, HO-1) y la modificación de la proteína por NO (3- nitrotirosina) en corazones de control y fetos RCIU.



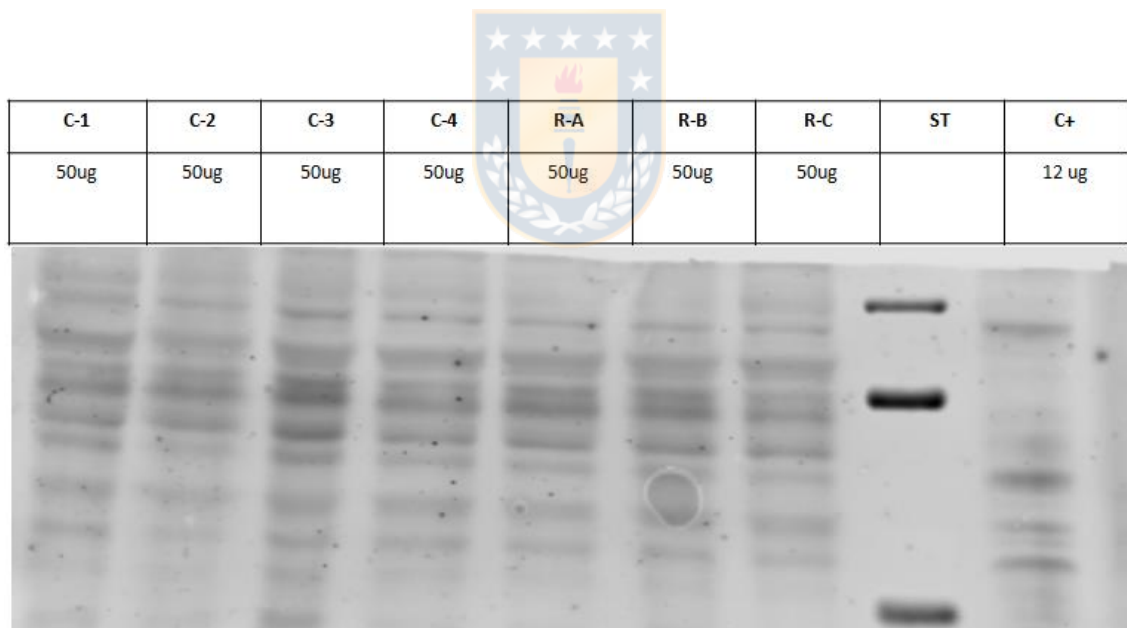
## ANEXOS



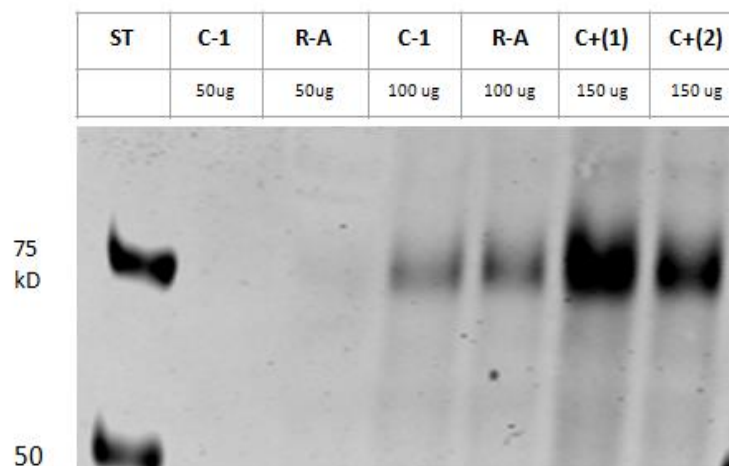
**Figura 1S.** El tamaño corporal fetal y el peso de la placenta fueron reducidos al restringir la circulación uteroplacentaria de los fetos. Las flechas indican la cirugía de ligadura de arteria uteroplacentaria (A). Tamaño de la placenta control v/s RCIU (B). Tamaño de neonatos obtenidos por cesarea(C). (Datos de artículo año 2016 de nuestro equipo (16)).

	Control	IUGR	p-value
Body size (mm)	80.63 ± 0.80 (n = 34)	69.22 ± 1.3 (n = 23)	<0.0001
Body weight (g)	30.14 ± 0.88 (n = 33)	19.90 ± 1.03 (n = 23)	<0.0001
Placental weight (g)	7.39 ± 0.55 (n = 12)	6.06 ± 0.27 (n = 14)	0.0319

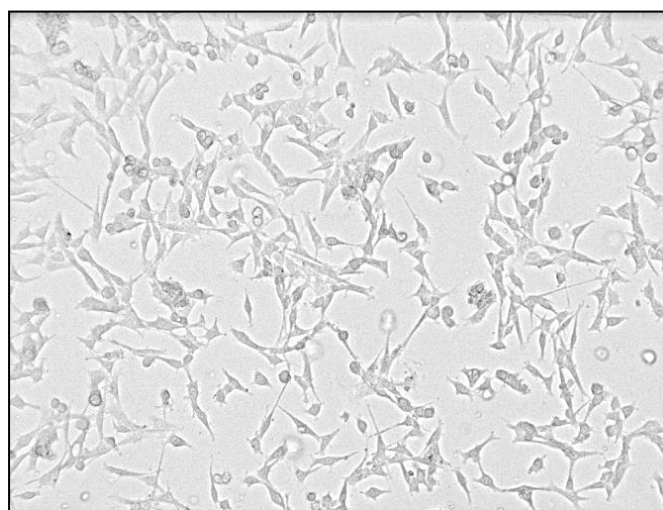
**Tabla 1.** Peso de la placenta y parámetros del cuerpo fetal (peso y tamaño) en grupos controles y grupos RCIU). (Datos de artículo año 2016 de nuestro equipo (16)).



**Figura 2S.** Anticuerpo anti-VEGF evaluado en muestras de prueba (C1-4: control, RA-C: RCIU) mediante Western blot. Se muestra estandarización con 50 ug de proteínas. Control positivo: fracción insoluble de trofoblastos.



**Figura 3S.** Anticuerpo anti-GLUT 1 evaluado en muestras de prueba (C1: control, RA: RCIU) mediante Western blot. Se muestra estandarización con 50 y 100 ug de proteínas. Control positivo 1: proteínas de membrana de células THP-1(células monocíticas humanas) expuestas a LPS. 2. extracto proteínas de eritrocitos lisados.



**Figura 4S.** Células embrionarias de ratón (MEF). Observación 10X en 60 % de confluencia. Imagen obtenida de microscopio Evos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A. Morbidity and mortality among very-low- birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *AmJObstetGynecol*. Departments of Obstetrics and Gynecology, University of Vermont College of Medicine, Burlington, VT 05401, USA; 2000 Jan;182(0002–9378 (Print)):198–206.
2. Soothill PW, Bobrow CS, Holmes R. Editorial Small for gestational age is not a diagnosis. 1999;225–8.
3. Gagnon R. Placental insufficiency and its consequences. *EurJObstetGynecolReprodBiol*. Departments of Obstetrics, Gynecology and Physiology, University of Western Ontario, St. Joseph's Health Care London, 268 Grosvenor Street, London, Ont., Canada N6A 4V2. rgagnon@uwo.ca; 2003 Sep;110 Suppl(0301–2115):S99-107.
4. Marsál K. Intrauterine growth restriction. *CurrOpinObstet Gynecol*. 2002 Apr;14(2):127–35.
5. Pardi G, Marconi AM, Cetin I. Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses-- a review. *Placenta*. 2002 Apr;23 Suppl A:S136-41.
6. Ferrazzi E, Bozzo M, Rigano S, Bellotti M, Morabito A, Pardi G, et al. Temporal sequence of abnormal Doppler changes in the peripheral and central circulatory systems of the severely growth-restricted fetus. *Ultrasound Obs*. Istituto di ScienzeBiologiche Luigi Sacco and ClinicaOstetrica e Ginecologica, University of Milan, Milan, Italy; 2002 Feb;19(0960–7692):140–6.
7. De Prins FA, Van Assche FA. Intrauterine growth retardation and development of endocrine pancreas in the experimental rat. *BiolNeonate*. 1982;41(0006–3126 (Print)):16–21.
8. Barker DJ, Martyn CN, Osmond C, Hales CN, Fall CH. Growth in utero and serumcholesterol concentrations in adult life. *BMJ*. 1993 Dec;307(6918):1524–7.
9. Martyn CN, Lever AF, Morton JJ. Plasma concentrations of inactive renin in adult life are related to indicators of foetal growth. *JHypertens*. MRC Environmental Epidemiology Unit, Southampton General Hospital, UK; 1996 Jul;14(0263–6352 (Print)):881–6.
10. Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr*. 2004 Sep;134(9):2169–72.

11. Barker DJ, Clark PM. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod* [Internet]. 1997 May;2(2):105–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414472>
12. Dong Y, Yu Z, Sun Y, Zhou H, Stites J, Newell K, et al. Chronic fetal hypoxia produces selective brain injury associated with altered nitric oxide synthases. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011. p. 254.e16-28.
13. Rueda-Clausen CF, Dolinsky VW, Morton JS, Proctor SD, Dyck JRB, Davidge ST. Hypoxia-induced intrauterine growth restriction increases the susceptibility of rats to high-fat diet-induced metabolic syndrome. *Diabetes*. 2011;60(2):507–16.
14. Thompson LP, Dong Y. Chronic hypoxia decreases endothelial nitric oxide synthase protein expression in fetal guinea pig hearts. *J Soc Gynecol Investig* [Internet]. 2005;12(6):388–95. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15982907](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15982907)
15. Figueroa H, Lozano M, Suazo C, Eixarch E, Illanes SE, Carretero JE, et al. Intrauterine growth restriction modifies the normal gene expression in kidney from rabbit fetuses. *EarlyHumDev*. 2012;88(11):899–904.
16. Figueroa H, Cifuentes J, Lozano M, Alvarado C, Cabezas C, Eixarch E, et al. Nitric oxide synthase and changes in oxidative stress levels in embryonic kidney observed in a rabbit model of intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn* [Internet]. 2016 Apr 25 [cited 2016 Apr 28]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27109011>
17. Barker DJP. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2002 Nov;13(9):364–8.
18. Derrick M, Luo NL, Bregman JC, Jilling T, Ji X, Fisher K, et al. Preterm fetal hypoxia-ischemia causes hypertonia and motor deficits in the neonatal rabbit: a model for human cerebral palsy? *J Neurosci*. 2004;24(1):24–34.
19. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989;2(8663):577–80.
20. Ross MG, Beall MH. Adult sequelae of intrauterine growth restriction. *SeminPerinatol*. Department of Obstetrics and Gynecology, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA 90502, USA. [mikeross@ucla.edu](mailto:mikeross@ucla.edu); 2008 Jun;32(0146–0005 (Print)):213–8.
21. Giussani DA, Camm EJ, Niu Y, Richter HG, Blanco CE, et al. Developmental Programming of Cardiovascular Dysfunction by Prenatal Hypoxia and Oxidative Stress. *PLoS ONE* 7(2012) (2): e31017

22. Xue Q, Dasgupta C, Chen M, Zhang L. Foetal hypoxia increases cardiac AT2R expression and subsequent vulnerability to adult ischaemic injury. *Cardiovasc Res* [Internet]. Oxford University Press; 2011 Feb 1 [cited 2017 Jan 24];89(2):300–8. Available from: <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/cvr/cvq303>
23. A. M. Carter, “Animal models of human placentation--a review.,” *Placenta*, vol. 28 Suppl A, pp. S41–S47, 2007.
24. Figueroa H, Alvarado C, Cifuentes J, Lozano M, Rocco J, Cabezas C, et al. Oxidative damage and nitric oxide synthase induction by surgical uteroplacental circulation restriction in the rabbit fetal heart. *Prenat Diagn* [Internet]. 2017 May [cited 2017 May 30];37(5):453–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28252205>
25. Patterson AJ<sup>1</sup>, Zhang L. Hypoxia and fetal heart development. *Curr Mol Med*. 2010 Oct;10(7):653-66. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20712587>
26. Mohn A, Chiavaroli V, Cerruto M, et al. Increased oxidative stress in prepubertal children born small for gestational age. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007;92(4):1372–1378.
27. Thompson LP, Al-Hasan Y. Impact of oxidative stress in fetal programming. *J Pregnancy*. 2012;2012:582748. doi:10.1155/2012/582748.
28. Movafagh S<sup>1</sup>, Crook S, Vo K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem*. 2015 May;116(5):696-703. doi: 10.1002/jcb.25074.
29. Hubbi ME, Hu H, Kshitiz, Ahmed I, Levchenko A, Semenza GL. Chaperone-mediated autophagy targets hypoxia-inducible factor-1 $\beta$  (HIF- 1 $\beta$ ) for lysosomal degradation. *J Biol Chem*. 2013;288(15):10703–14.
30. M.L. Lemus-Varela a , M.E. Flores-Soto b , R. Cervantes-Munguía a , B.M.G. Torres-Mendoza c , et al. Expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and EPO in peripheral blood from patients with two cardiac abnormalities associated with hipoxia. *Clinical Biochemistry* 43 (2010) 234–239.
31. Tekin D, Dursun AD, Xi L. Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2010;31(9):1085-1094. doi:10.1038/aps.2010.132.
32. Soon-Sun Hong, Hyunseung Lee, Kyu-Won Kim. HIF-1 $\alpha$ : a Valid Therapeutic Target for Tumor Therapy. *Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association* 2004; 36(6): 343-353.



33. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem*. 2001;276:9519–9525.
34. Tajima M, Kurashima Y, Sugiyama K, Ogura T, Sakagami H. The redox state of glutathione regulates the hypoxic induction of HIF-1. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2009 Mar 15 [cited 2017 Jan 24];606(1–3):45–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19374849>
35. Duyndam MC, Hulscher TM, Fontijn D, Pinedo HM, Boven E. Induction of vascular endothelial growth factor expression and hypoxia-inducible factor 1alpha protein by the oxidative stressor arsenite. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Dec 21 [cited 2017 Jan 24];276(51):48066–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11641398>
36. Olmos G, Conde I, Arenas I, Del Peso L, Castellanos C, Landazuri MO, et al. Accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha through a novel electrophilic, thiol antioxidant-sensitive mechanism. *Cell Signal* [Internet]. 2007 Oct [cited 2017 Jan 24];19(10):2098–105. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656807001799>
37. Görlach A. Regulation of HIF-1alpha at the transcriptional level. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2009 [cited 2017 Jan 24];15(33):3844–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19671046>
38. Frede S, Freitag P, Otto T, Heilmaier C, Fandrey J. The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2017 Jan 24];65(11):4690–7. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-04-3877>
39. De Ponti C, Carini R, Alchera E, Nitti MP, Locati M, Albano E, et al. Adenosine A2a receptor- mediated, normoxic induction of HIF-1 through PKC and PI-3K- dependent pathways in macrophages. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2007 Aug 18 [cited 2017 Jan 24];82(2):392–402. Available from: <http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0107060>
40. Kasuno K, Takabuchi S, Fukuda K, Kizaka-Kondoh S, Yodoi J, Adachi T, et al. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Jan 23 [cited 2017 Jan 24];279(4):2550–8. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M308197200>
41. Alonso M, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *J Pineal Res* [Internet]. 2006 Aug [cited 2017 Jan 24];41(1):8–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842535>



42. Richard DE, Berra E, Gothié E, Roux D, Pouysségur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Nov 12 [cited 2017 Jan 24];274(46):32631–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551817>
43. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q, et al. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell* [Internet]. 2007 Apr 13 [cited 2017 Jan 24];26(1):63–74. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276507001244>.
44. Vadim V. Sumbayev, Andreja Budde, Jie Zhou, Bernhard Brune. HIF-1 $\alpha$  protein as a target for S-nitrosation. *FEBS Letters* 535 (2003) 106-112.
45. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Li CY. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell*. 2007;26:63–74.
46. Cho H, Ahn DR, Park H, Yang EG. Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1alpha. *FEBS Lett*. 2007;581:1542–1548.
47. Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, et al. HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2017 Jan 24];115(7):1806–15. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/23865>
48. Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, Isenberg JS. Nitric oxide: what's new to NO? *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 18];312:254–62. Available from: [www.ajpcell.org](http://www.ajpcell.org).
49. Balligand J-L, Feron O, Dessy C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* [Internet]. 2009 Apr [cited 2019 Mar 15];89(2):481–534. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00042.2007>
50. Zhang H, Wei Z, Zhu X, Li H, Yu M, Duan Y, et al. Assessment of Left Ventricular Myocardial Systolic Acceleration in Diabetic Rats Using Velocity Vector Imaging. *J Ultrasound Med* [Internet]. 2014 May [cited 2019 Mar 18];33(5):875–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24764343>
51. Lee S-H, Kwak C-H, Lee S-K, Ha S-H, Park J, Chung T-W, et al. Anti-Inflammatory Effect of Ascochlorin in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells Is Accompanied With the Down- Regulation of iNOS, COX-2 and Proinflammatory Cytokines Through NF- $\kappa$ B, ERK1/2, and p38 Signaling Pathway. *J Cell Biochem* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2019 Mar 18];117(4):978–87.

52. Lee R, Margaritis M, Channon KM, Antoniades C. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Curr Med Chem* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 May 4];19(16):2504–20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3412204&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
53. Kwon NS, Nathan CF, Gilker C, Griffith OW, Matthews DE, Stuehr DJ. L-citrulline production from L- arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. *J Biol Chem* [Internet]. 1990 Aug 15 [cited 2019 Mar 15];265(23):13442–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1696255>
54. Erwin PA, Lin AJ, Golan DE, Michel T. Receptor-regulated Dynamic S -Nitrosylation of Endothelial Nitric-oxide Synthase in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 May 20 [cited 2019 Mar 18];280(20):19888–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774480>
55. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine- induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1991 Sep 1 [cited 2019 Mar 20];88(17):7773–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715579>
56. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1997 Apr [cited 2019 Mar 20];15(1):323–50. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>
57. Evans LC, Liu H, Pinkas GA, Thompson LP. Chronic hypoxia increases peroxynitrite, MMP9 expression, and collagen accumulation in fetal guinea pig hearts. *Pediatr Res*. 2012 Jan;71(1):25–31.
58. Jones AK, Brown LD, Rozance PJ, Serkova NJ, Hay, Jr. WW, Friedman JE, et al. Differential effects of intrauterine growth restriction and a hypersinsulinemic-isoglycemic clamp on metabolic pathways and insulin action in the fetal liver. *Am J PhysiolIntegr Comp Physiol* [Internet]. 2019 Feb 13 [cited 2019 Mar 20];ajpregu.00359.2018. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30758974>
59. Li H-H, Xu X-H, Tong J, Zhang K-Y, Zhang C, Chen Z-J. Association of TNF- $\alpha$  genetic polymorphisms with recurrent pregnancy loss risk: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2016 Dec 2 [cited 2017 Nov 2];14(1):6. Available from: <http://www.rbej.com/content/14/1/6>
60. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *BiochimBiophys Acta* [Internet]. 2011 Jul [cited 2014 Dec 30];1813(7):1263–8.

61. Yamazaki K, Endo T, Kitajima Y, Manase K, Nagasawa K, Honnma H, et al. Elevation of Both Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Receptor EP3 Expressions in Rat Placenta after Uterine Artery Ischemia–Reperfusion. *Placenta* [Internet]. 2006 Apr [cited 2019 Mar 22];27(4–5):395–401.  
Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15990166>
62. Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, et al. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem* [Internet]. 1994 Nov 4 [cited 2019 Mar 20];269(44):27580–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525557>
63. de Vera ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM, et al. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Feb 6 [cited 2019 Mar 20];93(3):1054–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8577713>.
64. Shaul YD, Seger R. (2007). La cascada MEK / ERK: desde la especificidad de señalización hasta diversas funciones . *Biochim Biophys Acta* 1773 , 1213-1226. 10.1016 / j.bbamcr.2006.10.005
65. Michael Mutlak. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 as regulators of cardiac hypertrophy. *Front Pharmacol*. 2015; 6: 149.
66. Orlando F. Bueno. Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 in Cardiac Hypertrophy and Cell Death. *Circulation Research*. 2002;91:776–78.
67. Li DY. Role of ERK1/2 in the anti-apoptotic and cardioprotective effects of nitric oxide after myocardial ischemia and reperfusion. *Apoptosis*. 2006 Jun;11(6):923-30.
68. Yaojun Liao. Cardioprotective effect of IGF-1 against myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of PI3K/Akt pathway in rats *in vivo*. *J Int Med Res*. 2019 Aug; 47(8): 3886–3897.
69. Angshuman Maulik. Ischaemic Preconditioning Protects Cardiomyocytes from Anthracycline-Induced Toxicity via the PI3K Pathway. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2018; 32(3): 245–253.
70. Masashi Ueda. Radiolabeled Probes Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1-Active Tumor Microenvironments. *ScientificWorldJournal*. 2014; 2014: 165461.

71. Y Yang. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death Dis.* 2016 May; 7(5): e2234.
72. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1–5.
73. Terrell AM, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, Morrell ED, Meldrum DR. Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock* 2006; 26: 226–234.
74. Carlos Menéndez-Castro. Intrauterine growth restriction - impact on cardiovascular diseases later in life. *Mol Cell Pediatr.* 2018 Dec; 5: 4.
75. Valfredo de Almeida Santos-Junior. Heat Shock Proteins: Protection and Potential Biomarkers for Ischemic Injury of Cardiomyocytes After Surgery. *Braz. J. Cardiovasc. Surg.* vol.33 no.3 São José do Rio Preto May/June 2018.
76. Kukreja RC, Qian YZ, Okubo S, Flaherty EE. Papel de la proteína quinasa C y la proteína de choque térmico de 72 kDa en la tolerancia isquémica después del estrés por calor en el corazón de la rata. *Mol Cell Biochem.* 1999; 195 (1-2): 123-31.
77. Yamanaka K, Takahashi N, Ooie T, Kaneda K, Yoshimatsu H, Saikawa T. Papel de la proteína quinasa C en la expresión inducida por geranilgeranilacetona de la proteína de choque térmico 72 y cardioprotección en el corazón de la rata. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35 (7): 785-94.
78. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* [Internet]. 1969 Mar [cited 2016 Feb 25];27(3):502–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4388022>
79. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* [Internet]. 1980 Jul 15 [cited 2016 May 20];106(1):207–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7416462>
80. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* [Internet]. 1979 Jun [cited 2015 Mar 25];95(2):351–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36810>
81. Wang Y, Li Y, Song L, Li Y, Jiang S, Zhang S. The transplantation of Akt-overexpressing amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells protects the heart against ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Mol Med Rep.* 2016;14(1):234–242. doi:10.3892/mmr.2016.5212.

82. Bloc G, Dietrich M, Norkus EP, et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. *American Journal of Epidemiology*. 2002;156:274–285.
83. Siciarz A, Weinberger B, Witz G, Hiatt M, Hegyi T. Urinary Thiobarbituric Acid–Reacting Substances as Potential Biomarkers of Intrauterine Hypoxia. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2001;155 (6):718–722. doi:10.1001/archpedi.155.6.718.
84. Buonocore GPerrone SLongini MTerzuoli LBracci R Total hydroperoxide and advanced oxidation protein products in preterm hypoxic babies. *Pediatr Res*. 2000;47221- 224.
85. Evans LC<sup>1</sup>, Liu H, Pinkas GA, Thompson LP. Chronic hypoxia increases peroxynitrite, MMP9 expression, and collagen accumulation in fetal guinea pig hearts. *Pediatr Res*. 2012 Jan;71(1):25-31. doi: 10.1038/pr.2011.10.
86. Kanski J, Behring A, Pelling J, Schöneich C. Proteomic identification of 3-nitrotyrosine-containing rat cardiac proteins: effects of biological aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H371–81.
87. Zhang HH, Wang YP, Chen DB. Analysis of nitroso-proteomes in normotensive and severe preeclamptic human placentas. *Biol Reprod*. 2011;84(5):966–975. doi:10.1095/biolreprod.110.090688..  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3080422/>
88. Peraçoli Jose C <sup>a</sup>.Bannwart-Castro Camila<sup>a</sup>Romao Mariana. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early-from late-onset preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*Volume 100, Issue 2, December 2013, Pages 129-134.
89. Barut F<sup>1</sup>, Barut A, Dogan Gun B. Expression of heat shock protein 70 and endothelial nitric oxide synthase in placental tissue of preeclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Pathol Res Pract*. 2010 Sep 15;206(9):651-6. doi: 10.1016/j.prp.2010.04.001. Epub 2010 May 15.
90. Giussani D. A., Camm E. J., Niu Y., Richter H. G., Blanco C. E., Gottschalk R., et al. . (2012). Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress. *PLoS ONE* 7:e31017. 10.1371/journal.pone.0031017.
91. Ghigo\* A. and Mingchuan Li. Phosphoinositide 3-kinase: friend and foe in cardiovascular disease. *Front. Pharmacol.*, 13 August 2015 | <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00169>.

