

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTOS DEL SULFATO DE MAGNESIO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL
PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA, SU
RECEPTOR Y RAMP1 EN PLACENTAS DE MUJERES CON
PREECLAMPSIA**

T E S I S

que para obtener el título de :

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta

Francisco Romero Alvarado

México, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Profesor:	Elena Zambrano González
Vocal	Profesor:	Euclides Avila Chávez
Secretario	Profesor:	Ana Carolina Ariza Gutiérrez
1er suplente	Profesor:	Oscar Armando Pérez Méndez
2° suplente	Profesor:	Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Biología de la Reproducción

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Asesora: **Dra. Ana Carolina Ariza Gutiérrez**

Sustentante: **Francisco Romero Alvarado**

A mi familia, amigos y Magui...

ÍNDICE

I. Resumen	3
II. Introducción	5
2.1 Preeclampsia	5
2.2 Placenta	7
2.3 Péptido relacionado con el gen de la calcitonina	11
2.3.1 Factores vasoactivos y preeclampsia	15
2.3.2 CGRP durante la gestación y la preeclampsia	15
2.4 Magnesio	18
2.4.1 Efectos del sulfato de magnesio sobre factores vasoactivos	19
2.4.2 El sulfato de magnesio en la prevención de la eclampsia	20
III. Justificación	23
IV. Objetivos	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos particulares	25
V. Hipótesis	26
VI. Material y métodos	27
6.1 Pacientes	27
6.2 Tamaño de muestra	29
6.3 Registro de datos clínicos y toma de muestras	29
6.4 Estudios de expresión	30
6.4.1 Aislamiento de RNA	31
6.4.2 Preparación del cDNA por RT-PCR	32
6.4.3 Amplificación por PCR en tiempo real	32
6.5 Análisis estadístico	34
VII. Resultados	35
7.1 Características clínicas de la población	35
7.2 Efectos del MgSO ₄ sobre la presión arterial	36
7.3 Expresión de CGRP, RAMP1 y CRLR	37
7.4 Efecto del tratamiento con MgSO ₄ en la expresión génica de CGRP, CRLR y RAMP1 en placentas de mujeres con PE.	38
VIII. Discusión	41
IX. Conclusiones	47
X. Perspectivas	48
XI. Bibliografía	49

Abreviaturas

PE	Preeclampsia
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CGRP₈₋₃₇	Antagonista de CGRP
CGRP-Z	Sondas para CRLR
RAMP	Proteína modificadora de la actividad del receptor
RMP1-X	Sondas para RAMP1
CRLR	Receptor similar al receptor de calcitonina
RCP	Proteína componente del receptor
NT	Normotenso
PESF	Preeclampsia tratada con solución fisiológica
PEMgSO₄	Preeclampsia tratada con sulfato de magnesio
AMPc	Monofosfato 3'-5' cíclico de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
hCG	Gonadotropina coriónica humana
hPL	Lactógeno placentario
PTHrp	Péptido relacionado con la hormona paratifoidea
NO	Óxido nítrico
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
Ang II	Angiotensina II
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAM	6-carboxifluoresceína
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
UNAM	Ácido ribonucleico mensajero
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
PBS	Solución salina amortiguada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Retrotranscripción
G	Gramos
Mg	Miligramos
μg	Microgramos
mL	Mililitros
μL	Microlitros
S	Segundos
mm Hg	milímetros de mercurio

I.RESUMEN

La preeclampsia (PE) es una de las enfermedades hipertensivas inducidas por el embarazo. El daño en las células endoteliales provoca un desequilibrio en la síntesis y/o acción de factores vasoactivos, lo que conlleva al desarrollo de hipertensión y proteinuria. Entre los factores vasoactivos que se encuentran alterados durante la PE se encuentra el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (por sus siglas en inglés CGRP) que es un potente vasodilatador que contribuye al control del flujo sanguíneo sistémico y local. El receptor del CGRP está constituido por dos partes: el receptor denominado CRLR calcitonin receptor like receptor (CRLR) y una proteína transmembranal denominada receptor activity modifying protein (RAMP) que determina la especificidad del receptor. La administración de $MgSO_4$ en la PE previene las convulsiones y disminuye la presión arterial, sin embargo el mecanismo por el que actúa se desconoce. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del tratamiento con $MgSO_4$ sobre la expresión placentaria de CGRP, CRLR y RAMP1 en la preeclampsia mediante el análisis de la expresión placentaria del RNAm de CGRP, CRLR y RAMP1 con la técnica de PCR en tiempo real. El análisis se realizó en placentas obtenidas de tres grupos de mujeres; un grupo normotenso (NT, n = 10), un grupo con PE tratado con solución fisiológica (PESF, n = 8) y grupo con PE tratado con $MgSO_4$ (PEMgSO₄ n = 10). En el grupo PEMgSO₄ disminuyó tanto la presión arterial sistólica (144.0 ± 1.8 mm Hg vs.

130.0 ± 3.3 mm Hg, P < 0.01) como la diastólica (98.0 ± 1.6 mm Hg vs. 77.5 ± 3.7 mm Hg, P < 0.01). En la PE, el grupo PESF mostró mayor expresión génica de CRLR y RAMP1 (PESF vs. NT, P = 0.01) y (PESF vs. NT, P = 0.0015) respectivamente, sin cambios para CGRP. La administración de MgSO₄ indujo la sobreexpresión de CGRP (PEMgSO₄ vs. PESF, P = 0.0035), CRLR (PEMgSO₄ vs. PESF, P = 0.03) encontrándose la menor expresión de éste en el grupo control y finalmente, la expresión de RAMP1 fue mayor en comparación con el grupo NT (PEMgSO₄ vs. NT, P = 0.0011), pero similar al grupo PESF. En conclusión, en las mujeres con PE el aumento en la expresión de los genes CRLR y RAMP1 puede representar un mecanismo de compensación que contrarresta la disminución en el flujo uteroplacentario. La administración de MgSO₄ aumentó la expresión de CGRP y mantuvo la sobreexpresión de CRLR y RAMP1 generando vasodilatación.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Preeclampsia

La preeclampsia (PE) es una de las enfermedades hipertensivas inducidas por el embarazo. La PE representa un problema de salud pública en México ya que afecta del 2 al 6 % de las mujeres embarazadas que acuden a los hospitales ¹⁻⁵. Esta enfermedad es comúnmente diagnosticada con la presencia simultánea de hipertensión y proteinuria, encontrándose ambas condiciones después de la semana 20 de gestación ⁶. En la actualidad la etiología de la PE se desconoce y ninguna de las teorías propuestas ha podido explicar en su totalidad su origen y desarrollo. Se ha sugerido que el daño en las células endoteliales o disfunción de las mismas provoca un desequilibrio en la síntesis y/o acción de agentes vasoconstrictores y vasodilatadores, lo cual conlleva a un vasoespasmo generalizado y a la disminución de la perfusión sanguínea de los órganos ^{7,8}. Una vez presentado el daño endotelial se incrementa la resistencia vascular y en consecuencia disminuye el flujo uteroplacentario ⁹. El flujo placentario determina la biodisponibilidad de nutrientes por lo que no es raro encontrar que en mujeres preeclámplicas cuyo flujo se encuentra disminuido de 2 a 3 veces, el peso del feto o el peso de nacimiento del neonato sea menor que los que presenta un mujer normotensa ¹⁰.

La PE requiere la presencia de la placenta para iniciarse, pues es en este órgano en donde la remodelación de las arterias espirales conforma un sistema

de baja resistencia vascular que aporta flujo sanguíneo al feto en crecimiento; sin embargo, en la PE existe una disfunción en la remodelación vascular lo cual evita una respuesta adecuada al incremento en la demandas fetales; esto conlleva a la disminución de la perfusión, hipoxia e isquemia en la unidad fetoplacentaria ¹¹.

La constricción vascular provoca una resistencia al flujo sanguíneo y se presume que tales cambios vasculares culminan en hemorragia, necrosis y otros trastornos en la función de la placenta. En la mayor parte de los casos de preeclampsia avanzada está indicado el parto, debido a que la cuenta de plaquetas continúa en descenso. En general, cuanto mas baja sea la cuenta de plaquetas, mayores serán la morbilidad y mortalidad maternas y fetales. La elevación de las enzimas hepáticas y el descenso de plaquetas, en conjunto, se conoce como síndrome de HELLP, esto por sus siglas en inglés, hemólisis (H), elevación de las enzimas hepáticas (LP) y plaquetas bajas (LP).

2.2 Placenta

La placenta humana es un órgano que mantiene el crecimiento normal y el desarrollo del feto durante el embarazo. La implantación y la formación de la placenta es un proceso altamente coordinado que involucra la interacción entre las células maternas y las células embrionarias. Cuando ocurre el proceso de implantación embrionaria en el ser humano, las células trofoblásticas desplazan y sustituyen a las células epiteliales de la decidua materna hasta finalizar en cambios en la estructura vascular uterina. La invasión de las células trofoblásticas a los tejidos uterinos y el remodelaje de las arterias espirales uterinas, aseguran que la placenta en desarrollo reciba el suplemento necesario de sangre y que se lleve a cabo una transferencia de nutrimentos y gases, así como la eliminación de desechos. Sin embargo, en la PE la irrupción trofoblástica no alcanza las arterias radiales del miometrio impidiendo que se dilaten y ofrezcan menor resistencia útero-placentaria. Las células trofoblásticas tienen un comportamiento biológico único, ya que tienen la capacidad de infiltrar o invadir el endometrio formando múltiples ramificaciones o arborescencias llamadas vellosidades coriales. Alrededor de cada una de estas vellosidades llegan las arterias maternas y forman lagos sanguíneos que regresan por las venas a la circulación materna ¹².

Aunque la invasión superficial del trofoblasto puede explicar el origen de la PE, no está claro el fenómeno de la invasión deficiente. Figura 1.

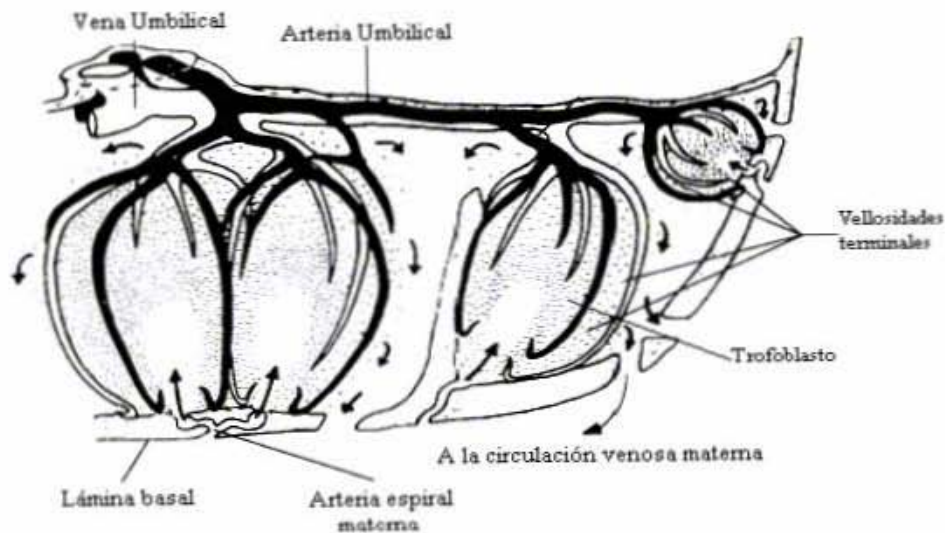


Figura 1. Organización de la placenta madura humana. (Modificado de Moore, 1988).

La placenta humana es un órgano de la cual depende el feto, en donde la sangre materna está en contacto directo con las células trofoblásticas de la placenta y permite una relación estrecha entre el embrión en desarrollo y el flujo de nutrientes ¹². Entre las principales funciones que realiza la placenta se encuentran: el transporte, metabolismo, protección y función endócrina. En cuanto al transporte, la placenta provee oxígeno, agua, carbohidratos, aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales y otros nutrientes al feto; al mismo tiempo retira dióxido de carbono y otros productos de desecho ¹³. El magnesio se transporta activamente a través de las membranas fetales ¹⁴. Además, existen

varios sistemas de transporte de iones en la placenta, incluyendo intercambiadores de Na^+/H^+ y las ATPasas de Ca^{2+} y Na^+/H^+ ¹⁵.

La placenta libera hormonas que influyen en el embarazo, en el metabolismo, en el crecimiento fetal, en el parto y en otras funciones. Entre las hormonas que se producen en la placenta podemos citar a la gonadotropina coriónica humana (hCG), a los estrógenos y a la progesterona, entre otras. La hCG es una hormona que se produce por la células trofoblásticas y su función es impedir la involución del cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo es responsable de la producción de la progesterona, hormona esencial para el desarrollo de la decidua y para reducir la contractilidad del útero grávido impidiendo contracciones uterinas capaces de causar aborto. Al mantener el cuerpo lúteo, la hCG también hace que éste secrete mas estrógenos los cuales tienen función proliferativa sobre la mayor parte de los órganos sexuales maternos: aumento de tamaño del útero y de los senos ¹⁶. La hormona lactógeno placentario (hPL), también es producida en la placenta. Esta hormona está involucrada en dos importantes procesos; el primero es en el metabolismo de ácidos grasos que proporciona energía para atender al metabolismo durante el embarazo y segundo, en la formación de vasos sanguíneos fetales ¹⁶. El péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) activa receptores en el trofoblasto y promueve la resorción ósea y transporte de calcio hacia la sangre para el crecimiento y la osificación de los huesos fetales ¹⁷.

La placenta protege al feto contra moléculas xenobióticas, infecciones y enfermedades de la madre. Por lo tanto, es comprensible que una característica notoria de la gestación humana sea el éxito de las adaptaciones fisiológicas de la mujer embarazada y los mecanismos compensatorios durante la PE.

2.3 Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) es un neuropéptido de 37 aminoácidos y pertenece a una familia de neuropéptidos que incluyen a la calcitonina (CT), la adrenomedulina y la amilina. El CGRP se deriva del corte y empalme alternativo del gen CT/CGRP localizado en el cromosoma 11 en humanos ^{18,19}. Figura 2.

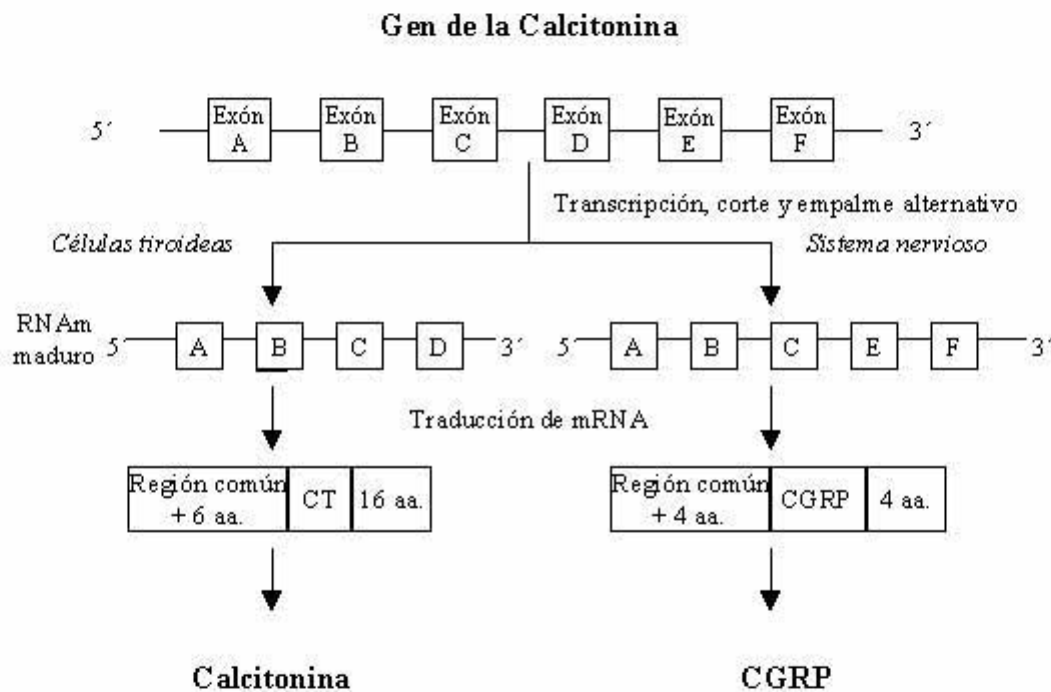


Figura 2. Síntesis del CGRP. El gen del CGRP conformado por 6 exones y 5 intrones se transcribe en pre-RNAm y por el corte y empalme alternativo da lugar al RNAm maduro de 5 exones. El RNAm se traduce en el precursor del CGRP y después de un procesamiento proteolítico se produce la proteína CGRP de 37 aminoácidos. (Modificado de Steenbergh, 1986).

El CGRP es un potente vasodilatador que contribuye al control del flujo sanguíneo tanto a nivel sistémico como a nivel local. Tanto el CGRP como su

receptor se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo ²⁰. Diversos estudios indican que el CGRP se produce en el sistema nervioso central y en el periférico ^{18,20}, en células endoteliales ²¹, en decidua ²² y en vellosidades ²³.

El receptor de CGRP, conocido como calcitonin receptor like receptor (CRLR) es un receptor que tiene siete dominios transmembranales y un dominio rico en cisteínas en el dominio amino terminal. Está constituido por dos partes: el receptor CRLR per se y una proteína accesoria llamada proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP) ²⁴.

Las RAMPs son proteínas de 148 aminoácidos constituidas por un anillo de 6 aminoácidos cercano al extremo amino terminal, formado por un puente disulfuro, un dominio transmembranal y un pequeño dominio intracelular ²⁵. Se han descrito tres subtipos de proteínas RAMP: 1, 2 y 3 ²⁶.

El dominio extracelular de la RAMP1 confiere la especificidad del CRLR al CGRP. Algunos estudios indican que la RAMP 1 presenta al CRLR como una glicoproteína madura en la superficie celular para formar el receptor para CGRP, mientras que los receptores transportados por las RAMP 2 y 3 forman el receptor para adrenomedulina ²⁷. Esta proteína es un vasodilatador y está implicada en la regulación de electrolitos en el organismo.

Hasta la fecha, no se conoce con certeza si RAMP1 participa como proteína chaperona en la movilización del CRLR hacia la superficie celular ²⁸. Datos bioquímicos y de microscopía confocal indican que las RAMPs y sus

receptores forman dímeros estables que se originan en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Los dímeros son mantenidos durante el proceso de translocación a la superficie celular, activación por el agonista, internalización y degradación lisosomal ²⁹. Fitzsimmons y cols., demostraron que el amino terminal de cada RAMP es suficiente para mantener la interacción funcional entre RAMP y el receptor CRLR ³⁰. El CRLR requiere la interacción con RAMP para formar un heterodímero funcional con su ligando ²⁴. Figura 3.

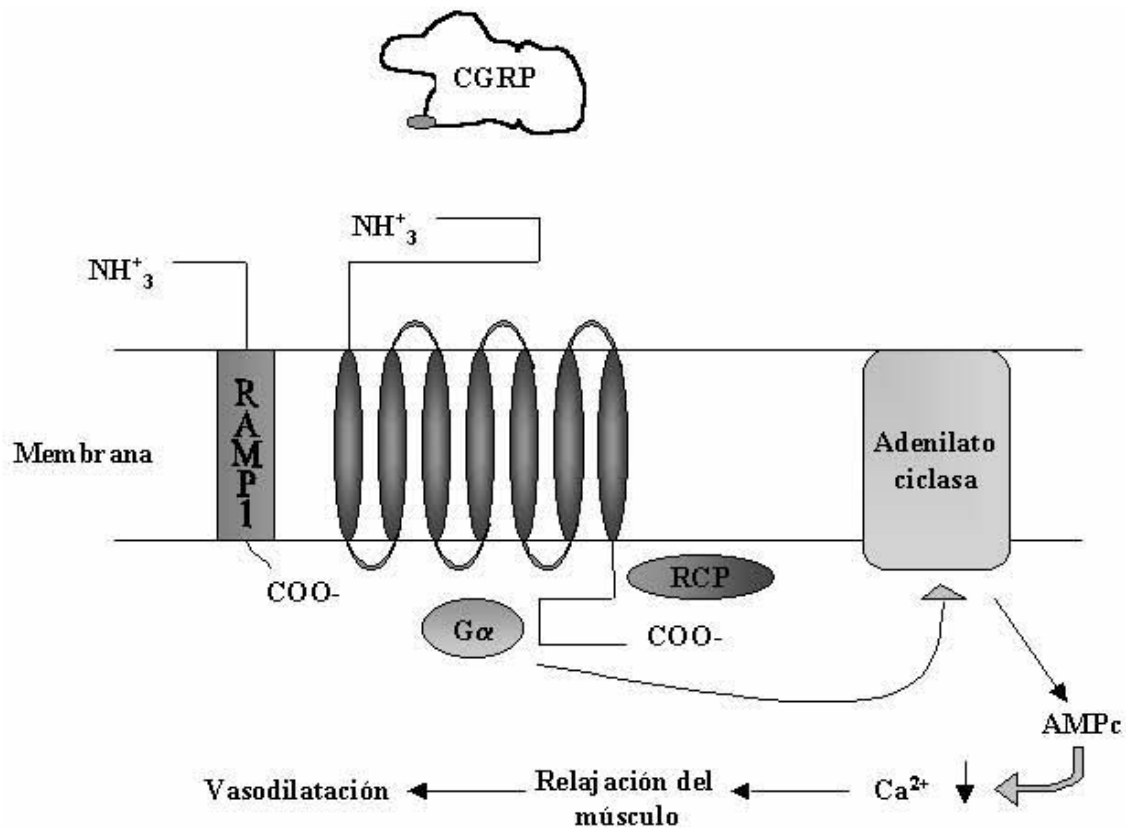


Figura 3. Mecanismo de acción de CRLR. La unión del CGRP a su receptor (CRLR) acoplado con la proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP1) y la proteína componente del receptor (RCP) estimula a la enzima adenilato ciclasa generando AMPc cuyo efecto principal es la disminución de la concentración de Ca²⁺ intracelular y en consecuencia la relajación del músculo liso. (Modificado de Brain, Susan D., 2004).

En una gran variedad de tejidos, la unión de CGRP a su receptor se traduce en una relajación de la vasculatura del corion y las venas fetoplacentarias, además de reducir la resistencia vascular en cotiledones perfundidos ^{32,33}. El mecanismo que explica estas observaciones implica la activación de la adenilato ciclasa que causa el incremento en los niveles intracelulares de AMP cíclico ³⁴ con la consecuente disminución de Ca^{2+} intracelular y la producción de óxido nítrico (NO) ^{35,36} en donde ambas causas convergen en vasodilatación ²⁰.

El CRGP per se activa otra vía de dilatación, ésta es mediante la activación de canales K^{+}_{ATP} ³⁷. En condiciones basales existen evidencias de que el NO juega un papel importante en la regulación de la hemodinamia renal. La arteriola aferente sintetiza y libera NO y las arteriolas tanto aferentes como eferentes liberan NO incrementándose el GMPc ³⁸. Cuando se prolonga la inhibición de la síntesis del NO no sólo se eleva la presión arterial sino también se produce lesión vascular renal y proteinuria ³⁹. El NO está aumentado en la placenta durante el embarazo normal, contribuyendo a la vasodilatación; sin embargo los estudios sobre su concentración durante la PE no son contundentes, ya que se ha encontrado disminuida ⁴⁰ o aumentada ⁴¹.

2.3.1 Factores vasoactivos y preeclampsia

La hipertensión que se manifiesta en mujeres con PE puede deberse a la alteración en la síntesis y/o acción de agentes vasoconstrictores tales como la angiotensina II (AII), la endotelina (ET-1) y los tromboxanos; así como a la alteración de agentes vasodilatadores tales como el NO, las prostaciclina, el CGRP y el PTHrP. En comparación con mujeres embarazadas normotensas, las concentraciones de prostaciclina^{42,43}, PTHrP y CGRP son significativamente menores en la mujer con PE⁴⁴. Durante la PE, los efectos benéficos del sulfato de magnesio involucran no solamente la prevención de las convulsiones sino también una reducción de la presión arterial, efectos posiblemente mediados por cambios en la síntesis de factores vasoactivos.

Entre los factores vasoactivos, el presente proyecto se limita al estudio del CGRP y su receptor.

2.3.2 CGRP durante la gestación y la preeclampsia

A nivel fisiológico se ha demostrado que la administración de CGRP aumenta el flujo renal, la filtración glomerular y favorece la natriuresis en ratas hipertensas⁴⁵. Otros estudios en estos animales preñados, indican que existe un aumento no solamente en la concentración del CGRP sino también de su receptor en el útero. Además, se ha encontrado que los factores hormonales, específicamente la progesterona y el estradiol, están involucrados en este

aumento ⁴⁶. La administración de CGRP a animales normotensos e hipertensos se asocia con menor resistencia vascular y disminución en la presión arterial ⁴⁷; mientras que al administrar un antagonista del CGRP, (CGRP₈₋₃₇) se observa un aumento en la presión arterial, disminución del peso fetal e incremento en la mortalidad fetal de forma dosis dependiente ⁴⁸. Con estas observaciones, se sugiere a este péptido como un tratamiento potencial de la hipertensión inducida por el embarazo ⁴⁷.

Dentro de los factores que promueven la expresión del CGRP se encuentran el NO ⁴⁹, la progesterona ^{46,50}, el TNF α ⁵¹ y el AMPc ⁵², mientras que se ha descrito que el ácido retinóico y los glucocorticoides disminuyen su expresión ⁵².

Se ha observado que las concentraciones de CGRP aumentan tanto en el compartimiento materno como en el fetal durante el embarazo de mujeres normotensas y que disminuyen al momento del parto y posparto ⁵³, mientras que en mujeres preeclámpticas se ha observado una concentración de CGRP significativamente más baja ⁴⁴. Dong y cols. ⁵⁴ observaron que la expresión de CGRP, CRLR y RAMP1 está disminuida en la vasculatura de placentas obtenidas de mujeres preeclámpticas.

Los resultados obtenidos por Gangula y cols ⁴⁸. indican que la disminución en la concentración del CGRP circulante constituye uno de los factores implicados en el desarrollo y sostenimiento de la hipertensión durante

el embarazo; pues se alteran la apertura de los canales de K^+ , la acción del AMPc sobre los niveles de Ca^{2+} y la producción de NO. Además, la magnitud del incremento del CGRP en el suero fetal se encuentra asociada de manera positiva con el peso fetal. Interesantemente se ha demostrado que la expresión génica de CGRP y CRLR está significativamente disminuida en el corion pero no en las vellosidades de placentas de mujeres preeclámpticas ²³; sin embargo existen pocos datos que ayuden a explicar la alteración del CGRP en la placenta durante la PE.

En los últimos años se han realizado estudios en animales para observar la expresión y el efecto de CGRP, CRLR y RAMP1. Se ha observado que el CGRP presenta mayor poder vasodilatador a nivel del miocardio en ovejas ⁵⁵ y a nivel del miocardio y de la arteria coronaria en cerdos ^{56,57}. La expresión del RNAm de la RAMP1 se encuentra elevada en arterias coronarias de cerdo ⁵⁷, sugiriendo que el incremento del poder vasodilatador del CGRP se debe a un aumento en el número de receptores o a cambios conformacionales en el receptor. Tales cambios probablemente son inducidos por la hipoxia ⁵⁸. Hallazgos recientes muestran que la hipoxia crónica aumenta la expresión del CRLR y RAMP1 en células de músculo liso vascular humano ⁵⁹. En células endoteliales vasculares, se demostró que el gen CRLR presenta un elemento de respuesta a hipoxia, sin embargo se desconoce si RAMP1 también lo presenta ⁶⁰.

2.4 Magnesio

El organismo humano contiene 21-28 g de magnesio, de los cuales el 53% se localiza en el hueso, 46% en el músculo y en tejidos blandos, y el resto se encuentra en eritrocitos y en el medio extracelular ⁶¹. En este último, 60% circula en forma libre, 30% se encuentra unido a proteínas plasmáticas y el Mg^{2+} remanente forma complejos con fosfatos, citratos y otros aniones ⁶². A nivel intracelular, el Mg^{2+} es el segundo catión más abundante después del potasio y se encuentra unido a ATP, ADP, citratos, proteínas y ácidos nucleicos ⁶³.

La homeostasis del Mg^{2+} es regulada principalmente por el riñón. En un adulto, el glomérulo filtra diariamente un promedio de 2,520 mg de magnesio, de los cuales el 96% se reabsorbe y únicamente se excreta el 4%. A nivel del asa de Henle la presencia de receptores de péptidos como la CT y el CGRP induce un incremento del AMPc. Este aumento causa la activación del contratransportador Mg^{2+}/Na^+ y da lugar a la reabsorción de Mg ⁶⁴. Y mediante la activación del receptor sensor de Ca^{2+}/Mg^{2+} (CaR) se presenta el efecto opuesto para equilibrar la cantidad del Mg ⁶⁵.

El Mg^{2+} presenta funciones estructurales, metabólicas y génicas ⁶¹. Se ha comprobado que la deficiencia de Mg se traduce en la disminución de la expresión del RNAm de ciclina D1 ⁶⁶, integrinas ⁶⁷, citocromo c y glutatión transferasa ⁶⁸, entre otros.

El incremento en la concentración de CGRP inducida por el MgSO_4 se traduce por el aumento en la concentración de AMPc y por ende favorece la transcripción del gen codificador de este péptido ya que el promotor del CGRP presenta un elemento de respuesta al AMPc (CRE) ⁵². Esto está apoyado por la observación de que el Mg^{2+} modula la afinidad de unión del factor de transcripción CREB a sus elementos de respuesta CRE en el DNA ⁶⁹.

2.4.1 Efectos del sulfato de magnesio sobre factores vasoactivos

El sulfato de magnesio además de prevenir las convulsiones que se presentan en la eclampsia, reduce la presión arterial que se presenta durante la PE ^{70,71}, efectos posiblemente mediados por cambios en la síntesis de factores vasoactivos. Además de sus efectos anticonvulsivos y de la disminución de la presión arterial también inhibe la vasoconstricción y la secreción de tromboxanos inducidos por el peróxido en placentas de mujeres embarazadas normotensas ⁷, aumenta la sensibilidad de los trombocitos a la prostaciclina ⁷², revierte la hipertensión inducida por angiotensina II en ratas ⁷³, reduce la actividad de la renina ⁷⁴ y reduce la vasoconstricción en arterias umbilicales. Además, se ha observado que después de la administración de MgSO_4 , la concentración en sangre de CGRP aumenta ^{44,75}.

A nivel de la placenta, el MgSO_4 atenúa la vasoconstricción inducida por peróxidos en cotiledones placentarios ⁷⁶, atenúa la vasoconstricción inducida

por endotelina ⁷⁷ y por peróxidos en la vasculatura placentaria ⁷⁸, relaja las arterias ³⁵ y venas umbilicales ⁷⁹, y aumenta la secreción de prostaciclina en células endoteliales de la vena del cordón umbilical ⁸⁰.

Entre los factores vasoactivos que se encuentran en desequilibrio durante la PE, el presente proyecto se limita al estudio de la expresión génica del CGRP, CRLR y RAMP1 en la placenta.

2.4.2 El sulfato de magnesio en la prevención de la eclampsia

La mayor complicación de la preeclampsia es la evolución a eclampsia, estado en el cual la embarazada presenta convulsiones y que se asocia con un incremento significativo en la tasa de mortalidad materna y/o fetal. Existen distintos agentes anticonvulsivos tales como la fenitoína y las benzodiazepinas. Sin embargo, la administración del $MgSO_4$ se considera el mejor tratamiento profiláctico ya que no representa riesgo alguno tanto para la madre como para el feto ⁸¹. Los niveles de Mg^{2+} se han encontrado bajos en las pacientes con PE ⁸²; y también hay evidencia de niveles bajos de Mg^{2+} eritrocitario. Por otro lado, se ha observado que la diferencia de concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el citoplasma se halla frecuentemente asociada en individuos que padecen hipertensión arterial ⁸³. Se ha comprobado que las concentraciones de Ca^{2+} dentro de la célula son de 10^3 a 10^4 veces menores que fuera de ella por lo que existe un gradiente que favorece la entrada de Ca^{2+} . Este gradiente se mantiene

estable por las bombas de Ca^{2+} . Durante el embarazo, se presenta hipercalciuria debido al aumento en la absorción intestinal e incremento en la filtración glomerular, contribuyendo de esta manera a una inversión de la relación $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ en la circulación ⁸⁴. Usando técnicas de micropuntura se ha demostrado que los niveles elevados del magnesio en el líquido extracelular, contribuyen a la inhibición de la reabsorción del calcio a nivel del asa de Henle ⁸⁵, y que la excreción aumentada de calcio urinario durante el tratamiento con MgSO_4 es debida a que el calcio y el magnesio compiten por sitios comunes de reabsorción a nivel de la nefrona ⁸⁶.

Está bien documentado que el incremento en el Ca^{2+} celular se encuentra acompañado de un aumento en la presión sanguínea y esto causa que el endotelio sea susceptible a efectos constrictores tales como los de la angiotensina ⁸⁷. Se ha reportado que el MgSO_4 suprime las convulsiones inducidas en ratas por lo que se sugiere que el MgSO_4 debe actuar a través de un proceso enzimático de regulación del calcio intraneural que alterna con la excitabilidad y produce convulsiones ⁸⁸. La entrada de Ca^{2+} hacia las neuronas es regulada por canales receptores de aminoácidos específicos ⁸⁶. De ahí que el Mg^{2+} puede bloquear la entrada de Ca^{2+} hacia las neuronas. Se ha comprobado que el receptor N-metil D-aspartato (NMDA) es bloqueado por el Mg^{2+} ⁸⁹. Esto demuestra que la actividad anticonvulsivante del MgSO_4 puede ser mediada por el bloqueo de la activación del receptor NMDA.

El MgSO_4 actúa como un vasodilatador potente, específicamente en la vasculatura cerebral. La administración del MgSO_4 a mujeres con PE, reduce el vasoespasmo arterial intracerebral, el cual fue medido por Doppler en la arteria cerebral media ⁹⁰. También se ha demostrado una reducción de la resistencia a nivel vascular sistémica confirmando sus propiedades vasodilatadoras ⁹¹.

Durante el embarazo, el magnesio cruza la barrera placentaria contra un gradiente de concentración, ya que las concentraciones de este nutriente se encuentran más elevadas en el compartimiento fetal con respecto al compartimiento materno ¹⁴. Este transporte está mediado principalmente por un transportador $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ que utiliza la energía del gradiente electroquímico y que ha sido identificado en el trofoblasto humano ⁹². La administración del MgSO_4 se traduce en el aumento significativo en la concentración de magnesio, tanto en la circulación materna como en el cordón umbilical ⁴⁴. Lo anterior muestra que la administración del MgSO_4 en el compartimiento materno puede presentar efectos tanto en la mujer como en la unidad fetoplacentaria ^{14,44}. Además de las propiedades anticonvulsivantes del MgSO_4 , se ha observado que durante su administración disminuye transitoriamente la presión sanguínea ⁹³. Estudios en mujeres preeclámpticas demuestran que la administración de MgSO_4 se traduce en el aumento en las concentraciones del CGRP ⁴⁴; sin embargo, no existen antecedentes precisos acerca de los efectos del MgSO_4 sobre la expresión placentaria de los genes de sustancias vasoactivas ni sobre

sus receptores, por lo que su estudio es de gran trascendencia. A pesar de que no se conocen los mecanismos de acción del magnesio sobre la síntesis de estos factores vasoactivos, lo anterior muestra claramente que el magnesio presenta una interrelación con el CGRP.

III. JUSTIFICACIÓN

En México la PE representa un problema de salud pública pues ocupa el primer lugar de mortalidad materna complicando del 2 al 6% de los embarazos que son atendidos en hospitales, aunque se estima que este porcentaje pueda ser mucho mayor.

La PE se ha definido como la enfermedad de las múltiples teorías, dado que ninguna de ellas ha podido explicar en su totalidad su origen y desarrollo y más aún, no existen agentes predictores seguros para pronosticarla; de ahí la importancia del desarrollo de modelos que ayuden a conocer su fisiopatogenia.

En la PE existen algunos hallazgos comunes y constantes en las pacientes, tales como falla en la invasión trofoblástica, desequilibrio en la síntesis y/o acción de agentes vasoconstrictores y vasodilatadores. Estos factores conllevan a un vasoespasmo generalizado y a la disminución de la perfusión sanguínea hacia los órganos y hacia la placenta, traduciéndose en el retraso del crecimiento del feto, muerte fetal y parto prematuro. En tanto, la madre

presenta complicaciones como falla renal, coagulopatía, síndrome de HELLP, falla hepática y eclampsia.

Uno de los tratamientos preventivos de las convulsiones que se presentan en estados avanzados de preeclampsia (eclampsia), consiste en la administración de $MgSO_4$, usado por obstetras desde 1906. En la preeclampsia, la administración de $MgSO_4$ se traduce en el aumento de las concentraciones de CGRP en suero y en la disminución de la presión arterial. Aunque los mecanismos aún son poco conocidos. El estudio de posibles cambios inducidos por el sulfato de magnesio sobre la expresión del CGRP y su receptor pueden aportar nuevos conocimientos acerca de su regulación.

En este proyecto se analizó si la expresión placentaria de factores vasoactivos como el CGRP, su receptor y RAMP1 se modifica en mujeres tratadas con $MgSO_4$.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Estudiar los efectos del tratamiento con $MgSO_4$ sobre la expresión placentaria de CGRP, CRLR y RAMP1 en la preeclampsia.

4.2 Objetivos específicos

- Corroborar si el $MgSO_4$ disminuye la presión arterial en mujeres con PE.
- Establecer si la expresión placentaria de CGRP, CRLR y RAMP1 se encuentra alterada en mujeres con PE.
- Determinar si el tratamiento con $MgSO_4$ se asocia con cambios en la expresión génica de CGRP, CRLR y RAMP1 en placentas de mujeres con PE.

V. HIPÓTESIS

- La expresión génica de CGRP, CRLR y RAMP1 se encontrará disminuida en mujeres con PE. El tratamiento con $MgSO_4$ en mujeres con preeclampsia disminuirá la presión arterial y se asociará con el aumento en la expresión génica de CGRP, CRLR y RAMP1 en placenta.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Pacientes

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Hospital de Gineco-Obstetricia "Luis Castelazo Ayala" (IMSS) y del Hospital General Manuel Gea González (SSa). La donación de las placentas se realizó con carta de consentimiento informado de las mujeres embarazadas participantes.

El reclutamiento y seguimiento de las mujeres embarazadas se realizó en el Hospital de Gineco-Obstetricia "Luis Castelazo Ayala" (IMSS) donde les fue administrada solución fisiológica, y en el Hospital General Manuel Gea González (SSa); en donde se les administró $MgSO_4$. Este estudio incluyó a mujeres embarazadas normotensas y preeclámpticas moderadas de 18-35 años, con edad gestacional ≥ 37 semanas y el nacimiento de un solo recién nacido con Apgar de 7-10. Cabe mencionar que por cuestiones éticas no se incluyeron mujeres con PE severa. En este trabajo no fueron consideradas las mujeres con hipertensión preexistente y/o preeclampsia previa, antecedentes o diagnóstico de enfermedades renales, hepáticas, cardíacas o cualquier otro desorden endocrino, así como aquellas ingiriendo suplementos nutricionales, diuréticos o bajo tratamiento hormonal. Se consideraron como criterios de exclusión la necesidad de tratamientos alternativos a los descritos anteriormente o el abandono voluntario del estudio. El tratamiento con sulfato de magnesio

consistió en la administración de 4 gramos de MgSO₄ en un tiempo de 30 minutos seguidos de una dosis de MgSO₄ a razón de 1 g/hora durante 3 a 6 horas antes del parto y durante 24 horas posparto.

El diagnóstico de la PE moderada se obtuvo utilizando criterios previamente establecidos ¹ (Tabla1).

	Presión sistólica (mm Hg)	Presión diastólica (mm Hg)	Proteinuria
Preeclampsia moderada	≥ 140	≥ 90 por lo menos en dos ocasiones	1-3 + en tiras reactivas
Preeclampsia severa	≥ 160	≥ 110	Más de 3 + en tiras reactivas

Tabla 1. Criterios del National High Blood Pressure Education Program Working Group.

Las placentas se obtuvieron de los siguientes grupos de mujeres embarazadas:

- Grupo NT: Sin hipertensión y ausencia o trazas de proteinuria.
- Grupo PESF: Preeclampsia moderada tratada con solución fisiológica libre de MgSO₄.
- Grupo PEMgSO₄: Preeclampsia moderada tratada con MgSO₄.

6.2 Tamaño de la muestra

El presente estudio se realizó en placentas de 10 mujeres del grupo NT, 10 del grupo PESF y 8 del grupo PEMgSO₄.

6.3 Registro de datos clínicos y toma de muestras

En el momento de la admisión se registró la presión arterial (PA), los datos clínicos de todos los grupos y se tomaron muestras de orina de las mujeres que presentaron hipertensión para determinar el grado de proteinuria. Cuando el diagnóstico fue positivo para PE se administró el tratamiento preescrito dependiendo del protocolo específico del hospital en donde se atendió a la paciente.

6.4 Estudios de expresión

Al finalizar el parto se colectaron las muestras de tejido placentario, se registró el peso de la placenta, así como el peso y la talla del recién nacido, Figura 4. Una vez expulsada la placenta se procedió de forma inmediata a la disección del tejido placentario, eliminando las membranas fetales y la decidua. Se tomaron aproximadamente 5 gramos, se lavaron con solución salina fría al 0.9%, se colocaron en microtubos de 1.5 mL (3-5 tubos por tejido), y se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido. Las muestras recolectadas se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de la extracción del RNA.

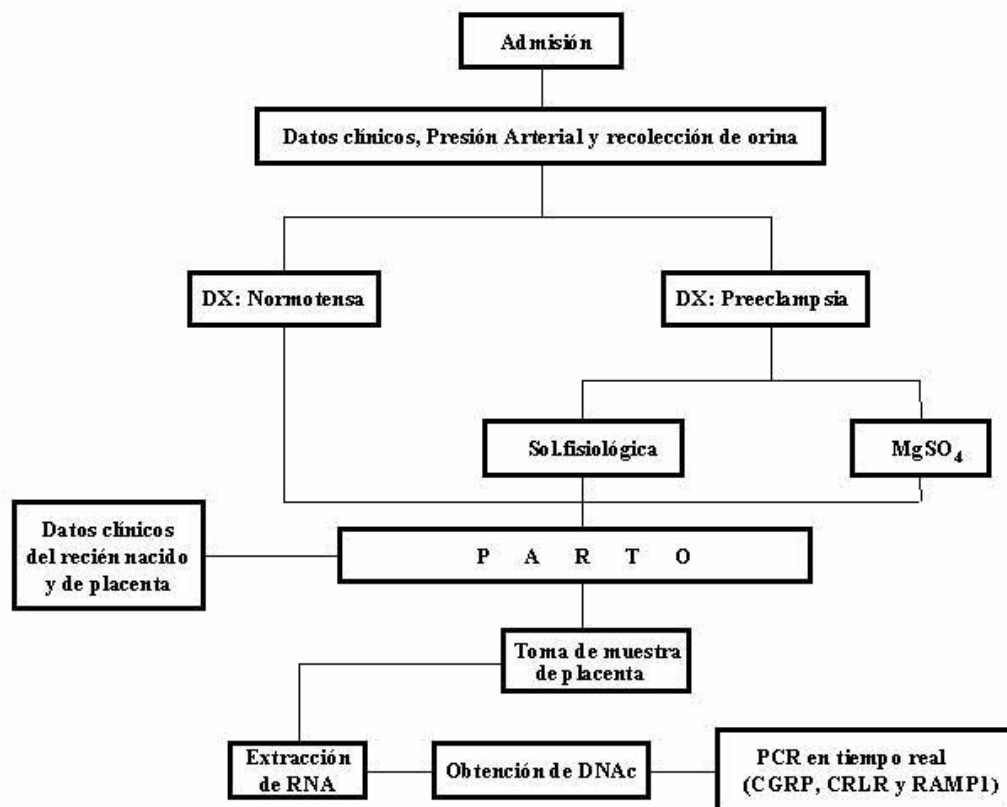


Figura 4. Diagrama de flujo desde la admisión hasta la cuantificación de los niveles de expresión de CGRP, CRLR y RAMP1.

6.4.1 Aislamiento de RNA

La extracción del RNA total del tejido se llevó a cabo mediante la técnica de Trizol[®] LS Reagent. Primero se lavó el politrón con agua desionizada, agua-DEPC antes de comenzar y entre cada una de las muestras. En un tubo de 15 mL, se añadieron 2 mL de trizol por cada 200 mg de tejido y se homogenizó. La muestra se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se añadieron 400 μ L de cloroformo, se mezcló vigorosamente en vortex por 1 minuto y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C en una microcentrífuga. La fase orgánica se desechó y la fase superior se transfirió a un tubo nuevo. Se precipitó con 1 mL de isopropanol frío, se mezcló en vortex y se incubó 20 minutos a -20°C. Se centrifugó por 15 minutos a 14,000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se desechó. Al botón de RNA se le agregaron 800 μ L de etanol frío al 75%, el botón se resuspendió por pipeteo y nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C. Por decantamiento se desechó el sobrenadante y finalmente el RNA se disolvió en agua desionizada, estéril y filtrada.

Las muestras se cuantificaron midiendo su densidad óptica. En un microtubo se colocaron 996 μ L de agua desionizada, estéril y filtrada y 4 μ L de RNA. Se mezcló ligeramente y se leyó a 260/280 nm en celdas de cuarzo. Las concentraciones de los RNAs se ajustaron a 2.5 μ g/ μ L. La integridad del RNA se confirmó por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

6.4.2 Preparación del DNAc por RT-PCR

Para la obtención del DNAc se utilizaron 3 μL de RNA como templado, 1 μL de oligo dT, 1 μL de dNTPs y 5 μL de agua estéril para después homogeneizarla por microcentrifugación. La mezcla se incubó en un termociclador Perkin Elmer 2400 a 65°C durante 5 minutos. En otro microtubo se preparó otra mezcla que contenía: 2 μL de amortiguador PCR 10X, 4 μL de MgCl_2 25 mM, 2 μL de DTT 0.1 M y 1 μL de RNAsa Out. Esta mezcla se agregó al RNA y se incubó a 25°C por 2 minutos. Posteriormente se agregó 1 μL de la enzima SuperScript™ II RT, se homogenizó con la pipeta y se continuó con la incubación a 42 °C por 50 minutos, 70 °C durante 15 minutos y 37 °C durante 25 minutos. Finalmente se agregó 1 μL de RNasa H y se incubó por 20 minutos a 37°C. El DNAc se guardó a -20°C hasta proceder al PCR en tiempo real. Los productos de PCR y un marcador de tamaño (pb) se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

6.4.3 Amplificación por PCR en tiempo real

El RT para la obtención de los DNAc de las muestras se llevó a cabo de la forma descrita anteriormente pero utilizando 1 μL (2.5 μg) de RNA como templado. Las sondas comerciales para CGRP (Hs00266142_m1), CRLR (CGRP-Z) y RMP1 (RMP1-X) marcadas con FAM (6-carboxifluoresceína) o VIC TaqMan® se obtuvieron de Applied Biosystems de México, las cuales son específicas para detectar y cuantificar secuencias de DNAc sin detectar DNA genómico.

FAM y VIC son utilizadas como reporteros fluorescentes; estos conjugados detectan cada copia amplificada. La cantidad de fluorescencia de FAM o VIC emitida en cada reacción fue medida como función del número de ciclos de PCR. Se utilizó un equipo ABI 7300 Prism Applied Biosystems (Foster City, CA). Se realizaron curvas de amplificación para evaluar la funcionalidad de las sondas y para la concentración final a utilizar de los DNAc para cada gen. Los resultados fueron normalizados con la expresión del RNA ribosomal 18S. En un volumen final de 15 μ L, las reacciones de PCR contuvieron lo siguiente: 3 μ L de DNAc como templado, 7.5 μ L de TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, 3.9 μ L de agua grado biología molecular y 0.6 μ L de la sonda específica. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 95°C por 15 s, y 60°C por un minuto. Los resultados se registraron utilizando un software de ABI PRISM 7300 SDS (Applied Biosystems). Se obtuvo el ciclo de umbral (Ct) de cada reacción de PCR. El Ct es definido como el número de ciclos al cual la cantidad del blanco amplificado alcanza un umbral fijo, que es el nivel de detección al cual una reacción alcanza una intensidad de fluorescencia por arriba del fondo.

La reacción de expresión del gen experimental con el gen control fue determinado por $2^{-\Delta\Delta CT}$, donde:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{gen experimental}) - \Delta CT (\text{gen control}) 18S$$

$$\Delta CT (\text{gen experimental}) = CT (\text{gen experimental}) - CT (18S)$$

$$\Delta CT (\text{gen normal}) = CT (\text{gen normal}) - CT (18S)$$

El valor de CT de cada gen en cada muestra se determinó por triplicado y los resultados fueron analizados como la relación entre el gen experimental / RNA ribosomal 18S.

6.5 Análisis estadístico

Los resultados están expresados como media \pm error estándar (SEM). Los resultados se evaluaron por ANOVA y la prueba protegida de la diferencia de los cuadrados mínimos de Fisher. El nivel de significancia se consideró con una $P < 0.05$.

VII. RESULTADOS

7.1 Características clínicas de la población

En tabla 2 se muestran las características clínicas basales de las madres y los recién nacidos pertenecientes a los grupos NT, PESF y PEMgSO₄. La edad materna y la edad gestacional fueron similares en todos los grupos. La presión arterial sistólica y la presión arterial diastólica fueron significativamente mayores en el grupo PESF y PEMgSO₄ en comparación con el grupo NT (P < 0.001).

	NT (n = 10)	PESF (n = 10)	PEMgSO ₄ (n = 8)
Edad materna	24.7 ± 1.8	25.3 ± 0.9	22.4 ± 1.4
Edad gestacional	39.2 ± 0.2	39.1 ± 0.4	38.8 ± 0.5
Presión arterial sistólica (mm Hg)	116.0 ± 1.6	140.0 ± 2.6 ^a	144.0 ± 1.8 ^a
Presión arterial diastólica (mm Hg)	74.0 ± 1.6	93.0 ± 1.52 ^a	98.0 ± 1.6 ^a
Proteinuria (mg/dL)	Trazas	≥ 100	≥ 100
Peso del recién nacido (kg)	3.22 ± 0.11	3.31 ± 0.98	3.07 ± 0.22
Peso de la placenta (g)	587.3 ± 27.6	613 ± 26.0	551.6 ± 17.8

Tabla 2. Características clínicas basales de los grupos NT, PESF y PEMgSO₄. Los valores están expresados como media ± error estándar. ^aP < 0.001 vs NT.

7.2 Efectos del MgSO₄ sobre la presión arterial

El sulfato de magnesio además de prevenir las convulsiones disminuye la presión arterial que se presenta durante la PE ^{70,71}. Los efectos del con MgSO₄ sobre la presión arterial en las mujeres con PE se muestran en la Tabla 3. La presión arterial sistólica fue de 144 ± 1.8 mm Hg antes del tratamiento y disminuyó significativamente durante el tratamiento con MgSO₄ al momento del parto 130.0 ± 3.3 mm Hg, $P < 0.01$. De manera similar, la presión arterial diastólica fue de 98 ± 1.6 mm Hg antes del tratamiento con MgSO₄ y disminuyó significativamente al momento del parto 77.5 ± 3.7 mm Hg, $P < 0.01$. Tabla 3.

	antes	después
Presión arterial sistólica (mm Hg)	144.0 ± 1.8	130.0 ± 3.3
Presión arterial diastólica (mm Hg)	98.0 ± 1.6	77.5 ± 3.7

Tabla 3. Presión arterial sistólica y presión arterial diastólica antes del parto. Los resultados están expresados como media \pm error estándar.

7.3 Expresión placentaria de CGRP, CRLR y RAMP1

Para determinar si la expresión placentaria de CGRP, CRLR y RAMP1 se encuentra modificada en la PE, se analizaron mediante PCR en tiempo real los RNAm en placentas del grupo NT y el grupo con PE tratado con solución fisiológica (PESF).

Los análisis mostraron que los niveles de expresión de CGRP se mantuvieron sin cambios, mientras que la expresión de CRLR y de RAMP1 fue significativamente más alta en las mujeres preeclámpticas en comparación con las mujeres normotensas. Figura 5.

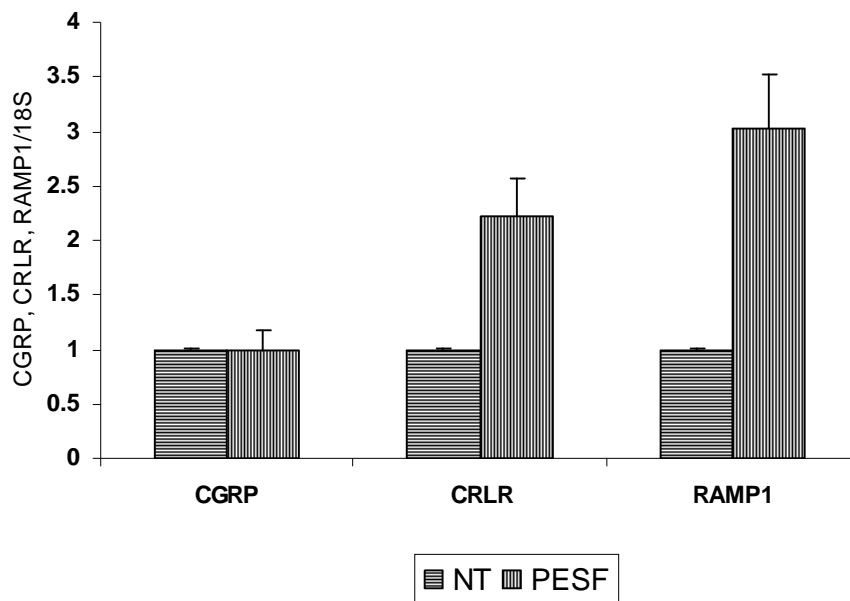


Figura 5. Expresión placentaria de CGRP, CRLR y RAMP1 en mujeres normotensas (NT, n = 10) y en mujeres preeclámpticas (PESF, n = 11). Los resultados están normalizados con la expresión del RNA ribosomal 18S y están expresados como media \pm error estándar.

7.4 Efecto del tratamiento con MgSO₄ en la expresión génica de CGRP, CRLR y RAMP1 en placentas de mujeres con PE.

Posteriormente, se analizaron los RNAm de los genes en las mujeres preeclámpticas que fueron tratadas con MgSO₄. La expresión del CGRP en el grupo tratado PEMgSO₄ presentó un aumento significativo NT vs PEMgSO₄, $P < 0.05$ y PESF vs PEMgSO₄, $P < 0.05$. Figura 6.

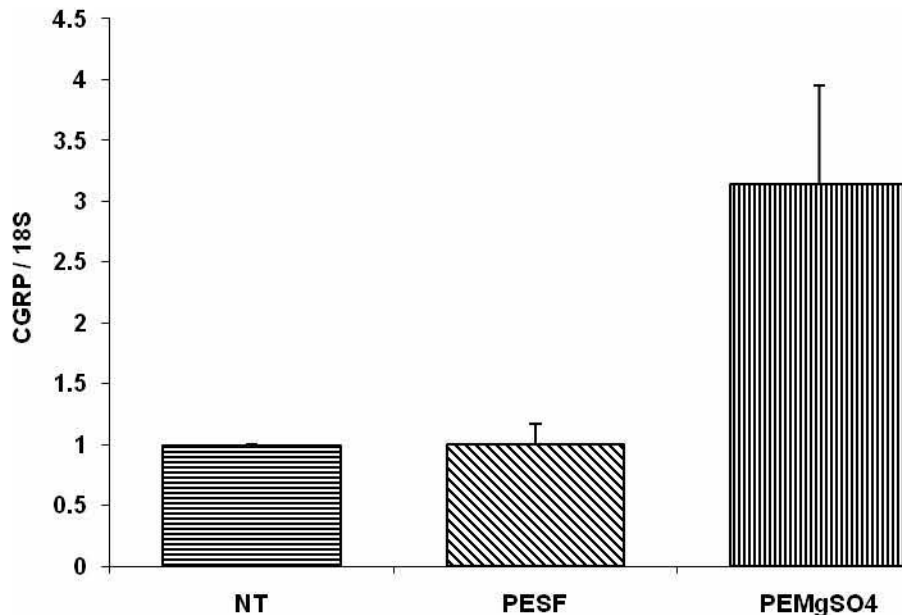


Figura 6. Expresión de CGRP por PCR en tiempo real en placentas de mujeres normotensas (NT, $n = 10$), preeclámpticas tratadas con solución fisiológica (PESF, $n = 10$) y preeclámpticas tratadas con MgSO₄ (PEMSO₄, $n = 8$). Los resultados están normalizados con la expresión del RNA ribosomal 18S y están expresados como media \pm error estándar. Caracteres diferentes muestran una significancia estadística con una $P < 0.05$.

La expresión génica del CRLR en mujeres preeclámpticas se encuentra elevada. Al analizar este gen en el grupo PEMgSO₄, observamos que los niveles aumentaron en un 100% aproximadamente NT vs PEMgSO₄, P < 0.05 y PESF vs PEMgSO₄, P < 0.05. Figura 7.

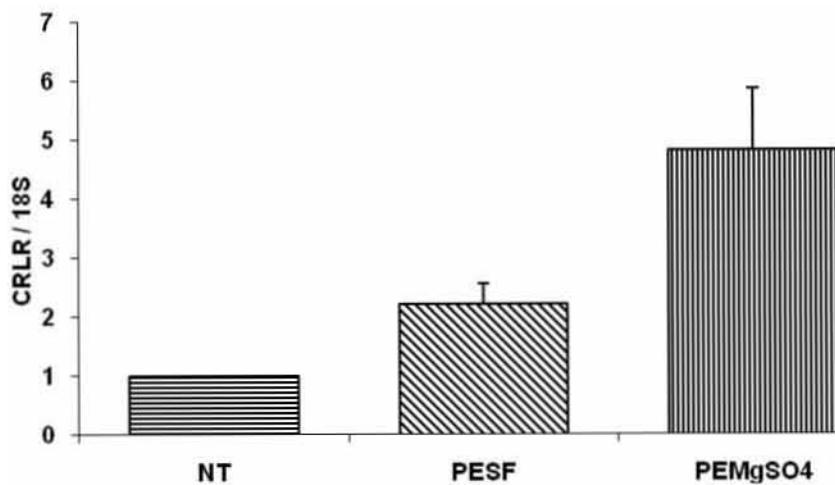


Figura 7. Expresión de CRLR por PCR en tiempo real en placentas de mujeres normotensas (NT, n = 10), preeclámpticas tratadas con solución fisiológica (PESF, n = 10) y preeclámpticas tratadas con MgSO₄ (PEMSO₄, n = 8). Los resultados están normalizados con la expresión del RNA ribosomal 18S y están expresados como media ± error estándar. Caracteres diferentes muestran una significancia estadística con una P < 0.05.

Finalmente, analizamos el efecto del $MgSO_4$, sobre la expresión placentaria de la RAMP1. Sus niveles de expresión fueron altos. La expresión génica de RAMP1 fue mayor en el grupo $PEMgSO_4$ que en el grupo NT; (NT vs $PEMgSO_4$, $P = 0.0011$) pero similar al grupo PESF. Figura 8.

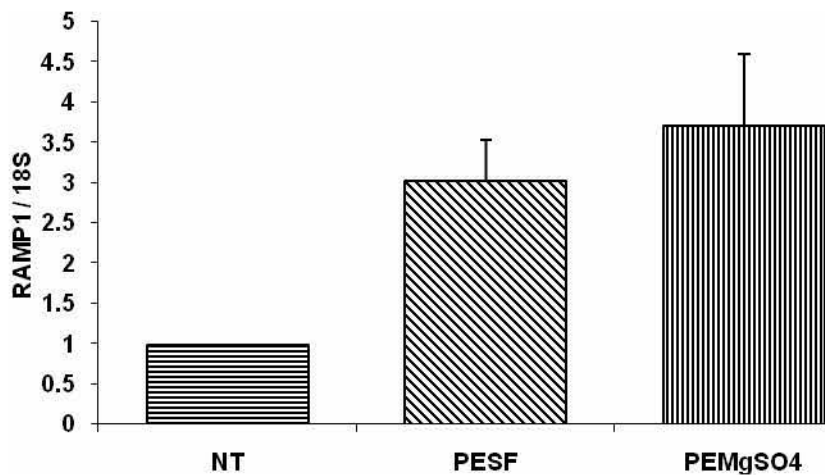


Figura 8. Expresión de RAMP1 por PCR en tiempo real en placentas de mujeres normotensas (NT, $n = 10$), preeclámpticas tratadas con solución fisiológica (PESF, $n = 10$) y preeclámpticas tratadas con $MgSO_4$ ($PEMSO_4$, $n = 8$). Los resultados están normalizados con la expresión del RNA ribosomal 18S y están expresados como media \pm error estándar. Caracteres diferentes muestran una significancia estadística con una $P < 0.05$.

VIII. DISCUSIÓN

La preeclampsia afecta del 2 al 6% de las mujeres embarazadas que acuden a hospitales representando un problema de salud pública ¹⁻⁵. En la actualidad, la administración de MgSO₄ es el mejor tratamiento profiláctico para evitar las convulsiones atribuidas a la eclampsia ⁸¹. Además, se ha observado que la administración de MgSO₄ disminuye la presión arterial ^{70,71}; sin embargo, los mecanismos no están claramente establecidos.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue corroborar si el tratamiento con MgSO₄ disminuye la hipertensión que se presenta durante la PE ^{8,9}. En el transcurso del embarazo normal el volumen sanguíneo aumenta 40-50%; sin embargo, durante la PE este aumento se traduce en una falta virtual de volumen sanguíneo a los órganos y a la placenta, lo cual causa un estado de hipoxia crónica. Paralelamente, el daño endotelial y el ulterior desequilibrio de factores vasoactivos en la preeclampsia disparan una serie de mecanismos compensatorios que pueden explicar en parte, la hemostasia que infiere el MgSO₄ y el CGRP en la regulación de factores vasoactivos.

En este estudio se evaluó la presión arterial antes y después de cada tratamiento corroborando que las presiones tanto sistólica como diastólica fueran mas altas en los grupos con PE. El tratamiento con sulfato de magnesio disminuyó significativamente tanto la presión sistólica como la diastólica.

Este abatimiento de la presión arterial puede deberse a dos posibles mecanismos: 1) los niveles elevados de magnesio tanto en la circulación

materna como en la unidad fetoplacentaria ^{44,86} contribuyen a la inhibición de la reabsorción del calcio a nivel del asa de Henle y por ende, la relajación del músculo liso; 2) después de la administración de $MgSO_4$ aumenta la expresión génica del CGRP que, como ya se ha explicado, es un potente vasodilatador.

El aumento en la expresión del CGRP inducido por el $MgSO_4$ se traduce teóricamente por el aumento en las concentraciones de AMPc y por ende favorecería la transcripción del gen codificador de este péptido ya que el promotor del CGRP presenta un elemento de respuesta al AMPc (CRE) ⁶⁹. Esta observación se puede explicar partiendo de que el Mg^{2+} modula la afinidad de unión del factor de transcripción CREB a sus elementos de respuesta CRE. Lo que indica que el Mg^{2+} regula no solamente la síntesis de AMPc, sino también su acción a nivel nuclear ^{52,69}. Además el AMPc modifica el grado de fosforilación de varias enzimas que inhiben la contracción. Una de éstas es la bomba que transporta Ca^{2+} desde el sarcoplasma hasta el retículo endoplásmico; así como la bomba de la membrana celular que lleva Ca^{2+} al exterior; la inhibición de las bombas provoca que baje la concentración de Ca^{2+} intracelular y por supuesto, se inhiba la contracción. También, el AMPc resulta en la activación del cotratransportador Mg^{2+}/Na^+ dando lugar a la reabsorción de Mg^{2+} ⁶⁴ manteniendo niveles elevados de este ión para sus diversas actividades.

Otro mecanismo que puede estar involucrado en la regulación de la presión, se encuentra a nivel de las células yuxtaglomerulares, pues en estas células es donde ocurre la síntesis de renina que es regulada por el AMP cíclico,

el NO y el calcio citosólico. El AMPc y el NO estimulan la síntesis de renina, mientras que el calcio es un inhibidor de su síntesis ⁹⁴.

Debido al papel crucial que tiene la placenta para el sostenimiento del embarazo y considerado como el detonador de la PE, en el presente trabajo se estudió el efecto del tratamiento con MgSO₄ sobre la expresión placentaria del CGRP. Los resultados indican que la expresión placentaria de este potente vasodilatador fue similar entre mujeres tratadas con solución fisiológica y mujeres normotensas. Esta observación es paralela a lo reportado por Knerr y cols. ²³ quienes no encontraron cambios en la expresión de CGRP en las vellosidades de la placenta de mujeres con PE. Sin embargo, el grupo tratado con MgSO₄ mostró una mayor expresión de dicho gen.

En este trabajo, el tratamiento de mujeres preeclámplicas con MgSO₄ resultó en cambios en la expresión placentaria del sistema CGRP. El incremento en la expresión de CGRP inducido por el MgSO₄ se traduce por el aumento en las concentraciones de AMPc que favorecen la transcripción del CGRP por su sitio en el promotor, elemento de respuesta al AMPc ⁵². Esto está apoyado por la observación de que el Mg²⁺ modula la afinidad de unión del factor de transcripción CREB a sus elementos de respuesta CRE en el DNA ⁶⁹.

El CGRP es un potente vasodilatador que puede contribuir al control del flujo sanguíneo tanto a nivel sistémico como a nivel local ^{19,20}. La disminución de la presión arterial observada puede deberse a otros factores que se derivan del sistema CGRP, pues se sabe que esta unión se traduce en vasodilatación

mediante la activación de la adenilato ciclasa causando: 1) el incremento en los niveles intracelulares de AMPc ³⁴ y su consecuente disminución de Ca²⁺ intracelular y 2) la producción de óxido nítrico ^{35,36}, en donde ambas causas convergen en vasodilatación ²⁰. Además de estas dos vías, el CRGP per se activa otra vía de dilatación, que es mediante la activación de canales K⁺_{ATP} ³⁷. Una vez que es producido el NO, éste activa la guanilato ciclasa, con la consecuente producción de GMPc, que participa en la activación de las bombas de calcio del sarcoplasma. Esta activación resulta en un secuestro sarcoplásmico de calcio y en su disminución intracelular, provocando la relajación del músculo liso.

Dong y cols. ⁵⁴ observaron una menor expresión de CRLR y RAMP1 en las venas de la unidad fetoplacentaria de mujeres con PE que en mujeres normotensas; lo cual difiere con lo encontrado en este trabajo, pues se observó que los grupos con PE tuvieron expresiones más altas en estos genes, que puede considerarse como un mecanismo compensatorio por la disminución del flujo uteroplacentario. Esta observación se apoya en recientes investigaciones en las cuales se muestra que en modelos de hipoxia crónica la expresión de CRLR y de RAMP1 está sobreexpresada en células de músculo liso vascular humano y en diversos tejidos en bovinos y cerdos. En células endoteliales vasculares se observó que el gen CRLR presenta un elemento de respuesta a hipoxia, sin embargo se desconoce si RAMP1 también lo presenta ⁶⁰, lo que refuerza la relación entre el estado de hipoxia y la mayor expresión de CRLR observada.

Como consecuencia de la disminución de la perfusión sanguínea a los órganos, se presenta hipoxia crónica. En este estado se ha observado que el poder vasodilatador del CGRP se encuentra incrementado ^{54,55,56}. El RNAm de la RAMP1 ⁵⁷ se encuentra alto en la hipoxia, sugiriendo que la potenciación del poder vasodilatador del CGRP, se debe a un aumento en el número de receptores o a cambios conformacionales en el receptor inducidos por hipoxia. Se ha observado en un modelo de hipertensión que el NO es un factor que regula a la alta la expresión de CRLR y RAMP1 ⁹⁵. Sin embargo, no se sabe con certeza si la potenciación del poder vasodilatador del CGRP se deba al incremento de receptores, a cambios conformacionales en el CRLR, a la vía NO, o al incremento de AMPc.

Es posible que diversos cambios fisiológicos que ocurren durante la PE, como el bajo flujo uteroplacentario, instauren mecanismos que regulen la sobreexpresión de CRLR y RAMP1; en particular RAMP1. Se ha estudiado que la sobreexpresión de RAMP1 aumenta la respuesta al CGRP ⁹⁶. Los resultados obtenidos en el grupo PESF indican que el incremento en la expresión de CRLR y RAMP1 podría compensar la falta de vasodilatación en la placenta, independientemente de no observarse cambios en el CGRP.

Con respecto al grupo tratado con MgSO₄, la expresión del CRLR fue mayor, mientras que RAMP1 no mostró cambios significativos. Aunque hasta la fecha no existen datos contundentes sobre el mecanismo por el cual el MgSO₄ ejerce su acción a nivel transcripcional en el sistema CGRP, se conoce que el

Mg²⁺ presenta funciones estructurales, metabólicas y génicas. Entre las más importantes encontramos que forma complejos con ATP o GTP ⁹⁷, proporciona estabilidad a los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, la cual confiere cambios fisicoquímicos con efectos biológicos y es capaz de modificar la estructura de algunas enzimas como las DNA y RNA polimerasas, topoisomerasas y exonucleasas, que están implicadas en los procesos de duplicación y transcripción de DNA ⁶⁵.

En resumen, en este trabajo se demuestra que la administración de MgSO₄ disminuye la PA en mujeres preeclámpticas. La administración de MgSO₄ se asoció con mayor expresión génica de CGRP en placentas de mujeres con PE. Además, el CRLR y la RAMP1 se encuentran sobreexpresados, posiblemente como mecanismo compensatorio a la disminución del flujo uteroplacentario.

IX. CONCLUSIONES

- La administración de $MgSO_4$ durante la PE disminuye la presión arterial tanto sistólica como diastólica.
- Las mujeres con preeclampsia presentan una mayor expresión placentaria de CRLR y RAMP1, sin cambios en CGRP.
- El tratamiento con $MgSO_4$ se asocia con un aumento en la expresión génica de CGRP y CRLR en placentas de mujeres con PE. Estos cambios pueden favorecer la vasodilatación en este tejido.

Aunque el CGRP es un vasodilatador potente, su expresión génica es de vital importancia en mujeres preeclámpticas; sin embargo, la disminución en el flujo uteroplacentario que se presenta en la PE puede ser revertida mediante la sobreexpresión génica de CRLR y RAMP1 inducida por la administración de $MgSO_4$.

X. PERSPECTIVAS

Existen diferentes técnicas para inhibir a un determinado gen. El RNA de interferencia (RNAi), es una respuesta biológica conservada, la cual media la resistencia a ácidos nucleicos patógenos y regula la expresión de genes que codifican proteínas. Actualmente el RNA de interferencia ha sido desarrollado como una herramienta muy útil para determinar la función de un gen en particular. Esta técnica es un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional muy eficiente que se basa en la capacidad de degradación de RNA mensajeros específicos por medio de pequeños RNAs de 21-23 nucleótidos.

Para estudiar los mecanismos moleculares de la Preeclampsia, se utilizarán cultivos celulares de placenta o en su defecto, líneas celulares. Se diseñarán RNAs de interferencia dirigidos para cada factor vasoactivo que se pretenda estudiar. De esta manera se podrá elucidar la importancia y el rol de algunos genes que intervienen en la fisiopatogenia de la preeclampsia.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Ceron-Mireles P, Harlow SD, Sanchez-Carrillo CL, Nuñez RM: Risk factors for pre-eclampsia/eclampsia among working women Mexico City. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2001, 15(1):40-46.
2. Roiz Hernandez J, Jimenez Lopez J: Pre-eclampsia and eclampsia. Experience at the Centro Medico Nacional de Torreon. *Gynecol Obstet Mex* 2001, 69:341-345.
3. Zalapa Martinez DF, Gomez Garcia A, Alvarez Aguilar C: Early hebdomanal complications in newborns from mothers with both mild and severe preeclampsia. *Gynecol Obstet Mex* 2003, 71:238-243.
4. Halhali A, Villa AR, Madrazo E, Soria MC, Mercado E, Diaz L, Avila E, garabedian M, Larrea F: Longitudinal changes in maternal serum 1,25-dihydroxyvitamin D and insulin like growth factor I levels in pregnant women who developed preeclampsia: comparison with normotensive pregnant women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, 89 (90):553-556.
5. Romero-Gutierrez G, Malacara JM, Amador N, Fierro-Martinez C, Muñoz-Guevara LM, Molina-Rodriguez R: Homeostatic model assessment and risk for hypertension during pregnancy: a longitudinal prospective study. *Am J Perinatol* 2004, 21(8):455-462.
6. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy: Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000, 184(1):S1-S22.
7. Walsh SW: Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am J Obstet Gynecol* 1985, 152(3):335-340.
8. Boura AL, Walters WA, Read MA, Leitch IM: Autacoids and control of human placental blood flow. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994, 21(10):737-748.
9. Redman CWG: Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 1991; 12(4):301-308.
10. Halhali A, Tovar AR, Torres N, Bourges H, Garabedian M, Larrea F: Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85(5):1828-1833.
11. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001, 38:718-722

12. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG: Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004, 114(5-6):397-407.
13. Marin JJ, Macias RI, Serrano MA: The hepatobiliary-like excretory function of the placenta. A review. *Placenta* 2003, 24(5):431-438.
14. Stulc J: Placental transfer of inorganic ions and water. *Physiol Rev* 1997, 77(3):805-836.
15. Sibley CP, Glazier JD, Greenwood SL, Lacey H, Mynett K, Speake P, Jansson T, Johansson M, Powell TL: Regulation of placental transfer: the Na⁺/H⁺ exchanger a review. *Placenta* 2002, 23(Suppl A):S39-46.
16. Corbacho AM, Martinez De La Escalera G, Clapp C: Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol* 2002, 173(2):219-238.
17. Saxe A, Dean S, Gibson G, Pandian MR, Levy J: Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in venous umbilical cord blood of healthy neonates. *J Perinat Med* 1997, 25(3):288-291.
18. Wimalawansa SJ: Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol* 1997, 11(2-3):167-239.
19. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG: Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 1982, 298(5871):240-244.
20. Wimalawansa SJ: Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular, genetics physiology, pathophysiology, and therapeutics potentials. *Endocr Rev* 1996, 17(5):533-585.
21. Doi Y, Kudo H, Nishino T, Kayashima K, Kiyonaga H, Nagata T, Nara S, Morita M, Fujimoto S: Synthesis of calcitonin gene-related peptide (CGRP) by rat endothelial cells. *Histol Histopathol* 2001, 16(4):1073-1079.
22. Graf AH, Hutter W, Hacker GW, Steiner H, Anderson V, Staudach A, Dietze O: Localization and distribution of vasoactive neuropeptides in the human placenta. *Placenta* 1996, 17(7):413-421.
23. Knerr I, Dachert C, Beinder E, Metzler M, Dotsch J, Repp R, Rascher W: Adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide and their receptors: evidence for a decreased placental mRNA content in preeclampsia and HELLP syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002, 101(1):47-53.
24. Flahaut M, Rossier BC, Firsov D: Respective roles of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity-modifying proteins (RAMP) in cell surface expression of CRLR/RAMP heterodimeric receptor. *J Biol Chem* 2002, 277(17):14731-14737.
25. Poyner D: Pharmacology of receptors for calcitonin gene-related peptide and amylin. *Trends Pharmacol Sci* 1995, 16(12):424-428.

26. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM: RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998, 393(6683):333-339.
27. Sexton PM, Albiston A, Morfis M, Tilakaratne N: Receptor activity modifying proteins. *Cellular signalling* 2001, 13(2):73-83.
28. Bomberger JM, Parameswaran N, Hall CS, Aiyar N, Spielman WS. Novel function for receptor activity-modifying proteins (RAMPs) in post-endocytic receptor trafficking. *J Biol Chem* 2005, 280(10):9297-9307.
29. Hay D, Poyner D, Sexton P: GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther* 2006, 109(1-2):173-197.
30. Fitzsimmons TJ, Zhao X, Wank SA: The extracellular domain of receptor activity-modifying protein 1 is sufficient for calcitonin receptor-like receptor function. *J Biol Chem* 2003, 278(27):14313-14320.
31. Prado MA, Evans-Bain B, Dickerson IM: Receptor component protein (RCP): a member of a multi-protein complex required for G-protein-coupled signal transduction. *Biochem Soc Trans* 2002, 30(4):460-464.
32. Firth KF, Broughton Pipkin F: Human alpha- and beta-calcitonin gene related peptides are vasodilators in human chorionic plate vasculature. *Am J Obstet Gynecol* 1989, 161(5):1318-1319.
33. Mandsager NT, Brewer AS, Myatt L: Vasodilator effects of parathyroid hormone, parathyroid hormone-related protein, and calcitonin gene related peptide in the human fetal-placental circulation. *J Soc Gynecol Investig* 1994, 1(1):19-24.
34. Gether U: Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr* 2000, 21(1):90-113.
35. Dong YL, Vegiraju S, Chauhan M, Gangula PR, Hankins GD, Goodrum L: Involvement of calcitonin gene-related peptide in control of human fetoplacental vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, 286(1):H230-H239.
36. Thakor AS, Giussani DA: Role of nitric oxide in mediating in vivo vascular responses to calcitonin gene-related peptide in essential and peripheral circulations in the fetus. *Circulation* 2005, 112(16):2510-2516.
37. Nelson SH, Suresh MS, Dehring DJ, Johnson RL: Relaxation by calcitonin gene-related peptide may involve activation of K⁺ channels in the human uterine artery. *Eur J Pharmacol* 1993, 242(3):255-261.
38. Edwards RM, Trizna W: Modulation of glomerular arteriolar tone by nitric oxide synthase inhibitors. *J Am Soc Nephrol* 1993, 4(5):1127-1132.
39. Ribeiro MO, Antunes E, De Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R: Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992, 20(3):298-303.

40. Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB: The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994, 171(4):944-948.
41. Ranta V, Viinikka L, Halmesmaki E, Ylikorkala O: Nitric oxide production with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1999, 93(3):442-445.
42. Goeschen K, Hemkel E, Behrens O: Plasma prostacyclin and thromboxane concentration in 160 normotensive, hypotensive and preeclamptic patients during pregnancy, delivery and the post partum period. *J Perinat Med* 1993, 21(6):481-489.
43. Mills JM, DerSimonian R, Raymond E, Morrow JD, Roberts L, Clemens JD, Hauth JC, Catalano P, Sibai B, Curet LB, Levine RJ: Prostacyclin and thromboxane changes predating clinical onset of preeclampsia: a multicenter prospective study. *JAMA* 1999, 282(4):356-363.
44. Halhali A, Wimalawansa SJ, Berentsen V, Avila E, Thota CS, Larrea F: Calcitonin gene-related peptide and parathyroid hormone-related peptides in preeclampsia: effects of magnesium sulfate. *Obstet Gynecol* 2000, 97(6):893-897.
45. Gangula PR, Supowit SC, Wimalawansa SJ, Zhao H, Hallman DM, DiPette DJ: Calcitonin gene-related peptide is a depressor in N^G-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension during pregnancy. *Hypertension* 1997, 29(1 Pt 2):248-253.
46. Gangula PR, Zhao H, Supowit SC, Wimalawansa SJ, DiPette DJ, Yamampalli C: Pregnancy and steroid hormones enhance the vasodilatation responses to CGRP in rats. *Am J Physiol* 1999, 276(1 Pt 2):H284-H288.
47. Wimalawansa SJ, Yallampalli C: Pre-eclamptic toxemia: potential new therapy based on animal studies. *Ceylon Med J* 1998, 43(3):138-146.
48. Gangula PR, Dong YL, Wimalawansa SJ, Yallampalli C: Infusion of pregnant rats with calcitonin gene-related peptide (CGRP)(8-37), a CGRP receptor antagonist, increases blood pressure and fetal mortality and decreases fetal growth. *Biol Reprod* 2002, 67(2):624-629.
49. Bellamy J, Bowen EJ, Russo AF, Durham PL: Nitric oxide regulation of calcitonin gene-related peptide expression in rat trigeminal ganglia neurons. *Eur J Neurosci* 2006, 23(8):2057-2066.
50. Gangula PR, Wimalawansa SJ, Yamampalli C: Progesterone up-regulates vasodilator effects of calcitonin gene-related peptide in N^G-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1997, 176(4):849-900.
51. Bowen EJ, Schmidt TW, Firm CS, Russo AF, Durham PL: Tumor necrosis factor-alpha stimulation of calcitonin gene-related peptide expression

- and secretion from rat trigeminal ganglion neurons. *J Neurochem* 2006, 96(1):65-77.
52. Freeland K, Liu YZ, Latchman DS: Distinct signalling pathways mediate the cAMP response element (CRE) dependent activation of the calcitonin gene-related peptide gene promoter by cAMP and nerve growth factor. *Biochem J* 2000, 345 Pt2:233-238.
 53. Saggese G, Bertelloni S, Baroncelli GI, Pelletti A, Benedetti U: Evaluation of a peptide family encoded by calcitonin gene in selected healthy pregnant women. A longitudinal study. *Horm Res* 1990, 34(5-6):240-244.
 54. Dong YL, Green KE, Vegiragus S, Hankins GD, Martin E, Chauhan M, Thota C, Yallampalli C: Evidence for decreased calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors and compromised responsiveness to CGRP of fetoplacental vessels in preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90 (4):2336-2343.
 55. Kwan YW, Wadsworth RM, Kane KA: Effects of neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide on sheep coronary artery rings under oxygenated, hypoxic and simulated myocardial ischaemic conditions. *Br J Pharmacol* 1990, 99(4):774-778.
 56. Franco-Cereceda A, Kallner G, Lundberg JM: Capsazepine-sensitive release of calcitonin gene-related peptide from C-fibre afferents in the guinea-pig heart by low pH and lactic acid. *Eur J Pharmacol* 1993, 238(2-3):311-316.
 57. Hasbak P, Sams A, Schifter S, Longmore J, Edvinsson L: CGRP receptors mediating CGRP adrenomedullin- and amylin-induced relaxation in porcine coronary arteries. Characterization with 'Compound 1' (WO98/11128), a non-peptide antagonist. *Br J Pharmacol* 2001, 133(8): 1405-1413.
 58. Fritz KI, Greonendaal F, McGowan JE, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M: Effect of cerebral hypoxia on NMDA receptor binding characteristics after treatment with 3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (CPP) in newborn piglets. *Brain Res* 1996, 729(1):66-74.
 59. Cueille C, Birot O, Bigard X, Hagner S, Garel JM: Post-transcriptional regulation of CRLR expression during hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 326(1):23-29.
 60. Nikitenko LL, Smith DM, Bicknell R, Rees MC: Transcriptional regulation of the CRLR gene in human microvascular endothelial cells by hypoxia. *Faseb J* 2003, 17(11):1499-1501.
 61. Cowan JA: Introduction to the biological biochemistry of magnesium. In: Cowan JA ed. *The biological chemistry of magnesium*. New York: VCH publishers; 1995, p.1-24.

62. Quamme GA, Dai LJ, Rabkin SW: Dynamics of intracellular free Mg²⁺ changes in a vascular smooth muscle cell line. *Am J Physiol* 1993, 265(1 Pt 2):H281-H288.
63. Güther T: Mechanisms and regulation of Mg²⁺ efflux and Mg²⁺ influx. *Miner Electrolyte Metab* 1993, 19(3):259-265.
64. Dai LJ, Ritchie G, Kerstan D, Sub Kang H, Cole DE, Quamme GA: Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule. *Physiol Rev* 2001, 81(1):51-84.
65. Riccardi D, Hall AE, Chattopadhyay N, Xu JZ, Brown EM, Hebert SC: Localization of the extracellular Ca²⁺/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am J Physiol* 1998, 274(3 Pt 2):F611-F622.
66. Sgambato A, Wolf FI, Faraglia B, Cittadini A: Magnesium depletion causes growth inhibition, reduced expression of cyclin D1, and increased expression of P27Kip1 in normal but not in transformed mammary epithelial cells. *J Cell Physiol* 1999, 180(2):245-254.
67. Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, Shakibaei M: Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res* 2002, 62(2):175-184.
68. Petrault I, Zimowska W, Mathieu J, Bayle D, Rock E, Favier A, Rayssiguier Y, Mazur A: Changes in gene expression in rat thymocytes identified by cDNA array support the occurrence of oxidative stress in early magnesium deficiency. *Biochem Biophys Acta* 2002, 1586(1):92-98.
69. Moll JR, Acharya A, Gal J, Mir AA, Vinson C: Magnesium is required for specific DNA binding of the CREB B-ZIP domain. *Nucleic Acids Res* 2002, 30(5):1240-1246.
70. Cotton DB, Gonik B, Dorman KF: Cardiovascular alterations in severe pregnancy-induced hypertension: acute effects of intravenous magnesium sulfate. *Am J Obstet Gynecol* 1984, 148(2):162-165.
71. Nadler JL, Goodson S, Rude RK: Evidence that prostacyclin mediates the vascular action of magnesium in humans. *Hypertension* 1987, 9(4):379-383.
72. Briel RC, Lippert TH: Changes in blood coagulation, thrombocyte function and vascular prostacyclin synthesis caused by magnesium sulfate. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1987, 47(5):332-336.
73. Kemp PA, Gardier SM: Magnesium sulphate reverses the carotid vasoconstriction caused by endothelin-1, angiotensin II and neuropeptide-Y, but not that caused by NG-nitro-L-arginine methyl ester, in conscious rats. *Clin Sci* 1993, 85(2):175-181.

74. Sipes LS, Weiner CP, Gelhaus TM, Goodspeed JD: Effect of magnesium sulphate infusion upon plasma prostaglandins in preeclamptic and preterm labour. *Hypertens Preg* 1994, 13:293-302.
75. Ariza AC, Bobadilla N, Fernandez C, Muñoz-Fuentes RM, Larrea F, Halhali A: Effects of magnesium sulfate on lipid peroxidation and blood pressure regulators in preeclampsia. *Clin Biochem* 2005, 38(2):128-133.
76. Kovac CM, Howard BC, Pierce BT, Hoeldtke NJ, Calhoun BC, Napolitano PG: Fetoplacental vascular tone in modified by magnesium sulfate in the preeclamptic ex vivo human placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol* 2003, 189(3):839-842.
77. Holcberg G, Sapir O, Hallak M, Alaa A, Shorok HY, David Y, Katz M, Huleiherl M: Selective vasodilator effect of magnesium sulfate in human placenta. *Am J Reprod Immunol* 2004, 51(3):192-197.
78. Walsh SW, Rommey AD, Wang Y, Walsh MD: Magnesium sulphate attenuates peroxide-induced vasoconstriction in the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1998, 178(1 Pt 1):7-12.
79. Belfont MA, Moise KJ Jr: Effects of magnesium sulphate on maternal brain blood flow in preeclampsia: a randomised placebo-controlled study. *Am J Obstet Gynecol* 1992, 167(3):661-666.
80. Watson KV, Moldow CF, Ogburn PL, Jacob HS: Magnesium sulphate: rationale for its use in preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci* 1986, 83(4):1075-1078.
81. Sibai BM: Magnesium sulfate is the ideal anticonvulsant in preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1990, 162(2):1141-1145.
82. Flowers CE: Magnesium sulphate in obstetrics; a study of magnesium in plasma, urine and muscle. *Am J Obstet Gynecol*. 1965, 91:763-776.
83. McCarron DA, Morris CD, Cole C: Dietary calcium in human hypertension. *Science* 1982, 217(4556):267-269.
84. Concentraciones de calcio y magnesio en plasma de mujeres embarazadas normales y con hipertensión gestacional. *Ginecología y Obstetricia de México* 1988, 56:35-38.
85. Carney SL, Wong NLM, Quamme GA, Dirks JH: Effect of magnesium deficiency on renal magnesium and calcium transport in the rat. *J Clin Invest* 1980, 65(1):180-188.
86. Cruikshank DP, Pitkin RM, Reynolds WA, William GA, Hargis GK: Effect of magnesium sulphate treatment on perinatal calcium metabolism. I. Maternal and fetal responses. *Am J Obstet Gynecol* 1979, 134(3):243-249.
87. Sibai BM: Management of preeclampsia clinics. *Perinatology* 1991, 18(4):793-808.

88. Katz A, Kerem D, Sherman D: Magnesium sulfate suppresses electroencephalographic manifestation of CNS oxygen toxicity. *Unsersea Biomed Res* 1990, 17(1):45-49.
89. Watkins JC, Evans RH: Excitatory amino acid transmitters. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1981, 21:165-204.
90. Belfort MA, Saade GR, Suresh M, Jonson D, Vedernikov YP : Human umbilical vessels: responses to agents frequently used in obstetrics patients. *Am J Obstet Gynecol* 1995, 172(5):1395-1403.
91. James PR, Nelson-Piercy C: Management of hypertension before, during and after pregnancy. *Heart* 2004, 90(12):1499-1504.
92. Standley PR, Standley CA: Identification of a functional $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ exchanger in human trophoblast cells. *Am J Hypertens* 2002, 15(6):565-570.
93. Touyz RM: Role of magnesium in the pathogenesis of hypertension. *Mol Aspects Med* 2003, 24(1-3):107-136.
94. Della Bruma R, Kurtz A, Schricker K: 1996. Regulation of renin synthesis in the juxtaglomerular cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996, 5(1):16-19.
95. Zhao Y, Bell D, Smith LR, Zhao L, Devine AB, McHenry EM, Nicholls DP, McDermott BJ: Differential expression of components of the cardiomyocyte adrenomedullin/intermedin receptor system following blood pressure reduction in nitric oxide-deficient hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 316(3):1269-1281.
96. Zhang Z, Dickerson IM, Russo AF: Calcitonin gene-related peptide receptor activation by receptor activity-modifying protein-1 gene transfer to vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2006, 147(4):1932-1940.
97. Ebel H, Günther T: Magnesium metabolism: a review. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980, 18(5):257-270.