

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTOS DEL SULFATO DE MAGNESIO SOBRE LAS  
CONCENTRACIONES CIRCULANTES Y LA  
EXPRESIÓN PLACENTARIA DE FACTORES  
VASOACTIVOS EN LA PREECLAMPSIA**

**T E S I S**

**que para obtener el grado de :**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**Presenta:**

**Lic. Nut. Ana Carolina Guadalupe Ariza Gutiérrez**

**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**Director de tesis: Dr. Ali Halhali Baghdad**

**México, D.F.**

**2006**



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.

---

---

*El presente proyecto se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, bajo la tutoría del Dr. Ali Halhali Baghdad. El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 42489). Mis estudios de doctorado fueron apoyados por beca de CONACyT (No. de registro 166577).*

---

---

## DEDICATORIAS

---

---

A Bicho, alias “el guapo” de mi esposito porque básicamente también te aventaste un doctorado. Te amo. Gracias por estos años maravillosos de amor y comprensión. Por evitar que pise tierra todo el tiempo, sin ti, tal vez estaría en el psiquiátrico!!!

A mis papás Mary y Manuel, por existir, por dejarme existir, y por apoyarme incondicionalmente desde que tengo memoria. Los amo con todo mi corazón.

A TODOS mis hermanos y hermanas (ya que forma parte del nuevo lenguaje mexicano), sobrinas y sobrinos, cuñados y cuñadas, es decir, mi numerosa y estupenda familia a la cual me siento orgullosa de pertenecer (jamás acabaría si pusiera sus nombres, pero ustedes saben quienes son y lo mucho que los quiero!).

A Ali, porque más que un tutor eres un amigo. Gracias por tu paciencia. Somos un excelente equipo. Lo logramos!!!

A mi querida Fer, que tanto hemos compartido. No importa en dónde estés, mi cerebro y mi corazón siempre están cerca de ti.

A la Vero, tan linda como tulipán (ja!), por todos estos años de verdadera amistad.

A todos mis AMIGOS que se dedican fervientemente a la ciencia y a la música, sin duda, la mejor combinación (o sea pobres pero felices, ja, ja) y por supuesto a aquellos que no lo son (quiero decir científicos o músicos).

## **AGRADECIMIENTOS**

---

---

**Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y al Departamento de Biología de la Reproducción por permitirme realizar mis estudios de Doctorado en sus instalaciones.**

**Al Dr. Ali Halhali Baghdad por su apoyo en todos estos años de lucha profesional, por compartir conocimientos y una invaluable experiencia personal.**

**A los miembros de mi Comité Tutorial, Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval y Dr. Armando R. Tovar Palacio por sus valiosos comentarios que ayudaron tanto a mi formación profesional como a cuestionar y mejorar este trabajo.**

**Al Dr. Fernando Larrea Gallo por hacerme sentir parte del Departamento de Biología de la Reproducción, por el apoyo académico y personal en los momentos más difíciles...**

**A los investigadores del Departamento de Biología de la Reproducción, especialmente a Euclides, Lorenza, Mayel, Isabel y Rocío por estar siempre dispuestos a contestar mis interminables preguntas y compartir horas de trabajo y entretenimiento.**

**A Xóchitl, Claudia, Francisco, Erika y Magali por su valiosa colaboración en el desarrollo de este trabajo.**

**A todos mis compañeros del laboratorio y especialmente a Helen, Caro y David por su ayuda técnica y por su amistad.**

**A Eva y Lupita Alarcón por su ayuda administrativa.**

**A la UNAM y al CONACYT por el apoyo económico sin el cual no hubiera podido dedicarme a la investigación.**

**Agradezco de forma especial a los integrantes del jurado por el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis y sus acertadas observaciones:**

**Dr. Roberto Domínguez Casala**

**Dr. Ali Halhali Baghdad**

**Dr. Gerardo Gamba Ayala**

**Dra. Margarita Martínez Gómez**

**Dr. Rafael Villalobos Molina**

**Dra. María Mercedes Perusquía Nava**

**Dra. Elena Zambrano González**

# ÍNDICE

---

---

	<b>ABREVIATURAS</b>	6
<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b>	7
<b>II.</b>	<b>ABSTRACT</b>	8
<b>III.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	9
	3.1. Endotelina 1 (ET-1)	11
	3.2. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)	19
	3.3. Óxido nítrico (NO) y sintasas del NO	23
	3.4. Magnesio	27
	3.5. El sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> ) en la prevención de la eclampsia	29
	3.6. Efectos del MgSO <sub>4</sub> sobre factores vasoactivos	30
<b>IV.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	32
<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	33
<b>VI.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	34
<b>VII.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	35
	7.1. Sujetos	36
	7.2. Tamaño de la muestra	38
	7.3. Consideraciones éticas	38
	7.4. Registro de datos clínicos y toma de muestras	38
	7.5. Estudio de las concentraciones de malondialdehído (MDA) y factores vasoactivos en suero	41

7.5.1.	Determinación de MDA	41
7.5.2.	Determinación de NO	41
7.5.3.	Determinación de ET-1 y CGRP	42
7.6.	Estudios de expresión génica	42
7.6.1.	Preparación del DNAc por RT-PCR	42
7.6.2.	Northern blot	44
7.6.3.	PCR en tiempo real	45
7.7.	Análisis estadístico	47
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>48</b>
8.1.	Características clínicas de la población	48
8.2.	Efectos del MgSO <sub>4</sub> sobre la presión arterial	48
8.3.	Efectos del MgSO <sub>4</sub> sobre la peroxidación de lípidos	50
8.4.	Efectos del MgSO <sub>4</sub> sobre las concentraciones circulantes de los factores vasoactivos	50
8.5.	Estudios de correlación	57
8.6.	Expresión placentaria de los factores vasoactivos	58
<b>IX.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>68</b>
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
<b>XI.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>81</b>
<b>XII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>82</b>
<b>XIII.</b>	<b>ANEXOS. Producción científica generada durante la realización de esta tesis</b>	<b>99</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Fig. 1</b>	Síntesis de ET-1	<b>13</b>
<b>Fig. 2</b>	Vías de señalización de ET-1 a través de sus receptores	<b>15</b>
<b>Fig. 3</b>	Síntesis y efectos del CGRP	<b>20</b>
<b>Fig. 4</b>	Diagrama de flujo	<b>40</b>
<b>Fig. 5</b>	Presión arterial sistólica y presión arterial diastólica antes y durante el tratamiento con MgSO <sub>4</sub>	<b>49</b>
<b>Fig. 6</b>	Concentraciones de MDA en suero de los grupos normotenso en condiciones basales y preecláptico antes y durante el tratamiento con MgSO <sub>4</sub>	<b>53</b>
<b>Fig. 7</b>	Concentraciones de ET-1 en suero de los grupos normotenso en condiciones basales y preecláptico antes y durante el tratamiento con MgSO <sub>4</sub>	<b>54</b>
<b>Fig. 8</b>	Concentraciones de los metabolitos de NO en suero de los grupos normotenso en condiciones basales y preecláptico antes y durante el tratamiento con MgSO <sub>4</sub>	<b>55</b>
<b>Fig. 9</b>	Concentraciones del CGRP en suero de los grupos normotenso en condiciones basales y preecláptico antes y durante el tratamiento con MgSO <sub>4</sub>	<b>56</b>
<b>Fig. 10</b>	Hibridación por Northern blot de ET-1, ET-1AR y ET-1BR en los grupos normotenso y preecláptico tratado con solución fisiológica	<b>60</b>
<b>Fig. 11</b>	Hibridación por Northern blot de ET-1, ET-1AR y ET-1BR en los grupos preecláptico tratado con solución fisiológica y preecláptico tratado con MgSO <sub>4</sub>	<b>61</b>

<b>Fig. 12</b>	Expresión placentaria de la eNOS por PCR en tiempo real	<b>63</b>
<b>Fig. 13</b>	Expresión placentaria de la iNOS por PCR en tiempo real	<b>64</b>
<b>Fig. 14</b>	Expresión placentaria del CGRP por PCR en tiempo real	<b>65</b>
<b>Fig. 15</b>	Expresión placentaria del CRLR por PCR en tiempo real	<b>66</b>
<b>Fig. 16</b>	Expresión placentaria de la RAMP1 por PCR en tiempo real	<b>67</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

---

---

<b>Cuadro 1.</b>	Presión arterial y factores vasoactivos en el grupo preeclámptico tratado con solución fisiológica	<b>52</b>
<b>Cuadro 2.</b>	Estudios de correlación entre las concentraciones circulantes de ET-1, NO y CGRP	<b>57</b>
<b>Cuadro 3.</b>	Características clínicas basales de los grupos normotenso, preeclámptico tratado con solución fisiológica y preeclámptico tratado con MgSO <sub>4</sub>	<b>58</b>

## **ABREVIATURAS**

---

<b>PE</b>	Preeclampsia
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnesio
<b>ET-1</b>	Endotelina 1
<b>CGRP</b>	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>ET-1<sub>A</sub>R</b>	Receptor de endotelina A
<b>ET-1<sub>B</sub>R</b>	Receptor de endotelina B
<b>CRLR</b>	Receptor de CGRP
<b>RAMP1</b>	Proteína modificadora de la actividad del receptor 1
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>eNOS</b>	Sintasa del óxido nítrico endotelial
<b>iNOS</b>	Sintasa del óxido nítrico inducible
<b>L-NAME</b>	Ng-nitro-L-arginina-metil ester

## I. RESUMEN

---

La administración del sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) es una medida profiláctica para prevenir las convulsiones en la preeclampsia (PE). Además de sus efectos anticonvulsivos, el  $MgSO_4$  disminuye la presión arterial a través de mecanismos no conocidos. El mecanismo fisiopatológico que conlleva a la hipertensión en la PE involucra daño endotelial, el cual puede ser causa o consecuencia del desequilibrio en la secreción, la acción de agentes vasoactivos o ambos. Así, el objetivo general fue estudiar los efectos del  $MgSO_4$  sobre las concentraciones circulantes y la expresión placentaria de factores vasoactivos en la PE. En este estudio, la PE se asoció con mayor peroxidación de lípidos y menor concentración de endotelina 1 (ET-1), óxido nítrico (NO) y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Con respecto a las concentraciones basales, el tratamiento con  $MgSO_4$  disminuyó la presión arterial y las concentraciones circulantes de malondialdehído, y aumentó las de ET-1 y CGRP sin modificar las de NO. En placentas del grupo PE tratado con solución fisiológica (PESF), el RNAm del receptor de endotelina tipo B (ET-1BR) se encontró disminuido comparado con el grupo normotenso, sin cambios en ET-1 y en el receptor de endotelina tipo A (ET-1AR). El tratamiento con  $MgSO_4$  (grupo PEMgSO<sub>4</sub>) disminuyó el RNAm de ET-1 y aumentó la expresión placentaria del ET-1BR comparado con el grupo tratado con solución fisiológica (PESF), sin modificar la de ET-1AR. Además, la sintasa del NO endotelial (eNOS) disminuyó mientras que la sintasa del NO inducible (iNOS) se encontró sobreexpresada en el grupo PESF con respecto al grupo normotenso y el tratamiento con  $MgSO_4$  revirtió estas condiciones ya que aumentó la eNOS y disminuyó la iNOS. A pesar de que el CGRP no se encontró alterado en la PE, el  $MgSO_4$  aumentó la expresión de su gen. Además, la expresión de los componentes del heterodímero receptor de CGRP (CRLR) y proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP1) fue mayor en el grupo PESF al compararla con el grupo NT y el  $MgSO_4$  aumentó aún más la expresión del CRLR, sin cambios significativos en la de RAMP1.

En conclusión, nuestros resultados muestran que la PE cursa con alteraciones en las concentraciones circulantes y la expresión placentaria de sustancias vasoactivas. Además, se muestra por primera vez que el  $MgSO_4$  disminuye la peroxidación de lípidos y modifica favorablemente las concentraciones circulantes y la expresión placentaria de factores vasoactivos que fomentan la vasodilatación tanto en el compartimiento materno como a nivel placentario.

## II. ABSTRACT

---

---

Magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>) is a well known prophylactic anticonvulsive treatment in preeclampsia (PE). In addition to its anticonvulsive effects, MgSO<sub>4</sub> decreases blood pressure through a still unknown mechanism. The physiopathological mechanism leading to hypertension in PE involves endothelial damage, which can be cause or consequence of an alteration in the production and/or action of vasoactive substances. Therefore, the aim of this work was to study the effects of MgSO<sub>4</sub> on serum levels and placental expression of vasoactive factors in PE.

In the present study, PE was associated with higher lipid peroxidation and lower ET-1, NO and CGRP serum levels. MgSO<sub>4</sub> treatment decreased blood pressure and MDA levels, increased ET-1 and CGRP serum levels without significant changes in NO levels. In PE women, ET-1BR mRNA levels were decreased but no changes were observed for ET-1 and ET-1AR. MgSO<sub>4</sub> treatment decreased ET-1 and increased ET-1BR placental expression, however, ET-1AR remained unchanged. Interestingly, eNOS placental expression was decreased, iNOS was overexpressed in PE and MgSO<sub>4</sub> treatment inverted this situation resulting in increased eNOS and decreased iNOS. CGRP mRNA was not altered in PE, and MgSO<sub>4</sub> treatment was associated with increased placental expression of this potent vasodilator. In addition, CGRP receptor (CRLR) and receptor activity modifying protein (RAMP1), were overexpressed in PE. MgSO<sub>4</sub> treatment increased even more CRLR placental expression without significant changes in RAMP1 expression.

In conclusion, our results showed that PE is associated with alterations in circulating levels and placental expression of vasoactive factors. In addition, this work demonstrates for the first time that MgSO<sub>4</sub> treatment in PE women decreases lipid peroxidation and modifies circulating levels and placental expression of vasoactive factors, promoting vasodilatation in maternal and placental compartments.

### III. INTRODUCCIÓN

---

---

La preeclampsia (PE), una de las enfermedades hipertensivas inducidas por el embarazo, representa un problema de salud pública en México ya que ocurre en el 2 al 6 % de las mujeres embarazadas<sup>1-5</sup>. La PE se presenta después de la semana 20 de gestación y para su diagnóstico se requiere la presencia simultánea de hipertensión y proteinuria<sup>6</sup>. Se asocia con un alto riesgo de morbi-mortalidad perinatal y puede generar retraso en el crecimiento intrauterino<sup>7,8</sup>. Se caracteriza por la presencia de vasoespasmo, aumento en la resistencia vascular periférica y disminución en la perfusión de los órganos, incluyendo a la placenta<sup>9</sup>. Además, hay un estado acentuado de estrés oxidativo, observado tanto en la circulación materna como en la unidad fetoplacentaria<sup>10,11</sup>.

Hasta la fecha, la etiología de la PE es desconocida; sin embargo, se reconoce que la disfunción de las células endoteliales juega un papel central en los mecanismos fisiopatológicos que contribuyen con la hipertensión, el vasoespasmo y la reducción del flujo uteroplacentario<sup>12,13</sup>. Los cambios patológicos que se observan en las células endoteliales incluyen mayor tamaño, contenido lipídico y obstrucción del lumen vascular<sup>14</sup>. Numerosas evidencias refieren a la placenta como fuente importante en la producción de factores que conllevan al daño endotelial. La placenta es un tejido con funciones endocrinas indispensable en la interacción madre-feto. En la placenta normal, la remodelación de las arterias espirales resulta en la formación de un sistema de baja resistencia vascular que aporta flujo sanguíneo al feto en crecimiento. En la

PE, existe una disfunción en la remodelación vascular evitando la respuesta adecuada al incremento en las demandas fetales que conlleva a la disminución de la perfusión, hipoxia e isquemia en la unidad fetoplacentario<sup>15</sup>. Se ha sugerido que la hipoxia e isquemia en la placenta PE puede fomentar la liberación de productos a la circulación materna promoviendo la instauración del síndrome materno<sup>15,16</sup>. El daño endotelial puede ser causa, consecuencia o ambas del desequilibrio en la producción, acción o ambas de factores vasoactivos<sup>13,17</sup>. Debido a que la placenta humana es un órgano no innervado, la regulación del flujo uteroplacentario es dependiente de la liberación local y circulación de factores vasoactivos.

A continuación se describen los aspectos básicos de los agentes vasoactivos considerados en este estudio y su implicación en la PE. Asimismo, se considera al magnesio, y al sulfato de magnesio en la prevención de la eclampsia y sus efectos sobre los factores vasoactivos.



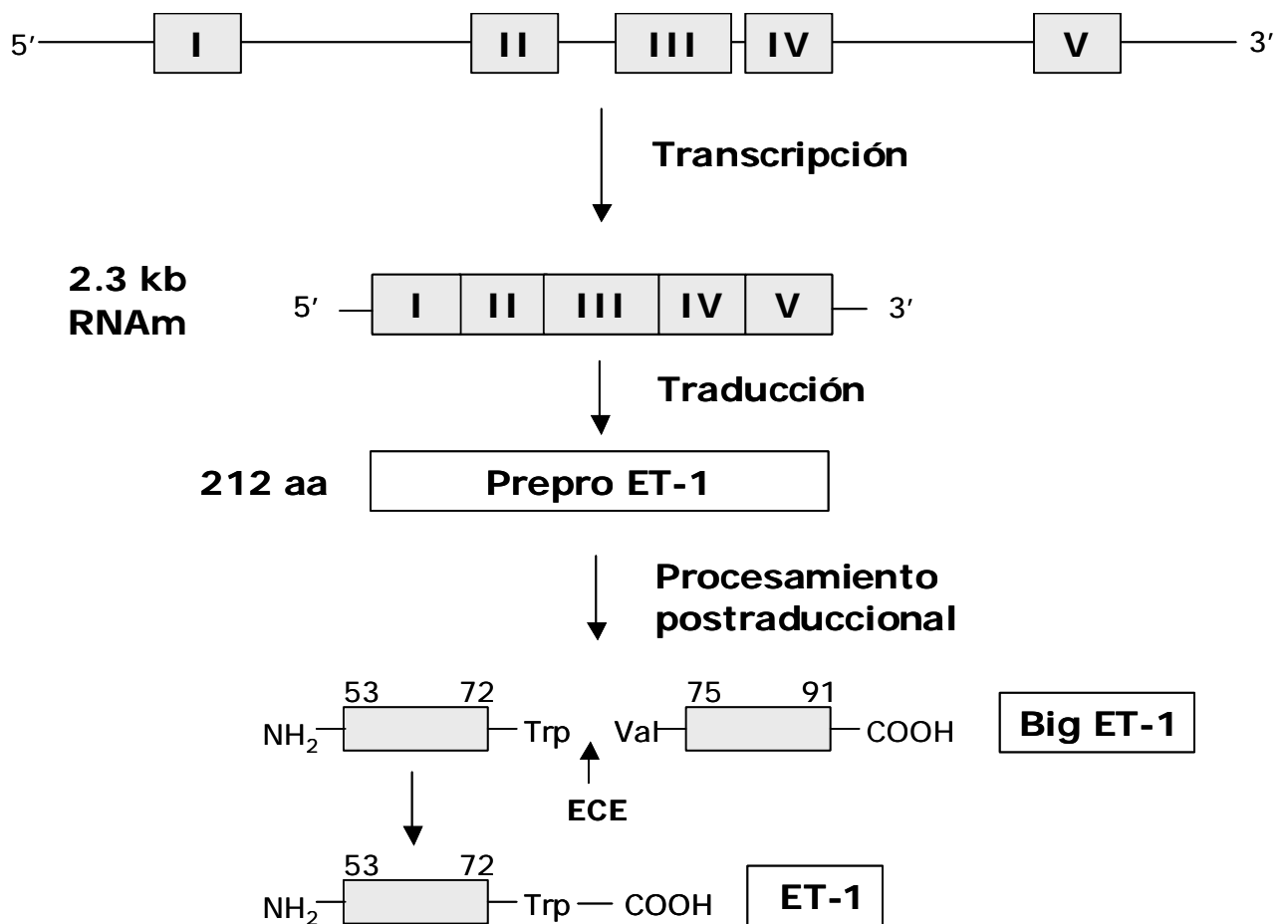
### 3.1. Endotelina 1

#### 3.1.1. Aspectos básicos de la endotelina 1

Las endotelinas pertenecen a una familia de péptidos vasoactivos de 21 aminoácidos. La endotelina 1 (ET-1) fue el primer péptido de la familia descrito en 1988 por Yanagisawa y cols. como sustancia vasoconstrictora producida por las células endoteliales vasculares<sup>18</sup>. Un año después, Inoue y cols. reportaron la existencia de 3 diferentes genes que codifican para la endotelina, la ya conocida ET-1 y las nuevas isoformas endotelina 2 (ET-2) y endotelina 3 (ET-3)<sup>19</sup>. A diferencia de la ET-1, la ET-2 y la ET-3 no se expresan en el endotelio y músculo liso vascular. La ET-1 se expresa en la mayoría de los tejidos incluyendo pulmón, riñón, cerebro, estómago, corazón, útero y placenta<sup>20</sup>. La mayoría de los estudios se han enfocado a ET-1 debido a que ésta presenta la mayor actividad biológica de la familia y se produce en todas las células endoteliales independientemente de su origen<sup>19,20</sup>.

La ET-1 se sintetiza a partir de preproendotelina, que es una proteína de 212 aa, que al ser procesada da lugar a la proET-1 de 38 aa. La ET-1 madura activa es un péptido de 21 aa y se forma mediante la acción de una metaloproteasa llamada enzima convertidora de endotelina (ECE)<sup>20</sup> (Figura 1). La ET-1 ejerce sus efectos biológicos actuando a través de dos tipos de receptores transmembranales acoplados a proteína G, el receptor A (ET1AR) y el receptor B (ET1BR). El ET1AR es el subtipo predominante en las células del músculo liso y regula la vasoconstricción inducida por ET-1, mientras que el ET1BR predomina en las células endoteliales y promueve

vasodilatación<sup>21,22</sup>. La acción biológica de la ET-1 a través del receptor ET1AR comienza con la activación de la fosfolipasa C (PLC) y produce inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> fomenta tanto la salida de calcio de los reservorios celulares, como la entrada de calcio extracelular aumentando las concentraciones intracelulares de este catión, lo que conlleva a contracción del músculo liso vascular<sup>23,24</sup>. Por su parte, el DAG activa vías de señalización mediadas por la proteína cinasa C (PKC) que involucran la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas), lo que puede inducir proliferación celular<sup>25</sup>. Con respecto a la vasodilatación que ejerce endotelina al unirse al receptor ET1BR, se ha mostrado que esta unión activa a una cinasa de serina-treonina conocida como proteína cinasa B/Akt<sup>26</sup>, que es capaz de fosforilar el residuo de la serina 1177 de la sintasa de óxido nítrico, lo que produce que esta enzima sea más activa y por lo tanto se incremente la síntesis de óxido nítrico (NO) (Figura 2).

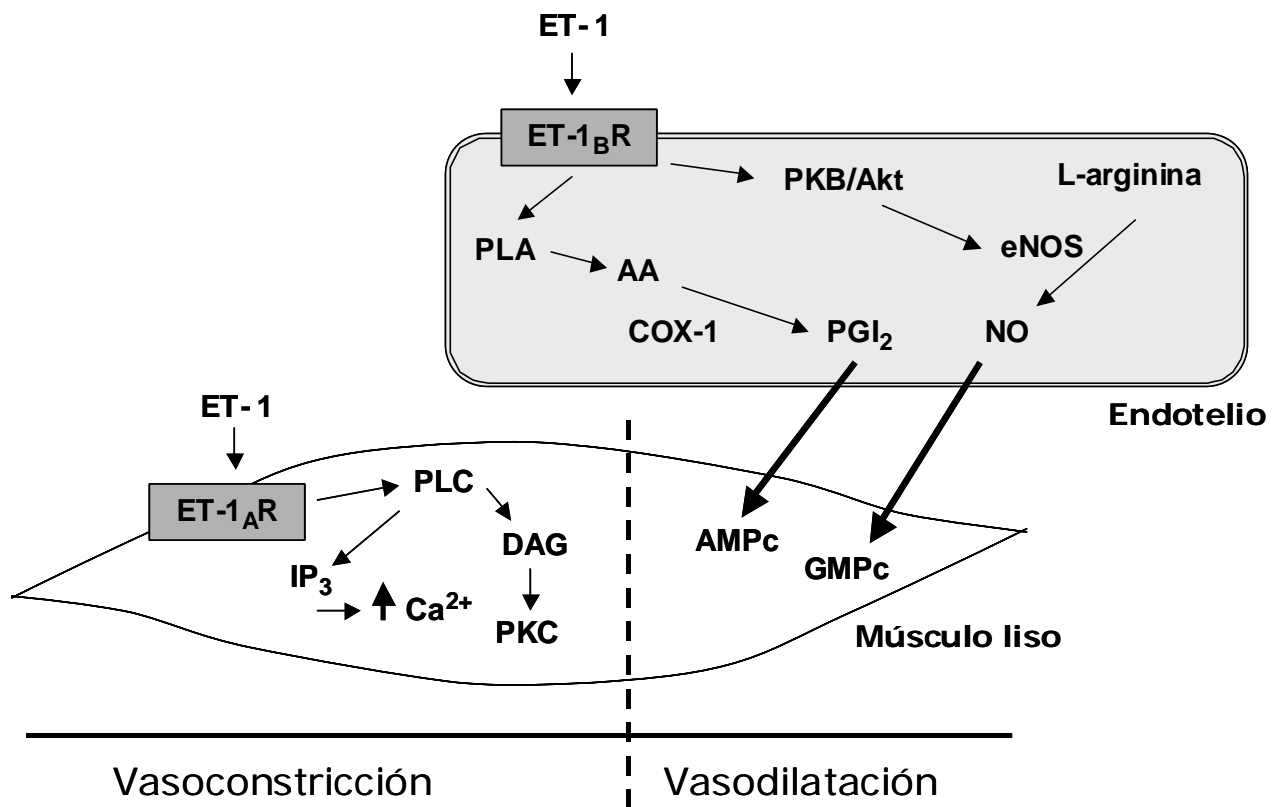


**Figura 1.** Síntesis de endotelina 1 (ET-1). El RNAm conformado por 5 exones se traduce en preproET-1 de 212 aa. La preproET-1 se escinde por la acción de endopeptidasas y carboxipeptidasas dando lugar a la proET-1 o Big ET-1. La enzima convertidora de ET-1 (ECE) transforma a la Big ET-1 en el péptido activo de 21 aa, la ET-1.

Además, algunos estudios reportan que la vasodilatación puede darse también como respuesta a la liberación de prostaciclina, posiblemente a través de la activación de la ciclooxygenasa 1 (COX 1)<sup>27</sup>.

La vida media de la ET-1 en la circulación es aproximadamente de 1 minuto y se estima que el 90% de la ET-1 circulante se depura en los pulmones y el resto a través de la circulación esplácnica y renal<sup>22,28</sup>. Se ha sugerido que ET<sub>1</sub><sub>B</sub>R juega un papel importante en la depuración de ET-1 debido a que la administración de antagonistas ET<sub>1</sub><sub>A</sub>R/ET<sub>1</sub><sub>B</sub>R y ET<sub>1</sub><sub>B</sub>R pero no ET<sub>1</sub><sub>A</sub>R específicos, incrementan las concentraciones plasmáticas de ET-1<sup>29</sup>. Después de que ambos receptores ingresan a los endosomas, ET<sub>1</sub><sub>A</sub>R unido a su vesícula regresa a la membrana plasmática y por lo tanto es reciclado, mientras que ET<sub>1</sub><sub>B</sub>R se dirige a los lisosomas donde es degradado<sup>30</sup>. Como ocurre con muchos receptores de membrana, los receptores ET-1 son regulados a la baja por su ligando<sup>20</sup>.

La expresión del gen de preproET-1 está regulada a la alta y a la baja por una gran cantidad de factores. La expresión de ET-1 aumenta en presencia de factores de crecimiento, hormonas, catecolaminas, citocinas y factores vasoactivos. Lo anterior incluye al factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), al factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), a la insulina, a la epinefrina, a la angiotensina II y a la bradicinina. Además, se ha mostrado que el estrés mecánico y la hipoxia aumentan también la expresión de ET-1, mientras que el NO, las prostaciclinas y los estrógenos tienen el efecto opuesto<sup>31</sup>.



**Figura 2.** Vías de señalización de endotelina 1 (ET-1) a través de sus receptores. En el endotelio, la unión de ET-1 a su receptor B (ET-1<sub>B</sub>R) fomenta la liberación de óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) con aumento de GMPc y AMPc, respectivamente, produciendo relajación del músculo liso. En este último tejido, la unión de ET-1 a su receptor A (ET-1<sub>A</sub>R) fomenta el aumento del calcio intracelular produciendo vasoconstricción. Abreviaciones: PKB/Akt, proteína cinasa B/Akt; eNOS, sintasa de óxido nítrico endotelial; PLA, fosfolipasa A; AA, ácido araquidónico; COX-1, ciclooxigenasa 1; PLC, fosfolipasa C; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína cinasa C; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato.

### *3.1.2. La endotelina 1 en la preeclampsia*

Durante el embarazo normal, las concentraciones de ET-1 en suero no sufren cambios significativos, con excepción en el momento del parto en donde su concentración aumenta<sup>32</sup>. Recientemente se ha mostrado que la sensibilidad vascular a la ET-1 no se modifica en este estado fisiológico, a diferencia de otras sustancias vasopresoras como la Ang II<sup>33</sup>.

En la placenta, la presencia de ET-1 evaluada por inmunoreactividad, muestra su localización durante todo el embarazo<sup>34,35</sup>. La producción de ET-1 en la placenta se ha mostrado en células endoteliales, en la decidua y el trofoblasto<sup>36,37</sup>. La expresión placentaria de los receptores muestra una mayor proporción ET-1<sub>B</sub>R con respecto a ET-1<sub>A</sub>R, lo que contribuye a la vasodilatación y perfusión uteroplacentaria durante el embarazo normal<sup>38</sup>.

El papel de los receptores de ET-1 sobre diferentes modelos de hipertensión arterial ha sido amplio tema de estudio. En ratas gestantes en las cuales se indujo un modelo de PE por medio de la reducción crónica de la perfusión uterina, lo que causa hipertensión arterial y disminución de la función renal, la administración del ABT-627 (antagonista específico para el ET-1<sub>A</sub>R) revirtió el estado de hipertensión<sup>39</sup>. Además, el pretratamiento con el ABT-627 a ratas gestantes abolió completamente la hipertensión inducida por TNF $\alpha$ <sup>40,41</sup>. Otro modelo de PE se produce por la administración de L-NAME (inhibidor de la sintasa del óxido nítrico), en el cual la inhibición crónica de la NOS produce hipertensión y disminuye la perfusión placentaria causando retraso de crecimiento intrauterino. Al utilizar este modelo, Thaete y cols.<sup>42</sup> mostraron que

la administración del A-127722 (antagonista del ET-1<sub>AR</sub>) disminuye la resistencia vascular y restablece la perfusión uteroplacentaria. Con respecto al ET-1<sub>BR</sub>, Matz y cols.<sup>43</sup> reportaron en este mismo modelo de PE que la administración de sarafotoxina S6c (agonista específico para el ET-1<sub>BR</sub>) revierte la hipertensión mientras que la administración del BQ-788 (antagonista específico para el ET-1<sub>BR</sub>) bloquea este efecto depresor. Ohuchi y cols.<sup>44</sup> estudiaron la presión arterial después de la administración de ET-1 en ratones deficientes en la expresión del ET-1<sub>BR</sub> y después del bloqueo farmacológico con BQ-788, observando en ambos casos un incremento en la presión arterial. De manera similar, Reinhart y cols.<sup>45</sup> mostraron que el bloqueo sistémico de ET-1<sub>BR</sub> utilizando el A-192621 (antagonista del ET-1<sub>BR</sub>) en primates produce hipertensión sostenida. Otros estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado efectos benéficos de ET-1 por su unión al receptor ET-1<sub>BR</sub>, no sólo sobre la presión arterial, sino también en el crecimiento placentario y fetal<sup>42,46</sup>. Los resultados obtenidos en los experimentos mencionados enfatizan la importancia de los receptores de ET-1 en la regulación de la presión arterial y en la regulación local del flujo uteroplacentario.

Las concentraciones de ET-1 en suero se encuentran aumentadas en embarazos complicados con PE en comparación con embarazos normotensos<sup>47,48</sup>. Sin embargo, en placentas de mujeres PE, la concentración de ET-1 se ha encontrado aumentada<sup>49</sup> o sin cambios<sup>34,50</sup>. Los resultados relacionados con la expresión placentaria de preproET-1 en la PE muestran diferencias dependiendo del material biológico utilizado ya sea cultivos

celulares u homogenados. En cultivos de células trofoblásticas, las concentraciones de RNAm son elevadas, mientras que en explantes no se observan diferencias en comparación a placentas de mujeres normotensas<sup>51,52</sup>. Los resultados de estos estudios son difíciles de comparar ya que los explantes están conformados por diversos tipos celulares que contribuyen de forma diferente a la expresión y secreción de ET-1.

Existen pocos estudios relacionados con la expresión de receptores de ET-1. En miometrio obtenido de mujeres con PE, Wolf y cols.<sup>53</sup> observaron una disminución en el RNAm de ambos receptores, mientras que Faxén y cols<sup>52</sup>, reportaron disminución exclusivamente en el RNAm de ET-1<sub>A</sub>R con respecto a la expresión observada en placentas de mujeres normotensas. En la placenta, el RNAm del receptor ET-1<sub>A</sub>R estuvo disminuido, a diferencia del ET-1<sub>B</sub>R que no presentó cambios.

Evidencia reciente muestra que la ET-1 no sólo participa como agente vasoactivo importante en la PE, sino que está involucrada también en el estado de estrés oxidativo observado en esta enfermedad. En ratas normales e hipertensas se ha observado que la ET-1 estimula la producción del anión superóxido a través de la vía ET-1<sub>A</sub>R/NADPH oxidasa<sup>54</sup>. Recientemente se ha descrito que la ET-1, en concentraciones similares a las encontradas en suero de mujeres preeclámpticas, induce el estrés oxidativo en la placenta al modificar el equilibrio entre oxidantes (aumento de malondialdehído) y antioxidantes (disminución de enzimas antioxidantes y ácido ascórbico)<sup>55</sup>.

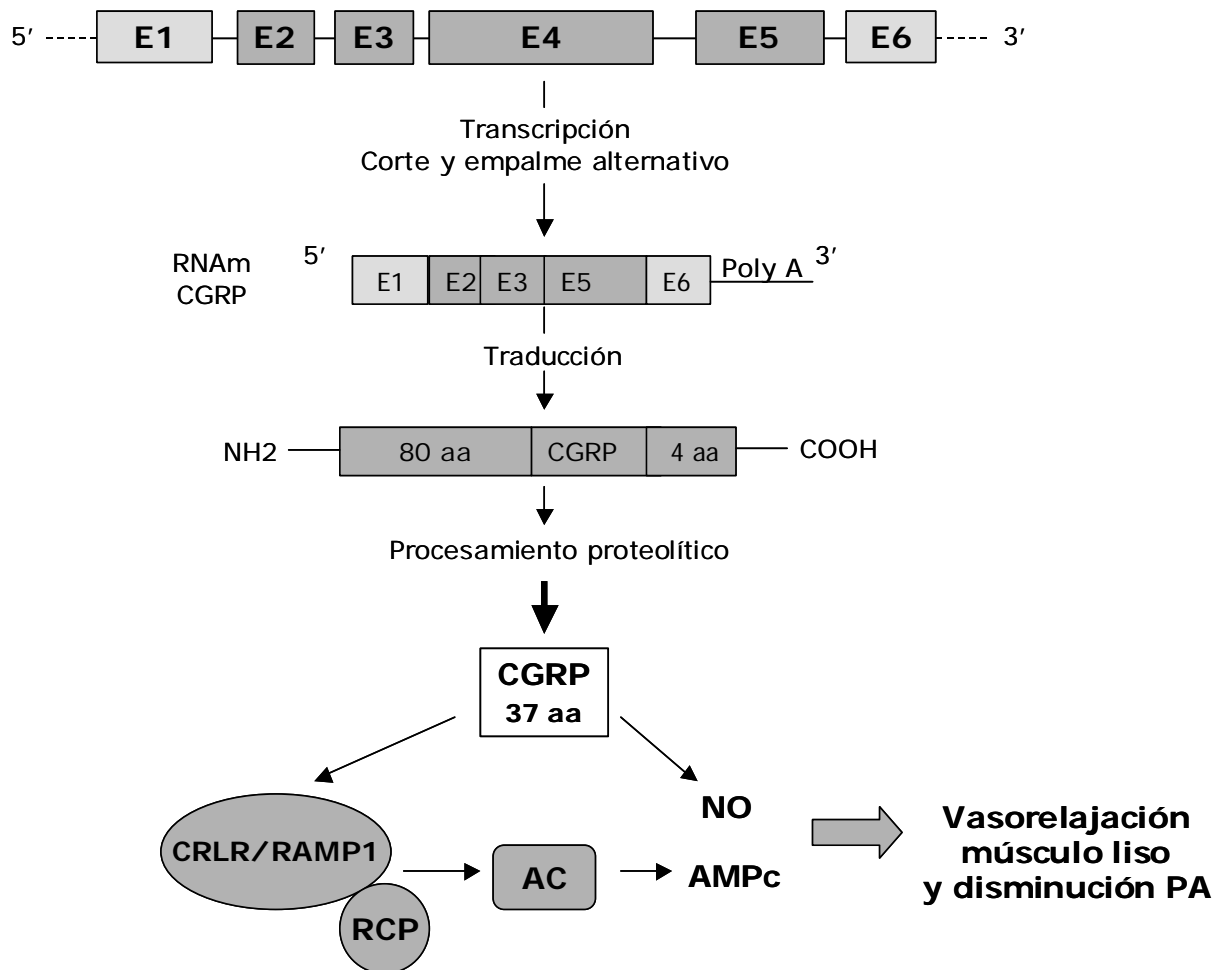


## 3.2. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

### 3.2.1. Aspectos básicos del péptido relacionado con el gen de la calcitonina

El CGRP es un neuropéptido de 37 amino ácidos, miembro de una familia de neuropéptidos que incluyen a la calcitonina (CT), adrenomedulina y amilina. El CGRP es un potente vasodilatador, producido por el corte y empalme alternativo del gen CT/CGRP en los sistemas nerviosos central y periférico<sup>56,57</sup> (Figura 3). También se ha mostrado que las células endoteliales sintetizan este péptido<sup>58</sup>. De igual manera que el CGRP, sus receptores están ampliamente distribuidos en el organismo<sup>59</sup>.

El receptor a CGRP, receptor similar al receptor de calcitonina (CRLR), pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G. Además de la proteína G, el CRLR requiere la interacción con una proteína accesoria llamada proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP) para formar un heterodímero funcional<sup>60</sup>. La RAMP1 es una proteína de 148 aminoácidos que pertenece a una familia de 3 proteínas de membrana conocidas como RAMP (RAMP1, RAMP2 y RAMP3) con un dominio N-terminal extracelular, un dominio transmembranal y un pequeño dominio intracelular. La coexpresión de RAMP1 con CRLR conlleva a la formación del heterodímero específico para el CGRP. En cambio, la coexpresión de CRLR con RAMP2 o RAMP3 promueve la respuesta a adrenomedulina<sup>61</sup>.



**Figura 3.** Síntesis y efectos del CGRP. El gen del CGRP conformado por 6 exones y 5 intrones se transcribe en pre-RNAm, el cual por empalme alternativo da lugar al RNAm maduro de 5 exones. El RNAm se traduce en el precursor de CGRP del cual deriva el CGRP activo de 37 aa. 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) es lo que estimula a la adenilato ciclasa (AC) lo que genera AMPc cuyo efecto principal es la disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. El CGRP estimula la síntesis de óxido nítrico (NO). El efecto global resulta en la relajación del músculo liso y disminución de la presión arterial (PA).

El dominio extracelular de la RAMP1 confiere la especificidad del CRLR al CGRP. Además del complejo CRLR/RAMP1, la respuesta al CGRP requiere de la presencia de una proteína recientemente descubierta, llamada proteína componente del receptor (RCP). La RCP es una proteína intracelular de 148 aminoácidos que, a diferencia de la RAMP1, no afecta la afinidad del receptor sino que está involucrada en el acoplamiento del heterodímero a la vía de transducción celular<sup>62</sup>.

La unión del CGRP a su receptor estimula la adenilato ciclasa lo que resulta en el incremento de la concentración de AMP cíclico. En la unidad fetoplacentaria, las vías de dilatación vascular involucran además del incremento en AMPc, la activación de canales  $K_{ATP}$  y producción de NO<sup>63,64</sup>.

La mayoría de los estudios relacionados con la regulación de la expresión del CGRP se han realizado a nivel neuronal. Dentro de los factores que promueven la expresión del CGRP se encuentran el NO<sup>65</sup>, la progesterona<sup>66,67</sup>, el  $TNF\alpha$ <sup>68</sup> y el AMPc, mientras que se ha descrito que el ácido retinoico y los glucocorticoides disminuyen su expresión<sup>69</sup>. No se tiene suficiente información que involucre a los factores que regulan los genes de CRLR y RAMP1. Sin embargo, se ha mostrado que el efecto del CGRP aumenta en condiciones hipóxicas sin modificar su expresión<sup>70</sup>. De forma interesante, la hipoxia induce la expresión del CRLR y RAMP1<sup>71,72</sup>.

### *3.2.2 El Péptido relacionado con el gen de la calcitonina en la preeclampsia*

Durante el embarazo normal, las concentraciones circulantes del CGRP aumentan en los compartimientos materno y fetal<sup>73</sup>. Además, la magnitud del incremento del CGRP en suero fetal correlaciona positivamente con el peso fetal y la edad gestacional<sup>74</sup>. El CGRP relaja la vasculatura del plato coriónico y las venas fetoplacentarias, además de reducir la resistencia vascular en cotiledones perfundidos<sup>75,76</sup>. Estudios en placenta humana muestran al CGRP en la decidua<sup>77</sup> y el trofoblasto<sup>63</sup>. Recientemente se ha mostrado que el CRLR y RAMP1 se expresan de forma homogénea en la vasculatura fetoplacentaria, específicamente en el endotelio, músculo liso y trofoblasto<sup>63</sup>. El incremento del CGRP durante el embarazo y la expresión placentaria de su receptor sugieren que la vasodilatación inducida por CGRP en la unidad fetoplacentaria contribuye a la baja resistencia vascular y el crecimiento fetal durante este estado fisiológico. Interesantemente, nuestro grupo ha observado que las concentraciones del CGRP están significativamente más bajas en las mujeres preeclámpticas que en embarazadas normotensas<sup>8</sup>. Lo anterior indica que la disminución en las concentraciones circulantes del CGRP puede constituir uno de los factores implicados en el desarrollo y sostenimiento de la hipertensión en la PE. En apoyo a este concepto, estudios en ratas han mostrado que la administración del antagonista CGRP<sub>8-37</sub> aumenta la presión arterial, disminuye el peso fetal e incrementa la mortalidad fetal de manera dosis dependiente<sup>74,78</sup>.

Existen pocos estudios sobre la expresión placentaria del sistema CGRP en la PE. Knerr y cols.<sup>79</sup> observaron una disminución en la expresión del CGRP y

CRLR en el corion pero no en vellosidades de placentas obtenidas de mujeres PE. Sin embargo, Dong y cols.<sup>80</sup> observaron que la expresión de CGRP, CRLR y RAMP1 está disminuida en la vasculatura de placentas obtenidas de mujeres PE. Además, la respuesta vasodilatadora dosis-dependiente de CGRP está disminuida en la unidad fetoplacentaria de mujeres con PE<sup>80</sup>. Lo anterior refleja la controversia y falta de datos que ayuden a comprender la alteración de este sistema en la placenta durante la PE.

### **3.3. Óxido nítrico y óxido nítrico sintasas**

#### *3.3.1. Aspectos básicos del óxido nítrico y las óxido nítrico sintasas*

El óxido nítrico (NO) es un gas inorgánico reconocido en 1987 por Moncada y cols.<sup>81</sup> como el factor relajante derivado del endotelio (EDRF), un potente vasodilatador que incrementa las concentraciones de GMPc en el tejido vascular. El NO es sintetizado a partir de L-arginina por acción catalítica de las enzimas pertenecientes a la familia de las óxido nítrico sintasas (NOS) y la participación de diferentes coenzimas y cofactores<sup>82</sup>. La familia de las NOS incluye a 3 proteínas codificadas por distintos genes, la NOS neuronal (nNOS o NOS I)<sup>83</sup>, la NOS inducible (iNOS o NOS II)<sup>84</sup> y la NOS endotelial (eNOS o NOS III)<sup>85</sup>. Debido a la abundancia relativa de eNOS e iNOS, el presente estudio se limitó a analizar únicamente a estas dos enzimas. La eNOS es una enzima constitutiva del endotelio y su actividad requiere de calcio/calmodulina. En el endotelio vascular el estímulo por agonistas aumenta la concentración de IP<sub>3</sub>, lo que resulta en el aumento del calcio intracelular. La unión del calcio a la calmodulina

forma el complejo Ca/CaM que activa a la eNOS<sup>86,87</sup>. La isoforma iNOS es inducida por citocinas y no requiere de calcio/calmodulina para ejercer su actividad biológica<sup>88,89</sup>.

Después de su síntesis, el NO difunde a través de las membranas celulares e interactúa con blancos específicos, donde el NO produce vasodilatación a través de la activación de la guanilato ciclasa. El NO se une al hemo de la guanilato ciclasa y la activa, induciendo un cambio conformacional que estimula la producción de GMPc a partir de GTP con la consecuente disminución de Ca<sup>2+</sup> intracelular e inhibición del aparato contráctil<sup>90,91</sup>. La síntesis de NO depende mayormente de la iNOS ya que ésta enzima produce NO en cantidades nanomolares y su acción es de largo plazo. En cambio, la eNOS lo hace en cantidades picomolares y sus efectos son de corta duración<sup>92</sup>.

La regulación de la expresión de estas enzimas es compleja y diferencial. En la regulación de la expresión de eNOS, se ha descrito que factores como el estrés mecánico inducido por cambios de flujo o viscosidad en la sangre del endotelio vascular<sup>93</sup>, los estrógenos<sup>94</sup> y el TGFβ<sup>95</sup> aumentan su expresión, mientras que la ET-1 a través de la producción de peróxido de hidrógeno<sup>96</sup>, los superóxidos<sup>97</sup>, el TNFα<sup>98</sup>, la IL1β y la hipoxia disminuyen su expresión<sup>95</sup>. En cambio la expresión de iNOS se regula a la alta por la hipoxia<sup>99</sup>, la IL-1β<sup>100</sup>, el INFγ<sup>101,102</sup>, y el TNFα<sup>103</sup>, mientras que el NO<sup>104</sup> y el AMPc<sup>105</sup> la disminuyen.

### 3.3.2. El óxido nítrico y las óxido nítrico sintasas en la preeclampsia

Las concentraciones de NO en suero aumentan durante el embarazo normal, lo que es considerado como un mecanismo de adaptación para contrarrestar algunos cambios hemodinámicos como el aumento del volumen plasmático<sup>106</sup>. Además, la producción local de NO contribuye al mantenimiento de la baja resistencia vascular en la circulación fetoplacentaria<sup>107</sup>. Dötsch y cols.<sup>108</sup> reportaron que la expresión de la eNOS en tejido placentario aumenta a medida que avanza la edad gestacional, mientras que la expresión placentaria de iNOS no se modifica entre el primer y el tercer trimestre del embarazo.

En embarazos complicados con preeclampsia, los resultados obtenidos sobre el sistema NO/NOS son controversiales. Las concentraciones de NO en suero se han encontrado disminuidas<sup>47,48,109</sup>, aumentadas<sup>110</sup> o sin cambios<sup>111,112</sup>, lo que puede deberse a cambios paralelos en la expresión, actividad, o ambas de las NOS. La mayoría de los estudios muestra actividad y expresión de eNOS similares a las observadas en placentas normales<sup>113-115</sup>. Sin embargo, se ha reportado un aumento en la expresión de eNOS cuando hay retraso de crecimiento intrauterino<sup>116</sup>. La expresión de iNOS ha sido menos estudiada y presenta mayor controversia debido a que se ha encontrado aumentada<sup>117</sup>, disminuida<sup>114</sup> o sin cambios<sup>115</sup>.

El NO forma parte de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluye a radicales libres y a moléculas reactivas que contienen electrones desapareados<sup>118</sup>. Los productos primarios, altamente reactivos, de la peroxidación de lípidos se forman cuando los radicales libres atacan a los

ácidos grasos poliinsaturados o al colesterol en las membranas o lipoproteínas, aunque también pueden formarse por la acción de las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa<sup>119</sup>. El NO puede reaccionar con el anión superóxido y formar el anión peroxinitrito, que no sólo limita la biodisponibilidad del NO sino que contribuye directamente a la peroxidación de lípidos<sup>120,121</sup>. La peroxidación de lípidos en exceso puede provocar disfunción y daño celular. La producción aumentada de radicales libres puede llevar a un desequilibrio entre moléculas prooxidantes y antioxidantes, produciendo un estado de estrés oxidativo<sup>122</sup>. En la preeclampsia ocurren numerosos cambios que indican un estado acentuado de estrés oxidativo, observados tanto en la circulación materna como en la unidad fetoplacentaria<sup>10</sup>. En ambos compartimientos, se ha mostrado el aumento en los niveles de peroxidación de lípidos, cuantificando el malondialdehído<sup>47</sup> y los isoprostanos<sup>123</sup>, productos relacionados con su metabolismo. Además, estudios inmunohistoquímicos en placentas de mujeres PE presentan aumento en la nitrotirosina, producto estable del daño generado por la interacción de los peroxinitritos con las proteínas<sup>124</sup>. El incremento en los niveles de peroxidación observado en la PE, puede ser también el resultado de una disfunción en el sistema antioxidante, ya que se ha reportado mayor actividad de la NADPH oxidasa<sup>125</sup> y menor actividad de enzimas tales como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa<sup>11,126</sup>.



### 3.4. Magnesio

Del magnesio corporal total, el 60% se localiza en el tejido óseo, del 20 al 26% en el músculo y del 14 al 20% restante se distribuye en tejidos blandos y en el medio extracelular<sup>127</sup>. Del magnesio extracelular, la mayor parte (60 %) se encuentra en forma libre, el 30 % se encuentra unido a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, mientras que el resto forma complejos con fosfato, citrato y otros aniones<sup>128</sup>. A nivel intracelular, el magnesio es el segundo catión más abundante después del potasio (0.5mM), y a la inversa que en el compartimiento extracelular, en el medio intracelular, sólo una pequeña parte está en forma libre, mientras que del 90 al 95 % se encuentra unido a ATP, ADP, citrato, proteínas y ácidos nucleicos<sup>129</sup>.

La forma iónica del magnesio ( $Mg^{2+}$ ) se encuentra involucrada en una gran variedad de reacciones metabólicas, particularmente en los procesos enzimáticos. El  $Mg^{2+}$  participa en las reacciones enzimáticas a través de dos mecanismos<sup>130</sup>: 1) al tener alta afinidad para los grupos fosfato se une a los nucleótidos ATP y GTP formando complejos ATP-Mg y GTP-Mg<sup>131</sup>. Estos complejos permiten a los nucleótidos ser utilizados como sustratos en diversas reacciones metabólicas donde participan ATPasas, GTPasas, adenilato y guanilato ciclasas, entre otras. Además, el ATP-Mg y GTP-Mg sirven como sustratos para la fosforilación de las proteínas MAP cinasas, involucradas en la propagación intracelular de las señales de transducción,<sup>131,132</sup> 2) el  $Mg^{2+}$  se une a sitios específicos de diferentes enzimas confiriendo cambios conformacionales que favorecen su actividad

catalítica, tal como ocurre con la fosfolipasa C, la adenilato ciclasa, la fosfofructocinasa, etc...

El  $Mg^{2+}$  también es necesario para la actividad de las enzimas involucradas en los procesos de duplicación y transcripción del DNA, tales como las DNA y RNA polimerasas, topoisomerasas y exonucleasas<sup>130,133</sup>. Como se mencionó, los grupos fosfato con carga negativa en los ácidos nucleicos permite su unión al  $Mg^{2+}$ , lo que resulta en mayor estabilidad de las cadenas de DNA o RNA<sup>131,134</sup>. Además, diversos estudios han mostrado que el  $Mg^{2+}$  participa en la regulación de la expresión génica, que se traduce en el estímulo o inhibición de la síntesis de proteínas involucradas en varios procesos biológicos. El  $Mg^{2+}$  regula la expresión de proteínas que participan en el crecimiento y la diferenciación celular (ciclina D1)<sup>135</sup>, en la adhesión y comunicación celular (integrinas),<sup>136</sup> en el desarrollo de lesiones fibróticas (TGF $\beta$  e inhibidor del activador de plasminógeno),<sup>137</sup> en el estrés oxidativo (citocromo c, glutatión transferasa, glutatión peroxidasa, CuZn superóxido dismutasa), en la respuesta al estrés (proteínas de choque térmico 70 y 84) y el flujo de iones (cotransportador 1 Na-P)<sup>138</sup>. Además, el  $Mg^{2+}$  modula la afinidad de unión del factor de transcripción CREB a sus elementos de respuesta (CRE) en el DNA, lo que indica que el  $Mg^{2+}$  regula no solamente la síntesis de AMPc, sino también su acción a nivel nuclear<sup>139,140</sup>. Estas observaciones indican el papel del  $Mg^{2+}$  sobre la regulación de la expresión génica además de sus efectos metabólicos.

La función del  $Mg^{2+}$  como antioxidante ha cobrado importancia en los años recientes debido a su participación en la prevención y atenuación del estrés oxidativo, principalmente en enfermedades cardiovasculares, incluyendo la hipertensión<sup>141</sup>. Aunque los mecanismos por los cuales el  $Mg^{2+}$  se relaciona con estas variables no están claramente definidos, se ha demostrado en diferentes modelos experimentales que su deficiencia se asocia con incremento en la concentración de radicales libres y marcadores de peroxidación de lípidos (malondialdehído). Además, la suplementación y el pretratamiento con  $Mg^{2+}$  o la administración de  $MgSO_4$  atenúa y en algunos casos inhibe el incremento de los radicales libres y del malondialdehído<sup>142-147</sup>.

### **3.5. El sulfato de magnesio en la prevención de la eclampsia**

El riesgo de mortalidad materna, fetal o ambas se incrementa cuando la preeclampsia evoluciona hacia la eclampsia, condición en la cual la mujer embarazada presenta convulsiones tónico-clónicas generalizadas<sup>6</sup>. A principios del siglo XX, el  $MgSO_4$  fue utilizado de forma empírica para la prevención y recurrencia de las convulsiones atribuibles a la eclampsia y actualmente se sigue considerando como una de las mejores opciones terapéuticas<sup>148</sup>.

El mecanismo anticonvulsivo del  $MgSO_4$  no está claramente definido. Sin embargo, los resultados de estudios experimentales en ratas llevan a sugerir que el  $MgSO_4$  inhibe la activación de receptores a aminoácidos excitatorios tales como el N-metil-D-aspartato (NMDA),<sup>149</sup> el kainato y el alfa-amino-3-hidroxi-5-

metil-isoxazol-4-ácido propiónico (AMPA)<sup>150</sup>. El receptor NMDA contiene un canal iónico permeable a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> con un sitio de unión específico para Mg<sup>2+</sup>, mientras que el kainato y el AMPA contienen un canal permeable a Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Estos receptores funcionan posiblemente como amplificadores sensibles a las respuestas excitatorias sinápticas, propagando el potencial de acción en las neuronas hiperexcitadas que posteriormente dan lugar a las crisis convulsivas. Lo anterior ha llevado a sugerir que el efecto anticonvulsivo del MgSO<sub>4</sub> implica dos tipos de mecanismos: uno a nivel de la secreción de neurotransmisores (actividad inhibitoria central) y otro a nivel de su acción. El aumento en la concentración de Mg<sup>2+</sup> favorece su ingreso a la célula en detrimento del ingreso de Ca<sup>2+</sup>, lo que se traduce por la disminución de la concentración intracelular de este último y por ende de la secreción de neurotransmisores dependiente de este catión<sup>149</sup>. Por otro lado, el aumento en la concentración de Mg<sup>2+</sup> favorece también la unión de este catión al receptor NMDA, lo cual mantiene al receptor inactivo, evitando por lo tanto el ingreso de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> a la célula.

### **3.6. Efectos del MgSO<sub>4</sub> sobre factores vasoactivos**

Durante el embarazo, el Mg<sup>2+</sup> cruza la barrera placentaria contra un gradiente de concentración<sup>151</sup>, transporte mediado principalmente por un transportador Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, el cual ha sido identificado en el trofoblasto humano<sup>152</sup>. La administración de MgSO<sub>4</sub> se traduce por un aumento significativo en la concentración de Mg<sup>2+</sup> en la circulación materna y en el cordón umbilical<sup>8,153</sup>. Lo anterior muestra que el MgSO<sub>4</sub> puede tener efectos en la mujer y en la unidad

fetoplacentaria. Además de sus efectos anticonvulsivos, el MgSO<sub>4</sub> disminuye la presión arterial a través de un mecanismo desconocido<sup>154,155</sup>. De manera interesante, el MgSO<sub>4</sub> disminuye la presión de perfusión en cotiledones placentarios obtenidos de mujeres con PE<sup>156</sup>. Además, el MgSO<sub>4</sub> atenúa la vasoconstricción inducida por angiotensina II, ET-1 y peróxidos en la vasculatura placentaria<sup>157,158</sup>.

Estudios en mujeres preeclámpticas muestran que la administración de MgSO<sub>4</sub> aumenta las concentraciones del CGRP<sup>8</sup> y disminuye la concentración de ET-1<sup>159</sup>. Sin embargo, no existen antecedentes acerca de los efectos del MgSO<sub>4</sub> sobre las concentraciones circulantes de NO y MDA, así como posibles cambios en la expresión placentaria de los sistemas de ET-1, CGRP y sintasas del NO en la PE.

## IV. JUSTIFICACIÓN

---

---

La preeclampsia representa un problema de salud pública en México y en el mundo. Hasta la fecha, la etiología de la preeclampsia es desconocida aunque es seguramente un padecimiento de origen multifactorial. El desarrollo de la hipertensión durante la preeclampsia ha sido asociado con un incremento en la resistencia vascular, así como a una disminución del flujo uteroplacentario. Una alteración en la síntesis, acción de agentes vasoactivos en la unidad placentaria o ambas puede explicar el aumento en la presión arterial en el compartimiento materno, como consecuencia del incremento de la resistencia vascular y el retraso del crecimiento uterino que resulta de la reducción del flujo uteroplacentario. El riesgo de mortalidad materna, fetal o ambos se incrementa cuando la preeclampsia evoluciona hacia eclampsia, estado en el cual la mujer embarazada presenta convulsiones. Uno de los tratamientos preventivos de las convulsiones consiste en la administración de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ). En la preeclampsia, la administración de  $\text{MgSO}_4$  aumenta las concentraciones del CGRP y disminuye la concentración de ET-1. A pesar de que el  $\text{Mg}^{2+}$  es transportado a través de la placenta, sus efectos sobre la expresión de los RNAs mensajeros de factores vasoactivos no ha sido explorado durante la preeclampsia. Este proyecto aporta nuevos conocimientos acerca de las concentraciones circulantes y describe la expresión placentaria de factores vasoactivos en respuesta al  $\text{MgSO}_4$ , tratamiento ampliamente utilizado en la práctica médica y cuyas acciones no han sido estudiadas en la preeclampsia.

## V. OBJETIVOS

---

---

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del  $MgSO_4$  sobre las concentraciones circulantes y la expresión placentaria de factores vasoactivos en mujeres preeclámpticas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si el tratamiento con  $MgSO_4$  disminuye la presión arterial en mujeres preeclámpticas.
2. Determinar si las concentraciones circulantes de ET-1, MDA, NO y CGRP en mujeres preeclámpticas se modifican en respuesta al  $MgSO_4$ .
3. Describir si la expresión placentaria de ET-1, ET-1AR, ET-1BR, eNOS, iNOS, CGRP, CRLR y RAMP1 se altera en mujeres preeclámpticas.
4. Estudiar si el  $MgSO_4$  en mujeres preeclámpticas, se asocia con cambios en la expresión placentaria de ET-1, ET-1AR, ET-1BR, eNOS, iNOS, CGRP, CRLR y RAMP1.

## VI. HIPÓTESIS

---

---

En mujeres con preeclampsia, el tratamiento con  $MgSO_4$  disminuirá las concentraciones circulantes de MDA, ET-1 y aumentará las de NO y CGRP. Además, el  $MgSO_4$  disminuirá la expresión placentaria de los agentes vasoconstrictores y aumentará la de aquellos que fomentan la vasodilatación.



## VII. METODOS Y MATERIALES

---

---

### A) Reactivos

El estuche comercial SuperScript II® para la obtención de los DNAc, los iniciadores, la formamida, la solución de prehibridización y el estuche comercial de marcaje RediPrime II® se adquirieron de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). El Cloruro de Cesio grado biología molecular se obtuvo de Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO). La Taq polimerasa y la nitrato reductasa se compraron a Roche Diagnostics Co. (Indianapolis, IN). Los estuches comerciales para la determinación de la ET-1 y el CGRP en suero por RIA se adquirieron de Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (Mountain View, CA). Todos los productos utilizados en el PCR en tiempo real, incluyendo las sondas específicas para los genes de interés, se compraron a Applied Biosystems (Foster City, CA).

### B) Materiales

Los tubos de polialómero utilizados se compraron a Beckman Instruments, Inc. (Palo Alto, CA). Las membranas de nylon cargadas positivamente Immobilon-NY+® y los filtros de centrifugación Microcon YM-10 se adquirieron de Millipore Co. (Bedford, MA). Las placas de autoradiografía Biomax XAR se compraron a Kodak (Rochester, NY).

## 7.1. Sujetos

El reclutamiento y seguimiento de las mujeres embarazadas se realizó en el Hospital de Gineco-Obstetricia "Luis Castelazo Ayala" (IMSS, México. D.F.) y en el Hospital General Manuel Gea González (SSA, México, D.F.). La razón de incluir a las dos instituciones mencionadas se debe a que en el Hospital de Gineco-Obstetricia "Luis Castelazo Ayala" el cuidado de las mujeres con preeclampsia moderada consiste en el aumento de la expansión de volumen dado por la administración de solución fisiológica al 0.9% libre de sulfato de magnesio. En el Hospital General Manuel Gea González, toda mujer con preeclampsia es tratada con sulfato de magnesio administrado en solución fisiológica tal como lo establece su protocolo. El tratamiento consistió en la administración de 4 gramos de  $MgSO_4$  en un tiempo de 30 minutos seguidos de una dosis de  $MgSO_4$  a razón de 1 g/h durante 3 a 6 horas antes del parto y durante 24 horas posparto.

Este estudio incluyó a un grupo de mujeres embarazadas normotensas (Grupo NT) que no presentaron hipertensión ni proteinuria como grupo testigo del grupo de mujeres embarazadas con preeclampsia (Grupo PE). El diagnóstico de la preeclampsia se obtuvo utilizando criterios establecidos<sup>6</sup> como se define a continuación: presión arterial sistólica  $\geq 140$  mm Hg y/o presión arterial diastólica  $\geq 90$  mm Hg en por lo menos 2 ocasiones y proteinuria ( $\geq 100$  mg/dL o 1-3 + en las tiras reactivas). En ambos grupos se incluyeron a mujeres de 18-35 años de edad, cuyo embarazo implicara el nacimiento de un solo recién nacido con Apgar de 7-10. No fueron consideradas las mujeres con hipertensión

previa al embarazo, con antecedentes o diagnóstico de enfermedades renales, hepáticas, cardíacas o cualquier otra alteración endocrina, así como aquellas que ingirieron suplementos nutricionales, diuréticos o con terapia hormonal. Se consideraron como criterios de exclusión la necesidad de tratamientos alternativos a los descritos anteriormente o el abandono voluntario del estudio.

### **7.1.2 Grupos experimentales**

Para el estudio del efecto del  $MgSO_4$  sobre las concentraciones circulantes de los factores vasoactivos, se obtuvieron muestras de sangre de los grupos como se indica a continuación:

**Grupo NT:** en la admisión

**Grupo PESF:** en la admisión (antes del tratamiento) y durante el tratamiento con solución fisiológica (parto y 24 horas posparto).

**Grupo PEMgSO<sub>4</sub>:** en la admisión (antes del tratamiento) y durante el tratamiento con  $MgSO_4$  (parto y 24 horas posparto).

Para el estudio de la expresión génica de los factores vasoactivos, las placentas se obtuvieron de 3 grupos de mujeres embarazadas:

**Grupo NT**

**Grupo PE (PESF):** Preeclampsia tratada con solución fisiológica libre de  $MgSO_4$ .

**Grupo PE  $MgSO_4$  (PEMgSO<sub>4</sub>):** Preeclampsia tratada con  $MgSO_4$ .

## **7.2. Tamaño de la muestra**

Para el estudio del efecto del MgSO<sub>4</sub> sobre las concentraciones circulantes de los factores vasoactivos antes y durante el tratamiento se incluyeron 15 pacientes del grupo PESF y 16 pacientes del grupo PEMgSO<sub>4</sub>. Con el fin de comparar las concentraciones basales de los factores vasoactivos se incluyó como grupo testigo al grupo NT conformado por 15 mujeres embarazadas normotensas. La determinación de la expresión placentaria se realizó en 10 mujeres del grupo NT, 10 del grupo PESF y 8 del grupo PEMgSO<sub>4</sub>. En los dos tipos de estudio, el tamaño de la muestra utilizado permitió alcanzar un nivel de confianza del 95%.

## **7.3. Consideraciones éticas**

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"(México, D.F). La donación de las muestras de sangre y de la placenta se realizó con carta de consentimiento informado de las mujeres embarazadas participantes.

## **7.4. Registro de datos clínicos y toma de muestras**

En el momento de la admisión se registraron los datos clínicos de todas las mujeres y se tomaron muestras de orina de las que presentaron hipertensión para determinar el grado de proteinuria. Cuando el diagnóstico fue positivo de

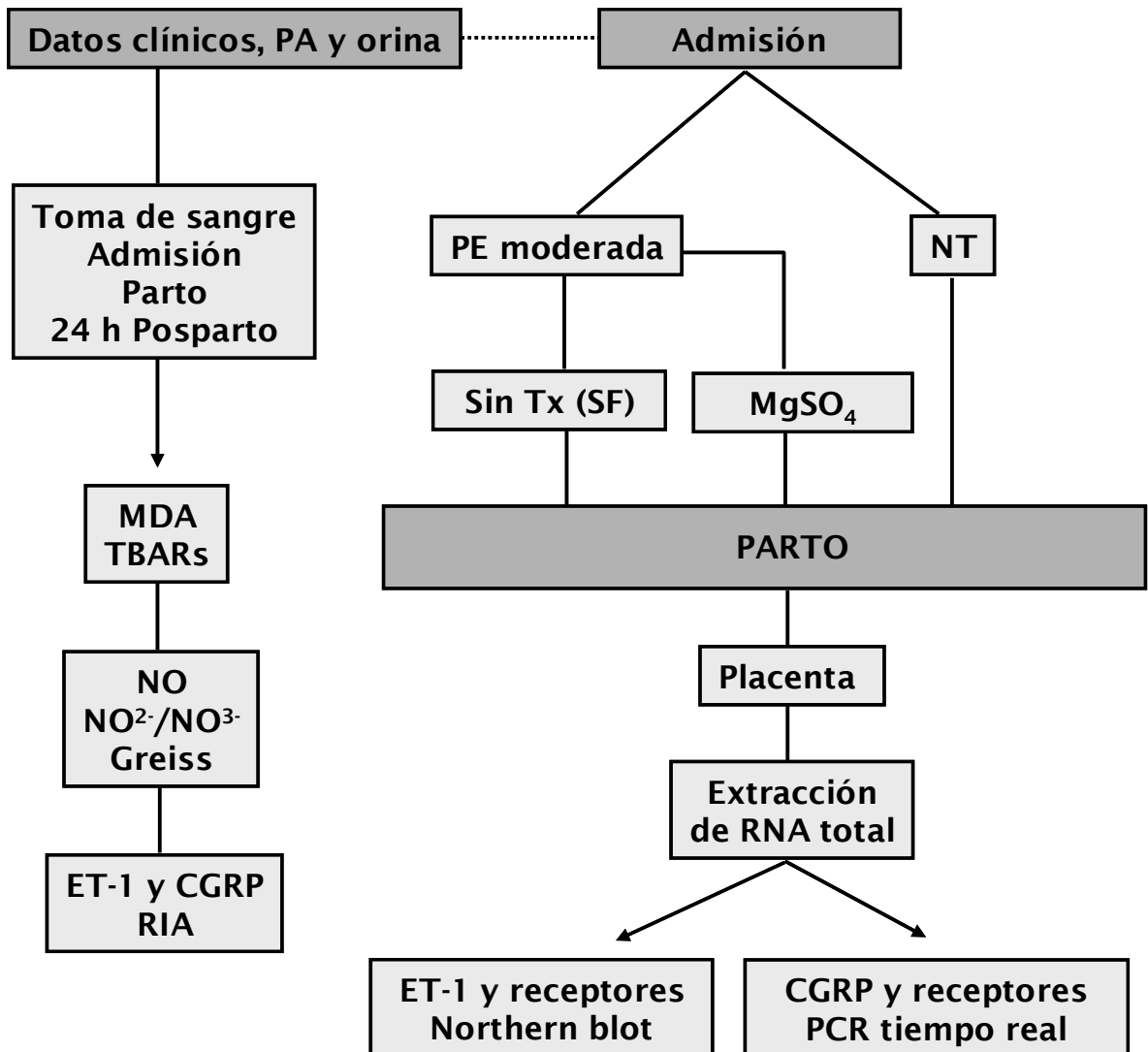
preeclampsia, se registró el tratamiento prescrito dependiendo del protocolo específico del hospital en donde se atendió la paciente.

#### **7.4.1 Obtención y preparación del suero para la determinación de ET-1, CGRP, NO y MDA**

Para el estudio de las concentraciones circulantes de los factores reguladores de la presión arterial se tomaron muestras de 10 mL de sangre antes y durante (parto y 24 horas posparto) los tratamientos. Una vez recolectadas las muestras de sangre se centrifugaron a 2,000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El suero se separó en alícuotas que se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

#### **7.4.2 Obtención y preparación de las placentas para el estudio de la expresión génica**

Al finalizar el parto se registró el peso de la placenta así como el peso y la talla del recién nacido. Una vez obtenida la placenta se procedió de forma inmediata a la disección del tejido placentario, eliminando las membranas fetales y la decidua. De los cotiledones se tomaron muestras de aproximadamente 1 gramo, que se lavaron con solución salina fría al 0.9% y se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido. Las muestras recolectadas se almacenaron a -70 °C hasta el día de la extracción del RNA. La Figura 4 resume la estrategia de la metodología utilizada.



**Figura 4.** Diagrama de flujo que representa los grupos estudiados y la metodología utilizada para evaluar tanto las concentraciones circulantes como expresión placentaria de factores vasoactivos.

## **7.5. Estudio de las concentraciones de malondialdehído y factores vasoactivos en suero**

### **7.5.1 Determinación de MDA**

La cantidad de peróxidos de lípidos en suero se expresó en concentraciones de MDA, medida como reactantes al ácido tiobarbitúrico (TBARs) utilizando el método descrito por Richard y cols.<sup>160</sup> La curva estándar se preparó con 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como solución estándar de MDA (0.6-0.9  $\mu\text{mol/L}$ ). Para la determinación de MDA en suero, se usaron 400  $\mu\text{L}$  de suero, 50  $\mu\text{L}$  de butiril hidroxitolueno 12.6 mM, 400  $\mu\text{L}$  de ácido ortofosfórico 0.2 M y 50  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.11 M. La mezcla se incubó a 95 °C en baño de agua; después de 45 minutos la reacción se detuvo al colocarla en hielo y se dejó a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 1 mL de n-butanol y 0.1 mL de solución NaCl saturada, se mezcló vigorosamente y se centrifugó para extraer el complejo TBA-MDA. La determinación de los TBARs en extracto de butanol se determinó por espectrofotometría utilizando las diferencias de absorbancias a 535 y 572 nm.

### **7.5.2 Determinación de NO**

El NO es inestable en solución acuosa ya que se oxidan rápidamente a sus productos finales estables, nitritos y nitratos ( $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ ). Debido a lo anterior, las concentraciones de NO en suero se determinaron con la cuantificación de nitritos totales por el reactivo de Greiss después de la reducción de nitratos a nitritos<sup>161</sup>. Con la finalidad de eliminar las proteínas, las muestras de suero se centrifugaron en filtros a 34,000 x g a 4 °C durante 2 horas. La reducción de

nitratos a nitritos se llevó a cabo con la enzima nitrato reductasa. Antes de la reacción enzimática, la nitrato reductasa se activó a 20 °C durante 20 minutos. La curva estándar se obtuvo usando solución de nitrito de sodio (25-125  $\mu\text{M}$ ). La reacción se inició con 40  $\mu\text{L}$  de blanco, estándares y muestras de suero, 20  $\mu\text{L}$  de  $\beta\text{-NADPH}$  2.4  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{L}$  de nitrato reductasa (0.007 U) y 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{KHPO}_4$  0.14 M, pH 7.5. Posteriormente se incubó a 20 °C durante 30 minutos y se agregó el reactivo de Greiss (100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfanílico al 0.1% en 2.5 % de ácido fosfórico y 100  $\mu\text{L}$  de naftiletilediamina al 0.5 % en 2.5 % de ácido fosfórico). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y la concentración de nitritos se determinó por espectrofotometría a 540 nm. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menores al 5 y 10 %, respectivamente.

### **7.5.3 Determinación de ET-1 y CGRP**

Las cantidades de ET-1 y CGRP en suero se midieron utilizando estuches de radioinmunoensayo (RIA) específicos. La sensibilidad fue de 2.5 pg/ml y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menores al 5 y 10 %, respectivamente.

## **7.6. Estudios de expresión génica. Estudio del RNAm de ET-1, ET-1AR, ET-1BR, eNOS, iNOS, CGRP, CRLR, y RAMP1**

### **7.6.1 Preparación del DNAc por RT y amplificación por PCR**

Para la obtención del DNAc se utilizaron 3  $\mu\text{L}$  de RNA como templado, 1  $\mu\text{L}$  de oligo dT, 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs y 5  $\mu\text{L}$  de agua estéril. Se incubó en un



termociclador GeneAmp (Perkin Elmer, USA) durante 7 minutos a 65 °C. A la mezcla inicial se agregaron 2 µL de amortiguador PCR 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µL de DTT 0.1 M y 1 µL de RNAsa y se dejó incubar a 42 °C. Después de 5 minutos, se agregó 1 µL de la enzima SuperScript II®, continuando la incubación por 50 minutos a 42 °C, 15 a 70 °C y 25 a 37 °C. La sonda obtenida se amplificó utilizando 2 µL de DNAc, 2.5 U de Taq polimerasa y 1 µL de los iniciadores sentido y antisentido específicos en un volumen final de 25 mL. Los iniciadores utilizados se construyeron con base en estudios previamente publicados como se describe a continuación:

Producto	Sentido	Orientación	Tamaño (pb)
ET-1 <sup>51</sup>	5'TTC CGT ATG GAC TTG GAA GC3'	Sentido	587
	5'AAG CCA GTG AAG ATG GTT GG3'	Antisentido	
ET-1AR <sup>162</sup>	5'TGG CCT TTT GAT CAC AAT GAC TTT3'	Sentido	302
	5'TTT GAT GTG GCA TTG AGC ATA CAG GTT3'	Antisentido	
ET-1BR <sup>162</sup>	5'ACT GGC CAT TTG GAG CTG AGA TGT3'	Sentido	428
	5'CTG CAT GCC ACT TTT CTT TCT CAA3'	Antisentido	

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el siguiente protocolo:

Número de ciclos	Temperatura (C)	Tiempo (min./ciclo)
1	94	3
33	94	1
	T° de alineamiento	1
	72	1
1	72	5
	4	Sostenido

Temperaturas de alineamiento utilizadas: 60 °C para ET-1 y 61 °C para ET-1AR y ET-1BR.

Los productos de PCR y un marcador de tamaño en pares de bases se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Las bandas que correspondieron al tamaño del producto esperado se sometieron a electroelución y se recuperaron en amortiguador TE (10mM Tris HCl-1mM EDTA).

### **7.6.2. Northern blot**

El RNA total se obtuvo con la técnica de extracción por cloruro de cesio. El tejido se homogenizó en solución desnaturante (Tiocianato de guanidina 4M y citrato de sodio 0.75 M, pH 7.0) y después de centrifugar a 12,000 x g durante 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se colocó en tubos de polialómero cargados previamente con cloruro de cesio. Después de una centrifugación a 32,000 x g durante 18 horas a 18 °C, el sobrenadante se eliminó, mientras que el precipitado se recuperó en agua DEPC. Al RNA recuperado se le agregó acetato de sodio y etanol absoluto, se centrifugó a 14000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y el procedimiento anterior se repitió dos veces con etanol al 70%. El RNA precipitado se disolvió en formamida y se cuantificó por espectrofotometría de 260 a 280 nm. La concentración de las muestras se ajustó a 2.5 µg/µL. Las muestras de RNA (20 µg) se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y formaldehído al 15% a 90 V durante 150 minutos. Los RNAs se transfirieron por capilaridad a membranas de nylon cargadas positivamente con solución SSC 10X. Las membranas se lavaron en SSC 2X durante 5 minutos, se dejaron secar y se fijaron con UV. Posteriormente, se prehibridizaron a 65 °C con rotación constante por un tiempo mínimo de 30

minutos. Durante este tiempo se procedió al marcaje del DNAC utilizando citosina marcada con  $^{32}\text{P}$  (dCTP) y el estuche Rediprime<sup>®</sup> (DNA polimerasa I sin actividad de exonucleasa, dATP, dTTP y dGTP), incubando por una hora a 37 °C. Posteriormente, las membranas se hibridaron con el DNAC previamente marcado y desnaturalizado durante 2 horas 30 minutos a 65 °C. Al final de la hibridación, las membranas se lavaron con solución SSC 2X /SDS 0.1% por 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de 2 lavados de 15 minutos cada uno a 65 °C con solución SSC 0.01X /SDS 0.1%. Una vez terminados los lavados, las membranas se colocaron en placas de autoradiografía BioMax XAR (Kodak, E.U.) y se revelaron por rayos X después de una exposición a -70 °C de 20 horas para ET-1 y ET-1<sub>B</sub>R y 24 horas para ET-1<sub>A</sub>R. La expresión del RNAm se obtuvo por densitometría utilizando un analizador de imágenes EagleEye-system Stratagene, E.U.

### **7.6.3 PCR en tiempo real**

El RNA total se disolvió en agua desionizada, estéril y filtrada, y las muestras se ajustaron a 2.5 µg/µL. La integridad del RNA se confirmó por electroforesis y tinción con bromuro de etidio. El RT para la obtención de los DNAC de las muestras se llevó a cabo de la forma descrita en la sección anterior pero utilizando 1 µL (2.5 µg) de RNA como templado. Las sondas marcadas con FAM o VIC TaqMan<sup>®</sup> se obtuvieron de Applied Biosystems de México, las cuales son específicas para detectar y cuantificar secuencias de DNAC sin detectar DNA genómico. FAM (6-carboxifluoresceína) y VIC son utilizados 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 7000 Prism Applied Biosystems (Foster City, CA). Las sondas comerciales para el CGRP, eNOS e iNOS se obtuvieron de Applied Biosystems: Hs00266142\_m1 para CGRP; Hs00167166\_m1 para eNOS y Hs00167248\_m1 para iNOS. Las sondas para CRLR (CGRP-Z) y RAMP1 (RAMP1-X) fueron diseñadas por Applied Biosystems. Se realizaron curvas de amplificación para evaluar la funcionalidad de las sondas y 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  $\mu$ L, las reacciones de PCR contuvieron lo siguiente: 3  $\mu$ L de DNAC como templado, 7.5  $\mu$ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix, 3.9  $\mu$ L de agua grado biología molecular y 0.6  $\mu$ L de la sonda específica. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, seguido de 50 ciclos de 95 °C por 15 s, y 60 °C 1 min. Los resultados se registraron utilizando un software de ABI PRISM 7000 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 relación 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/18S RNA ribosomal (gen constitutivo).

### **7.7. Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar (SEM). Los resultados de las concentraciones en suero se evaluaron utilizando análisis de varianza y las diferencias significativas entre las etapas del tratamiento se determinaron con la prueba protegida de la diferencia de los cuadrados mínimos de Fisher. Cuando los datos no presentaron una distribución normal, se realizó una transformación logarítmica antes del análisis por ANOVA. Para el análisis de las asociaciones se utilizó correlación de rangos de Spearman. Los resultados de la expresión placentaria obtenidos por Northern blot se evaluaron con la prueba de "t" de Student para muestras independientes mientras que para los resultados obtenidos por PCR en tiempo real se utilizó ANOVA y la prueba protegida de la diferencia de los cuadrados mínimos de Fisher. El nivel de significancia se estableció con una  $P < 0.05$ .

## VIII. RESULTADOS

---

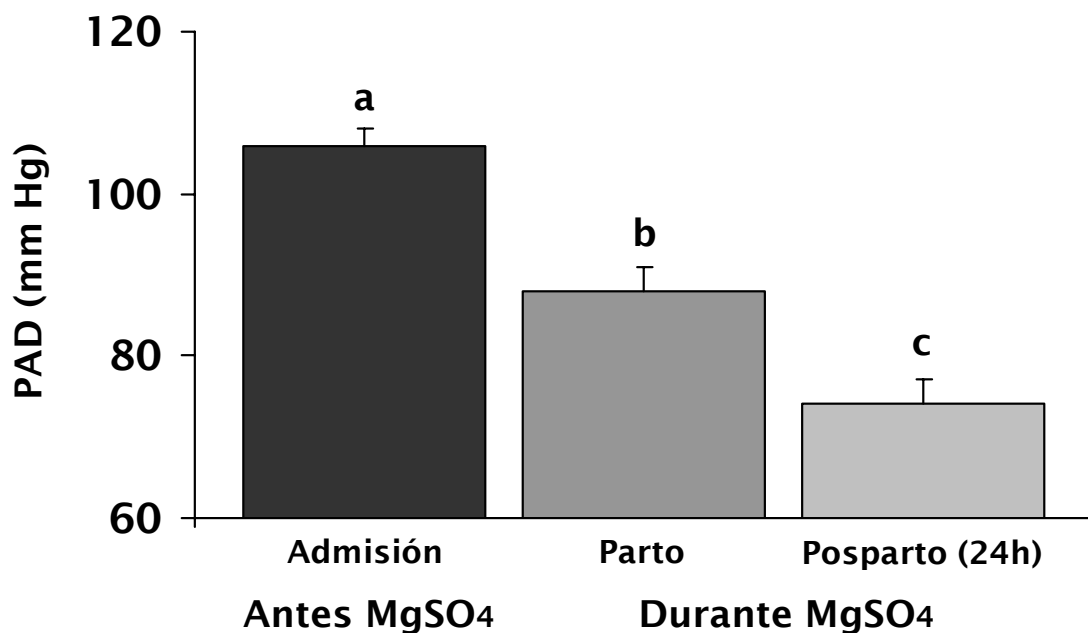
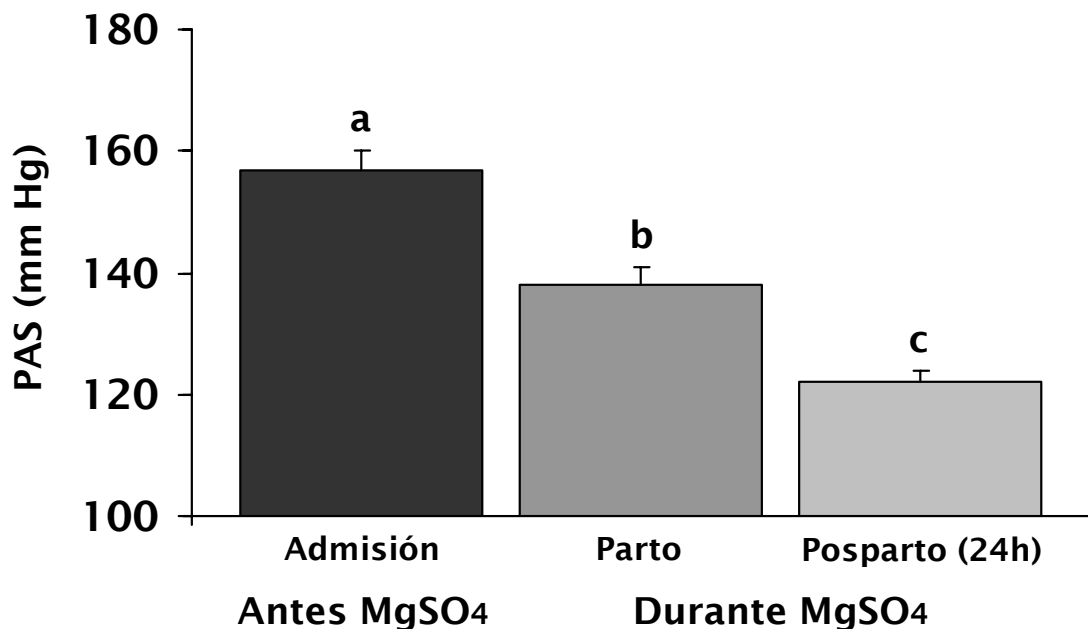
---

### 8.1. Características clínicas de la población

Con el propósito de evaluar los efectos del MgSO<sub>4</sub> sobre la presión arterial, la peroxidación de lípidos y las concentraciones en suero de factores vasoactivos, las variables se estudiaron antes y durante el tratamiento con PESF ó MgSO<sub>4</sub> (parto y 24 horas posparto). La edad biológica (PE = 23.8 ± 0.9 y NT = 23.2 ± 1.4 años) y la edad gestacional (PE = 38.5 ± 0.4 y NT = 38.7 ± 0.3 semanas) no presentaron diferencias significativas entre los grupos.

### 8.2. Efectos del MgSO<sub>4</sub> sobre la presión arterial

Los efectos del MgSO<sub>4</sub> sobre la presión arterial en las mujeres con PE se muestran en la Figura 5. La presión arterial sistólica fue de 157 ± 3 mm Hg antes del tratamiento (en la admisión) y disminuyó significativamente durante el tratamiento al momento del parto ( $P < 0.0001$ ) y una mayor reducción se observó a las 24 h posparto ( $P < 0.0001$ ). De manera similar, la presión arterial diastólica fue de 106 ± 2 mm Hg antes del tratamiento, y disminuyó significativamente al compararlo con la admisión tanto en el parto ( $P < 0.0001$ ) como a las 24 h posparto ( $P < 0.0001$ ).



**Figura 5.** Presión arterial sistólica (PAS, panel superior) y presión arterial diastólica (PAD, panel inferior) antes (admisión) y durante (parto y 24h posparto) el tratamiento con MgSO<sub>4</sub>, n = 16. Los datos están expresados como la media ± error estándar. Los valores en los grupos con diferentes caracteres son significativamente diferentes,  $P < 0.05$ .

### **8.3. Efectos del MgSO<sub>4</sub> sobre la peroxidación de lípidos en suero**

La Figura 6 muestra los efectos del MgSO<sub>4</sub> sobre la peroxidación de lípidos. En el grupo con PE, las concentraciones en suero de MDA antes del tratamiento fueron mayores con respecto al grupo NT ( $P < 0.0001$ ) y disminuyeron significativamente durante el tratamiento al momento del parto y 24 h posparto ( $P < 0.0001$ ) en comparación con los valores de la admisión. Además, los valores en suero de MDA fueron significativamente ( $P = 0.003$ ) menores a las 24 h posparto en comparación con aquellos observados al momento del parto.

### **8.4. Efectos del MgSO<sub>4</sub> sobre las concentraciones circulantes de los agentes vasoactivos**

Como se observa en la Figura 7, el grupo PE tuvo concentraciones en suero de ET-1 menores con respecto al grupo NT en la admisión ( $P = 0.001$ ). Las concentraciones en suero de ET-1 24 h posparto fueron significativamente mayores que los observados antes del tratamiento ( $P = 0.002$ ). Sin embargo, las concentraciones de ET-1 en la admisión no fueron diferentes de aquellos durante el tratamiento al momento del parto.

Los efectos del MgSO<sub>4</sub> sobre las concentraciones de los agentes vasodilatadores se muestran en las Figuras 8 y 9. Las concentraciones en suero de NO<sup>2</sup>/NO<sup>3</sup> (Figura 8) en el grupo PE antes del tratamiento fueron significativamente menores con respecto al grupo NT ( $P = 0.0003$ ). No se observaron cambios significativos durante el tratamiento al momento del parto



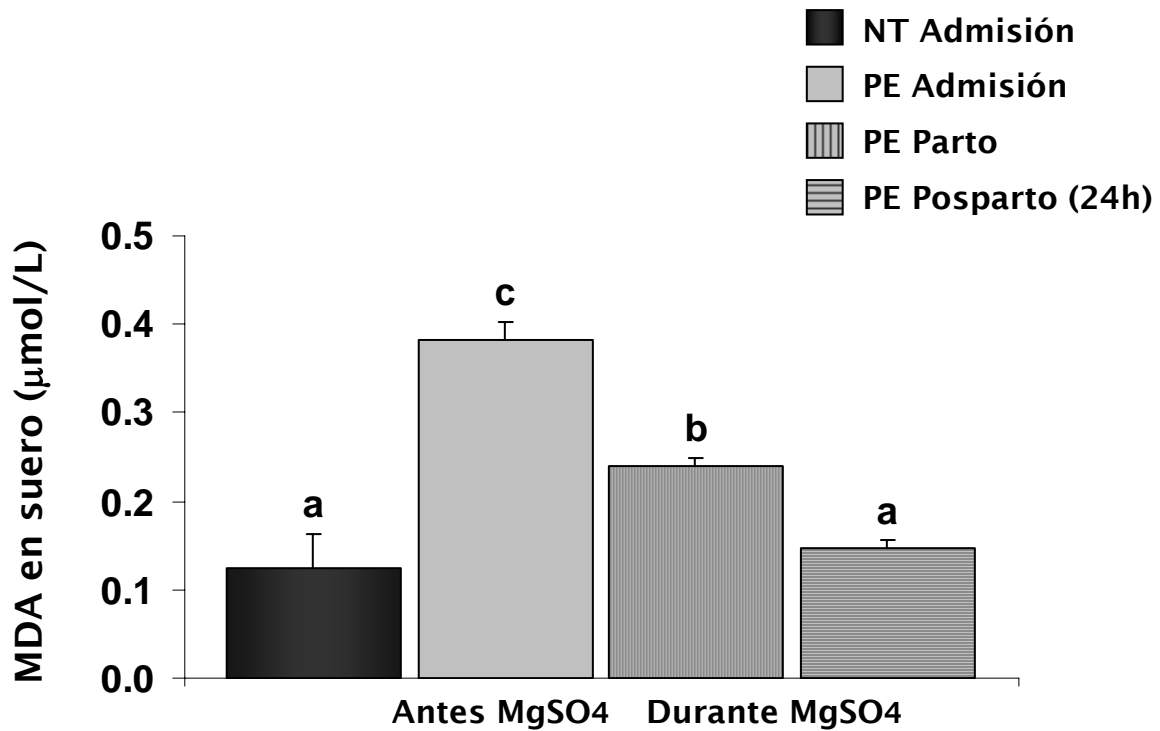
y 24 h posparto. De manera similar, las concentraciones en suero del CGRP (Figura 9) en el grupo PE fueron significativamente menores en comparación al grupo NT durante la admisión ( $P = 0.0001$ ). Además, las concentraciones en suero incrementaron significativamente durante el tratamiento al momento del parto ( $P < 0.01$ ) y 24 h posparto ( $P < 0.0001$ ). Las concentraciones en suero de CGRP después del tratamiento al momento del parto y 24 h posparto no fueron significativamente diferentes.

En comparación con el grupo NT, las mujeres preeclámpicas que fueron tratadas con solución fisiológicas (grupo PESF) tuvieron concentraciones basales de MDA en suero significativamente mayores ( $P < 0.0001$ ) y de ET-1, NO, y CGRP significativamente menores ( $P < 0.05$ ). Como se muestra en el cuadro 1, la administración de solución fisiológica no se asoció con cambios significativos en la concentración de las variables estudiadas con excepción de la disminución significativa ( $P < 0.01$ ) en la presión arterial.

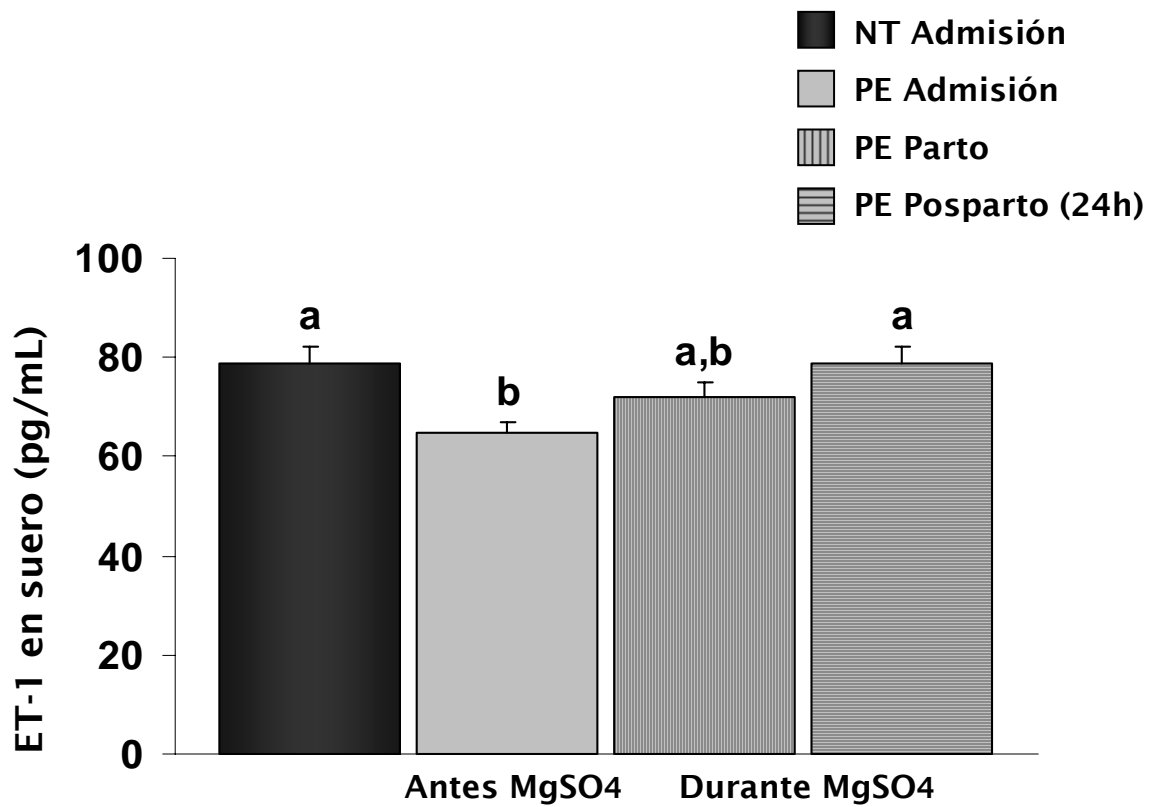
Cuadro 1. Presión arterial y factores vasoactivos en el grupo preeclámptico tratado con solución fisiológica (PESF)

<b>PESF (n = 15)</b>			
<b>Variable</b>	<b>Antes</b>	<b>Parto</b>	<b>Posparto</b>
<b>PAS</b>	139 ± 2 <sup>a</sup>	129 ± 1 <sup>b</sup>	118 ± 2 <sup>c</sup>
<b>PAD</b>	93 ± 1 <sup>a</sup>	86 ± 2 <sup>b</sup>	76 ± 1 <sup>c</sup>
<b>MDA</b>	0.221 ± 0.026	0.185 ± 0.013	0.195 ± 0.028
<b>ET-1</b>	61 ± 3	63 ± 2	63 ± 5
<b>NO</b>	29.4 ± 4.4	28.3 ± 3.1	25.3 ± 1.5
<b>CGRP</b>	41 ± 3	44 ± 2	44 ± 1

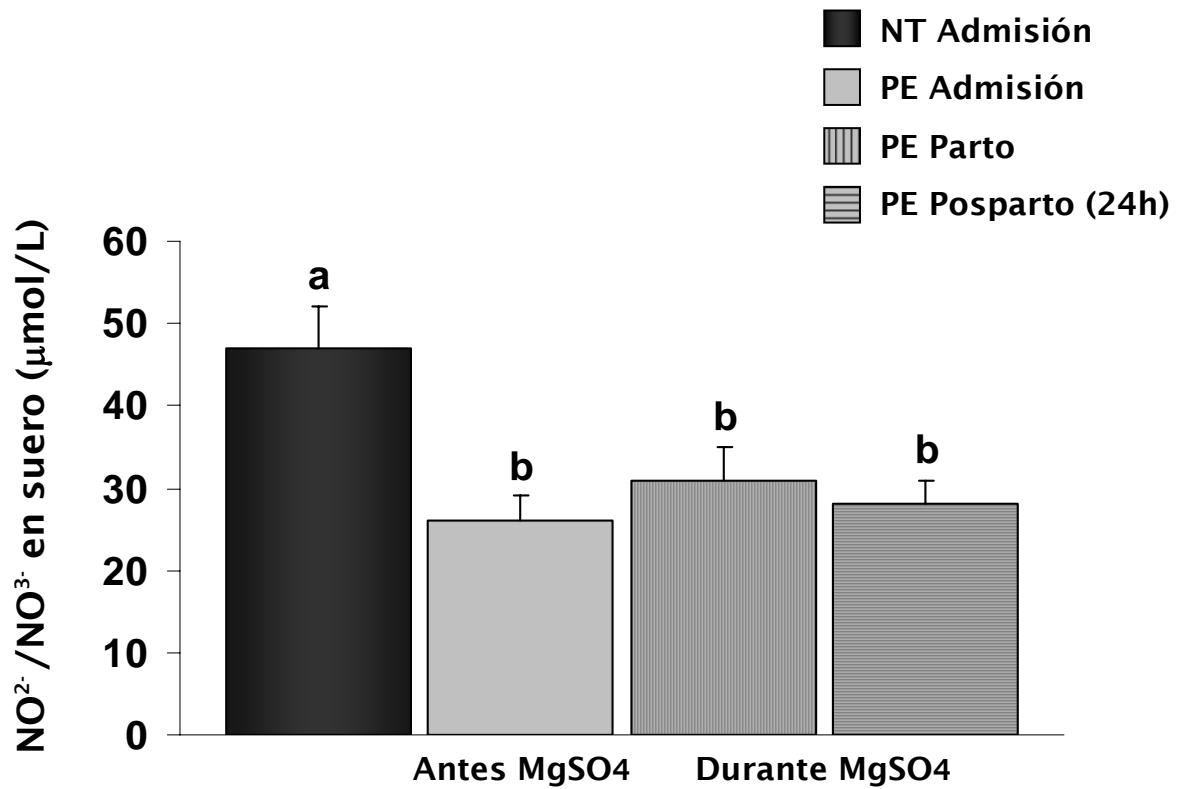
Los resultados están expresados como media ± error estándar. Caracteres diferentes muestran diferencia estadística,  $P < 0.01$ .



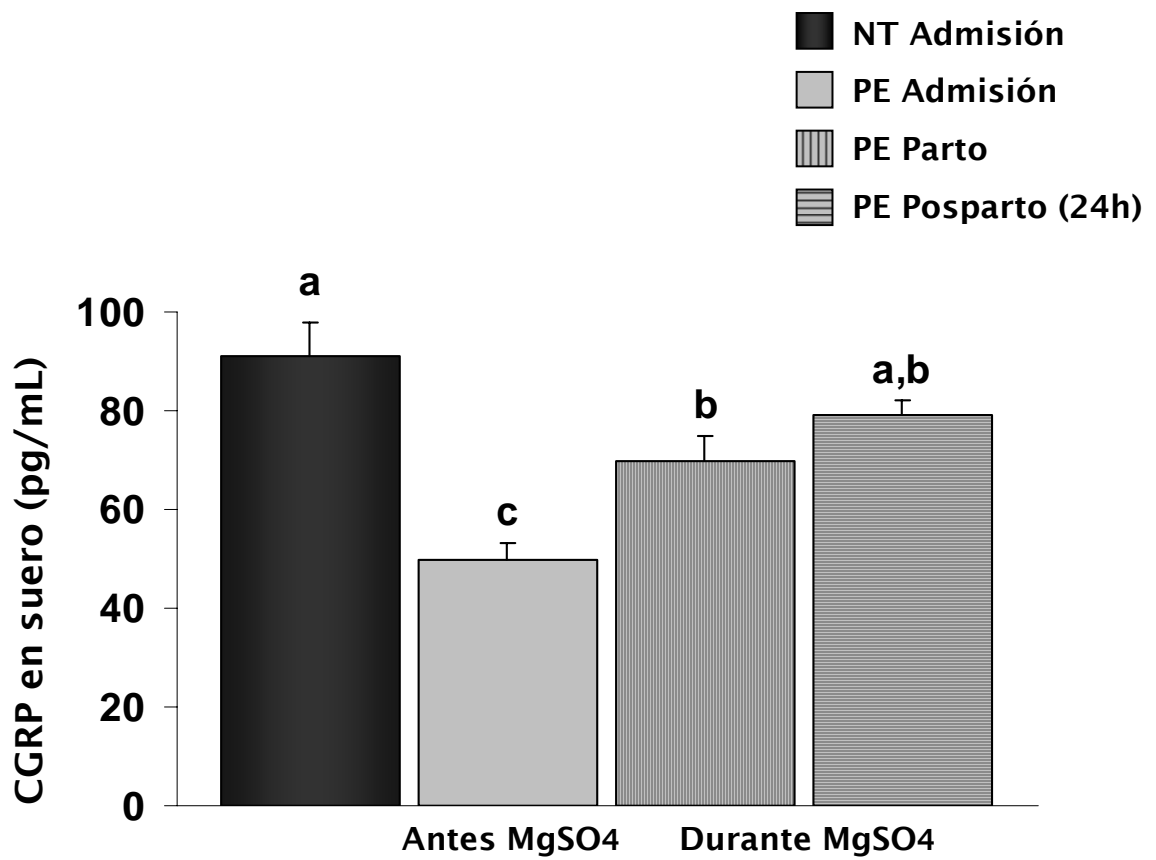
**Figura 6.** Concentraciones de MDA en suero de los grupos normotenso (NT; n=15) en condiciones basales y preecláptico (PE; n=16) antes (admisión) y durante (parto y 24 h posparto) el tratamiento con MgSO<sub>4</sub>. Los datos están expresados como la media ± error estándar. Los valores en los grupos con diferentes caracteres son significativamente diferentes,  $P < 0.05$ .



**Figura 7.** Concentraciones de la ET-1 en suero de los grupos normotenso (NT; n=15) en condiciones basales y preeclámptico (PE; n=16) antes (admisión) y durante (parto y 24 h posparto) el tratamiento con MgSO<sub>4</sub>. Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar. Los valores en los grupos que no comparten al menos un caracter son significativamente diferentes,  $P < 0.05$ .



**Figura 8.** Concentraciones de los metabolitos de NO en suero de los grupos normotenso (NT; n=15) en condiciones basales y preecláptico (PE; n=16) antes (admisión) y durante (parto y 24 h posparto) el tratamiento con MgSO<sub>4</sub>. Los datos están expresados como la media ± error estándar. Los valores en los grupos con diferentes caracteres son significativamente diferentes,  $P < 0.05$ .



**Figura 9.** Concentraciones del CGRP en suero de los grupos normotenso (NT; n=15) en condiciones basales y preeclámptico (PE; n=16) antes (admisión) y durante (parto y 24 h posparto) el tratamiento con MgSO<sub>4</sub>. Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar. Los valores en los grupos que no comparten al menos un caracter significativamente diferentes,  $P < 0.05$ .

Para las concentraciones circulantes de los agentes vasoactivos, se analizó el efecto del MgSO<sub>4</sub> en función de la severidad de la PE y no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas.

### 8.5. Estudios de correlación

Debido a que los agentes vasoactivos actúan en concierto para regular la presión arterial, se realizaron estudios de asociación utilizando la prueba de correlación de rangos de Spearman entre ET-1, metabolitos del NO y CGRP en el grupo PEMgSO<sub>4</sub>. Como se muestra en el cuadro 2, las concentraciones de ET-1 en suero presentaron una correlación inversa con los metabolitos del NO antes, pero no durante el tratamiento al momento del parto y 24 h posparto. En contraste, las concentraciones de ET-1 presentaron una correlación positiva con las concentraciones del CGRP durante el tratamiento (al momento del parto y 24 h posparto), pero no antes del tratamiento.

**Cuadro 2.** Estudios de correlación entre las concentraciones circulantes de ET-1, NO y CGRP

Etapa	ET-1 vs NO		ET-1 vs CGRP	
	R	P	R	P
Admisión	-0.69	0.002	-0.24	0.38
Parto	0.14	0.61	0.73	0.002
Posparto (24 h)	-0.24	0.37	0.71	0.002

## 8.6. Expresión placentaria de factores vasoactivos

En el cuadro 3 se muestran las características clínicas basales de las madres y los recién nacidos pertenecientes a los grupos normotenso (NT), PE tratado con solución fisiológica (PESF) y PE tratado con MgSO<sub>4</sub> (PEMgSO<sub>4</sub>) en los cuales se estudió la expresión placentaria de factores vasoactivos. 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 los grupos PESF y PEMgSO<sub>4</sub> en comparación con el grupo NT ( $P < 0.001$ ). El peso del recién nacido y de la placenta no presentó diferencias en ninguno de los grupos.

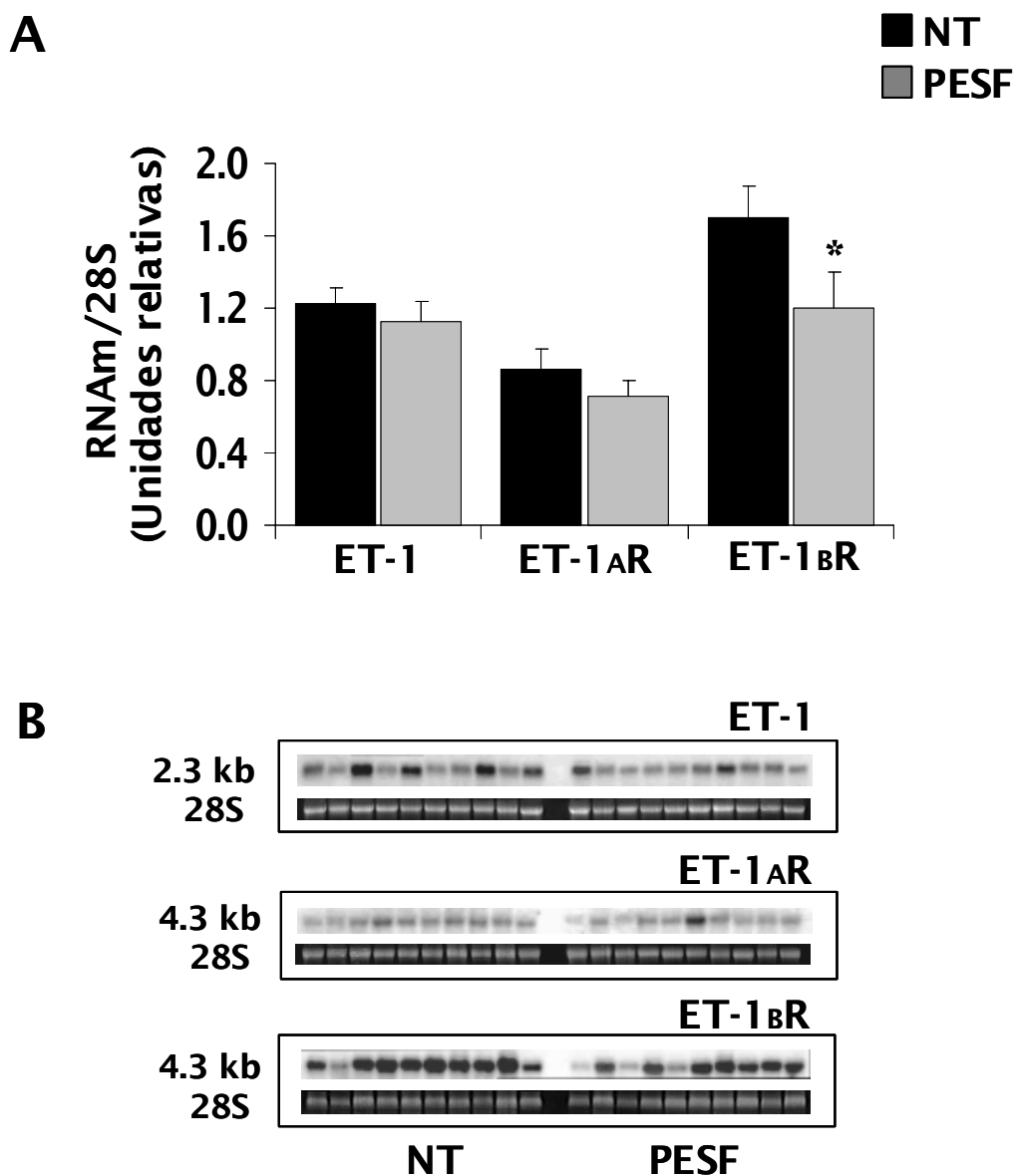
**Cuadro 3.** Características clínicas basales de los grupos normotenso (NT), PE tratado con solución fisiológica (PESF) y PE tratado con MgSO<sub>4</sub> (PEMgSO<sub>4</sub>).

	NT (n=10)	PESF (n =10)	PEMgSO <sub>4</sub> (n = 8)
Edad materna (años)	24.7 ± 1.8	25.3 ± 0.9	22.0 ± 1.6
Edad gestacional (semanas)	39.2 ± 0.2	39.1 ± 0.4	38.9 ± 0.4
PAS (mm Hg)	116 ± 1.6	140 ± 2.6 <sup>a</sup>	144 ± 1.8 <sup>a</sup>
PAD (mm Hg)	74 ± 1.6	93 ± 1.5 <sup>a</sup>	97.5 ± 1.6 <sup>a</sup>
Proteinuria (mg/dL)	Trazas	≥ 30	≥ 30
Peso del recién nacido (kg)	3.20 ± 0.1	3.31 ± 0.9	3.05 ± 0.2
Peso de la placenta (g)	595.9 ± 26.1	613 ± 26.0	551.6 ± 17.8

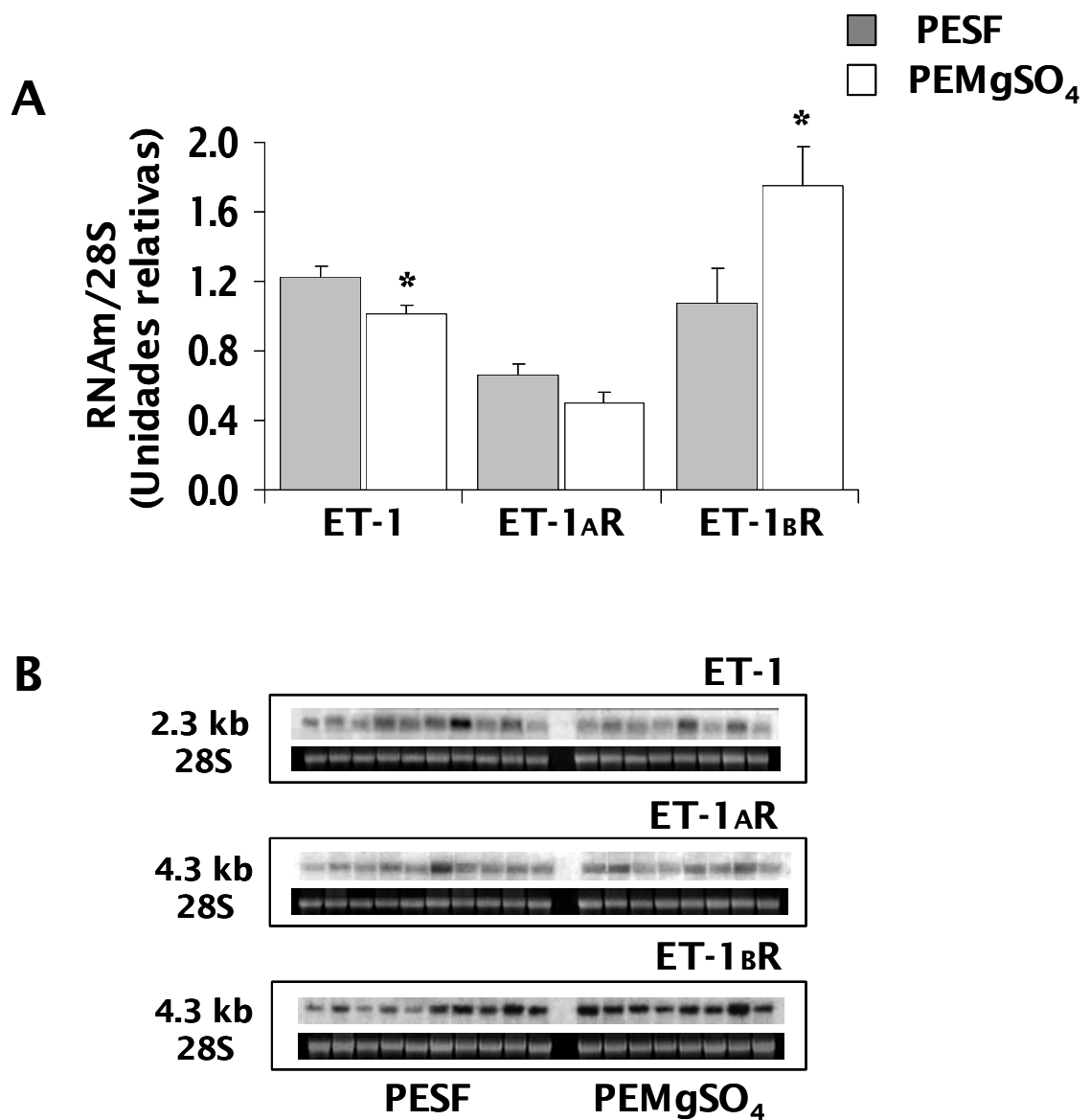
Los resultados están expresados como media ± error estándar. <sup>a</sup> =  $P < 0.001$ .



Con el fin de determinar si la expresión placentaria del sistema ET-1/receptores se encuentra modificada en la PE y en la PE tratada con MgSO<sub>4</sub>, se estudiaron los RNAm en placentas del grupo NT y los grupos PE (PESF y PEMgSO<sub>4</sub>) utilizando el método de Northern blot. La Figura 10 muestra que la expresión de ET-1 y ET-1<sub>A</sub>R fue similar en el grupo NT y PESF, mientras que la expresión de ET-1<sub>B</sub>R fue menor en el grupo PESF que en el grupo control ( $P < 0.05$ ). Como se muestra en la Figura 11, el grupo PE tratado con MgSO<sub>4</sub> (PEMgSO<sub>4</sub>) presentó menor expresión de ET-1 y mayor expresión de ET-1<sub>B</sub>R ( $P < 0.05$ ), mientras que la expresión de ET-1<sub>A</sub>R fue similar a la del grupo PE tratado con solución fisiológica (PESF).



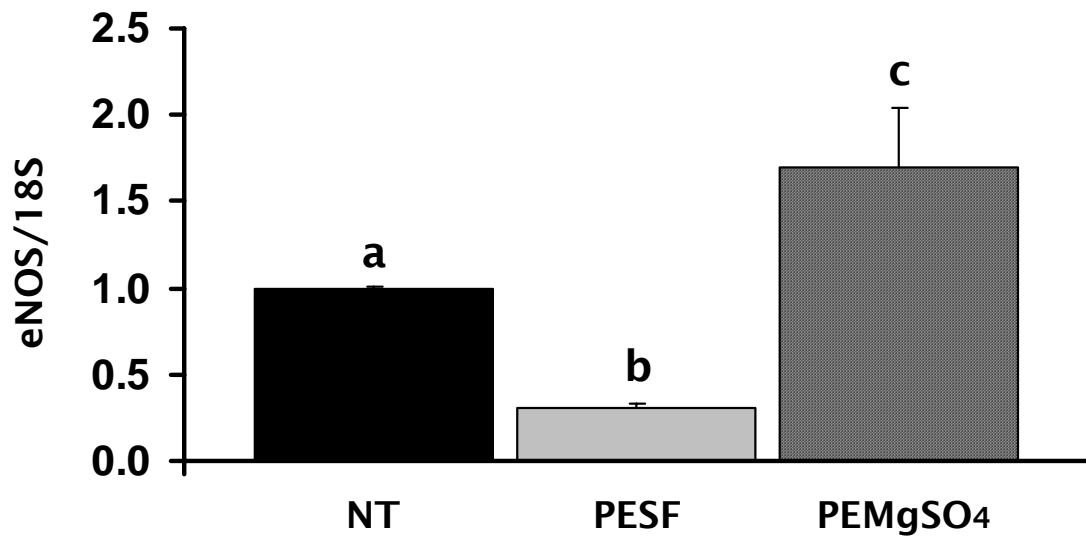
**Figura 10.** Hibridación por Northern blot de ET-1, ET-1AR y ET-1BR en los grupos normotenso (NT; n= 10) y preecláptico tratado con solución fisiológica (PESF; n=10). Las bandas se analizaron por densitometría (panel A). El 28S RNAr se utilizó como control para la normalización del cargado (panel B). Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar. \*  $P < 0.05$ .



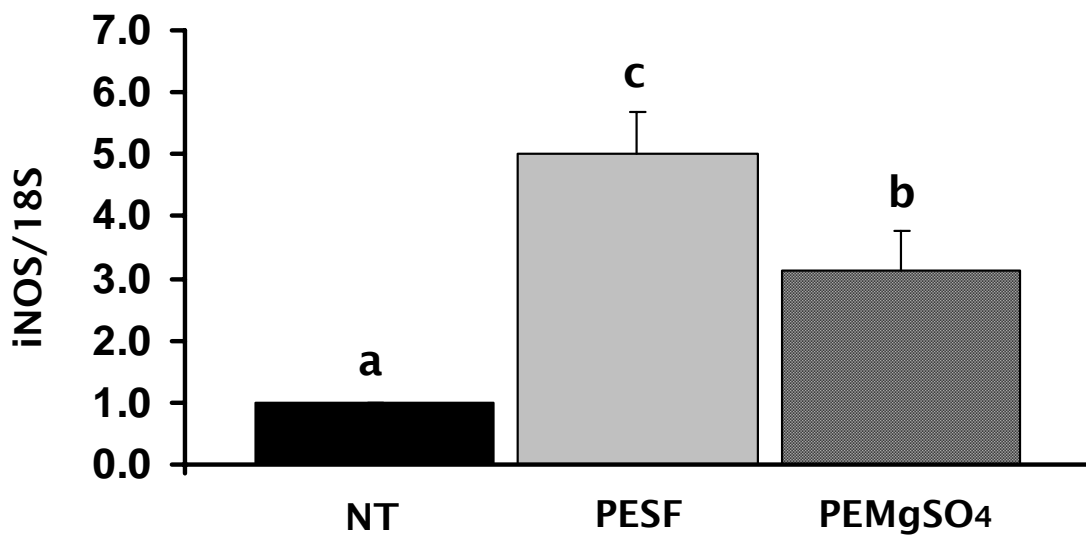
**Figura 11.** Hibridación por Northern blot de ET-1, ET-1AR y ET-1BR en los grupos preecláptico tratado con solución fisiológica (PESF; n=10) y preecláptico tratado con MgSO<sub>4</sub> (PEMgSO<sub>4</sub>; n=8). Las bandas se analizaron por densitometría (panel A). El 28S RNAr se utilizó como control para la normalización del cargado (panel B). Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar. \*  $P < 0.05$ .

Como se muestra en la Figura 12, la expresión de la eNOS en el grupo PESF fue significativamente menor que la del grupo NT. En cambio, la expresión en el grupo con PE moderada tratado con MgSO<sub>4</sub> fue mayor que la del grupo PESF ( $P = 0.0063$ ) y similar al grupo NT. La expresión de iNOS (Figura 13) fue mayor en los grupos PESF y PEMgSO<sub>4</sub> en comparación al grupo NT ( $P < 0.0001$ ). Sin embargo, la expresión de iNOS en el grupo PE moderado tratado con MgSO<sub>4</sub> fue menor en comparación al grupo PESF ( $P = 0.0119$ ).

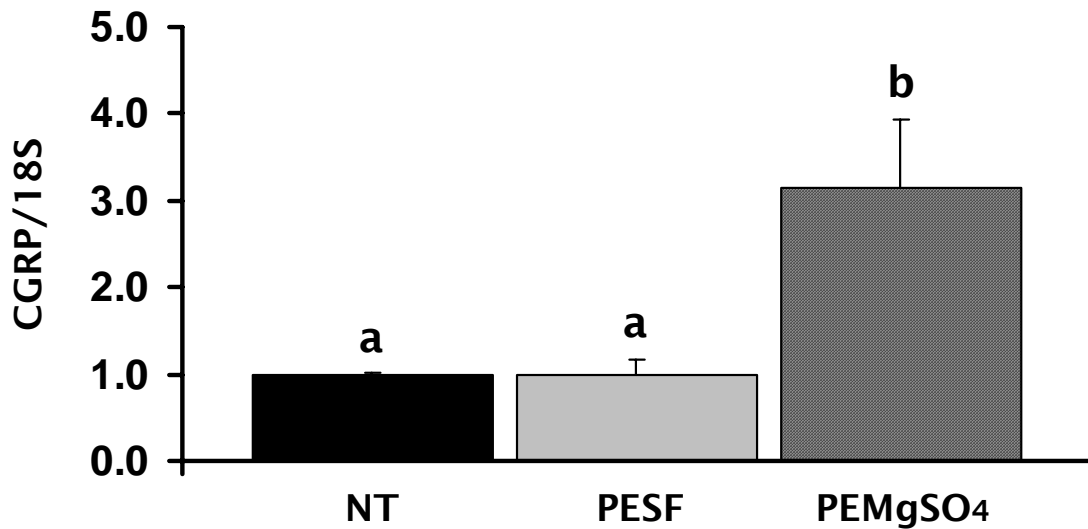
Como se muestra en la Figura 14, la expresión del CGRP en el grupo PE moderado tratado con solución fisiológica no mostró diferencias con respecto al grupo NT. Sin embargo, el grupo PEMgSO<sub>4</sub> presentó mayor expresión de este vasodilatador en comparación con los grupos NT ( $P = 0.0008$ ) y PE tratado con solución fisiológica ( $P = 0.0035$ ). En contraste al CGRP, su receptor CRLR (Figura 15) presentó mayor expresión en el grupo PE tratado con solución fisiológica en comparación al grupo NT ( $P = 0.01$ ). El tratamiento con MgSO<sub>4</sub> en el grupo PE moderado se asoció con mayor expresión de CRLR con respecto tanto al grupo NT ( $P < 0.0001$ ) como al PESF ( $P = 0.03$ ). De manera similar al CRLR, la expresión placentaria de la proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP1) fue mayor en el grupo PESF en comparación al grupo NT ( $P = 0.0015$ ). Además, el grupo con PE moderada tratado con MgSO<sub>4</sub> también presentó mayor expresión en comparación al grupo NT ( $P = 0.0011$ ), pero similar al grupo PESF (Figura 16).



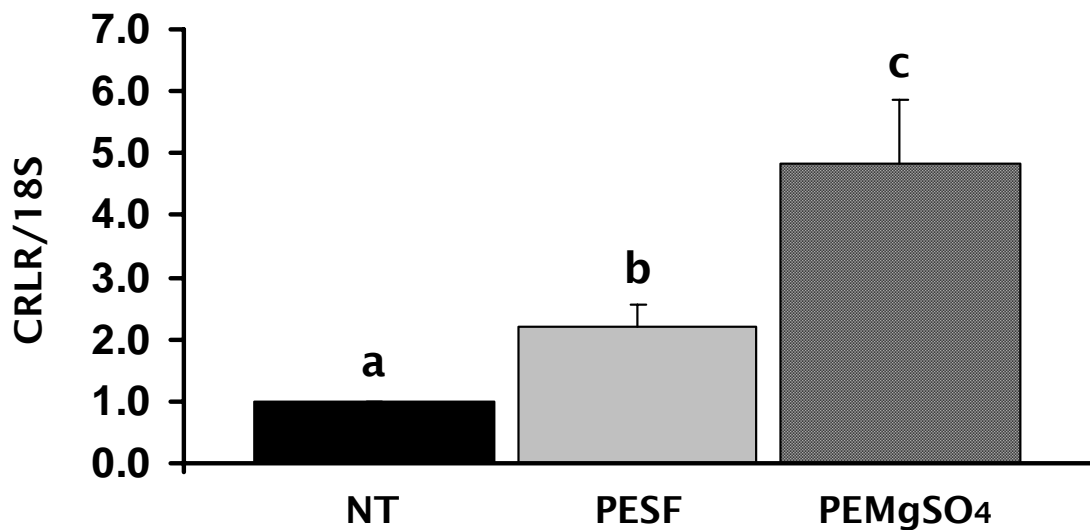
**Figura 12.** Expresión placentaria de la eNOS por PCR en tiempo real. Los resultados fueron normalizados con la expresión del RNA ribosomal 18S. Grupo normotenso (NT, n=10); Grupo PE tratado con solución fisiológica (PESF, n= 10); Grupo PE tratado con MgSO<sub>4</sub> (PEMgSO<sub>4</sub>, n=8). Los datos están expresados como la media ± error estándar. Caracteres diferentes muestran diferencia estadística,  $P < 0.05$ .



**Figura 13.** Expresión placentaria de la iNOS por PCR en tiempo real. Los resultados fueron normalizados con la expresión del RNA ribosomal 18S. Grupo normotenso (NT, n=10); Grupo PE tratado con solución fisiológica (PESF, n= 10); Grupo PE tratado con MgSO<sub>4</sub> (PEMgSO<sub>4</sub>, n=8). Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar. Caracteres diferentes muestran significancia estadística,  $P < 0.05$ .

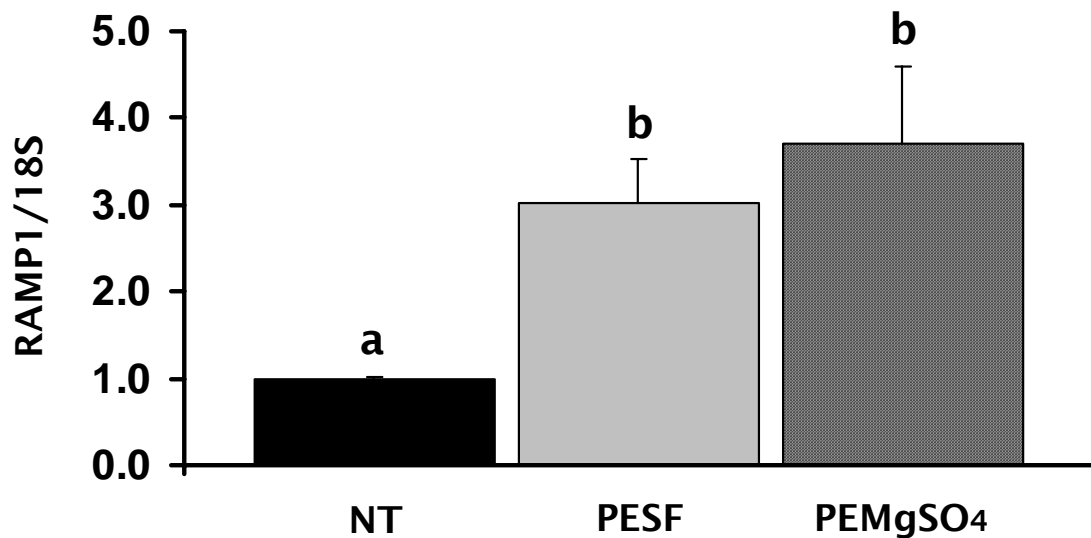


**Figura 14.** Expresión placentaria del CGRP por PCR en tiempo real. Los resultados fueron normalizados con la expresión del RNA ribosomal 18S. Grupo normotenso (NT, n=10); Grupo PE tratado con solución fisiológica (PESF, n= 10); Grupo PE tratado con MgSO<sub>4</sub> (PEMgSO<sub>4</sub>, n=8). Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar. Caracteres diferentes muestran significancia estadística,  $P < 0.05$ .



**Figura 15.** Expresión placentaria del CRLR por PCR en tiempo real. Los resultados fueron normalizados con la expresión del RNA ribosomal 18S. Grupo normotenso (NT, n=10); Grupo PE tratado con solución fisiológica (PESF, n= 10); Grupo PE tratado con MgSO<sub>4</sub> (PEMgSO<sub>4</sub>, n=8). Los datos están expresados como la media ± error estándar. Caracteres diferentes muestran significancia estadística,  $P < 0.05$ .





**Figura 16.** Expresión placentaria de la RAMP1 por PCR en tiempo real. Los resultados fueron normalizados con la expresión del RNA ribosomal 18S. Grupo normotenso (NT, n=10); Grupo PE tratado con solución fisiológica (PESF, n= 10); Grupo PE tratado con MgSO<sub>4</sub> (PEMgSO<sub>4</sub>, n=8). Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar. Caracteres diferentes muestran significancia estadística,  $P < 0.05$ .

## IX. DISCUSIÓN

---

---

La preeclampsia (PE) es una de las enfermedades hipertensivas inducidas por el embarazo y es considerada como un problema de salud pública<sup>6</sup>. El sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) es considerado como un tratamiento anticonvulsivo en la PE<sup>148</sup>. Además de sus efectos anticonvulsivos, el  $\text{MgSO}_4$  disminuye la presión arterial<sup>154,155</sup> a través de mecanismos todavía no claramente establecidos. También, el  $\text{Mg}^{2+}$  puede participar en la regulación de la peroxidación de lípidos ya que está involucrado en la biodisponibilidad de radicales libres<sup>142</sup>. Por lo anterior uno de nuestros objetivos fue estudiar el efecto del  $\text{MgSO}_4$  sobre la peroxidación de lípidos y las concentraciones circulantes de agentes vasoactivos. En este estudio las concentraciones en suero del malondialdehído (MDA), marcador de la peroxidación de lípidos, fueron significativamente mayores en el grupo con embarazo complicado con preeclampsia con respecto al grupo NT, lo que concuerda con resultados previamente publicados<sup>47,163</sup>. Además, se demostró por primera vez que el tratamiento con  $\text{MgSO}_4$  a mujeres PE disminuye las concentraciones de MDA en suero. Los mecanismos involucrados en la disminución de las concentraciones de MDA por el  $\text{MgSO}_4$  no se han descrito en la PE. Sin embargo, se ha observado que la deficiencia de  $\text{Mg}^{2+}$  en ratas con hipertensión espontánea está asociada con incremento en las concentraciones de MDA, lo que conlleva al desarrollo de hipertensión severa y disfunción endotelial<sup>145</sup>. Mak y cols.<sup>143</sup> han mostrado que el gluconato de magnesio secuestra los radicales libres, presenta efectos citoprotectores e inhibe la peroxidación de lípidos en membranas

microsomales obtenidas de cultivo de células endoteliales aórticas de bovino. Además, se ha observado que la deficiencia de  $Mg^{2+}$  se asocia con mayor cantidad de radicales libres y MDA, mientras que la suplementación revierte estas alteraciones<sup>145,146</sup>. De manera interesante, en un estudio publicado posterior a nuestros hallazgos se observó que la administración de  $MgSO_4$  a mujeres PE resulta en la disminución de la peroxidación de lípidos en membranas de eritrocitos<sup>164</sup>, lo que confirma nuestros resultados e indica que el  $Mg^{2+}$  juega un papel antioxidante. Los efectos del  $MgSO_4$  en la disminución de la concentración de MDA podrían estar asociados con menor cantidad de radicales libres en la PE. Esta hipótesis es factible debido a que 1) las mujeres preeclámpticas tienen menor actividad antioxidante en comparación con embarazos normotensos<sup>11</sup> y que el  $Mg^{2+}$  es indispensable para diversas reacciones que involucran enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, enzimas cuya actividad es  $Mg^{2+}$ -dependiente<sup>165</sup> y 2) se ha demostrado que el  $Mg^{2+}$  disminuye la biodisponibilidad de radicales libres ya que forma complejos con los radicales hidroxilo y peróxidos a nivel de las membranas<sup>164,166</sup>. En resumen, la disminución de la peroxidación de lípidos inducida por el  $MgSO_4$  a nivel sistémico, tal como se observó en este estudio, y particularmente a nivel de membranas (Abad y cols.<sup>164</sup>) puede ser considerada como medida protectora del daño endotelial.

Como se mencionó, estudiamos también el efecto del tratamiento con  $MgSO_4$  sobre algunos reguladores de la presión arterial. Dentro de los agentes vasoactivos, el NO, el CGRP y la ET-1 son considerados mediadores importantes

de la regulación de la presión arterial durante el embarazo normal y complicado con PE. Los resultados de las concentraciones de NO en suero de mujeres PE generan controversia, ya que se han encontrado aumentadas, disminuidas o sin cambios. En nuestro estudio, las concentraciones de NO fueron significativamente menores en la PE en comparación al grupo normotenso, lo que coincide con la mayoría de los estudios previos<sup>47,48,109</sup>. El tratamiento con MgSO<sub>4</sub> no modificó significativamente las concentraciones de NO en la PE. Debido a que el NO es considerado como especie reactiva de oxígeno, la ausencia de cambio en su concentración puede deberse a que el Mg<sup>2+</sup> lo reconozca como radical libre y de esta forma lo secuestre evitando su transformación en nitratos y nitritos, metabolitos estables a través de los cuales se determinó la concentración de NO. Esta posibilidad no se descarta ya que las concentraciones de NO y de CGRP presentaron una asociación positiva y significativa antes del tratamiento con MgSO<sub>4</sub>, asociación que se pierde por la falta de aumento en el NO durante el tratamiento. Con respecto al CGRP, nuestros resultados mostraron que las mujeres PE presentan bajas concentraciones de este potente vasodilatador en comparación a las mujeres normotensas y que el tratamiento con MgSO<sub>4</sub> aumentó significativamente sus concentraciones en suero, confirmando resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio<sup>8</sup>. Esta observación sugiere al CGRP como factor mediador del efecto antihipertensivo del MgSO<sub>4</sub>. Además, este efecto puede estar en parte regulado por el NO, ya que se ha observado que la administración de CGRP a ratas con PE experimental inhibe los efectos hipertensivos del L-NAME, inhibidor de las

NOS<sup>167</sup>. En relación con la ET-1, los datos muestran que las concentraciones de este agente vasoactivo fueron significativamente menores en el grupo PE y que el tratamiento con MgSO<sub>4</sub> resultó en el reestablecimiento de las concentraciones de ET-1 a valores similares a los obtenidos en el grupo de mujeres normotensas. Nuestras observaciones difieren de otros estudios, ya que las concentraciones de ET-1 están aumentadas en la PE y el tratamiento con MgSO<sub>4</sub> en las mujeres con PE disminuye las concentraciones de ET-1<sup>159,168</sup>. A pesar de que es difícil conciliar el aumento de ET-1 con el efecto antihipertensivo del MgSO<sub>4</sub>, este hallazgo puede deberse a que los agentes vasoactivos actúan en concierto en la regulación del sistema hemodinámico<sup>169</sup>, por lo que las asociaciones entre la ET-1, el NO y el CGRP se evaluaron en este estudio. La observación de que la ET-1 se correlacionó positivamente con CGRP, por el efecto hipotensor del MgSO<sub>4</sub>, nos hace pensar que el incremento en las concentraciones de ET-1 pueden representar un mecanismo compensatorio del efecto vasodilatador inducido por el aumento en el CGRP. Como apoyo a esta hipótesis, se han descrito asociaciones positivas entre ET-1 y CGRP en condiciones normales y patológicas<sup>170,171</sup>. En este contexto, Wang y cols.<sup>169</sup> mostraron recientemente que la administración de ET-1 a ratas aumenta la liberación de CGRP, el cual juega un papel compensatorio al prevenir el aumento de la presión arterial inducido por ET-1, a través de la activación del receptor ET-1AR, receptor mediador de la vasoconstricción. Debido a que estos autores encontraron una respuesta del CGRP a la ET-1, la posibilidad de una respuesta de la ET-1 al CGRP como mecanismo compensatorio no se debe

descartar y merece ser evaluada en estudios posteriores. Otro punto interesante es que los autores del trabajo mencionado<sup>169</sup> observaron que la infusión de ET-1 genera 2-3 veces de aumento en las concentraciones de ET-1 sin modificar la presión arterial, la cual aumenta únicamente al administrar un antagonista del ET<sub>1</sub>B<sub>R</sub>, receptor mediador de la vasodilatación. Por lo anterior se propone que la regulación de la presión arterial mediada por ET-1 es el resultado de un equilibrio entre la vasoconstricción mediada por ET-1A<sub>R</sub>, la vasodilatación mediada por ET-1B<sub>R</sub> y el CGRP. En resumen, los datos obtenidos en el presente estudio muestran que en la preeclampsia las concentraciones de NO y CGRP están bajas lo que contribuye al estado hipertensivo. Además, debido a los cambios inducidos por el MgSO<sub>4</sub> sobre las concentraciones del CGRP proponemos a este potente vasodilatador no solamente como mediador del efecto hipotensivo del MgSO<sub>4</sub> sino también como modulador de la concentración, acción o ambas de NO y de ET-1.

A diferencia del embarazo normal, la PE se asocia con una reducción del flujo uteroplacentario<sup>172</sup>, por lo que la segunda parte de nuestro estudio consistió en evaluar la expresión placentaria de agentes vasoactivos, los cuales están involucrados en la regulación de la presión de perfusión placentaria. En este trabajo se encontró que el RNAm de ET-1 no mostró cambios en la PE al compararlo con embarazos normotensos, lo que concuerda con resultados previamente publicados<sup>52</sup>. Es bien conocido que la ET-1 es una potente sustancia vasoactiva con efectos duales, ya que al actuar con el receptor ET-1A<sub>R</sub>, la ET-1

promueve vasoconstricción. En cambio, su unión al receptor ET-1<sub>B</sub>R contribuye a la depuración de ET-1 y a la vasodilatación por medio de la liberación de NO<sup>26</sup>. Durante el embarazo normal, se presenta una mayor proporción ET-1<sub>B</sub>R/ET-1<sub>A</sub>R en la placenta, lo que contribuye a la perfusión uteroplacentaria y vasodilatación<sup>38</sup>. En nuestro estudio la PE no se asoció con cambios en la expresión placentaria del ET-1<sub>A</sub>R. Sin embargo, la expresión del mediador de la vasodilatación ET-1<sub>B</sub>R fue significativamente menor en el grupo PE. Los resultados de un estudio previo realizado en mujeres con PE<sup>52</sup> mostraron una disminución en la expresión placentaria de ET-1<sub>A</sub>R sin cambios en la expresión de ET-1<sub>B</sub>R en comparación a embarazos normotensos. Esta discrepancia puede explicarse por la diferencia de las técnicas utilizadas para evaluar la expresión ya que Faxén y cols.<sup>52</sup> usaron RT-PCR semicuantitativo, mientras que nosotros utilizamos Northern blot. Además, en el estudio de Faxén y cols., el grupo PE presentaba menor edad gestacional que el grupo de mujeres normotensas, lo que dificulta la interpretación en las diferencias observadas. No obstante esta discrepancia, es importante resaltar que en nuestro estudio la única alteración del sistema ET-1 que conlleva a la vasoconstricción en la PE recae en la menor expresión del receptor ET-1<sub>B</sub>R. Esta observación es fundamentada por estudios *in vitro* e *in vivo* en los cuales se demostró que la utilización de antagonistas del ET-1<sub>B</sub>R fomenta la hipertensión en modelos animales<sup>44,45,173</sup>.

En este estudio determinamos la expresión placentaria de las dos enzimas, eNOS e iNOS, involucradas en la síntesis del NO. Así, la expresión de eNOS fue significativamente menor en el grupo PE, lo que confirma los

resultados obtenidos por otros autores<sup>174,175</sup> pero difiere con los estudios de Orange y cols.<sup>113</sup> y Karteris y cols.<sup>115</sup>, en los cuales no se observaron diferencias significativas entre embarazo normal y PE. La disminución en la expresión placentaria de eNOS es muy factible y puede deberse al estado de hipoxia y a las altas concentraciones de  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$  que se presentan en la PE, condiciones que regulan a la baja el RNAm de eNOS al disminuir su vida media<sup>95,176</sup>. En estudios previos, la expresión de iNOS se ha encontrado sin cambios o aumentada en la placenta PE en comparación a mujeres normotensas. En el presente trabajo, el RNAm de iNOS fue 5 veces mayor en la PE en comparación al grupo normotenso. De forma opuesta a lo que ocurre con la regulación de la expresión de eNOS, la de iNOS es regulada a la alta por la hipoxia y las citocinas<sup>99,102</sup>, lo que explicaría el aumento en la expresión placentaria de esta enzima. Además, las bajas concentraciones de NO observadas en otros<sup>47,48</sup> y el presente estudio pueden también contribuir en el aumento de la expresión de iNOS ya que la producción deficiente de NO se acompaña por el aumento de 1.5 a 2 veces en la expresión del gen de iNOS y de su proteína en un modelo de inflamación crónica del hígado<sup>177</sup>, mientras que la presencia de donadores de NO en cultivo de hepatocitos aislados de rata macho resulta en la supresión de la expresión de iNOS<sup>104</sup>. Lo anterior nos lleva a sugerir que el gen de iNOS se induce en la PE como posible mecanismo de compensación por la falta de vasodilatación. En resumen, el estado de hipoxia, las bajas concentraciones de NO y el incremento en las concentraciones de citocinas que se observan en la PE



pueden explicar tanto la disminución en la expresión placentaria de eNOS como el aumento en la expresión de iNOS.

El CGRP es un potente vasodilatador y sus efectos biológicos se presentan siempre y cuando su receptor (CRLR) forme un heterodímero con la proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP1), proteína que confiere especificidad del CRLR al CGRP<sup>60</sup>. En este estudio se observó que la expresión placentaria de CGRP fue similar entre mujeres PE y NT. Esta observación coincide con lo reportado con Knerr y cols.<sup>79</sup> quienes no encontraron cambios en la expresión de CGRP en las vellosidades de la placenta de mujeres PE. Además, hemos observado que la PE se asoció con mayor expresión placentaria de CRLR y RAMP1, lo que puede considerarse como mecanismo compensatorio. Los resultados obtenidos en el presente estudio difieren de los encontrados por Dong y cols.<sup>80</sup> donde observaron menor expresión de CRLR y RAMP1 en las venas de la unidad fetoplacentaria de mujeres PE que en las de mujeres normotensas. No tenemos elementos suficientes para explicar esta discrepancia ya que en el reporte de Dong y cols. no se diferencian las mujeres con PE severa y moderada, ni se especifica si las pacientes estaban bajo tratamiento. Sin embargo, el incremento observado en la expresión de CRLR y RAMP1 en nuestro estudio puede deberse a la instauración de un mecanismo de compensación por la disminución del flujo uteroplacentario. Lo anterior se apoya en los recientes hallazgos que mostraron que la hipoxia crónica regula a la alta la expresión del CRLR y de RAMP1 en células del músculo liso vascular humano<sup>72</sup>. En células endoteliales vasculares, se demostró que el gen de CRLR presenta un elemento

de respuesta a hipoxia, sin embargo se desconoce si la RAMP1 también lo presenta<sup>71</sup>, lo que refuerza la relación entre el estado de hipoxia y la mayor expresión placentaria del CRLR observada en este trabajo. Además, en cardiomiocitos de ratas tratadas con L-NAME, se incrementa la expresión del RNAm de CRLR y RAMP1<sup>178</sup>, lo que es interpretado como indicativo de que el NO es un factor regulador de la expresión de estos efectores. Es posible que en la PE el bajo flujo uteroplacentario active mecanismos de compensación como la sobreexpresión de CRLR y RAMP1, independientemente de no observarse cambios en el ligando, ya que en diferentes tejidos de rata, los RNAm de CRLR y RAMP1 se correlacionan positivamente con la unión y respuesta a CGRP<sup>179</sup> y la sobreexpresión de RAMP1 aumenta la respuesta al CGRP<sup>180</sup>.

En resumen, los resultados obtenidos muestran una asociación de la PE con menor expresión de ET-1<sub>BR</sub> y de eNOS, lo que puede contribuir en parte al estado de vasoconstricción. Sin embargo, el incremento en la expresión de iNOS, CRLR y RAMP1 puede reflejar un mecanismo compensatorio por la falta de vasodilatación en la placenta.

En el presente estudio, el tratamiento de mujeres PE con MgSO<sub>4</sub> resultó en cambios en la expresión placentaria de los agentes vasoactivos arriba mencionados, observaciones que no han sido documentadas en estudios previos. De manera interesante, el MgSO<sub>4</sub> disminuyó significativamente la expresión placentaria de ET-1 y revirtió la baja expresión placentaria de ET-1<sub>BR</sub>. Estos cambios pueden explicar en parte la vasodilatación inducida por el MgSO<sub>4</sub>,

ya que la perfusión de esta sal revierte la vasoconstricción inducida por ET-1 en la vasculatura fetoplacentaria<sup>157</sup>.

Con respecto a las sintasas de NO, el tratamiento con MgSO<sub>4</sub> se asoció con aumento significativo en el RNAm de eNOS alcanzando valores similares a los observados en el grupo normotenso. En cambio, el MgSO<sub>4</sub> disminuyó significativamente el RNAm de iNOS los cuales sin embargo se mantuvieron por arriba de los valores normales. Esta disminución de la expresión de iNOS puede indicar que el mecanismo compensatorio instaurado en la PE inicia su desactivación de manera paralela al incremento en la expresión de eNOS. Es posible que estos cambios inducidos por el MgSO<sub>4</sub> sean explicados por modificaciones en el estado de hipoxia y en las concentraciones de citocinas, ya que estas condiciones regulan de manera opuesta la expresión de estas enzimas.

Con relación a la expresión del CGRP, el tratamiento con MgSO<sub>4</sub> se asoció con mayor expresión placentaria de este vasodilatador. El incremento en las concentraciones circulantes del CGRP inducida por el MgSO<sub>4</sub> se traduce teóricamente por el aumento en las concentraciones de AMPc y por ende favorecería la transcripción del gen codificador de éste péptido ya que el promotor del CGRP presenta un elemento de respuesta al AMPc (CRE)<sup>69</sup>. Esta hipótesis se ve apoyada por la observación de que el Mg<sup>2+</sup> favorece la unión del factor de transcripción CREB a su CRE<sup>140</sup>. Además, el MgSO<sub>4</sub> fomentó también el aumento en la expresión del CRLR sin cambios significativos en la RAMP1. El aumento en la expresión del CRLR puede deberse al incremento paralelo en la

expresión de su ligando, hipótesis que se apoya por la observación de la correlación significativa y positiva entre la unión del CGRP y los niveles de expresión del RNAm del CRLR en diferentes tejidos de rata<sup>179</sup>.

En resumen, los resultados obtenidos muestran por primera vez que el tratamiento con MgSO<sub>4</sub> de mujeres con PE disminuye la expresión placentaria de ET-1 e iNOS y aumenta la expresión de ET-1<sub>BR</sub>, eNOS, CGRP y CRLR lo que puede contribuir de manera significativa a la vasodilatación en la unidad placentaria. Cabe mencionar que falta por demostrar los mecanismos por los cuales el MgSO<sub>4</sub> modifica las concentraciones circulantes y la expresión placentaria de los agentes vasoactivos estudiados, lo que abre oportunidades futuras de investigación.

## X. CONCLUSIONES

---

1. El tratamiento con MgSO<sub>4</sub> disminuye la presión arterial en mujeres con PE.
2. En comparación con embarazos normales, las concentraciones en suero de MDA son mayores, mientras que el NO, CGRP y ET-1 son menores en mujeres con preeclampsia. De forma general, esto podría conducir a mayor vasoconstricción.
3. El MgSO<sub>4</sub> se asoció con menor concentración de MDA y mayor concentración de CGRP y ET-1, sin cambios significativos en la de NO.

En resumen, estos resultados indican que las concentraciones de los factores vasoactivos fomentan la vasoconstricción en la PE, mientras que el MgSO<sub>4</sub> revierte este estado, principalmente por la disminución de la peroxidación de lípidos (MDA) y el aumento del CGRP, potente vasodilatador.

Con respecto a la expresión placentaria de agentes vasoactivos los resultados nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. En comparación con placentas de mujeres normotensas, las placentas de mujeres PE presentan disminución en el receptor ET-1<sub>B</sub>R, sugiriendo menor vasodilatación en este tejido. El MgSO<sub>4</sub> se asoció con menor expresión de ET-1 y mayor expresión de ET-1<sub>B</sub>R.

2. La expresión placentaria de eNOS fue menor en la PE, lo que nos lleva a sugerir que se presenta menor vasodilatación en este tejido. El MgSO<sub>4</sub> aumentó la expresión de eNOS.
3. La sobreexpresión de iNOS en la PE puede deberse a un mecanismo de compensación. El MgSO<sub>4</sub> disminuyó la expresión de iNOS aunque se mantuvo por arriba de los valores normales.
4. La sobreexpresión de CRLR y RAMP1 en la PE puede representar un mecanismo de compensación que contrarresta la disminución en el flujo uteroplacentario. El MgSO<sub>4</sub> aumentó la expresión de CGRP y mantuvo la sobreexpresión del CRLR y RAMP1.

En resumen, estos resultados nos hacen pensar que en la placenta PE existe un desequilibrio en la expresión de factores vasoactivos, a pesar de la instauración de mecanismos de compensación para contrarrestar la disminución del flujo uteroplacentario. El MgSO<sub>4</sub> modifica la expresión de factores vasoactivos favoreciendo la vasodilatación en este tejido.

## **XI. PERSPECTIVAS**

---

---

Para entender mejor el efecto del MgSO<sub>4</sub> sobre los factores vasoactivos en la preeclampsia, se estudiará si los cambios en la expresión placentaria de los factores vasoactivos después del tratamiento con MgSO<sub>4</sub> se asocian con cambios paralelos en la concentración de sus respectivas proteínas.

Para estudiar los mecanismos moleculares del MgSO<sub>4</sub> sobre los factores vasoactivos se utilizarán cultivos celulares de placenta, modelo ampliamente utilizado en nuestro laboratorio. En este sentido se puede realizar estudios de dosis-respuesta del efecto del MgSO<sub>4</sub>, su poder secuestrador de radicales libres, su efecto sobre la síntesis de la nitrotirosina, indicador de peroxinitrito, producto de la reacción de NO con el anión superóxido. Así mismo, el cultivo celular permitirá investigar el efecto de la hipoxia sobre la expresión y traducción de factores vasoactivos así como su respuesta al MgSO<sub>4</sub>. Debido a gran influencia de las citocinas en la expresión de los factores vasoactivos sería interesante explorar la relación entre el estado inmunológico, los factores vasoactivos y el MgSO<sub>4</sub>.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

---

---

1. Roiz J, Jimenez J. Pre-eclampsia and eclampsia. Experience at the Centro Médico Nacional de Torreón. *Gynecol Obstet Mex* 2001;69:341-345.
2. Ceron P, Harlow SD, Sánchez CL, Nuñez RM. Risk factors for pre-eclampsia/eclampsia among working women in Mexico City. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2001;15:40-46.
3. Zalapa DF, Gómez A, Alvarez C. Early hebdomadal 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, et al. 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 G, Malacara JM, Amador N, Fierro C, Muñoz LM, Molina R. Homeostatic model assessment and risk for hypertension during pregnancy: a longitudinal prospective study. *Am J Perinatol* 2004;21:455-462.
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;183:S1-S22.
7. Halhali A, Tovar AR, Torres N, Bourges H, Garabédian 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;85:1828-1833.
8. Halhali A, Wimalawansa SJ, Berentsen V, Avila E, Thota CS, Larrea F. Calcitonin gene- and parathyroid hormone-related peptides in preeclampsia: effects of magnesium sulfate. *Obstet Gynecol* 2001;97:893-897.
9. Hauth J, Cunningham F. Preeclampsia-Eclampsia. In: Lindheimer M, Roberts JM, Cunningham F, editors. *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*. Stamford: Appleton & Lange, 1999. pp. 169-199.



10. Raijmakers MTM, Dechend R, Poston L. Oxidative stress and preeclampsia. Rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension* 2004;44:374-380.
11. Vanderlelie J, Venardos K, Clifton VL, Gude NM, Clarke FM, Perkins AV. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 2005;26:53-58.
12. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:1200-1204.
13. Redman CWG. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 1991;12:301-308.
14. Shanklin DR, Sibai BM. Ultrastructural aspects of preeclampsia. I. Placental bed and uterine boundary vessels. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:735-741.
15. 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.
16. Dekker GA, Sibai BM. Fisiopatología cardiovascular de los trastornos hipertensivos en el embarazo. In: Gleicher N BL, Elkayam U, Evans M, Galbraith R, Gall S, Sibai BM, editor. Tratamiento de las complicaciones clínicas del embarazo. Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana, 2000. pp. 1171-1185.
17. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592-1594.
18. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-415.
19. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989;86:2863-2867.
20. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* 1994;46:325-415.
21. Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Suga S, et al. Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of

the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem* 1992;267:18797-18804.

22. Böhm F, Pernow J, Lindstrom J, Ahlborg G. ETA receptors mediate vasoconstriction whereas ETB receptors clear endothelin-1 in the splanchnic and renal circulation of healthy men. *Clin Sci* 2003;104:143-151.
23. Mondon F, Kotto-Maka FD, Sabry S, Ferré F. Endothelin-induced phosphoinositide hydrolysis in the muscular layer of stem villi vessels of human term placenta. *Eur J Endocrinol* 1995;133:606-612.
24. Miwa S, Kawanabe Y, Okamoto Y, Masaki T. Ca<sup>2+</sup> entry channels involved in endothelin-1-induced contractions of vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 2005;41:61-75.
25. Cain AE, Tanner DM, Khalil RA. Endothelin-1 induced enhancement of coronary smooth muscle contraction via MAPK-dependent and MAPK-independent [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sensitization pathways. *Hypertension* 2002;39:543-549.
26. Liu S, Premont RT, Kontos CD, Huang J, Rockey DC. Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heteromeric G-protein βγ subunit signaling to protein kinase B/Akt. *J Biol Chem* 2003;278:49929-49935.
27. Lal H, Woodward B, Williams KI. Investigation of the contributions of nitric oxide and prostaglandins to the actions of endothelins and safarotoxin b in rat isolated perfused lungs. *Br J Pharmacol* 1996;118:1931-1938.
28. Goraca A. New views on the role of endothelin. *Endocr Reg* 2002;36:161-167.
29. Nussdorfer GG, Rossi GP, Malendowicz LK, Mazzocchi G. Autocrine-paracrine endothelin system in the physiology and pathology of steroid-secreting tissues. *Pharmacol Rev* 1999;51:403-437.
30. Bremnes T, Paasche JD, Mehлум A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 2000;275:17596-17604.
31. Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000;102:2434-2440.

32. Mastrogiannis DS, O'Brien WF, Krammer J, Benoit R. Potential role of endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *J Obstet Gynecol* 1991;165:1711-1716.
33. Ajne G, Ahlborg G, Wolff K, Nisell H. Contribution of endogenous endothelin-1 to basal vascular tone during normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:234-240.
34. Hasegawa M, Sagawa N, Nanno H, Itoh H, Inamori K, Ihara Y, et al. Endothelin-1-like immunoreactivity and endothelin receptors in the human placenta from normotensive and hypertensive pregnancies. *J Perinat Med* 1996;24:461-460.
35. Jauniaux E, Mignot TM, Rebourcet R, Robert B, Ferré F. Placental endothelin gene expression and endothelin concentration in fetal fluids of the first trimester gestational sac. *Mol Hum Reprod* 2000;6:758-762.
36. Kubota T, Kamada S, Hirata Y, Eguchi S, Imai T, Marumo F, et al. Synthesis and release of endothelin-1 by human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1230-1234.
37. Robert B, Malassine A, Bourgeois C, Mignot TM, Cronier L, Ferré F, et al. Expression of endothelin precursor genes in human trophoblast in culture. *Eur. J. Endocrinol.* 1996;134:490-496.
38. Cervar M, Huppertz B, Barth S, Hahn T, Weiss U, Kaufmann P, et al. Endothelin A and B receptors change their expression levels during development of human placental villi. *Placenta* 2000;21:536-546.
39. Alexander BT, Rinewalt AN, Cockrell KL, Massey MB, Bennett WA, Granger JP. Endothelin type A receptor blockade attenuates the hypertension in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure. *Hypertension* 2001;37:485-489.
40. LaMarca BB, Bennett WA, Alexander BT, Cockrell K, Granger JP. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of tumor necrosis factor-alpha. *Hypertension* 2005;46:1022-1025.
41. LaMarca BB, Cockrell K, Sullivan E, Bennett W, Granger JP. Role of endothelin in mediating tumor necrosis factor-induced hypertension in pregnant rats. *Hypertension* 2005;46:82-86.
42. Thaete LG, Kushner DM, Dewey ER, Neerhof MG. Endothelin and the regulation of uteroplacental perfusion in nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction. *Placenta* 2005;26:242-250.

43. Matz RL, Van Overloop B, Gairard A. Hypotensive effect of endothelin-1 in nitric oxide-deprived, hypertensive pregnant rats. *Am J Hypertens* 2001;14:585-591.
44. Ohuchi T, Kuwaki T, Ling G-Y, Dewit D, Ju K-H, Onodera M, et al. Elevation of blood pressure by genetic and pharmacological disruption of the ETB receptor in mice. *Am J Physiol* 1999;276:R1071-R1077.
45. Reinhart GA, Preusser LC, Burke SE, Wessale JL, Wegner CD, Opgenorth TJ, et al. Hypertension induced by blockade of ETB receptors in conscious nonhuman primates: role of ETA receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1555-H1561.
46. Thaete LG, Neerhof MG, Silver RK. Differential effects of endothelin A and B receptor antagonism on fetal growth in normal and nitric oxide-deficient rats. *J Soc Gynecol Investig* 2001;8:18-23.
47. Aydin S, Benian A, Madazli R, Uludag S, Uzun H, Oz H. Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;113:21-25.
48. Baksu B, Davas I, Baksu A, Akyol A, Gulbaba G. Plasma nitric oxide, endothelin-1 and urinary nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate levels in hypertensive pregnant women. *Int J Gynaecol Obstet* 2005;90:112-117.
49. Singh HJ, Rahman A, Larmie ET, Nila A. Endothelin-1 in fetoplacental tissues from normotensive pregnant women and women with preeclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2001;80:99-103.
50. Wolff K, Nisell H, Carlström K, Kublickiene KR, Hemsén A, Lunell NO, et al. Endothelin-1 and big endothelin-1 levels in normal term pregnancy and in preeclampsia. *Regul Pept* 1996;67:211-216.
51. Napolitano M, Miceli F, Calce A, Vacca A, Gulino A, Apa R, et al. Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2318-2323.
52. Faxén M, Nisell H, Kublickiene KR. Altered gene expression of endothelin-A and endothelin-B receptors, but not endothelin-1, in myometrium and placenta from pregnancies complicated by preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2000;264:143-149.

53. Wolff K, Faxén M, Lunell NO, Nisell H, Lindblom B. Endothelin receptor type A and B gene expression in human nonpregnant, term pregnant and preeclamptic uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1295-1300.
54. Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, et al. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelinA-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation* 2003;107:1053-1058.
55. Fiore G, Florio P, Micheli L, Nencini C, Rossi M, Carretani D, et al. Endothelin-1 triggers placental oxidative stress pathways: putative role in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4205-4210.
56. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 1982;298:240-244.
57. Wimalawansa SJ. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedulin: a peptide superfamily. *Crit. Rev. Neurobiol.* 1997;11:167-239.
58. Doi Y KH, 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;16:1073-1079.
59. Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr. Rev.* 1996;17:533-585.
60. 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 receptors. *J Biol Chem* 2002;277:14731-14737.
61. 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;280:9297-9307.
62. 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;30:460-464.
63. Dong YL, Vegiraju S, Chauhan M, Gangula PR, Hankins GD, Goodrum L, et al. Involvement of calcitonin gene-related peptide in control of human fetoplacental vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H230-H239.

64. 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;112:2510-2516.
65. Bellamy J, Bowen EJ, Russo AF, Durham PL. Nitric oxide regulation of calcitonin gene-related peptide gene expression in rat trigeminal ganglia neurons. *Eur J Neurosci* 2006;23:2057-2066.
66. Gangula PR, Wimalawansa SJ, Yallampalli C. Progesterone up-regulates vasodilator effects of calcitonin gene-related peptide in N<sup>c</sup>-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1997;176:894-900.
67. Gangula PRR, Wimalawansa SJ, Yallampalli C. Pregnancy and sex steroid hormones enhance circulating calcitonin gene-related peptide concentrations in rats. *Human Reproduction* 2000;15:949-953.
68. 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;96:65-77.
69. 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 Pt 2:233-238.
70. Hasbak P, Eskesen K, Schifter S, Edvinsson L. Increased alphaCGRP potency and CGRP-receptor antagonist affinity in isolated hypoxic porcine intramyocardial arteries. *Br J Pharmacol* 2005;145:646-655.
71. Nikitenko LL, Smith DM, Bicknell R, Rees MC. Transcriptional regulation of the CRLR gene in human microvascular endothelial cells by hypoxia. *Faseb J* 2003;17:1499-1501.
72. Cueille C, Birot O, Bigard X, Hagner S, Garel JM. Post-transcriptional regulation of CRLR expression during hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326:23-29.
73. Saggese G, Bertelloni S, Baroncelli GI, Pelletti A, Benedetti U. Evaluation of a peptide family encoded by the calcitonin gene in selected healthy pregnant women. A longitudinal study. *Horm. Res.* 1990;34:240-244.
74. 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;67:624-629.

75. 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;161:1318-1319.
76. 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;1:19-24.
77. Graf AH, Hutter W, Hacker GW, Steiner H, Anderson V, Staudach A, et al. Localization and distribution of vasoactive neuropeptides in the human placenta. *Placenta* 1996;17:413-421.
78. Wimalawansa SJ, Yallampalli C. Pre-eclamptic toxemia: potential new therapy based on animal studies. *Ceylon Med. J.* 1998;43:138-146.
79. Knerr I, Dachert C, Beinder E, Metzler M, Dotsch J, Repp R, et al. 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;101:47-53.
80. Dong YL, Green KE, Vegiraju S, Hankins GD, Martin E, Chauhan M, et al. 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;90:2336-2343.
81. Moncada S, Radomski MW, Palmer RMJ. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1988;37:2495-2501.
82. Moncada S, Higgs EA, Hodson HF, Knowles RG, Lopez-Jaramillo P, McCall T, et al. The L-Arginine:nitric oxide pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17(Suppl.3):S1-S9.
83. Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus AM, Olson SL, et al. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS I). *J Biol Chem* 1994;269:33082-33090.
84. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, et al. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994;269:6765-6772.
85. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive

endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993;268:17478-17488.

86. Dinerman JL, Lowenstein CJ, Snyder SH. Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease. *Circ Res* 1993;73:217-222.
87. Sessa WC. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100 Suppl 1:15-18.
88. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298 ( Pt 2):249-258.
89. Browner NC, Sellak H, Lincoln TM. Downregulation of cGMP-dependent protein kinase expression by inflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C88-96.
90. Ignarro LJ. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels* 1991;28:67-73.
91. Ignarro LJ. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 1991;41:485-490.
92. Welch G, Loscalzo J. Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Card Surg* 1994;9:361-371.
93. Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, Cutchins A, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem* 2004;279:163-168.
94. Sumi D, Ignarro LJ. Estrogen-related receptor alpha 1 up-regulates endothelial nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14451-14456.
95. Tai SC, Robb GB, Marsden PA. Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:405-412.
96. Wedgwood S, Black SM. Endothelin-1 decreases endothelial NOS expression and activity through ETA receptor-mediated generation of hydrogen peroxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L480-487.
97. Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, Palmer LA, Edelstein D, Brownlee M, et al. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases



eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia* 2004;47:1727-1734.

98. Neumann P, Gertzberg N, Johnson A. TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L452-459.
99. Teng X, Li D, Catravas JD, Johns RA. C/EBP-beta mediates iNOS induction by hypoxia in rat pulmonary microvascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2002;90:125-127.
100. Kolyada AY, Madias NE. Transcriptional regulation of the human iNOS gene by IL-1 beta in endothelial cells. *Mol Med* 2001;7:329-343.
101. Teng X, Zhang H, Snead C, Catravas JD. Molecular mechanisms of iNOS induction by IL-1 beta and IFN-gamma in rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C144-152.
102. Yu Z, Zhang W, Kone BC. Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2009-2017.
103. Lowenstein CJ, Padalko E. iNOS (NOS2) at a glance. *J Cell Sci* 2004;117:2865-2867.
104. Chang K, Lee SJ, Cheong I, Billiar TR, Chung HT, Han JA, et al. Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of I $\kappa$ B. *Exp Mol Med* 2004;36:311-324.
105. Harbrecht BG, Taylor BS, Xu Z, Ramalakshmi S, Ganster RW, Geller DA. cAMP inhibits inducible nitric oxide synthase expression and NF- $\kappa$ B-binding activity in cultured rat hepatocytes. *J Surg Res* 2001;99:258-264.
106. Weiner CP, Knowles RG, Moncada S. Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:838-843.
107. Thompson LP, Weiner CP. Pregnancy enhances G protein activation and nitric oxide release from uterine arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H2069-2075.
108. Dotsch J, Hogen N, Nyul Z, Hanze J, Knerr I, Kirschbaum M, et al. Increase of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 mRNA expression in human placenta during gestation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;97:163-167.

109. 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;171:944-948.
110. Ranta V, Viinikka L, Halmesmaki E, Ylikorkala O. Nitric oxide production with preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 1999;93:442-445.
111. D'Anna R, Baviera G, Corrado F, Crisafulli A, Ientile R, Buemi M, et al. Neurokinin B and nitric oxide plasma levels in pre-eclampsia and isolated intrauterine growth restriction. *Bjog* 2004;111:1046-1050.
112. Schiessl B, Strasburger C, Bidlingmaier M, Mylonas I, Jeschke U, Kainer F, et al. Plasma- and urine concentrations of nitrite/nitrate and cyclic Guanosinemonophosphate in intrauterine growth restricted and preeclamptic pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2006.
113. Orange SJ, Painter D, Horvath J, Yu B, Trent R, Hennessy A. Placental endothelial nitric oxide synthase localization and expression in normal human pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:376-381.
114. Faxén M, Nisell H, Kublickiene KR. Altered mRNA expression of eNOS and iNOS in myometrium and placenta from women with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2001;265:45-50.
115. Karteris E, Vatish M, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. Preeclampsia is associated with impaired regulation of the placental nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway by corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH-related peptides. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3680-3687.
116. Rossmanith WG, Hoffmeister U, Wolfahrt S, Kleine B, McLean M, Jacobs RA, et al. Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta. *Mol Hum Reprod* 1999;5:487-494.
117. Schiessl B, Mylonas I, Hantschmann P, Kuhn C, Schulze S, Kunze S, et al. Expression of endothelial NO synthase, inducible NO synthase, and estrogen receptors alpha and beta in placental tissue of normal, preeclamptic, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Histochem Cytochem* 2005;53:1441-1449.
118. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620.
119. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993;57:715S-724S; discussion 724S-725S.

120. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension* 1999;34:539-545.
121. Poston L, Raijmakers MT. Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome--a review. *Placenta* 2004;25 Suppl A:S72-78.
122. Gupta S, Agarwal A, Sharma RK. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv* 2005;60:807-816.
123. Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ, 2nd. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *Faseb J* 2000;14:1289-1296.
124. Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *PSEBM* 1999;222:222-235.
125. Cui XL, Brockman D, Campos B, Myatt L. Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia. *Placenta* 2006;27:422-431.
126. Wang Y, Walsh SW. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta* 2001;22:206-212.
127. Elin RJ. Assesment of magnesium status. *Clin Chem* 1987;33:1965-1970.
128. Quamme GA, Dai L-J, Rabkin SW. Dynamics of intracellular free Mg<sup>2+</sup> changes in a vascular smooth muscle cell line. *Am J Physiol* 1993;265:H281-H288.
129. Günther T. Mechanisms and regulation of Mg<sup>2+</sup> efflux and Mg<sup>2+</sup> influx. *Miner Electrolyte Metab* 1993;19:259-265.
130. Ebel H, Günther T. Magnesium metabolism:a review. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980;18:257-270.
131. Cowan JA. Introduction to the biological biochemistry of magnesium. In: Cowan JA, editor. The biological chemistry of magnesium. New York: VCH Publishers, 1995. pp. 1-24.
132. Al-Ghamdi SM, Cameron EC, Sutton RA. Magnesium deficiency:pathophysiologic and clinical overview. *Am J Kidney Dis* 1994;24:737-752.

133. Covacci V, Bruzzese N, Sgambato A, Ganapathi R, Cittadini A, Wolf FI. Effect of extracellular magnesium on topoisomerase II activity and expression in human leukemia HL-60 cells. *J Cell Biochem* 2000;78:325-333.
134. Agris PF. The importance of being modified: roles of modified nucleosides and Mg<sup>2+</sup> in RNA structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1996;53:79-129.
135. 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;180:245-254.
136. Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, et al. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res* 2002;62:175-184.
137. Miura K, Nakatani T, Asai T, Yamanaka S, Tamada S, Tashiro K, et al. Role of hypomagnesemia in chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation* 2002;73:340-347.
138. Petrault I, Zimowska W, Mathieu J, Bayle D, Rock E, Favier A, et al. Changes in gene expression in rat thymocytes identified by cDNA array support the occurrence of oxidative stress in early magnesium deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2002;1586:92-98.
139. Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG. The structure of a CREB bZIP somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *J Biol Chem* 2000;275:35242-35247.
140. Moll JR, Acharya A, Gal J, Mir AA, Vinson C, Gal J. Magnesium is required for specific DNA binding of the CREB B-ZIP domain. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1240-1246.
141. Bukoski RD. Reactive oxygen species: the missing link between magnesium deficiency and hypertension? *J Hypertens* 2002;20:2141-2143.
142. Garcia LA, Dejong SC, Martin SM, Smith RS, Bouettner GR, Kerber RE. Magnesium reduces free radicals in an in vivo coronary occlusion-reperfusion model. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:536-539.
143. Mak IT, Komarov AM, Kramer JH, Weglicki WB. Protective mechanisms of Mg-gluconate against oxidative endothelial cytotoxicity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000;46:1337-1344.

144. Zhang Y, Davies LR, Martin SM, Bawaney IM, Buettner GR, Kerber RE. Magnesium reduces free radical concentration and preserves left ventricular function after direct current shocks. *Resuscitation* 2003;56:199-206.
145. Touyz RM, Pu Q, He G, Chen X, Yao G, Neves MF, et al. Effects of low dietary magnesium intake on development of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: role of reactive oxygen species. *J Hypertens* 2002;20:2221-2232.
146. Hans CP, Chaudhary DP, Bansal DD. Magnesium deficiency increases oxidative stress in rats. *Indian J Exp Biol* 2002;40:1275-1279.
147. Bariskaner H, Ustun ME, Ak A, Yosunkaya A, Ulusoy HB, Gurbilek M. Effects of magnesium sulfate on tissue lactate and malondialdehyde levels after cerebral ischemia. *Pharmacology* 2003;68:162-168.
148. Sibai BM. Magnesium sulfate is the ideal anticonvulsant in preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:1141-1145.
149. Cotton DB, Hallak M, Janusz C, Irtenkauf SM, Berman RF. Central anticonvulsant effects of magnesium sulfate on N-methyl-D-aspartate-induced seizures. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:974-978.
150. Hallak M, Hotra JW, Custodio D, Kruger ML. Magnesium prevents seizure-induced reduction in excitatory amino acid receptor (kainate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) binding in pregnant rat brain. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:793-798.
151. Stulc J. Placental transfer of inorganic ions and water. *Physiol Rev* 1997;77:805-836.
152. Standley PR, Standley CA. Identification of a functional Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> exchanger in human trophoblast cells. *Am J Hypertens* 2002;15:565-570.
153. Cruikshank DP, Pitkin RM, Reynolds WA, Williams GA, Hargis GK. Effects of magnesium sulfate treatment on perinatal calcium metabolism. I. Maternal and fetal responses. *Am J Obstet Gynecol* 1979;134:243-249.
154. Cotton DB, Gonik B, Dorman KF. Cardiovascular alterations in severe pregnancy-induced hypertension: acute effects of intravenous magnesium sulfate. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:162-165.
155. Touyz RM. Role of magnesium in the pathogenesis of hypertension. *Mol Aspects Med* 2003;24:107-136.

156. Kovac CM, Howard BC, Pierce BT, Hoeldtke NJ, Calhoun BC, Napolitano PG. Fetoplacental vascular tone is modified by magnesium sulfate in the preeclamptic ex vivo human placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:839-842.
157. Holcberg G, Sapir O, Hallak M, Alaa A, Shorok HY, David Y, et al. Selective vasodilator effect of magnesium sulfate in human placenta. *Am J Reprod Immunol* 2004;51.
158. Walsh SW, Romney AD, Wang Y, Walsh MD. Magnesium sulfate attenuates peroxide-induced vasoconstriction in the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:7-12.
159. Mastrogiannis DS, Kalter CS, O'Brien WF, Carlan SJ, Reece EA. Effect of magnesium sulfate on plasma endothelin-1 levels in normal and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1554-1559.
160. Richard MJ, Portal B, Meo J, Coudray C, Hadjian A, Favier A. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem* 1992;38:704-709.
161. Muñoz-Fuentes RM, Vargas F, Bobadilla NA. Assay validation for determining nitrites and nitrates in biological fluids. *Rev Invest Clin* 2003;55:670-676.
162. Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H, Schafers H-J. Selective upregulation of endothelin B receptors gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation* 2002;105:1034-1036.
163. Karabulut AB, Kafkasli A, Burak F, Gozukara EM. Maternal and fetal plasma adenosine deaminase, xanthine oxidase and malondialdehyde levels in pre-eclampsia. *Cell Biochem Funct* 2005;23:279-283.
164. Abad C, Teppa-Garran A, Proverbio T, Pinero S, Proverbio F, Marin R. Effect of magnesium sulfate on the calcium-stimulated adenosine triphosphatase activity and lipid peroxidation of red blood cell membranes from preeclamptic women. *Biochem Pharmacol* 2005;70:1634-1641.
165. Kuzniar A, Mitura P, Kurys P, Szymonik-Lesiuk S, Florianczyk B, Stryjecka-Zimmer M. The influence of hypomagnesemia on erythrocyte antioxidant enzyme defence system in mice. *Biometals* 2003;16:349-357.
166. Anastassopoulou J, Theophanides T. Magnesium-DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;42:79-91.

167. Gangula PR, Supowit SC, Wimalawansa SJ, Zhao H, Hallman DM, DiPette DJ, et al. Calcitonin gene-related peptide is a depressor in N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension during pregnancy. *Hypertension* 1997;29:248-253.
168. Sagsoz N, Kucukozkan T. The effect of treatment on endothelin-1 concentration and mean arterial pressure in preeclampsia and eclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2003;22:185-191.
169. Wang Y, Wang DH. Prevention of endothelin-1-induced increases in blood pressure: role of endogenous CGRP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1868-1874.
170. Parlapiano C, Paoletti V, Campana E, Giovanniello T, Pantone P, Labbadia G, et al. CGRP and ET-1 plasma levels in normal subjects. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 1999;3:139-141.
171. Zhou Q, Sun M, Li X. [A study on the relationship between plasma level of ET-1 and cGRP and blood pressure in hemodialysis patients]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1997;22:335-337.
172. Boura AL, Walters WA, Read MA, Leitch IM. Autacoids and control of human placental blood flow. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994;21:737-748.
173. Ohkita M, Wang Y, Nguyen NDT, Tsai Y-H, Williams CL, Wiseman RC, et al. Extrarenal ETB plays a significant role in controlling cardiovascular responses to high dietary sodium in rats. *Hypertension* 2005;45:940-946.
174. Lee CN, Chang SW, Cho NH, Cho SH. Nitrous oxide synthase expression in placenta of preeclampsia. *J Korean Med Sci* 1997;12:532-538.
175. Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK, et al. Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta* 2006;27:438-444.
176. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R1-12.
177. Luss H, DiSilvio M, Litton AL, Molina y Vedia L, Nussler AK, Billiar TR. Inhibition of nitric oxide synthesis enhances the expression of inducible nitric oxide synthase mRNA and protein in a model of chronic liver inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:635-640.

178. Zhao Y, Bell D, Smith LR, Zhao L, Devine AB, McHenry EM, et al. 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;316:1269-1281.
179. Chakravarty P, Suthar TP, Coppock HA, Nicholl CG, Bloom SR, Legon S, et al. CGRP and adrenomedullin binding correlates with transcript levels for calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) in rat tissues. *Br J Pharmacol* 2000;130:189-195.
180. 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;147:1932-1940.



## XIII. ANEXOS

---

### Producción científica generada durante la realización de esta tesis

#### Capítulos de libro

- Halhali A, **Ariza AC**, Larrea F. Control hormonal del embarazo, el parto y la lactancia. En: Drucker R, ed. Fisiología Médica. El Manual Moderno, 2004. ISBN: 970-729-069-2.
- **Ariza AC**, De Santiago S, Halhali A. Magnesio. En: Recomendaciones de ingestión diaria de nutrimentos para la población mexicana. Bases fisiológicas. Tomo 1. Editores: Héctor Bourges, Esther Casanueva, Jorge Luis Rosado. Editorial Médica Panamericana, 2005. ISBN: 968-798-858-4.
- Halhali A, De Santiago S, Díaz L, Ávila E, **Ariza AC**, Díaz E, Frenk S, Larrea F. Vitamina D. En: Recomendaciones de ingestión diaria de nutrimentos para la población mexicana. Bases fisiológicas. Tomo 1. Editores: Héctor Bourges, Esther Casanueva, Jorge Luis Rosado. Editorial Médica Panamericana, 2005. ISBN: 968-798-858-4.

#### Artículos científicos

- **Ariza AC**, Díaz E, Halhali A. Magnesio: aspectos fisiológicos y su implicación en el embarazo normal y la preeclampsia. *Rev Invest Clin* 2004; 56: 640-648.
- **Ariza AC**, Bobadilla N, Fernández C, Larrea F, Halhali A. Effects of magnesium sulfate on lipid peroxidation and blood pressure regulators in preeclampsia. *Clin Biochem* 2005; 38(2): 128-133.
- **Ariza AC**, Halhali A. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina en embarazos normales y complicados con preeclampsia. *Revista de la Escuela de Medicina "Dr. José Sierra Flores", Universidad del Noreste* 2006; 20(1): Junio.
- **Ariza AC**, Bobadilla NA, Halhali A. Acciones de endotelina 1 y angiotensina II en embarazos complicados con preeclampsia. *Rev Invest Clin* 2006. En Prensa.
- Halhali A, Díaz L, Ávila E, **Ariza AC**, Larrea F. Decreased fractional urinary excretion and serum 1,25-dihydroxyvitamin D and IGF-I levels in preeclampsia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006. En prensa.
- **Ariza AC**, Ponce X, González-González ME, Larrea F, Halhali A. Effects of magnesium sulfate on placental expression of endothelin 1 and its receptors in preeclampsia. Enviado a *Clin Biochem*.