

CITRATO SINTASA, CITOCROMO C OXIDASA Y eNOS COMO
BIOMARCADORES DE FUNCIÓN PLACENTARIA EN UN GRUPO DE
PRIMIGESTANTES DIAGNOSTICADAS CON PREECLAMPSIA.

CESAR JOSE VELA PRIETO
Enfermero

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
SANTIAGO DE CALI 2015

CITRATO SINTASA, CITOCROMO C OXIDASA Y eNOS COMO
BIOMARCADORES DE FUNCIÓN PLACENTARIA EN UN GRUPO DE
PRIMIGESTANTES DIAGNOSTICADAS CON PREECLAMPSIA.

CESAR JOSE VELA PRIETO

TRABAJO DE GRADO
PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS.

DIRECTORES

ANA CECILIA AGUILAR DE PLATA M.Sc

ANDRÉS ORLANDO CASTILLO Ph.D

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE SALUD

SANTIAGO DE CALI 2015

AGRADECIMIENTOS

Gracias, de corazón, a mis tutores los Doctores Ana Cecilia Aguilar de Plata y Andrés Orlando Castillo por su colaboración, apoyo y paciencia. Ha sido un privilegio poder contar con su guía.

También quiero agradecer de manera especial la amistad y colaboración del Grupo de Nutrición de la Universidad del Valle y a todas las madres que permitieron su participación en este estudio.

De igual manera agradezco a las entidades financiadoras de este trabajo, el Instituto Colombiano para la Ciencia y la Tecnología (Colciencias) y la Fundación FES.

A toda mi familia, por su amor incondicional, que llena de alegría cada paso que doy haciendo posibles los sueños y los retos que la vida pone en mi camino, les dedico este trabajo.

INDICE

	Pág.
1 RESUMEN	8
2 JUSTIFICACIÓN	9
3 MARCO TEÓRICO	10
3.1 PREECLAMPSIA.	10
3.2 FUNCIÓN ENDOTELIAL Y PREECLAMPSIA.	11
3.3 FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y PREECLAMPSIA.	19
4 OBJETIVOS	24
4.1 OBJETIVO GENERAL.	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	24
5 METODOLOGÍA.	25
5.1 HIPÓTESIS	25
5.2 DISEÑO METODOLÓGICO.	25
5.3 SELECCIÓN DE MUESTRAS.	25
5.4 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.	25
5.4.1 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CS.	25
5.4.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE COX.	28
5.4.3 WESTERN BLOT DE eNOS EN PLACENTA.	30
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	32
5.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS.	33
6 RESULTADOS	34
6.1 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DE LAS GESTANTES	34
6.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CS EN PACIENTES PREECLAMPTICAS	34
*TEST U DE MANN-WHITNEY.	35
6.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE COX EN PACIENTES PREECLAMPTICAS	35
6.4 EXPRESIÓN DE eNOS EN LAS PACIENTES PREECLAMPTICAS	37
7 DISCUSIÓN	39
8 CONCLUSIONES.	43
9 PERSPECTIVAS	44
10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	45

INDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. SOLUCIONES PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN (200 μ G/ML 1000 μ G/ML).	26
TABLA 2. SOLUCIONES PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CS.	27
TABLA 3. SOLUCIONES PARA PREPARACIÓN DE PBS.	28
TABLA 4. SOLUCIONES PARA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA COX.	29
TABLA 5. SOLUCIONES PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN (200 μ G/ML 1000 μ G/ML) DE WESTERN BLOT.	31
TABLA 6. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DE LAS GESTANTES	34
TABLA 7. CORRELACIÓN DE ENOS, COX Y CS CON CO-VARIABLES EN EL GRUPO DE GESTANTES QUE SUFRIERON PREECLAMPSIA.	36

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CITRATO SINTASA EN PLACENTA DE GESTANTES CON PRE ECLAMPSIA.	35
FIGURA 2: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CITOCROMO C OXIDASA EN PLACENTA DE GESTANTES CON PREECLAMPSIA.	36
FIGURA 3: CORRELACIÓN DEL GROSOR DE LA PLACENTA VS. CS	37
FIGURA 4: WESTERN BLOT EN PLACENTA PARA DETERMINAR LA EXPRESIÓN DE ENOS EN LAS PACIENTES PREECLAMPTICAS.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
NO	Óxido nítrico
CS	Citrato sintasa
COX	Citocromo C oxidasa
PE	Preeclampsia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
FMN	Flavina adenina mononucleotido
FAD	Flavina adenina dinucleotido
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato – reducido-
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
CaM	Calmodulina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
IFN- γ	Interferon Gamma
ONOO ⁻	Anión peroxinitrito
N ^G - monometil-L-arginina	L-NMMA
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
PKG	Proteinkinasa
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
VEGF	Factores de Crecimiento Endotelial Vascular
PIGF	Factor de Crecimiento de Placenta
HUVECs	Células endoteliales de cordón umbilical de humano
ATP	Adenosin Trifosfato

1 RESUMEN

La preeclampsia (PE) es la mayor causa de restricción del crecimiento intrauterino y mortalidad perinatal. Se ha observado, que su etiología se encuentra relacionada con disfunción endotelial, deficiencia en la vascularización placentaria y alteraciones en la función mitocondrial entre otras.

Objetivos: en el presente estudio se compararon los niveles de expresión de la proteína eNOS como biomarcador bioquímico de función endotelial; y las actividades de las enzimas citrato sintasa (CS) y citocromo c oxidasa (COX) como biomarcadores bioquímicos de función mitocondrial, en tejido placentario obtenido de un grupo de mujeres primigestantes diagnosticadas con preeclampsia vs. un grupo control.

Metodología: se seleccionaron 13 muestras de placenta de primigestantes y 10 de aquellas que presentaron preeclampsia (PE) al final del embarazo. Las muestras fueron lisadas mediante homogenizador para obtener el extracto con proteína total. Estos extractos se analizaron utilizando la técnica de Western Blot y la expresión de las proteínas eNOS se cuantificó por densidad óptica. Con el objetivo de comparar la actividad enzimática mitocondrial de CS y COX y compararlas con la de las gestantes que desarrollaron PE se prepararon extractos de ambos grupos de pacientes (sanas y PE), utilizando el kit de ensayo de marca Sigma de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados: en el presente estudio se observó un incremento en la expresión de eNOS en las placentas de las gestantes con PE en relación con las placentas de las gestantes sanas. Además, la actividad enzimática de COX en las placentas de las gestantes con PE fue mayor que en las placentas de gestantes sanas. Igualmente, la actividad enzimática de CS en las placentas de las gestantes con PE fue menor que en las placentas de gestantes sanas.

Conclusión: El análisis de biomarcadores bioquímicos de función endotelial como la proteína eNOS y de función mitocondrial como las enzimas citrato sintasa (CS) y citocromo c oxidasa (COX) en tejido placentario, nos permitió obtener evidencias de que patologías como la preeclampsia están relacionadas con alteración de los procesos de vascularización placentaria. Esta relación posiblemente se pueda explicar ya que una alteración vascular placentaria conllevaría a un aumento en los niveles de estrés oxidativo provocando disfunción endotelial, y además, contribuye con la disminución del aporte energético a la placenta, lo que trae como consecuencia una alteración de los procesos de actividad enzimática mitocondrial placentaria necesarios para que la placenta presente un eficaz funcionamiento.

2 JUSTIFICACIÓN

La preeclampsia (PE) es la mayor causa de restricción del crecimiento intrauterino y mortalidad perinatal. Se ha observado que su etiología se encuentra relacionada con disfunción endotelial, deficiencia en la vascularización placentaria y alteraciones en la función mitocondrial entre otras. La placenta se conoce que desempeña un papel importante en el dominio de la vascularización que relaciona al feto con la madre. Las funciones placentarias están determinadas por la vascularización y un adecuado fluido de sangre entre la madre y el feto para que se ofrezca a este último los nutrientes y el oxígeno necesarios para su desarrollo. En todo el desarrollo de la vascularización placentaria participa el Óxido Nítrico (NO) como vasodilatador y precursor de la angiogénesis. El NO es sintetizado a partir de la L – Arginina por la Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).

Se ha propuesto, como parte de la fisiopatología de la preeclampsia, que existen fallas en el sistema de generación de NO que compromete la función del endotelio, de tal manera que la menor vasodilatación dependiente de NO y el exceso en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) podrían explicar la falta de perfusión placentaria en la preeclampsia. Así como es necesaria para la vasculogénesis la función endotelial, se hace importante un aporte energético adecuado ya que los procesos de placentación requieren de niveles altos de energía, aquí radica la necesidad de estudiar la función mitocondrial en las placentas de las primigestantes con preeclampsia.

También se ha relacionado la posterior aparición de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) con alteraciones materno – fetales como la preeclampsia, que afecta directamente aspectos relacionados con la nutrición del feto, limitando la cantidad de nutrientes que este recibe y haciéndolo susceptible a padecer ECNT en su vida adulta.

Los objetivos del presente trabajo están enmarcados dentro de la línea de investigación que estudia los mecanismos biológicos asociados a la programación fetal de ECNT y que dispone de un banco de muestras de placentas conformado a partir del proyecto (Cód. N° 110645921540). Estas muestras fueron utilizadas para el desarrollo de la presente propuesta.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 PREECLAMPSIA.

La preeclampsia es la mayor causa de morbilidad materno fetal en el mundo y ocurre después de la semana 20 del embarazo, afectando entre el 3% y el 5% de todas las embarazadas(1). En Sur África los mayores índices de muertes son por esta patología (2), en el Reino Unido la preeclampsia es la segunda causa de muerte(3) y en Colombia la preeclampsia aporta el 42% de la morbilidad materno fetal(4).

Esta patología se caracteriza por vasoespasmo e incremento de la resistencia vascular periférica, con consecuencias como la reducción en la perfusión de los órganos e hipertensión. La preeclampsia es una de las mayores causas de restricción en el crecimiento intrauterino(5), y complicaciones como alteraciones de la función hepática y renal, las cuales se manifiestan con síntomas tales como: dolor abdominal, dolor de cabeza, dolor epigástrico y edema.

Los factores de riesgo asociados a preeclampsia son: obesidad(6), diabetes *mellitus*(7), gestante nulípara(8), edades extremas en la gestante(9), enfermedad renal, primer parto, alteraciones en la coagulación, hipertensión crónica, antecedentes genéticos, respuesta inflamatoria de la madre, disfunción endotelial, índice de masa corporal alto(10) y más de 10 años entre embarazos(11).

Se sospecha de una preeclampsia cuando después de la segunda mitad del embarazo se presenta: hipertensión con proteinuria; cuando las cifras están por encima de los 140/90 (sistólica y diastólica respectivamente), tomada en más de dos ocasiones con una diferencia en tiempo de 6 horas y después de la semana 20 de gestación. Otra característica clínica de la preeclampsia es: la proteinuria mayor a 300mg en el día.

La complicación de esta patología compromete la función hepática y renal, manifestándose con síntomas tales como: dolor abdominal, dolor de cabeza, dolor epigástrico y edema. Los exámenes de laboratorio que confirman la complicación de esta patología son: enzimas hepáticas elevadas, trombocitopenia y el bajo, lo que lleva a pensar en un síndrome de HELLP (de sus siglas en inglés: hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, conteo de plaquetas bajo). Sin embargo, un solo examen de laboratorio positivo, no es suficiente para confirmar la presencia de preeclampsia (12).

El común denominador que modula el desenlace de preeclampsia es la placenta, que es un órgano transitorio que actúa como interface entre la madre y el feto, evitando así el rechazo inmunológico y satisfaciendo las necesidades fisiológicas y la secreción de hormonas endocrinas para el buen término del embarazo(13).

La placenta es objeto de múltiples procesos fisiológicos que se encargan del enriquecimiento vascular de la misma durante el primer trimestre del embarazo, para satisfacer las necesidades del feto durante toda la gestación. Su

funcionamiento está determinado por el desarrollo adecuado de la vascularización, fluido de sangre, y diferenciación del trofoblasto(14).

En un embarazo normal, la invasión del trofoblasto en el músculo uterino forma los espacios intervillosos y forman una red vascular en la que se incrementan gradualmente los vasos sanguíneos los cuales responden a los estímulos vasomotores. Simultáneamente, se genera nuevo endotelio, la sustitución de la lámina elástica interna, el musculo liso por trofoblasto, y la distensión venosa junto con la matriz fibrinoide; siendo la transformación completa a la semana 20 del embarazo. Con esto el espacio intervilloso recibe el suministro de sangre necesario para satisfacer las demandas de la unidad feto placentaria durante todas las etapas de la gestación(14).

La placenta de una gestante con preeclampsia se caracteriza por una deficiente invasión del trofoblasto, y la remodelación de la arteria espiral se limita a las porciones de la decidua; de tal manera que los segmentos miometriales no la permiten ampliar y permanece contráctil(15).

El defecto en la remodelación de la arteria uterina, se ve reflejado en la deficiente perfusión sanguínea que conlleva a una hipoxia o a una isquemia placentaria; siendo frecuente que las placentas de gestantes que han padecido preeclampsia presenten infartos(15).

Esta patología se presenta cuando hay condiciones de hipoxia, disfunción endotelial y estrés oxidativo(16) en la placenta, que son los causantes de una pobre placentación en etapas tempranas. En las etapas siguientes, cuando incrementa la hipoxia, se evidencian cifras tensionales altas, proteinuria y disfunción hepática. Cuando la preeclampsia se instaura en etapas tempranas de la gestación, especialmente antes de la semana 34, se observan consecuencias graves para el feto como: insuficiencia en su nutrición y en su respiración que pueden provocar la muerte del mismo(16).

3.2 FUNCIÓN ENDOTELIAL Y PREECLAMPSIA.

El endotelio es un tejido complejo que al recubrir el interior de los vasos sanguíneos actúa como una lámina de transición entre la circulación sanguínea y la íntima vascular y recubre todo el sistema cardiovascular y también los vasos linfáticos(17).

La función del endotelio depende de la integridad de las células endoteliales, de la adecuada conexión entre ellas y de la producción de sustancias vasoactivas estas últimas, responsables de la regulación del tono vascular, de la interacción con las células blancas, de la coagulación, de la fibrinólisis, de la agregación plaquetaria, de la angiogénesis, entre otras(18).

El óxido nítrico es un gas con múltiples propiedades biológicas y está encargado de modular varios procesos fisiológicos en todo el organismo; Esta molécula es producida por las células endoteliales a partir de la L – arginina e interactúa con el grupo hemo de la guanilato ciclasa para aumentar la formación de cGMP en las células de musculo liso vascular. La síntesis del NO por la vía de la L – arginina se

ha encontrado en muchas otras células y en tejidos como: glándulas adrenales(19), cerebro(20) y plaquetas(21) entre otros.

La molécula del NO comparte las mismas características químicas de un radical libre debido a la presencia de un electrón desapareado en el último nivel de su estructura química, y que le brinda la posibilidad de reaccionar con diferentes moléculas, está presente en los tejidos en una concentración de 1 a 3000 nM bajo condiciones fisiológicas normales.

El NO está involucrado en muchos procesos bioquímicos y fisiológicos debido a su relación con funciones endoteliales que son parte del desarrollo y mantenimiento de toda la biología humana(22). Sus características químicas le permiten relacionarse fácilmente con otras moléculas como: proteínas, grupos hemo, átomos de cobre o de hierro(23) y moléculas que hacen parte de la cadena respiratoria como: el complejo I, II y la Aconitasa, a través de las cuales afecta la respiración mitocondrial celular(24).

Como ya se mencionó anteriormente el NO es el principal mediador de la homeostasis vascular y por tanto una disminución en su biodisponibilidad es signo de una alteración en la función endotelial(18).

El NO es sintetizado en el sitio y en el momento en que se requiere ya que este no puede ser almacenado y posteriormente transportado debido a su alta reactividad.

La enzima encargada de producir el NO es la Oxído Nítrico Sintasa (de sus siglas en inglés, NOS) la cual utiliza como sustrato a la L – arginina y junto con el NADPH y el Oxígeno producen el NO (gas), la L - citrulina, y el agua(25).

La NOS ha sido clasificada en 3 isoenzimas basándose en las características físicas y bioquímicas de las enzimas purificadas como neuronal, endotelial (eNOS), y NOS inducible (el tejido placentario humano ha mostrado la expresión selectiva de la isoforma eNOS). Estas isoenzimas comparten entre el 50 y 60% de homología entre sí, respecto a la secuencia de los aminoácidos que la conforman, y a sus dominios oxidasa y reductasa (26-28). Cada una de las isoenzimas posee determinadas propiedades y una expresión tejido específica que funciona de acuerdo a su propia regulación(29).

Aunque las isoformas presentan algunas diferencias entre sí, son muy similares en su estructura proteica con 1144 residuos de aminoácidos aproximadamente. Generalmente, la literatura menciona en la conformación de la NOS, dos segmentos principales constituidos por un par de monómeros idénticos: un dominio carboxi-terminal reductasa (NOSred) homólogo al citocromo P450, y un dominio N-terminal oxigenasa catalítico (NOSox), el cual extrae un electrón del sustrato L-arginina(30).

La NOS cuenta con un dominio extra ubicado de manera intermedia entre los residuos 499 y 530 de su estructura, sitio restringido para la unión a la calmodulina, proteína citosólica cuya actividad es regulada por el calcio, si esta se encuentra desacoplada la enzima produce anión superóxido en lugar de NO y se convierte en fuente de estrés oxidativo(31, 32).

El dominio NOS reductasa contiene sitios de unión importantes para dar inicio a la reacción para coenzimas como: Flavina Mononucleótido (FMN), Flavina Adenina Dinucleótido (FAD) y Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato –reducido- (NADPH); y el NOSox por su parte, requiere oxígeno molecular (O_2), tetrahidrobiopterina (BH_4), hierro, hemo y el sustrato de la reacción para finalizarla(33).

La L- arginina, el hemo y la BH_4 son los encargados de ofrecer la estabilidad y el soporte a la estructura que una vez formada, el paso siguiente es iniciar la reacción con la activación de la calmodulina (CaM), la cual, dependiendo de la isoforma, puede estar unida a la estructura o formando un complejo dependiente de calcio (CaM- Ca^{+2})(34).

La CaM ofrece un equilibrio cinético a la reacción, acelerando y manteniendo un buen ritmo del flujo de los electrones que se transportan a través de los dominios reductasa y oxigenasa(35). Una vez acoplada la CaM, un transportador específico lleva la L – arginina al sitio de reacción y se suma a esta la presencia del NADPH y el oxígeno molecular.

Se inicia con la donación de un H^+ por parte de la NADPH, pasando de su estado reducido al oxidado ($NADP^+$), el electrón viaja a través del dominio reductasa gracias a los transportadores de electrones FAD y FMN. Los cofactores de flavina, tienen como función permitir que el electrón llegue al grupo hemo en el N-terminal el cual se comporta como aceptor final de electrones y propicia la formación de radicales intermediarios estables(29, 35).

En este punto, los electrones transferidos interactúan también con la (BH_4) para activar el sitio de catálisis y son usados para reducir y activar el O_2 . Particularmente en las enzimas de expresión constitutiva, éstas deben ejecutar dos veces todo el proceso para generar una molécula de NO: en el primer ciclo, se lleva a cabo la hidroxilación del sustrato a N^G - hidroxil- L-arginina, el cual permanece unido a la enzima, hasta que en el segundo ciclo, la NOS oxida éste producto a L-citrulina y NO(36).

Las isoformas presentan diferencias respecto al tipo de expresión que desarrollan, por ejemplo la eNOS y nNOS son de expresión constitutiva, mientras que la iNOS tiene una expresión inducible. En el caso de las primeras, la enzima está o no presente, si ésta, se mantiene inactiva hasta que un estímulo, en este caso el incremento de Ca^{2+} intracelular, inicia su actividad que puede ser alta o baja dependiendo de la intensidad del mismo(37).

La expresión de la iNOS es inducida en varios tipos de células en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos como agentes inflamatorios e interleuquinas, entre los que se destacan el Factor de Necrosis Tumoral ($TNF-\alpha$), Interferón *gamma* ($IFN-\gamma$), lipopolisacáridos bacterianos(38) entre otros. Es importante tener en cuenta que la generación del NO por parte de esta isoforma, no depende de la concentración del Ca^{2+} intracelular ya que la iNOS posee en su estructura proteica

la calmodulina ligada permanentemente al sitio de unión y no requiere del ión para su activación.

La cantidad adecuada de cada uno de estos cofactores, es vital para el éxito de la reacción, si por ejemplo el hierro hemo se encuentra en cantidades bajas, puede oxidar el oxígeno molecular a anión superóxido(39); que es un radical libre tóxico para las células. Una disminución en la concentración de (BH_4) por su parte, cursa con producción de NO acompañado de O_2^- , productos que reaccionan entre sí, dando lugar a la formación de peroxinitrito (ONOO^-)(40) el cual es una especie reactiva de oxígeno altamente oxidante y en la mayoría de los casos se comporta como una molécula tóxica.

La NOS, se puede ver afectada por diferentes moléculas según su isoforma, sin embargo, la actividad de eNOS, iNOS y nNOS, se ha visto inhibida por compuestos comunes, como la N^G - monometil-L-arginina (L-NMMA), una molécula análoga al aminoácido L-arginina, en el cual uno de sus átomos de nitrógeno del grupo guanidino es metilado. El efecto que ejerce el L-NMMA respecto a la inhibición de la enzima, puede ser rápidamente revertido por la L-arginina(41).

El suministro de L-NMMA en una arteria muestra una vasoconstricción inversamente proporcional a la cantidad de L – NMMA suministrado, mientras que si se suministra por vía venosa el resultado es contrario, lo que llevo a los autores a concluir de tal ensayo que el NO ejerce un efecto importante en la regulación del tono vascular(41).

Así como se ha mencionado anteriormente, en la placenta humana encontramos la expresión de la isoforma eNOS que se encuentra localizada en el endotelio específicamente en complejos denominados caveolas las cuales hacen parte de la membrana plasmática y que contienen una proteína denominada caveolina(42, 43). Tiempo atrás el conocimiento sobre las caveolas permitió conocer mecanismos de señalización celular propios del NO, y también han reseñado la importancia de su papel en el transporte celular(44).

La expresión de la eNOS no es exclusiva del endotelio vascular, pues también se ha encontrado en células del músculo liso y en células tubulares. Su función principal está dada por la producción del óxido nítrico con el cual se logra regular a través del endotelio procesos como: vasodilatación, señalización celular, angiogénesis, migración celular y ejerce control sobre la regulación de las plaquetas(45).

Esta enzima también responde al estrés de fricción hemodinámico que es una medida de la fuerza de fricción de un flujo en el organismo, sin embargo la enzima puede ser modulada también por ejercicio, hipoxia y algunos cambios hormonales(46).

La activación de esta enzima depende de su ubicación, ya que si se encuentra en las caveolas su estado va a ser inactivo debido a la presencia de proteínas como la $\text{cav} - 1$; factores como $\text{CaM} - \text{Ca}^{2+}$ y el Ca^+ intra celular los cuales permiten la disociación de la eNOS también intervienen en su función(47).

Una vez activada la enzima se desencadena la transferencia de electrones y se inicia un proceso enzimático que va a producir como resultado final el NO, este, una vez(48) liberado, cruza la membrana de la célula endotelial y se difunde en las células musculares lisas dispuestas en la túnica íntima de los vasos sanguíneos, en donde activa la enzima citosólica guanilato ciclasa, permitiendo la síntesis del guanosín monofosfato cíclico (cGMP) intracelular a partir de guanosín trifosfato (GTP). El cGMP activa la proteinkinasa (PKG) y ésta se encarga de generar la apertura de canales de potasio en la célula endotelial, permitiendo la salida del ión y generando una hiperpolarización de la membrana, en la que los canales de calcio dependientes de voltaje, se cierran y la disminución del calcio en el interior de la célula, es lo que da lugar finalmente a la vasodilatación(49). Para detener esta acción, las fosfodiesterasas, localizadas en las células musculares lisas, inactivan el GMPc ocluyendo los canales de potasio e incrementando al nivel normal el calcio intracelular(50).

La eNOS también puede ser activada por otro mecanismo como la fosforilación(51), que se presenta principalmente cuando hay un estrés hemodinámico, porque este estímulo produce altos niveles de NO como consecuencia del incremento en la expresión de mRNA de la eNOS.

Adicionalmente, la producción de NO puede ser mediada por otros mecanismos de activación que puede ser ultra-rápida, rápida y lenta. La activación ultra-rápida de la eNOS esta mediada por los canales iónicos, gracias a ellos se puede dar una respuesta en segundos. Si la respuesta se da a un tiempo un poco más prolongado, se refiere a una respuesta mediada principalmente por vía fosforilativa. De lo contrario, si ante el estímulo tarda horas en desencadenar una respuesta, el mecanismo que se ha empleado se relaciona con la inducción del mRNA.

Otros mecanismos regulatorios de la eNOS: mediante la interacción proteína-proteína (CaM-Ca²⁺), la participación de la Proteína de *Shock Térmico* de 90 KDa (Hsp 90) y por medio de la adhesión de las células endoteliales a determinadas moléculas como PECAM-1 (molécula de adhesión de células endoteliales/plaquetas-1)(52).

Adicionalmente, esta isoforma cuenta con diferentes herramientas de regulación post-traducciona como la fosforilación dirigida a sitios específicos dentro de la estructura de la enzima, la acilación, la unión a cofactores y sustratos, y mecanismos relacionados con la localización subcelular.

Otros mecanismos que son requeridos en la regulación de la eNOS relacionan la proteína Hsp 90, que es miembro de la familia de las chaperonas, esta proteína se une a la enzima cuando se requieren algunas funciones como: estabilizar la estructura conformacional proteica, participando en el plegamiento o ensamble de la misma, en determinadas vías y ciclos de regulación, en el transporte celular y además en la disminución de la agregación proteica(53); Esta proteína también modula la activación de la eNOS(42), uniéndose a ella mediante la kinasa Akt y regulando la actividad de la enzima mediante fosforilación(54, 55).

El mecanismo de fosforilación/desfosforilación es requerido por muchas enzimas, las cuales son funcionales cuando son fosforiladas por quinasas. Las quinasas son las encargadas de adicionar un grupo fosfato a una proteína en una localización determinada y en contraposición, las desfosforilasas (fosfatasas) escinden el fosfato de las enzimas para inactivarlas. Éste proceso se repite muchas veces en el organismo para una determinada acción. Para el caso de la eNOS, se ha determinado que se activa cuando es fosforilada en residuos de serina en la posición 1177(48, 56, 57) por la enzima AKt-quinasa (quinasa que fosforila residuos serina y treonina)(58) lo que aumenta la sensibilidad de la eNOS a las concentraciones basales de CaM-Ca²⁺. Su inactivación se propicia gracias a la fosforilación del residuo de treonina 495(59).

Durante la gestación ocurren muchos cambios fisiológicos en los cuales participa activamente el endotelio con la producción de sustancias vasoactivas, por ejemplo durante el inicio de la gestación, cuando la inervación de los vasos sanguíneos umbilicales disminuye(60), este produce sustancias como: el NO, factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (de sus siglas en inglés, PDGF), además miembros de la familia de Factores de Crecimiento Endotelial Vascular (de sus siglas en inglés, VEGF), como el Factor de Crecimiento de Placenta (de sus siglas en inglés, PIGF)(61) entre otros; que ejercen control en el tono vascular, en la regulación del flujo sanguíneo, en la generación de nuevos vasos sanguíneos y en la formación de trofoblasto.

Otras sustancias como la Oxitocina y el Péptido Natriurético Atrial (siglas en inglés, ANP), son liberadas por diferentes células del organismo y, se ha demostrado mediante diferentes estudios, su síntesis a partir de las células endoteliales de cordón umbilical de humano (siglas en inglés, HUVECs)(62).

La Oxitocina actúa como una sustancia vasorelajante, el ANP en cambio, tiene efecto antiinflamatorio, vasoconstrictor e inductor de citoquinas como el Factor de Necrosis Tumoral- α (siglas en inglés, TNF- α).

La endoglina (ENG) es una glucoproteína de membrana, e integrante de la familia de Factores de Crecimiento Transformante- β (TGFB-1), los cuales son otros de los factores que influyen la angiogénesis en la placenta, además de regular la invasión y el crecimiento trofoblástico(63).

Como podemos ver, la intervención del endotelio a través de las HUVEC durante la gestación es amplia, de igual manera es importante la relación que existe entre el buen funcionamiento del endotelio con una gestación sana, y en los últimos años ha sido objeto de muchos estudios que especialmente van dirigidos al NO que contribuye a la regulación del flujo sanguíneo en los vasos, y que además tiene la capacidad de contribuir a un mantenimiento de un estado saludable del feto durante todas las etapas de la gestación(64).

Adicionalmente hay otras sustancias que también son producidas por el endotelio y que están en todos los procesos fisiológicos de la gestación como: El PDGF, VEGF(65), PIGF, TGFB-1, ATP, la oxitocina, la Angiopoyetina (Ang) implicada en

la vasculogénesis, así mismo quinasas como la Akt, Proteína Quinasa C (siglas en inglés, PKC) moduladora de procesos celulares mediante rutas de señalización, Quinasas Reguladoras de Señales Extracelulares (siglas en inglés, ERK), Adenosina (Ado) y moléculas que incrementan el calcio intracelular como la histamina y el Péptido Relacionado con el gen de Calcitonina (siglas en inglés, CGRP), todos estos son algunos de los péptidos y proteínas que pueden inducir la activación de la eNOS(66).

Desde la fecundación, el óxido nítrico interviene en la formación del embrión, participando en el proceso de implantación del blastocisto(67), así mismo está íntimamente relacionado con la proliferación y diferenciación de células trofoblásticas, en los embarazos normales y en los que hay alteraciones debido a enfermedades trofoblásticas, como coriocarcinoma, mola hidatidiforme parcial, completa, invasiva, entre otras(68).

Durante la gestación, la acción vaso-relajante debida al NO en la embarazada, brinda un flujo sanguíneo adecuado entre la madre y el feto(69). Además, las funciones de la eNOS están relacionadas con la salud de la madre, lo cual se ha demostrado en estudios realizados por diferentes grupos de investigación, en los que se ha determinado que alteraciones en la funcionalidad de la enzima tienen un fuerte nexo con enfermedades gestacionales, principalmente con la Preeclampsia(70-72).

En el primer trimestre de un embarazo normal, esta enzima constitutiva se expresa en el endotelio temprano primitivo e intermedio de los capilares vellosos y en las vellosidades trofoblásticas de la placenta(73). A medida que avanza el embarazo, la expresión en las células endoteliales se incrementa y gracias al NO y otras moléculas vasoactivas, la resistencia inicial de estos vasos sanguíneos, disminuye. Así, el NO interviene en la remodelación de las arterias uterinas espirales permitiendo un adecuado flujo sanguíneo materno-fetal(74).

Durante el periodo gestacional, los procesos de vasculogénesis y angiogénesis son fuertemente influenciados por el NO(75), el cual puede activarse por estimulación directa de la enzima o indirecta, gracias a varios tipos de factores de crecimiento como reguladores de ambos procesos(76) entre ellos VEGF, PDGF, PIGF, Ang-1 y Ang-2, el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (de sus siglas en inglés, bFGF), el Factor de Crecimiento epidérmico (de sus siglas en inglés, EGF), entre otros.

Se ha encontrado que uno de los desencadenantes de la preeclampsia es la disfunción endotelial(77, 78) y también se ha reportado que las células endoteliales provenientes de mujeres que padecen preeclampsia tienen mayor permeabilidad de esta monocapa celular(79). Este aumento de permeabilidad está asociado con una alteración en la distribución de las proteínas encargadas de realizar la unión entre las células endoteliales; También se encontró que las células endoteliales expuestas al suero de pacientes con preeclampsia incrementan su permeabilidad, al comparar con las células endoteliales que fueron expuestas a suero de mujeres

normales(80); y llama la atención que el plasma de mujeres con preeclampsia contiene altos niveles de lípidos peroxidados y de citoquina interleucina 8,(de sus siglas en inglés, IL- 8), los cuales pueden estar interfiriendo en la permeabilidad del endotelio. Sin embargo, se conocen las propiedades de la eNOS por medio de la producción del NO en todo el sistema vascular. Y el incremento de la permeabilidad del endotelio cuando disminuye la expresión de la encima NOS en la preeclampsia(81).

También se han encontrado altos niveles de homocisteína y dimethylarginina asimétrica (siglas en inglés, ADMA) en pacientes que desarrollaron preeclampsia en las primeras etapas de la gestación, y se sugiere que altos niveles en suero de homocisteína y ADMA son signo de la severidad del síndrome, además los elevados niveles de ADMA y los niveles constantes de eNOS en embarazadas con preeclampsia, sugieren que la deficiencia de NO en esta patología no es resultado de una disminución en la actividad o en los niveles de eNOS, sino que es el resultado de los elevados niveles de ADMA que es el inhibidor endógeno(82).

Se ha observado de manera consistente en varios estudios realizados por diferentes grupos, que los niveles de NO tienen una mayor bioactividad durante el periodo de gestación, pero que en procesos patológicos como la preeclampsia no ocurre lo mismo(83). En un ensayo clínico con pacientes que estuvieron sometidas a una ingesta de vitaminas se hallaron mayores niveles plasmáticos de H_2O_2 en pacientes con preeclampsia y menores niveles plasmáticos de NO al comparar con el grupo control, lo cual lleva a considerar que hay una respuesta compensatoria en el comportamiento de estas dos moléculas(72) y también se podría pensar en una relación estrecha entre los hábitos alimenticios de cada una de las pacientes y las variables bioquímicas y fisiológicas que presentan.

El incremento en la expresión de eNOS en tejidos placentarios de pacientes preeclámpticas podría estar relacionado con la severidad del síndrome(84)

Otros autores han encontrado en pacientes preeclámpticas una disminución en NO y en cGMP y un aumento en los niveles plasmáticos de endotelina – 1 (ET- 1) la cual se encarga de contrarrestar los efectos vasodilatadores del NO produciendo vasoconstricción lo que nos lleva a concluir que un desbalance entre NO y endotelina – 1 (ET – 1) podría estar desempeñando un rol fisiopatológico importante en el desarrollo de la preeclampsia(85).

Se ha encontrado que la dimetil-arginina asimétrica (de sus siglas en inglés: ADMA) que inhibe a la eNOS, juega un papel importante ya que en procesos patológicos como la preeclampsia esta se encuentra aumentada(86) y contribuye a la disminución de NO. Así mismo otros autores encontraron en pacientes con preeclampsia un marcado aumento en ADMA y en homocisteína y niveles bajos de NO (87).

El balance que proporciona el NO a todo el sistema vascular especialmente en la placenta es muy importante por sus efectos vasoactivos dentro de todo el funcionamiento de la misma, cabe resaltar que en embarazos normales la presencia

del NO es elevada y que estos aumentos parecen jugar un papel importante en la vasodilatación renal en esta etapa(88), sin embargo el papel específico del NO en la patogénesis de la preeclampsia está siendo estudiado desde muchos puntos de vista, entre ellos los polimorfismos en el gen de eNOS encargado de la producción del NO(89).

3.3 FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y PREECLAMPSIA.

Las placentas de pacientes que padecen preeclampsia se caracterizan por tener un menor número de mitocondrias, siendo estas muy importantes en el papel de aportar energía a la placenta(90).

Estas organelas citoplasmáticas propias de las células eucariotas, desempeñan un importante papel en la producción de energía útil para la célula, a partir del metabolismo de los carbohidratos y la oxidación de los ácidos grasos. También las mitocondrias participan en procesos como: apoptosis y regulación del calcio intracelular, y procesos de señalización. Posee la singularidad de tener su propio ADN (ADNmt) el cual cuenta con características especiales tales como herencia materna, poca recombinación y alta tasa de mutación, que hace estas organelas muy particulares. Gracias a las características de las mitocondrias, se han hecho diferentes estudios de filogenética y linaje, que han dilucidado el origen de diferentes poblaciones y han relacionado mutaciones propias de las mitocondrias de grupos poblacionales, con protección o riesgo a padecer diferentes patologías. A lo largo del tiempo se han evidenciado enfermedades que afectan la función mitocondrial y por tanto se ve afectada la función celular.

Su tamaño y forma varían considerablemente dependiendo del tipo y del estado metabólico de la célula, pero en general son elipsoides de aproximadamente 0.5µm de diámetro y 10µm de largo. La cantidad de mitocondrias en una célula depende de la función que desempeña, de tal forma que las células eucariotas típicas, contienen más de 2000 mitocondrias, sin embargo las células con elevada demanda energética como por ejemplo las células musculares, tienen muchas más mitocondrias puesto que desarrollan trabajos intensos, comparados con células poco activas como las epiteliales(91).

Las mitocondrias cuentan con un sistema de membranas, compuesto por una membrana externa que contiene una gran cantidad de moléculas porinas, que le dan una apariencia de tamiz, el cual permite el paso de moléculas menores de 10 kilodaltons; y una membrana interna, que se encuentra ampliamente plegada formando crestas que se extienden hacia el interior de la matriz mitocondrial, el número de crestas varía con la actividad respiratoria de cada tipo de célula. La membrana interna está compuesta por un 75% de proteínas y 25% de lípidos y es impermeable a la mayoría de moléculas que atraviesan la membrana externa, es altamente especializada gracias a su composición fosfolípida de cardiolipina y de proteínas de transporte y con actividad enzimática, que la hacen muy selectiva. Ambas membranas definen dos compartimientos: la mencionada matriz interna y el espacio intermembrana que las separa entre sí(91).

La matriz mitocondrial posee el genoma mitocondrial que es DNA circular de doble cadena que codifica proteínas mitocondriales; otras proteínas de la mitocondria son codificadas por el genoma nuclear de la célula y se sintetizan en el citoplasma) posee ribosomas, mRNAs, rRNAs, para la síntesis mitocondrial de proteínas codificadas en el genoma mitocondrial. contiene las enzimas del metabolismo energético es decir, las que metabolizan el piruvato y los ácidos grasos hasta acetil CoA y las que oxidan el acetil CoA en el ciclo del ácido cítrico, produciendo principalmente CO₂ que se elimina de la célula y moléculas reductoras (FADH y NADH) que son los sustratos para la cadena de transporte de electrones(91).

La COX se encuentra en la membrana interna mitocondrial y juegan un papel esencial en la fosforilación oxidativa, proceso por el cual se produce la mayor cantidad de ATP de la célula animal. La membrana interna mitocondrial también contiene sustratos, iones y cofactores inorgánicos(92).

Además existen otras funciones en las que se involucra a las mitocondrias como son la producción de precursores para la síntesis de diferentes biomoléculas como aminoácidos, ácidos grasos, glucosa, etc. y la síntesis del 10% de proteínas mitocondriales(92).

Recientemente se ha visto que esta organela tiene participación importante en el proceso de la apoptosis celular o muerte celular programada. Consiste en un colapso celular que comienza con la formación de burbujas en la membrana plasmática y conlleva la fragmentación de proteínas, condensación de la cromatina, disminución del volumen celular y la degradación del ADN. El proceso termina con la aparición de fragmentos celulares rodeados de membrana denominados cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos evitan la salida del contenido intracelular que puede ser dañino para las células colindantes y son fagocitados rápidamente por macrófagos circulantes evitando la respuesta inflamatoria. En las gestantes con preeclampsia se ha encontrado que hay un incremento en la tasa de apoptosis en las células de la placenta debido a la hipoxia, al daño en la perfusión sanguínea y al aumento en los radicales libres que también son precursores de apoptosis(92).

El ADN mitocondrial es una molécula circular, que presenta una gran economía debido a una información muy compacta y a que sus genes no tienen intrones. Cuenta con 16.569 pares de bases, que incluyen 37 genes dentro de una región codificante que representa el 90% del total de la molécula. Estos 37 genes corresponden a: 13 subunidades del sistema de fosforilación oxidativa, 2 RNAs ribosomales (rRNAs), y 22 RNAs de transferencia (tRNAs). Adicionalmente 11.000 pares de bases a lo largo de un fragmento cuya función es principalmente regulatoria o de control que es polimórfica y presenta dos regiones hipervariables bien caracterizadas, definidas por Vigilant *et al.* En 1989 y conocidas como la *región hipervariable I* (HVI) y *II* (HVII). La región control se extiende desde la posición 16.024 hasta la 16.569 y desde la 1 hasta la 576.

Las dos cadenas complementarias tienen una proporción de C y G muy diferente, por lo que tienen un peso molecular muy distinto, existe una hebra rica en purinas

que es la cadena pesada o H (*heavy*) y la cadena complementaria rica en pirimidinas conocida como cadena liviana o L (*light*).

El ADNmt ha sido extensamente utilizado para estudios de evolución humana, migración e historias poblacionales. Éste amplio uso es debido a las características únicas del ADNmt que lo hacen preferible para estudios evolutivos. Esas características incluyen un alto número de copias, herencia materna, y una tasa de mutación generalmente más alta que la del ADN nuclear(92).

Anteriormente se había mencionado que las mitocondrias están aumentadas en la placenta de mujeres preeclámpicas y producen mayores cantidades de radicales libres de oxígeno, a cuyos efectos los organelos son más sensibles. Este fenómeno puede relacionarse con la mayor actividad de peroxidación lipídica que presentan las mitocondrias de las pacientes preeclámpicas(93).

Las alteraciones mitocondriales ocurren en varios desordenes incluidos procesos de proliferación benignos y malignos, igualmente en estados inflamatorios(94), la actividad metabólica de la placenta se soporta mediante el incremento en los procesos mitocondriales que aportan energía(95), los daños en estos procesos llevan a un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno(95) contribuyendo al daño placentario que se evidencia en patologías como la preeclampsia e insuficiencia en el crecimiento intrauterino.

La disfunción mitocondrial también representa un factor crítico en casos de programación fetal y de insuficiencia placentaria(95) en embriones de ratón, la función mitocondrial alterada afecta subsecuentemente el crecimiento del feto y de la placenta(96) y la restricción calórica materna en ratas induce fallas en la función mitocondrial placentaria induciendo la restricción del crecimiento fetal y placentario(97).

La alteración en el contenido mitocondrial se evidencia en un inadecuado aporte energético a la placenta y el consumo de oxígeno que esta requiere para mantener sus funciones fisiológicas no es el adecuado en respuesta a una pobre vascularización(98), lo anterior está sujeto a más estudios que permitan aclarar los mecanismos involucrados en el desarrollo de patologías placentarias.

Muralimanoharan (99), *et al.* Encontraron anomalías morfológicas significativas en las mitocondrias a nivel estructural de las placentas de gestantes con preeclampsia en contraste con los controles, también reportan una reducción en la actividad del complejo III, así como una disminución en la expresión proteica de los complejos I y IV, ellos sugieren un daño a nivel funcional en la mitocondria, el cual se relaciona directamente con el incremento en la producción de ROS.

MrRNAs han sido identificados como mediadores esenciales en numerosos procesos celulares(100) y se han asociado a hipoxia los siguientes: miR 23, miR 23, miR 26, miR 107 y miR 210 y son denominados “hypoxamirs” por su peculiar y estrecha relación con la hipoxia(101), pero cabe resaltar el rol de miR 210 modulando la producción de energía y el consumo de oxígeno en la disfunción mitocondrial en varios tipos de cáncer(102). Muralimanoharan, *et al*(99) encontraron

un incremento en la expresión de miR 210 en pacientes que desarrollaron preeclampsia e igualmente confirman la correlación existente entre la expresión de miR 210 y la hipoxia marcada en el síndrome.

La biogénesis mitocondrial que permite el incremento de las mitocondrias, es un término utilizado para describir la formación de mitocondrias durante el ciclo celular, estas se dividen durante la mitosis proporcionando a las células hijas sus respectivas mitocondrias, sin embargo se puede presentar división mitocondrial en situaciones que no estén ligadas al ciclo celular, como por ejemplo cuando se realiza ejercicio o en la ingesta de medicamentos como las benzodiazepinas, inhibidores de la fosforilación oxidativa, ingesta de calcio, hormonas tiroideas, estados de inflamación, infecciones y exposición a bajas temperaturas entre otros. Igualmente la biogénesis es un mecanismo en el cual participan muchos factores en el control de la expresión y replicación del genoma mitocondrial, transporte a la mitocondria de diversas proteínas codificadas por genes nucleares y mitocondriales que coordinan todos los procesos(103).

La mitocondria contribuye a varias funciones muy importantes como lo son: Oxidación Aeróbica, Metabolismo de combustibles, Oxidación de ácidos grasos, metabolismo de nitrógeno, biosíntesis de hemo, la mitocondria es el sitio de la cadena de transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa. En esta, es importante el mantenimiento de la integridad en sus procesos. Se ha relacionado un mal funcionamiento mitocondrial con varias enfermedades como la diabetes *mellitus* tipo 2, la resistencia a la insulina y la preeclampsia(103).

La NOS se encuentra en la mitocondria y el NO regula la respiración mitocondrial(104, 105). La mitocondria es capaz de generar tanto NO como O_2^- y en consecuencia, dependiendo de la cantidad de estos radicales, dar lugar a la formación de ONOO $^-$, que causa peroxidación en la mitocondria. El NO interactúa con el grupo hemo de la COX y produce una inhibición momentánea de esta enzima clave en la cadena respiratoria mitocondrial(106), la actividad mitocondrial se encuentra alterada en el trofoblasto de pacientes preeclámpticas(107, 108).

La enzima Citrato Sintasa es una enzima soluble ubicada en la matriz mitocondrial y se encarga de catalizar la condensación entre Oxaloacetato y Acetil CoA para producir Citrato y CoA en la primera reacción del Ciclo del ácido cítrico el oxaloacetato es regenerado después de completar el Ciclo de Krebs; El Oxaloacetato es el primer sustrato que se une a la enzima este induce a la enzima a cambiar su conformación y crea un sitio de unión para el Acetil – CoA, cuando el Citrato – CoA se ha formado la enzima sufre otro cambio conformacional que causa la hidrólisis del tioéster liberando Coenzima A, esto asegura que la ruptura generada por el enlace tioéster le produzca energía a la reacción. Esta enzima es codificada por el ADN nuclear. Es sintetizada por ribosomas citoplasmáticos y luego transportada a la matriz mitocondrial. La Citrato Sintasa se utiliza comúnmente como marcador enzimático cuantitativo para la presencia de mitocondrias intactas (109).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar los biomarcadores bioquímicos asociados con función endotelial y función mitocondrial placentaria en un grupo de primigestantes diagnosticadas con preeclampsia

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Comparar los niveles de expresión de la proteína eNOS como biomarcador de función endotelial en un grupo de primigestantes diagnosticadas con preeclampsia vs. Un grupo control.

Comparar la actividad de las enzimas citrato sintasa y citocromo c oxidasa (COX) como biomarcadores de función mitocondrial placentaria en un grupo de primigestantes diagnosticadas con preeclampsia vs. Un grupo control.

5 METODOLOGÍA.

5.1 HIPÓTESIS

Existe asociación del estado de la función endotelial y de la función mitocondrial con la placentación y la función placentaria de primigestantes con preeclampsia.

5.2 DISEÑO METODOLÓGICO.

Para el presente estudio se analizaron muestras de placenta almacenadas del banco de tejidos y suero generado como parte de los objetivos del proyecto “Efecto de la complementación con micronutrientes y del ejercicio físico durante la gestación sobre factores maternos y placentarios relacionados con enfermedades crónicas no transmisibles” financiado por Colciencias/Universidad del Valle/FES (Cód. 11064592).

1. Las placentas de las primigestantes que participaron en este estudio fueron recogidas inmediatamente en el momento del parto.
2. se realizaron 6 cortes del lado materno de la placenta.
3. se le realizaron lavados con suero fisiológico con el fin de eliminar la mayor cantidad de sangre posible.

Este material fue preservado a -70 °C hasta el momento del estudio.

5.3 SELECCIÓN DE MUESTRAS.

Se tomaron como casos aquellas madres diagnosticadas con preeclampsia de acuerdo a los criterios clínicos del personal de salud de la IPS donde fue atendido el parto, el diagnóstico fue registrado de acuerdo con la base de datos del mencionado estudio.

Los casos y los controles de este estudio procedieron del grupo control del estudio anteriormente mencionado, las determinaciones se realizaron en ciego, finalizado el desarrollo de las determinaciones se desenmascaro el estudio y se procedió a realizar los análisis estadísticos.

Y los datos antropométricos y clínicos que se reportan en el presente trabajo son parte de la base de datos del proyecto ya mencionado.

5.4 DETERMINACIONES BIOQUIMICAS.

5.4.1 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CS.

La actividad de CS fue determinada utilizando un kit comercial de marca Sigma código No CS0720 en una solución de mitocondrias obtenida de tejido de placenta por medio del proceso que se describe a continuación:

5.4.1.1 Preparación de homogenizado de placenta y cuantificación de proteína total.

1. Se tomaron 500 mg de tejido placentario, en 3 ml de buffer CelLityc marca Sigma – Aldrich código del producto 3228. con inhibidor de proteasas complete de Roche código del producto 04693116001 ROCHE. La muestras se homogenizaron y luego se sonicaron durante 10 segundos con una amplitud de 30m y en baño frío a 4°C para ruptura celular con obtención de una solución de tejido homogénea, se incubó en baño frío por 30 min. Centrifugación a 1000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se tomó para medir la concentración de proteínas.
2. Por medio de la técnica de ácido bicinonínico con kit de la casa comercial Sigma en placa de 96 pozos teniendo en cuenta los siguientes pasos:

-Preparación reactivo de trabajo (W): Mezcla de 50 partes de reactivo A más una parte de reactivo B hasta obtener el color verde claro.

Tabla 1. Soluciones para la curva de calibración (200µg/ml 1000µg/ml).

Tubos	1	2	3	4	5	6
Concentración (µg/ml)	0	200	400	600	800	1000
Solución proteína estándar (µl)	0	12	24	36	48	60
Buffer de lisis (µl)	60	48	36	24	12	0

Se adicionaron 25 µL de cada estándar y de cada muestra en los pozos. Se adicionaron 200 µl de la solución W, Se incubó por 30 min a 37°C. Se leyó la absorbancia a 562nm.

5.4.1.2 Lectura de la actividad enzimática de CS.

Buffer de ensayo 1x para CS = se descongeló el buffer de ensayo para CS 5X y se mezcló hasta obtener una solución homogénea, luego se diluyó una alícuota de buffer 5 veces con agua.

Solución 30mM de Acetyl CoA = Se disolvió el contenido del vial comercial en 1 ml de agua y se mezcló lentamente hasta obtener una solución homogénea.

Solución 10mM de Oxaloacetato (OAA) = Se disolvieron 1,3 mg de (OAA) en 1 ml de buffer de ensayo 1X.

Solución DTNB 10mM= Se disolvió el contenido del vial en 1 ml de etanol absoluto.

La enzima CS cataliza la reacción entre Acetil Coenzima A (acetil CoA) y el ácido oxaloacético (OAA) para formar ácido cítrico. El Acetil CoA aporta 2 carbonos a los 4 carbonos del oxaloacetato produciendo citrato con 6 carbonos. La hidrólisis del

tioester de Acetil CoA resulta en la formación de CoA con un grupo Tiol (CoA – SH). El Tiol reacciona con el DTNB, en la reacción se mezcla para producir ácido 5 –tiol – 2 – nitrobenzoico (TNB). Este producto amarillo (TNB) se observa espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 412 nm.

Reacción catalizada por Citrato Sintasa =



Reacción colorimétrica:



Tabla 2. Soluciones para la actividad enzimática de CS.

Pozo	Descripción	Muestra	Buffer ensayo 1x	Solución 30mM Acetil CoA	Solución 10mM DTNB	Solución 10mM OOA Se Adiciona de ultima.
1-3	CellLytic muestra	8ul	178ul	2ul	2ul	10ul
7-9	Citrato Sintasa control Positivo	2 ul	184ul	2ul	2ul	10ul

Para medir la actividad de Citrato Sintasa en placa de 96 pozos:

1. Se graduó el lector del plato a 412nm y se realizó la lectura durante 1.5 minutos con intervalos de 10 segundos.
2. Se calentó la solución de ensayo a 25°C antes de iniciar la reacción y se mezcló suavemente.
3. Se preparó la reacción mezclando el contenido de buffer ensayo 1x, solución 30mM Acetil CoA, Solución 10mM DTNB y muestra.
4. Se leyó la absorbancia de la mezcla preliminar por 1.5 minutos para establecer la línea de base.
5. Se adicionaron 10ul de solución 10mM OOA a cada pozo para iniciar la reacción y se mezcló la placa por 10 segundos antes de iniciar la reacción.
6. Se midió la absorbancia de la reacción por 1.5 minutos con intervalos de 10 segundos.
7. Se calculó la actividad de la CS usando la siguiente ecuación:

$$\text{"unidades}(\mu(\text{mole/ml})/\text{min}) = \frac{(\Delta A_{412})/\text{min} \times V(\text{ml}) \times \text{dil}}{\epsilon^{\text{mM}} \times L(\text{cm}) \times V_{\text{enz}}(\text{ml})}$$

dil : factor de dilución de la muestra.

V(ml) : volumen de la reacción, para placa de 96 pozos 0,2 ml

Venz (ml) el volumen de la muestra en ml

ϵ^{Mm} ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) la constante del coeficiente de TNB a 412 nm es de 13.6.

5.4.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE COX.

La actividad de COX fue determinada utilizando un kit comercial de marca Sigma código No CYTOCOX1 en una solución de mitocondrias obtenida de tejido de placenta por medio del proceso que se describe a continuación:

5.4.2.1 Extracción de mitocondrias de placenta:

Soluciones para extracción de mitocondrias:

Buffer MSH: (ph: 7.4).

Manitol (210 Mm): $250\text{ml} \times \frac{0.21\text{mol}}{1000\text{ml}} \times \frac{182.172\text{g}}{1\text{mol}} = 9.56\text{g}.$

Sacarosa (70mM).

$250\text{ml} \times \frac{0.07\text{mol}}{1000\text{ml}} \times \frac{342.296}{1\text{mol}} = 5.99\text{g}$

HEPES (5 mM).

$250\text{ml} \times \frac{0.005\text{mol}}{1000\text{ml}} \times \frac{260.3\text{g}}{1\text{mol}} = 0.325\text{g}.$

Buffer MSHE (ph:7.4):

Manitol= 0.56g

Sacarosa= 5.99g

Hepes= 0.325g

EDTA (1mM)

$250\text{ml} \times \frac{0.001\text{mol}}{1000\text{ml}} \times \frac{292.254\text{g}}{1\text{mol}} = 0.073\text{gr}$

PBS

Tabla 3. Soluciones para preparación de PBS.

Reactivo	Concentración	
	1X	10X
NaCl	137	1370
KCl	2.7	27

Na₂HPO₄	10	100
KH₂PO₄	2	20

Se realiza el siguiente proceso para obtener la suspensión de mitocondrias:

- 1 Se descongelo y se pesó el tejido.
- 2 Homogenizar con buffer MSH: se utiliza con una relación de 1:3 (1gr de tejido por 3ml buffer). La homogenización se realizó con homogenizador de vidrio potter elvehjem a 4°C.
- 3 Centrifugación a 3720 rpm/10 min a 4°C, se obtuvo sobrenadante (S1) y pellet (P1)
- 4 Recuperación del sobrenadante (S1) y centrifugación del mismo a 6070rpm/10min a 4°C, Se obtiene S2 y P2.
- 5 El sobrenadante (S2) se centrifugó a 10500 rpm por 10min a 4°C y se obtiene P3 y S3 (este se descarta).
- 6 Se resuspende el P3 y el P2 en MSHE y corresponde a la suspensión de mitocondrias.

5.4.2.2 Actividad enzimática de COX:

Buffer de ensayo 1x: Se diluyó una alícuota de buffer de ensayo 5x.

Buffer de dilución de la enzima 1x: Se diluyó con agua. una alícuota de buffer de dilución de la enzima 2x.

Dithiotheritol (DTT) Solución 0.1 M: Se diluyó una alícuota de 1M DTT diez veces con agua.

Ferrocitocromo C (0.22mM): se disolvieron 2.7 mg de citocromo C en 1ml de agua y luego se adicionó el DTT (5UL X ML).

Control positivo para Citocromo C Oxidasa: Se diluyó la muestra 10 veces con el buffer de dilución de la enzima 1x y se utilizaron 20 µl para cada reacción

Tabla 4. Soluciones para actividad enzimática COX.

	Buffer de ensayo (µl)	Buffer dilución de la enzima (µl)	Muestra (µl)	Sustrato de ferrocitocromo C (µl)
Blanco	950	100		50
Muestra	950	80	20	50
Control positivo	950	80	20	50

1. Se adicionaron 0.95ml de buffer de ensayo 1x en la cubeta y se ajustó a cero la absorbancia.
2. Se adicionó el volumen indicado por el kit de solución de enzima o de la suspensión de mitocondrias a la cubeta y se ajusta con 1.05ml de buffer de dilución de la enzima 1x y se mezcla suavemente.
3. Se inició la reacción con la adición de 50ul del sustrato ferrocitocromo C.
4. La lectura de la absorbancia se realizó a un (λ) de 550 nm durante un minuto.
5. Los valores esperados de la absorbancia estuvieron 0.001 y 0.005 A550/min. a λ =550
6. Se realizan los cálculos de la actividad de la muestra de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Units/ml} = \frac{\Delta A/\text{min} \times \text{dil} \times 1.1}{(\text{vol of enzyme}) \times 21.84}$$

$\Delta A \text{ min} = \Delta A \text{ minuto (muestra)} - A \text{ minuto (blanco)}$

dil = factor de dilución de la muestra de la enzima.

1.1 = volumen en ml de la reacción.

Vol of enzyme = volumen de la muestra en ml.

21.84 = $\Delta \epsilon^{\text{mM}}$ entre ferrocitocromo C y ferrocitocromo C a 550 nm.

Definición de la unidad: una unidad será oxidada a 1.0 μmol de ferrocitocromo C por minuto a un PH 7.0 a 25°C.

5.4.3 WESTERN BLOT DE eNOS EN PLACENTA.

5.4.3.1 Preparación de la muestra

Se tomaron 500 mg de tejido placentario, en 3 ml de buffer CellLityc con inhibidor de proteasas, la muestras se homogenizaron y se lisaron por ultrasonido. Se incubo en baño frio por 30 min y se centrifugación a 10000 rpm/ 10 min a 4 °C.

5.4.3.2 Cuantificación de proteínas en tejido de placenta para el Western Blot.

Se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante de cada muestra mediante la técnica de ácido bicinoninico (kit de SIGMA) en placa de 96 pozos con el siguiente procedimiento:

Preparación del reactivo de trabajo: Mezcla de 50 partes de reactivo A más una parte de reactivo B hasta obtener el color verde claro.

Tabla 5. Soluciones para la curva de calibración (200µg/ml 1000µg/ml) de Western Blot.

tubos	1	2	3	4	5	6
Concentración µg/ml	0	200	400	600	800	1000
Sln proteína estándar µl	0	12	24	36	48	60
Buffer lisis	60	48	36	24	12	0

1. Se adicionaron 25µl del blanco de cada estándar y de cada muestra en los pozos.
2. Se adicionaron 200µl de la Sln de trabajo (W).
3. Se incubo por 30 min a 37°C.
4. Lectura de absorbancia a 562nm.

De acuerdo con la cantidad de proteína obtenida se realizan los cálculos para determinar cuanta proteína se debe colocar en cada pozo con el fin de encontrar la mejor medida que brinde una buena separación de las proteínas en la electroforesis, para el caso de las muestras de placenta se encontró una mejor separación con una concentración de 50µg/µl.

5.4.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Se realizó la electroforesis en gel de Poliacrilamida al 10 %. Se utilizó el marcador de peso molecular pre teñido, bio rad catalogo # 161 -0373.

La electroforesis se llevó a cabo haciendo una pre-corrida de 30 min a 60 voltios y luego se aplicaron 125 voltios por 90min, se usó el sistema Mini-Protean II de Bio-Rad, empleando Tris-glicina (pH 8.8) como buffer.

5.4.3.4 Electro transferencia Blotting.

Culminado el proceso anterior y obtenido el perfil proteico, se recuperó el gel, esta vez se desechó la porción al 4% y el gel remanente, se situó sobre el soporte de nitrocelulosa, para proceder a realizar electro transferencia de las proteínas de placenta. La electrotransferencia se llevó a cabo a voltaje constante de 100 voltios por 90 minutos, se usó el sistema Mini-Protean II de Bio-Rad, empleando Tris-glicina (pH 8.6) como buffer a 4 °C.

5.4.3.5 Inmuno Blot.

La membrana de nitrocelulosa se incubó con rojo de Ponceau por 30min para verificar la transferencia de las proteínas y observar el patrón de separación. Tomando como referencia el Marcador de peso molecular, se realizaron cortes en la membrana teniendo en cuenta los pesos de las proteínas de interés eNOS (140 kDa), B-actina (38 kDa), esta última usada como control interno para normalizar los resultados. Los fragmentos de membrana, fueron lavados con buffer TBS y TBST por 5 min, tres veces con cada buffer respectivamente, luego se bloquearon con leche libre de grasa al 2% para evitar la fijaciones inespecíficas del anticuerpo primario, posteriormente se incubaron over-night (12hrs) con su respectivo anticuerpo policlonal marca Abcam, anti actina, cat: ab 129348, a una concentración de 1:2000, y anti eNOS, cat: ab 66127, a una concentración de 1:500. Se recuperó el anticuerpo y se realizaron los lavados con buffer TBS y TBST por 5 min, tres veces con cada buffer respectivamente, Luego cada membrana fue incubada con anticuerpo secundario HRP) (Santacruz) goat anti mouse IgG HRP cat: sc 2005 por 1 hora, el cual favorece la identificación de las proteínas de interés. Finalmente se retira el anticuerpo y aplican lavados con buffer TBS y TBST respectivamente.

5.4.3.6 Revelado.

En cuarto oscuro se procedió a aplicar luminol (ECL) a cada membrana con el fin de generar luminiscencia en las proteínas eNOS y B-Actina, se observó la presencia de bandas luminosas en cada carril de muestra a los 6 min y 1 minutos respectivamente. Para medir la intensidad de las bandas se expusieron las membranas a películas radiofotográficas o fotosensibles (Kodak) por 45 min para eNOS y 15 segundos para actina. Después se recuperaron las películas del casete y se llevaron a las soluciones de revelado. Estas películas fueron llevadas al escáner para digitalización de las imágenes, para luego cuantificar por densidad óptica utilizando el software libre Imagen J.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS versión 21, aplicando pruebas de normalidad (test de levine y shapiro wilk) para determinar la diferencia entre las medias de las variables clínicas y pruebas no paramétricas se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para la expresión de proteínas y actividad enzimática. Para determinar si existen asociaciones entre las variables y co-variables se usó la prueba de correlación de Spearman. Se tomó un valor de $P \leq 0,05$ como significativo.

5.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Las muestras de placenta manejadas en este estudio procedían de madres participantes del proyecto “Efecto de la complementación con micronutrientes y del ejercicio físico durante la gestación sobre factores maternos y placentarios relacionados con enfermedades crónicas no transmisibles” aprobado por el Comité de Ética en Investigación en Humanos (CEIH) de la Universidad del Valle (Acta No 017-08).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DE LAS GESTANTES

En la Tabla 1 se describen las características antropométricas de las gestantes y de las placentas. A la semana 32 de embarazo, la edad promedio de las embarazadas con preeclampsia fue de $21,2 \pm 3,1$ años y de las gestantes sanas fue de $21 \pm 3,5$ años. Al comparar el IMC de las gestantes que presentaron preeclampsia ($27,7 \pm 2,94$) con las gestantes sanas ($25,3 \pm 3,7$) encontramos un incremento del mismo en las gestantes que desarrollaron la patología.

Tabla 6. Características antropométricas de las gestantes

GRUPO	CONTROL (N=13)	PREECLAMPSIA (N=10)	VALOR- P
Edad (años)	21 ± 3,5	21,2 ± 3,1	0,9
Peso (Kg)	61,7 ± 10,4	65,9 ± 8,1	0,1
Talla (cm)	156 ± 4,5	154,1 ± 6,08	0,5
IMC (Kg/m²)	25 ± 3,7	27,7 ± 2,9	0,08
Edad gestacional (Sem)	39,3 ± 1,2	38,1 ± 1,2	0,04*
ETNIA			
Mestiza (%)	100	90	< 0,001*
Negra (%)	0	10	
Características de las Placentas			
Peso (g)	433,5 ± 106,9	436,0 ± 125,5	0,8
Diámetro (cm)	18,1 ± 0,9	18,10 ± 2,23	0,8
Grosor (mm)	1,3 ± 0,3	1,11± 0,2	0,08

*Test U de Mann-Whitney

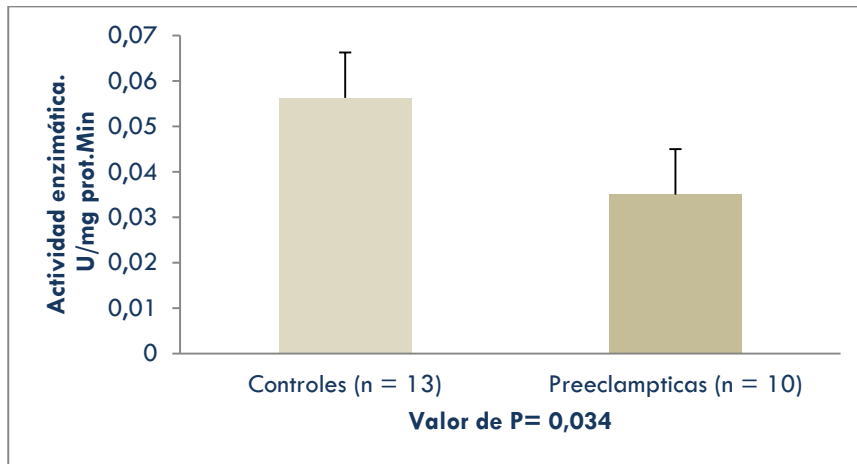
Valores presentados como la media $\pm$ Desviación estándar (SD).

*p<0.05 comparado con embarazadas normales.

6.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CS EN PACIENTES PREECLAMPTICAS

Con el objetivo de determinar la actividad enzimática mitocondrial de CS y comparar el mismo en las gestantes que desarrollaron PE se prepararon extractos de proteínas de tejido placentario de ambos grupos de pacientes (PE y sanas) Y se procedió a determinar su actividad usando la técnica de espectrofotometría en placa de 96 pozos.

Figura 1: Actividad enzimática de Citrato Sintasa en placenta de gestantes con pre eclampsia.



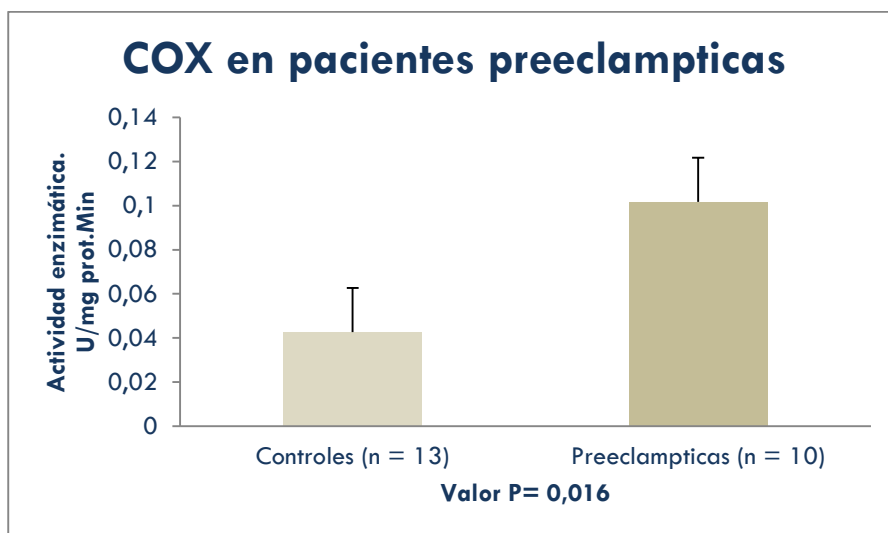
	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)
control	0,056	0,02
preeclampsia	0,035	0,0084

*Test U de Mann-Whitney.

6.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE COX EN PACIENTES PREECLAMPTICAS

Con el objetivo de determinar la actividad enzimática mitocondrial de COX y comparar el mismo en las gestantes que desarrollaron PE se prepararon extractos de proteínas de tejido placentario de ambos grupos de pacientes (PE y sanas); Y se procedió a determinar su actividad enzimática usando la técnica de espectrofotometría.

Figura 2: Actividad enzimática Citocromo C Oxidasa en placenta de gestantes con preeclampsia.



	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)
control	0,042	0,020
preeclampsia	0,1017	0,10

*Test U de Mann-Whitney

En el presente trabajo se estudió la asociación entre las variables resultado eNOS, CS, COX frente a co-variables antropométricas como edad, peso, talla, Índice de masa corporal (IMC) y características de la placenta (peso, diámetro y grosor) en cada grupo de estudio. Los resultados de las correlaciones para el grupo de gestantes sanas no evidenciaron ningún tipo de correlación entre las variables, los resultados de las correlaciones para el grupo de gestantes con preeclampsia se muestra a continuación. (Tabla 2).

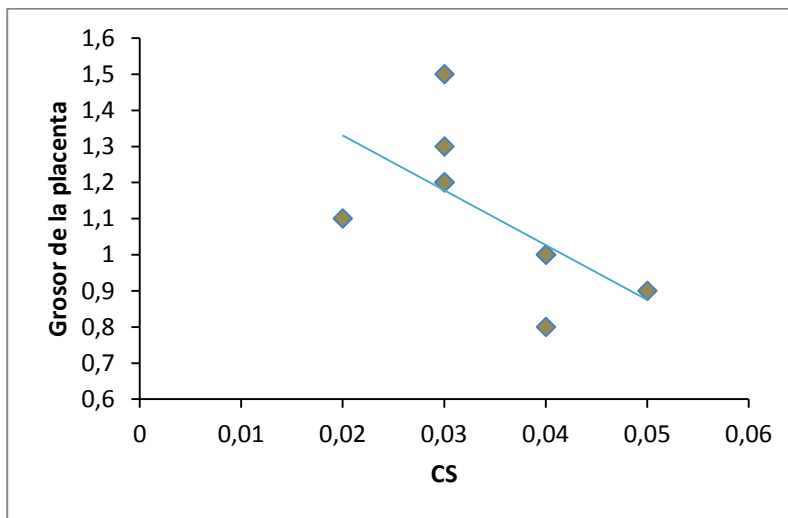
Tabla 7. Correlación de eNOS, COX y CS con co-variables en el grupo de gestantes que sufrieron Preeclampsia.

Variable	eNOS		COX		CS	
	r*	P	r*	P	r	Valor-p
Edad	-0,389	0,26	0,160	0,657	-0,468	0,173
Peso	-0,383	0,308	-0,224	0,533	-0,194	0,591
Talla (cm)	-0,067	0,853	-0,597	0,068	-0,306	0,390
IMC	-0,364	0,300	0,334	0,345	0,139	0,701

Edad gestacional		-0,543	0,104	0,148	0,682	0,240	0,504
Diámetro de placenta	de	-0,156	0,711	-0,651	0,080	0,046	0,914
Grosor de la placenta	de	0,235	0,542	0,436	0,239	-0,733	0,025
Peso de placenta	de	-0,383	0,308	-0,466	0,205	0,469	0,201

*coeficiente de correlación de Spearman.

Figura 3: Correlación del grosor de la placenta vs. CS



6.4 EXPRESIÓN DE eNOS EN LAS PACIENTES PREECLAMPTICAS

Con la finalidad de determinar la presencia de la enzima eNOS y comparar su expresión se prepararon extractos de proteínas de tejido placentario de ambos grupos de pacientes (PE y sanas) para realizar los estudios de Western Blot.

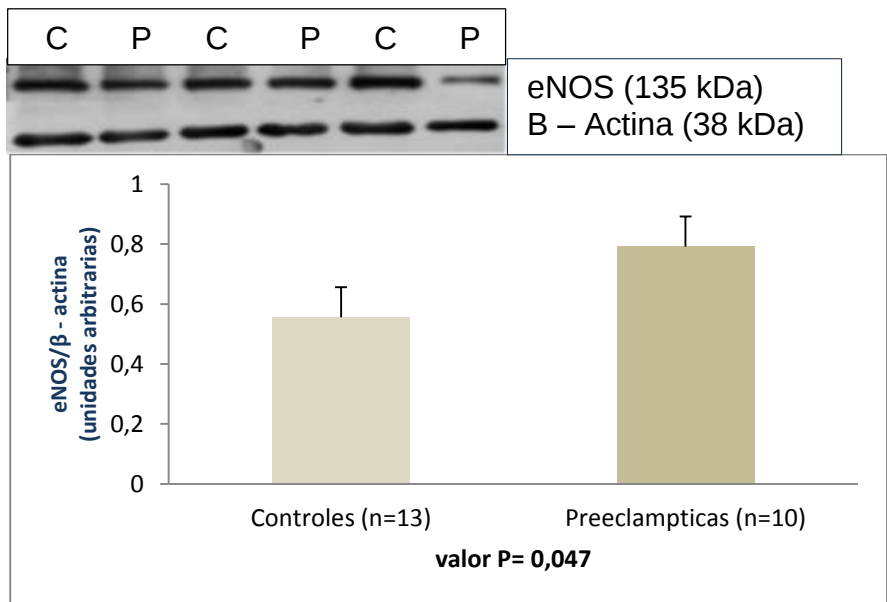
Para la detección de las bandas correspondientes a las proteínas eNOS y β – actina, en la membrana de nitrocelulosa se realizó la inmunodetección de estas proteínas en cada uno de los extractos de placenta de pacientes sanas y con PE como se describe en materiales y métodos.

Con los resultados obtenidos se elaboraron los gráficos mostrados en la figura 2 en los cuales se observa una mayor expresión en los extractos de placenta de pacientes con PE que en aquellos de placentas sanas.

La cuantificación de proteínas por Western Blot muestra para eNOS una banda de 135 kDa, para β -actina, la banda aparece a 38 kDa. No se observan bandas

inespecíficas en el inmuno blot Fig 1. Se utilizó el mismo tejido de placenta como control positivo.

Figura 4: Western blot en placenta para determinar la expresión de eNOS en las pacientes preeclámpticas.



PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)
control	0, 56	0,36
preeclampsia	0,79	0,2

*Test U de Mann-Whitney

P: Preeclampsia, C: Control.

7 DISCUSIÓN

La PE es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materno fetal y es una patología que afecta entre el 2 y el 7% de todas las embarazadas en el hemisferio occidental, aunque la incidencia en otras áreas geográficas, con características étnicas y sociales diferentes, puede llegar a ser mayor(110). Su etiología aun esta por establecerse aunque se han deducido numerosas causas que tratan de explicar la enfermedad.

En esta patología se observa un estado de mayor coagulopatía que se evidencia con el incremento de fibrina y de todo el sistema fibrinolítico, con la activación de las plaquetas y con una disminución en el recuento de las mismas; Las pruebas de rutina para evaluar la coagulopatía intravascular diseminada, tienen un valor limitado en la población con preeclampsia, pero pruebas más sofisticadas como: la determinación de antitrombina III, la trombina – antitrombina complejo III, Dimero D y Beta – tromboglobulina muestran una coagulopatía en pacientes con preeclampsia. Estos cambios hemostáticos son probablemente el resultado de un daño en la función endotelial(111).

Se ha propuesto que el NO tiene una relación estrecha con los mecanismos de vasodilatación y angiogénesis placentaria y que una alteración en el metabolismo de este compuesto podría estar relacionada con las alteraciones vasculares de la PE (112). Todos los cambios fisiológicos que se producen debido a las alteraciones en la disponibilidad del NO son responsables del incremento en el estrés oxidativo, el cual se va a ver involucrado en el daño endotelial.

En la presente investigación, se encontró que la expresión de eNOS se encuentra aumentada en las pacientes con PE cuando las comparamos con las pacientes sanas (Figura.1.). Estos resultados están en concordancia con las de varios investigadores, quienes han reportado un incremento en la producción de NO en la circulación placentaria, fetal y/o materna en estados de PE(113, 114).

Shaamash *et al*, (115) encontraron que tanto la actividad de la NOS como la concentración de los productos finales de NO en placenta fueron significativamente más altos en el homogeneizado de placentas con PE, al compararlas con las del embarazo normal, ellos sugieren que este hallazgo se debe a la severidad del síndrome y mencionan que estos cambios resultan de respuesta adaptativa al incremento en la resistencia vascular placentaria para minimizar la adhesión de leucocitos a la superficie de las vellosidades placentarias o dentro de los espacios intervillosos.

En un estudio realizado en mujeres venezolanas (84) preeclámpicas encontraron un incremento en la expresión de eNOS cuando compararon con las gestantes pertenecientes al grupo control. Este incremento probablemente se deba a una respuesta a la elevada presión arterial, por el papel del NO como vasodilatador y el incremento del NO se podría estar dando como una respuesta compensatoria al incremento en la presión arterial. A pesar de ello, no se está generando una

respuesta vasodilatadora por el NO en la PE, por lo que probablemente hay un daño en el endotelio en los pacientes con esta patología.

Ellos plantean que el aumento en la expresión de eNOS se debe al incremento del estrés por roce, causado por la corriente sanguínea sobre el endotelio, en una situación de hipertensión, lo cual conduciría al aumento del NO (116). Además se ha demostrado en bovinos que el estrés por roce genera una fosforilación en la serina ⁶³⁵ (ser ⁶³⁵) de la proteína eNOS localizada en la región autoinhibitoria (residuo 596 – 647). Esta fosforilación podría provocar remoción de la autoinhibición, permitiendo el flujo de electrones entre los dominios reductasa y oxigenasa y además, una disminución del requerimiento de Ca⁺² y calmodulina (CaM) para la activación de la enzima lo que produce un aumento de su actividad.

En contraste con nuestros resultados Kim *et al.* 2006 (117) reportan una disminución en la expresión de eNOS de las pacientes con preeclampsia al comparar con las gestantes sanas lo que podría estar ejerciendo un efecto adverso sobre la hemodinamia de la placenta. La validación de esta hipótesis se observa con la administración de un medicamento donante de NO el cual va a mejorar las ondas anormales que se observan en el Doppler y a reducir la resistencia vascular útero – placentaria característica en esta patología

En el presente trabajo se realizaron determinaciones de actividad enzimática mitocondrial con el objeto de explorar el comportamiento de las enzimas CS y COX y poder comparar dicha actividad en pacientes con PE.

En el presente estudio, se encontró que la actividad de COX se encuentra aumentada en las pacientes con PE cuando las comparamos con las pacientes sanas (figura 3). Gran parte de la reducción biológica del oxígeno se lleva a cabo en la mitocondria, específicamente en las enzimas que hacen parte de la cadena de transporte de electrones. El COX juega un papel importante en este proceso, ya que contribuye manteniendo un gradiente electroquímico de protones(118).

El ON es un inhibidor de la COX, con la característica de que se revierte completa y rápidamente(119, 120), se sugiere que esta particularidad puede ser un control funcional de la respiración celular(121).

Las mitocondrias de pacientes con PE producen mayor cantidad de ROS debido a que la placenta se expone a mayor estrés debido al fluido anormal de sangre por la arteria espiral, lo cual genera en la placenta un daño generalizado en el que se liberan factores deletéreos para todo el tejido.(122) afectando también la cantidad de mitocondrias y demás organelas celulares del tejido de placenta en las mujeres con PE(93).

La cantidad de ROS modula la función mitocondrial, proceso que podría estar relacionado con la regulación de la actividad de la enzima COX de las gestantes con PE (106, 123). Matsubara *et al* estudiaron la actividad de COX en sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto de mujeres con preeclampsia y realizaron la comparación con gestantes sanas, encontrando una baja actividad enzimática de COX en las placentas de pacientes con PE. Sugieren que existe una estrecha

relación entre la capacidad energética mitocondrial de la placenta y la patología de la preeclampsia, y enfatizan en que la fisiopatología de dicho síndrome aun no es clara.(108).

En la placenta de mujeres con diagnóstico de preeclampsia, la actividad de COX tiende a ser mayor, en contraposición a la actividad de CS, lo que lleva a pensar en que al verse disminuida la cantidad de mitocondrias estas deberían de producir mayor energía con lo cual se ve incrementado su funcionamiento.

Torbergson *et al.* Fue el primero en reportar una alta incidencia de preeclampsia en una familia con patologías que se relacionaran con disfunción mitocondrial(124), esto lleva a la hipótesis que un defecto en la función mitocondrial podría ser el agente causal de la preeclampsia(90).

Por otra parte, cuando evaluamos la actividad enzimática de CS encontramos una menor actividad en las gestantes que desarrollaron PE (figura 2) y también podemos inferir que el conteo de mitocondrias en los extractos de placenta de gestantes con PE pudo ser menor al comparar con los extractos de placentas de gestantes sanas. La anterior inferencia se hace debido a que la actividad enzimática de CS es un indicador del contenido mitocondrial(125).

Illsinger *et al.*(126) encontraron una menor actividad enzimática de COX y de CS de las pacientes con PE, cuando compararon con las pacientes sanas. Estos autores proponen que la función mitocondrial está fuertemente relacionada con el desarrollo de esta patología. Pero la razón por la cual se altera la función mitocondrial aun no es clara. En principio, el defecto principal se puede estar dando a nivel genómico. La expresión de los genes mitocondriales es regulada por varios factores que son codificados a nivel nuclear como: factores de respiración nuclear (NRF-1, NRF-2), Coactivador 1^a del receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas (PGC-1 α) y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR- α). Las alteraciones en cualquiera de estos factores regulatorios podrían explicar los hallazgos que comprometen la función mitocondrial.

En el presente estudio se encontró una correlación negativa entre el grosor de la placenta y la actividad enzimática de CS, lo cual podría estar relacionado con la capacidad aeróbica del tejido y su papel en el paso de nutrientes al feto, que para nuestro conocimiento, esta correlación no ha sido reportada por otros investigadores (Tabla 7 del presente documento). La correlación entre el grosor de la placenta y la actividad de CS podría estar relacionada con una respuesta compensatoria al flujo anormal de sangre y a la regular placentación, con el objetivo de mejorar las funciones fisiológicas de la placenta.

El estudio de la función mitocondrial y la función endotelial en la PE, podría dar un aporte importante en la detección temprana de dicha patología ya que como se mencionó en un principio, las pruebas diagnósticas que existen en este momento se limitan a los cambios hemodinámicos típicos de esta enfermedad los cuales ocurren con la severidad del síndrome. En este orden de ideas, biomarcadores de

función mitocondrial como CS y COX y biomarcadores de función endotelial como eNOS podrían ser claves para la prevención temprana de esta patología.

8 CONCLUSIONES.

En la placenta de mujeres con diagnóstico de preeclampsia, los niveles de eNOS tienden a ser más elevados al comparar con las gestantes sanas.

En la placenta de mujeres con diagnóstico de preeclampsia, la actividad de COX tiende a ser mayor, en contraposición a la actividad de CS.

9 PERSPECTIVAS

Las perspectivas que este estudio presenta a corto tiempo están encaminadas a realizar las siguientes determinaciones:

- Western blot de PGC 1 α . (coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma).
- Western blot de tFAM. (factor de transcripción mitocondrial A).
- Malondialdehído en homogenato de placenta por medio de HPLC.

Con el fin de profundizar en los mecanismos mitocondriales que están implicados en la patogénesis de la preeclampsia.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Mol BW, Roberts CT, Thangaratnam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2015.
2. Moodley J. Maternal deaths associated with hypertension in South Africa: lessons to learn from the Saving Mothers report, 2005-2007. *Cardiovasc J Afr*. 2011;22(1):31-5.
3. Benhamou D, Chassard D, Mercier FJ, Bouvier-Colle MH. [The seventh report of the confidential enquiries into maternal deaths in the United Kingdom: comparison with French data]. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2009;28(1):38-43.
4. Lopez-Jaramillo P, Casas JP, Serrano N. Preeclampsia: from epidemiological observations to molecular mechanisms. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(10):1227-35.
5. Valsamakis G, Kanaka-Gantenbein C, Malamitsi-Puchner A, Mastorakos G. Causes of intrauterine growth restriction and the postnatal development of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1092:138-47.
6. Roman H, Robillard PY, Hulse TC, Laffitte A, Kouteich K, Marpeau L, et al. Obstetrical and neonatal outcomes in obese women. *West Indian Med J*. 2007;56(5):421-6.
7. Nerenberg KA, Johnson JA, Leung B, Savu A, Ryan EA, Chik CL, et al. Risks of gestational diabetes and preeclampsia over the last decade in a cohort of Alberta women. *J Obstet Gynaecol Can*. 2013;35(11):986-94.
8. North RA, McCowan LM, Dekker GA, Poston L, Chan EH, Stewart AW, et al. Clinical risk prediction for pre-eclampsia in nulliparous women: development of model in international prospective cohort. *Bmj*. 2011;342:d1875.
9. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005;365(9461):785-99.
10. Conti E, Zezza L, Ralli E, Caserta D, Musumeci MB, Moscarini M, et al. Growth factors in preeclampsia: a vascular disease model. A failed vasodilation and angiogenic challenge from pregnancy onwards? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(5):411-25.
11. Tuffnell DJ, Jankowicz D, Lindow SW, Lyons G, Mason GC, Russell IF, et al. Outcomes of severe pre-eclampsia/eclampsia in Yorkshire 1999/2003. *Bjog*. 2005;112(7):875-80.
12. Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, Rana S. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2010;37(2):239-53.
13. Wright C, Sibley CP, Kay H, Nelson M, Wang Y. Placental transfer in health and disease. The placenta: from development to disease Hoboken (NJ): John Wiley and Sons. 2011;66.
14. Wang Y, editor Vascular biology of the placenta. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function; 2010: Morgan & Claypool Life Sciences.
15. Cross JC. Trophoblast function in normal and preeclamptic pregnancy. *Fetal and Maternal Medicine Review*. 1996;8:57-66.

16. Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2004;11(6):342-52.
17. Yuan SY, Rigor RR, editors. Regulation of endothelial barrier function. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function; 2011: Morgan & Claypool Life Sciences.
18. Sen S, Rao R, Chaudhuri G. Endothelial cell function in utero-placental circulation physiology and pathophysiology. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013;11(5):730-6.
19. Palacios M, Knowles RG, Palmer RM, Moncada S. Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;165(2):802-9.
20. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(13):5159-62.
21. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol.* 1987;92(1):181-7.
22. Ignarro LJ, Olson S, Garbán HJ. NO, NO y NO•: Óxido Nítrico en la Fisiología Vascular. *VITAE Academia Biomédica Digital.* 2002(13).
23. Alfieri AB. Óxido Nítrico: estudios sobre su papel como mediador en diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas. *Vitae: Academia Biomédica Digital [periódico online].* 2003;16:1-57.
24. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart.* 2001;85(3):342-50.
25. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(2):682-5.
26. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* 1991;351(6329):714-8.
27. Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(15):6711-5.
28. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280(2):F193-206.
29. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;357(Pt 3):593-615.
30. López-Jaramillo P. *Bioquímica del Endotelio Vascular: Implicaciones Fisiológicas y Clínicas.* Quinta edición ISBN 958-33-2224-5. Bogotá, Colombia. 2001.
31. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):lii27-32.
32. Weitzberg E, Lundberg JO. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide.* 1998;2(1):1-7.

33. Martinez-Ruiz A, Cadenas S, Lamas S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(1):17-29.
34. Forstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *Br J Pharmacol.* 2011;164(2):213-23.
35. Matsuda H, Iyanagi T. Calmodulin activates intramolecular electron transfer between the two flavins of neuronal nitric oxide synthase flavin domain. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1473(2-3):345-55.
36. Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem.* 1991;266(10):6259-63.
37. Kolluru GK, Siamwala JH, Chatterjee S. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie.* 2010;92(9):1186-98.
38. Viant D, Fonseca C, Rodríguez R, Anglada P. Óxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *Medisan.* 1998;2(3):45-53.
39. Mayer B, John M, Heinzl B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, et al. Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multi-functional oxidoreductase. *FEBS Lett.* 1991;288(1-2):187-91.
40. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
41. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989;2(8670):997-1000.
42. Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, et al. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol.* 1999;19(11):7289-304.
43. Parat MO. The biology of caveolae: achievements and perspectives. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2009;273:117-62.
44. Razani B, Lisanti MP. Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J Clin Invest.* 2001;108(11):1553-61.
45. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 2005;26(1-2):33-65.
46. Demosthenous M, Antoniadou C, Tousoulis D, Margaritis M, Marinou K, Stefanadis C. Endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall: Mechanisms regulating its expression and enzymatic function. *Artery Research.* 2011;5(2):37-49.
47. Rizzo V, McIntosh DP, Oh P, Schnitzer JE. In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem.* 1998;273(52):34724-9.
48. Boo YC, Kim HJ, Song H, Fulton D, Sessa W, Jo H. Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular localization. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(1):144-53.
49. Orías M. El papel de los canales de potasio en la regulación de la presión arterial. *Medwave.* 2005;5(07).
50. Durazo-Quiroz F. I. El óxido nítrico en medicina. *Gac Méd Méx.* 2007;143(5).

51. 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(1):R1-12.
52. Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(3):C499-508.
53. Dobson CM. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15(1):3-16.
54. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Balligand JL, Feron O. Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001;276(35):32663-9.
55. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*. 1996;79(5):984-91.
56. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399(6736):601-5.
57. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399(6736):597-601.
58. Ruiz MM. Participación de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 quinasa/Akt/sintasa endotelial del óxido nítrico en procesos de angiogénesis y remodelado vascular. *NEFROLOGÍA*. 2002;22(Suplemento 5).
59. Fleming I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):793-806.
60. Fox SB, Khong TY. Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study. *Placenta*. 1990;11(1):59-62.
61. Mandala M, Osol G. Physiological remodelling of the maternal uterine circulation during pregnancy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;110(1):12-8.
62. Cai WQ, Dikranian K, Bodin P, Turmaine M, Burnstock G. Colocalization of vasoactive substances in the endothelial cells of human umbilical vessels. *Cell Tissue Res*. 1993;274(3):533-8.
63. Yinon Y, Nevo O, Xu J, Many A, Rolfo A, Todros T, et al. Severe intrauterine growth restriction pregnancies have increased placental endoglin levels: hypoxic regulation via transforming growth factor-beta 3. *Am J Pathol*. 2008;172(1):77-85.
64. Groesch KA, Torry RJ, Wilber AC, Abrams R, Bieniarz A, Guilbert LJ, et al. Nitric oxide generation affects pro- and anti-angiogenic growth factor expression in primary human trophoblast. *Placenta*. 2011;32(12):926-31.
65. Ahmad S, Hewett PW, Wang P, Al-Ani B, Cudmore M, Fujisawa T, et al. Direct evidence for endothelial vascular endothelial growth factor receptor-1 function in nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res*. 2006;99(7):715-22.
66. De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp Mol Med*. 2012;44(1):1-9.
67. Thaler CD, Epel D. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Curr Pharm Des*. 2003;9(5):399-409.

68. Barut A, Harma M, Arikan I, Harma MI, Barut F. Endothelial nitric oxide synthase expression in gestational trophoblastic diseases. *Int J Gynecol Cancer*. 2010;20(3):337-40.
69. Poston L, McCarthy AL, Ritter JM. Control of vascular resistance in the maternal and feto-placental arterial beds. *Pharmacol Ther*. 1995;65(2):215-39.
70. Ahmed A. New insights into the etiology of preeclampsia: identification of key elusive factors for the vascular complications. *Thromb Res*. 2011;127 Suppl 3:S72-5.
71. Sharma D, Singh A, Trivedi SS, Bhattacharjee J. Intergenotypic variation of nitric oxide and inflammatory markers in preeclampsia: a pilot study in a North Indian population. *Hum Immunol*. 2011;72(5):436-9.
72. Aris A, Benali S, Ouellet A, Moutquin JM, Leblanc S. Potential biomarkers of preeclampsia: inverse correlation between hydrogen peroxide and nitric oxide early in maternal circulation and at term in placenta of women with preeclampsia. *Placenta*. 2009;30(4):342-7.
73. 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(5):487-94.
74. Osol G, Barron C, Gokina N, Mandala M. Inhibition of nitric oxide synthases abrogates pregnancy-induced uterine vascular expansive remodeling. *J Vasc Res*. 2009;46(5):478-86.
75. Pipili-Synetos E, Sakkoula E, Maragoudakis ME. Nitric oxide is involved in the regulation of angiogenesis. *Br J Pharmacol*. 1993;108(4):855-7.
76. Valdes G, Corthorn J. Review: The angiogenic and vasodilatory utero-placental network. *Placenta*. 2011;32 Suppl 2:S170-5.
77. Roberts JM, Redman CW. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet*. 1993;341(8858):1447-51.
78. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161(5):1200-4.
79. Wang Y, Gu Y, Granger DN, Roberts JM, Alexander JS. Endothelial junctional protein redistribution and increased monolayer permeability in human umbilical vein endothelial cells isolated during preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;186(2):214-20.
80. Zhang Y, Gu Y, Li H, Lucas MJ, Wang Y. Increased endothelial monolayer permeability is induced by serum from women with preeclampsia but not by serum from women with normal pregnancy or that are not pregnant. *Hypertens Pregnancy*. 2003;22(1):99-108.
81. Wang Y, Gu Y, Zhang Y, Lewis DF. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia: decreased endothelial nitric oxide synthase expression is associated with increased cell permeability in endothelial cells from preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190(3):817-24.
82. Laskowska M, Laskowska K, Terbosh M, Oleszczuk J. A comparison of maternal serum levels of endothelial nitric oxide synthase, asymmetric

- dimethylarginine, and homocysteine in normal and preeclamptic pregnancies. *Med Sci Monit.* 2013;19:430-7.
83. López-Jaramillo P, Narváez M, Felix C, Sosa C, Calle A, Nava E, et al. Decreased nitric oxide synthesis in Andean Ecuadorian women with pregnancy-induced hypertension. *Biology of Nitric Oxide.* 1992;376-9.
 84. Aleman I, Alex R, Ramirez M, Hung A, Ramirez C. [Endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in Venezuelan patients with pre-eclampsia]. *Invest Clin.* 2008;49(3):321-30.
 85. 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(2):112-7.
 86. Huang LT, Hsieh CS, Chang KA, Tain YL. Roles of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in pregnancy and fetal programming. *Int J Mol Sci.* 2012;13(11):14606-22.
 87. Demir B, Demir S, Pasa S, Guven S, Atamer Y, Atamer A, et al. The role of homocysteine, asymmetric dimethylarginine and nitric oxide in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol.* 2012;32(6):525-8.
 88. Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol.* 1997;272(2 Pt 2):R441-63.
 89. Dai B, Liu T, Zhang B, Zhang X, Wang Z. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: a meta-analysis. *Gene.* 2013;519(1):187-93.
 90. Widschwendter M, Schrocksnadel H, Mortl MG. Pre-eclampsia: a disorder of placental mitochondria? *Mol Med Today.* 1998;4(7):286-91.
 91. Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 2008;88(2):611-38.
 92. Hung TH, Chen SF, Liou JD, Hsu JJ, Li MJ, Yeh YL, et al. Bax, Bak and mitochondrial oxidants are involved in hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis in human placenta. *Placenta.* 29. England2008. p. 565-83.
 93. Morikawa S, Kurauchi O, Tanaka M, Yoneda M, Uchida K, Itakura A, et al. Increased mitochondrial damage by lipid peroxidation in trophoblast cells of preeclamptic placentas. *Biochem Mol Biol Int.* 1997;41(4):767-75.
 94. Colleoni F, Lattuada D, Garretto A, Massari M, Mando C, Somigliana E, et al. Maternal blood mitochondrial DNA content during normal and intrauterine growth restricted (IUGR) pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203(4):365.e1-6.
 95. Leduc L, Levy E, Bouity-Voubou M, Delvin E. Fetal programming of atherosclerosis: possible role of the mitochondria. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;149(2):127-30.
 96. Wakefield SL, Lane M, Mitchell M. Impaired mitochondrial function in the preimplantation embryo perturbs fetal and placental development in the mouse. *Biol Reprod.* 2011;84(3):572-80.
 97. Mayeur S, Lancel S, Theys N, Lukaszewski MA, Duban-Deweere S, Bastide B, et al. Maternal calorie restriction modulates placental mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency: putative involvement in fetoplacental growth defects in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304(1):E14-22.

98. Regnault TR, de Vrijer B, Galan HL, Wilkening RB, Battaglia FC, Meschia G. Development and mechanisms of fetal hypoxia in severe fetal growth restriction. *Placenta*. 2007;28(7):714-23.
99. Muralimanoharan S, Maloyan A, Mele J, Guo C, Myatt LG, Myatt L. MIR-210 modulates mitochondrial respiration in placenta with preeclampsia. *Placenta*. 2012;33(10):816-23.
100. Ivan M, Harris AL, Martelli F, Kulshreshtha R. Hypoxia response and microRNAs: no longer two separate worlds. *J Cell Mol Med*. 2008;12(5a):1426-31.
101. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2007;27(5):1859-67.
102. Devlin C, Greco S, Martelli F, Ivan M. miR-210: More than a silent player in hypoxia. *IUBMB Life*. 2011;63(2):94-100.
103. Clementi E, Nisoli E. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2005;142(2):102-10.
104. Clementi E, Brown GC, Foxwell N, Moncada S. On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(4):1559-62.
105. Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*. 1504. Netherlands2001. p. 46-57.
106. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 328. United States1996. p. 309-16.
107. Furui T, Kurauchi O, Tanaka M, Mizutani S, Ozawa T, Tomoda Y. Decrease in cytochrome c oxidase and cytochrome oxidase subunit I messenger RNA levels in preeclamptic pregnancies. *Obstet Gynecol*. 1994;84(2):283-8.
108. Matsubara S, Minakami H, Sato I, Saito T. Decrease in cytochrome c oxidase activity detected cytochemically in the placental trophoblast of patients with pre-eclampsia. *Placenta*. 18. England1997. p. 255-9.
109. Wang Y, Walsh SW. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta*. 1998;19(8):581-6.
110. Dekker G. The partner's role in the etiology of preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 57. Ireland2002. p. 203-15.
111. Perry KG, Jr., Martin JN, Jr. Abnormal hemostasis and coagulopathy in preeclampsia and eclampsia. *Clin Obstet Gynecol*. 1992;35(2):338-50.
112. Norman JE, Cameron IT. Nitric oxide in the human uterus. *Rev Reprod*. 1996;1(1):61-8.
113. Cameron IT, van Papendorp CL, Palmer RM, Smith SK, Moncada S. Relationship between nitric oxide synthesis and increase in systolic blood pressure in women with hypertension in pregnancy. *Hypertension in pregnancy*. 1993;12(1):85-92.
114. Baker PN, Davidge ST, Roberts JM. Plasma from women with preeclampsia increases endothelial cell nitric oxide production. *Hypertension*. 1995;26(2):244-8.
115. Shaamash A, Elsonosy E, Zakhari M, Radwan SH, El-Dien H. Placental nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production in normal pregnancy,

pre-eclampsia and eclampsia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2001;72(2):127-33.

116. Kublickiene KR, Lindblom B, Krüger K, Nisell H. Preeclampsia: Evidence for impaired shear stress-mediated nitric oxide release in uterine circulation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2000;183(1):160-6.

117. 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*. 27. England 2006. p. 438-44.

118. Babcock GT, Wikström M. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. 1992.

119. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*. 345. Netherlands 1994. p. 50-4.

120. Bolanos JP, Peuchen S, Heales SJ, Land JM, Clark JB. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J Neurochem*. 1994;63(3):910-6.

121. Sarti P, Giuffre A, Barone MC, Forte E, Mastronicola D, Brunori M. Nitric oxide and cytochrome oxidase: reaction mechanisms from the enzyme to the cell. *Free Radic Biol Med*. 34. United States 2003. p. 509-20.

122. Wang Y, Walsh S. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta*. 1998;19(8):581-6.

123. Sarti P, Forte E, Mastronicola D, Giuffre A, Arese M. Cytochrome c oxidase and nitric oxide in action: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta*. 1817. Netherlands: A 2011 Elsevier B.V; 2012. p. 610-9.

124. Torbergsten T, øian P, Mathiesen E, Borud O. Pre-eclampsia-a mitochondrial disease? *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 1989;68(2):145-8.

125. Bartha JL, Visiedo F, Fernandez-Deudero A, Bugatto F, Perdomo G. Decreased mitochondrial fatty acid oxidation in placentas from women with preeclampsia. *Placenta*. 33. England: 2011 Elsevier Ltd; 2012. p. 132-4.

126. Illsinger S, Janzen N, Sander S, Schmidt KH, Bednarczyk J, Mallunat L, et al. Preeclampsia and HELLP syndrome: impaired mitochondrial function in umbilical endothelial cells. *Reprod Sci*. 2010;17(3):219-26.