

---

---

## **Expresión de las óxido nítrico sintasas constitutiva endotelial e inducible en pacientes venezolanas con preeclampsia.**

*Ingrist Alemán<sup>1</sup>, Rixio Alex<sup>2</sup>, Margelis Ramírez<sup>1</sup>, Alida Hung<sup>1</sup> y Carlos Ramírez<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Cátedra de Bioquímica, Escuela de Medicina “José María Vargas”, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela y

<sup>2</sup>Maternidad Concepción Palacios. Caracas, Venezuela.

**Palabras clave:** Preeclampsia, óxido nítrico, óxido nítrico sintasa endotelial, eNOS, óxido nítrico sintasa inducible, iNOS.

**Resumen.** La preeclampsia (PE) es una enfermedad que se presenta en la segunda mitad de embarazo. Es una condición caracterizada por hipertensión, proteinuria y frecuentemente cierto grado de restricción del crecimiento intrauterino (RCIU). El óxido nítrico (ON) regula el flujo de sangre en la placenta humana, induce vasodilatación, inhibe la agregación plaquetaria, y previene la adhesión de plaquetas a las células endoteliales. En este trabajo se evaluó, en sangre periférica de mujeres embarazadas normales (n = 46) y con PE (n = 50), los niveles séricos de nitritos y se analizó la expresión de las óxido nítrico sintasas constitutiva endotelial (eNOS) e inducible (iNOS) en tejido placentario. Se observó un aumento significativo en la concentración sérica de nitritos en las pacientes con PE al compararlas con mujeres embarazadas normales ( $150,64 \pm 8,94$  vs  $40,62 \pm 1,65$   $\mu$ M,  $p < 0,00001$ ) y un aumento significativo en la expresión de las enzimas NOS (eNOS e iNOS) en las placentas de esas mismas pacientes, con respecto a las mujeres con embarazo normal (iNOS  $4,29 \pm 1,51$  vs  $0,59 \pm 0,13$ ; eNOS  $1,78 \pm 0,74$  vs  $0,46 \pm 0,22$ ,  $p < 0,005$ ). Nuestros resultados muestran que existe una relación entre los valores de nitritos en suero de sangre periférica y el análisis de la expresión de las enzimas eNOS e iNOS en extracto de proteínas de tejido de placenta.

## **Endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in Venezuelan patients with pre-eclampsia**

*Invest Clin 2008; 49(3): 321*

**Key words:** Preeclampsia, nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, eNOS, inducible nitric oxide synthase, iNOS.

**Abstract.** Preeclampsia (PE) is a disease that onsets in the second half of pregnancy. This condition is characterized by hypertension, proteinuria and, frequently, intrauterine growth restriction (IUGR). Nitric oxide (NO) regulates blood flow in the human placenta, it induces vasodilatation, inhibition of platelet aggregation and prevents adhesion of platelets to endothelial cells. In this work, nitrite levels were evaluated in the sera of peripheral blood of normal pregnant women ( $n = 46$ ) and women with PE ( $n = 50$ ); additionally, the expression of endothelial constitutive nitric oxide and inducible synthases (eNOS and iNOS, respectively) of placental tissues, were determined. An increased concentration of serum nitrites from patients with PE, in relation to normal pregnant women ( $150.64 \pm 8.94$  vs  $40.62 \pm 1.65$   $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.00001$ ) was observed. An increased expression of nitric oxide synthases (eNOS and iNOS), in the placental tissues of (PE) patients, as compared to that of normal pregnant women (iNOS  $4.29 \pm 1.51$  vs  $0.59 \pm 0.13$ ; eNOS  $1.78 \pm 0.74$  vs  $0.46 \pm 0.22$ ,  $p < 0.005$ ) was also observed. Our results show that there exists a relationship between serum nitrites concentration and the expression of eNOS and iNOS, as analyzed in protein extracts of placental tissues.

*Recibido: 26-07-2007. Aceptado: 31-01-2008.*

### **INTRODUCCIÓN**

La preeclampsia (PE) es una enfermedad que se presenta en la segunda mitad de embarazo y se caracteriza por hipertensión, proteinuria y frecuentemente por cierto grado de restricción del crecimiento intrauterino (RCIU). Lleva a nacimientos pretérmino y a infantes pequeños para su edad gestacional (1, 2). Es una enfermedad multifactorial que involucra, por igual, componentes inmunes, inflamatorio, citocinas, factores genéticos y vasculares (3-5). En la PE existe reducción de la perfusión de los órganos debido al vasoespasmo (1) y ocurre en 3-5% de los embarazos, es una causa importante de mortalidad materna en países

desarrollados y en países en desarrollo, tales como en Colombia, donde el 42% de las muertes maternas son atribuidas a este desorden (6). En Venezuela es la segunda causa de muerte por complicaciones del embarazo, y de acuerdo a los archivos de estadística, la prevalencia de la hipertensión en el embarazo fue de 7,7% (7).

El óxido nítrico (ON), es producido enzimáticamente por la óxido nítrico sintasa (NOS), la cual convierte la L-arginina en presencia de oxígeno en L-citrulina y ON. Se han aislados tres isoformas de óxido nítrico sintasa (NOS) cuyos genes se localizan en diferentes cromosomas: el gen *NOS1*, localizado en el cromosoma 12q24.2, codifica para una enzima neuronal constitutiva

(nNOS), el gen *NOS2* presente en el cromosoma 17qcen-q12 codifica para una isoforma inducible (iNOS) y el gen *NOS3* del cromosoma 7q35-36 codifica para una enzima constitutiva endotelial (eNOS) (8).

Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro*, que el ON es la molécula responsable de modular el flujo sanguíneo feto placentario y útero placentario (9), lo cual está asociado con la PE. Se ha propuesto que en embarazos normales hay un incremento en la generación de ON que mantiene la vasodilatación, y que un defecto en la síntesis, liberación o acción del ON podría producir las alteraciones vasculares observadas en la PE (10), lo que lleva a un incremento en el estrés oxidativo, perpetúa la disfunción de la NOS y eventualmente produce la combinación de sustancias para generar el síndrome clínico (11).

El objetivo del presente estudio fue evaluar los niveles de nitritos, medida indirecta del ON, en suero de sangre periférica de mujeres embarazadas sanas y con PE, y analizar las proteínas eNOS e iNOS en tejido placentario, esperando establecer una correlación entre ellas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección de pacientes

Se seleccionaron pacientes con edad promedio de 23 años y promedio de edad gestacional de 38 semanas, 46 embarazadas sanas (edad promedio:  $23,59 \pm 9,33$  años; edad gestacional:  $37,26 \pm 4,52$  semanas) y 50 embarazadas con PE (edad promedio:  $24,25 \pm 11,41$  años; edad gestacional:  $38,66 \pm 5,13$  semanas). Se excluyeron pacientes con enfermedad renal, hipertensión arterial crónica, anormalidad fetal, diabetes mellitus, desórdenes cardiovasculares y corioamionitis. Las embarazadas fueron incluidas en el estudio por presentar presión sanguínea de 140/90 mmHg o más alta, después de las 20 semanas de gestación, o por haber

excedido sus propios valores basales en 30 mmHg para la presión sistólica o 15 mmHg para la diastólica, comprobado en al menos dos tomas con 6 horas de intervalo; presentaron además proteinuria ( $> 300$  mg/24h) o el equivalente a dos cruces (++), en la prueba cualitativa de proteínas de orina, y presencia de edema (7). Tanto las pacientes como el grupo de mujeres sanas, fueron informadas de la toma de muestra y objeto del estudio, y se les solicitó llenar el consentimiento válido, el cual fue avalado por la comisión de Bioética de la Maternidad Concepción Palacios, Caracas, Venezuela.

### Determinación de óxido nítrico en suero

Se recolectaron muestras de sangre periférica de mujeres embarazadas. La extracción de la sangre se realizó al inicio del trabajo del parto o cesárea. Las muestras de sangre se colocaron en tubos de vidrio y se dejaron a temperatura ambiente hasta su coagulación. El suero se obtuvo por centrifugación por 15 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para el ensayo de nitritos.

La concentración de óxido nítrico fue medida indirectamente a través de la concentración de nitritos (un producto de la degradación del ON). Esta fue determinada con el kit de ensayo colorimétrico de Griess, reactivo no enzimático para óxido nítrico de Oxford Biomedical Research que utiliza el cadmio (Cd) para la conversión de nitrato en nitrito (12).

Los datos fueron procesados para obtención de un promedio de la media  $\pm$  desviación estándar. Se aplicó Test de Student para datos no pareados, para comparar los niveles de nitrito en suero de gestantes con PE y gestantes normotensas.

### Preparación de extractos de tejido placentario

Se tomó una muestra de aproximadamente 5 g en el centro de la placenta (coti-

ledones) por debajo de la inserción del cordón umbilical. Se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

Para la preparación de los extractos de proteínas totales se homogenizó 1 g del tejido de placenta en 2 mL de tampón (sacrosa 0,32 M, Hepes 20 mM, EDTA 0,5 mM y DTT 1 mM, leupeptina 3  $\mu\text{M}$ , pepstatina A 1  $\mu\text{M}$  y PMSF 1 mM). Se centrifugó a 12000 rpm por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en un rotor SS-34 de centrífuga Sorwall. Los sobrenadantes de proteínas fueron utilizados para los ensayos de la fracción de proteínas solubles. A partir de los precipitados se realizó la extracción de proteínas particuladas en tampón Tris pH 7,2 1M, EDTA 0,1 M, EGTA 0,1 M, mercaptoetanol 14,33 M y Glicerol 10% y CHAPS 20 mM (detergente zwitteriónico) y se incubó por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (13). Se resuspendió en un vortex y se centrifugó por 30 minutos a 15000 g. Los sobrenadantes de proteínas fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó como control positivo de la expresión de las NOS en estudio, cultivos de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) de mujeres embarazadas sanas, como se describe en Domínguez y col. (14). Se procedió a realizar los extractos de proteínas de células HUVEC tal como se describió anteriormente.

La concentración de proteínas de los extractos (proteínas solubles y particuladas) se determinó con el ensayo de proteínas basado en el método Micro BCA de Pierce (15).

#### Análisis de Western Blot

Se utilizaron alícuotas de extractos de 80  $\mu\text{g}$  proteínas para realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 8% y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de poro 0,45  $\mu\text{m}$  (SIGMA) en buffer de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% y SDS 10%) utilizando el método de "trans-blot" semiseco (Bio-

Rad) a un voltaje constante de 16 V durante 30 minutos. La calidad de la transferencia de las proteínas se verificó por tinción con Ponceau (16).

Las membranas fueron bloqueadas durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en solución bloqueante: TBS-T (1,21 g Tris, pH 7,5; 5,84 g de NaCl, 1 mL Tween-20) y 5% de leche descremada. Posteriormente las membranas se incubaron en solución bloqueante a temperatura ambiente por 1 h con agitación leve en presencia de los anticuerpos específicos para cada isoforma NOS: para eNOS, anticuerpo policlonal (1:250) e iNOS, monoclonal (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Cat. N° sc-654 y sc-7271 respectivamente) y para GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada), monoclonal (1/1000) (Chemicon, Cat. N° 401215). Las membranas se lavaron 6 veces por 5 minutos con agitación leve en tampón TBS-T a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas fueron incubadas 1 h con agitación leve a temperatura ambiente en solución bloqueante en presencia de anti-conejo-HRP (HRP: horseradish peroxidase) (1:500) para eNOS y anti-ratón-HRP para iNOS (1:1000) y GAPDH (1:2000) (Amershan). Nuevamente se realizaron 6 lavados como se describe anteriormente y las bandas inmunoreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia de acuerdo a las especificaciones del método Super signal (Pierce).

La determinación semi-cuantitativa de las intensidades de las bandas se realizó en las películas de rayos X obtenidas por inmunodetección de eNOS, iNOS y GAPDH utilizando el programa Kodak Digital Science. La intensidad neta de cada banda para eNOS e iNOS de cada una de las muestras se dividió entre la intensidad neta de banda para la GAPDH de la misma muestra. Esta relación se denominó "intensidad normalizada".

Los datos de intensidad normalizada de bandas tanto para eNOS como para

iNOS fueron procesados para obtención de la media  $\pm$  desviación estándar, tanto para pacientes sanas como con PE. Se aplicó Test de Student para datos no pareados.

### RESULTADOS

#### Concentración de nitritos en suero

Se determinaron las concentraciones de nitritos en muestras de suero de sangre periférica de 50 mujeres con PE y 46 mujeres sanas embarazadas. Al promediar los valores obtenidos por cada grupo se encontró que la concentración de nitritos en suero fue significativamente más alto en mujeres con PE que en mujeres con embarazo sano con un promedio  $\pm$  DS ( $150,64 \pm 8,94$  vs  $40,62 \pm 1,65 \mu\text{M}$ ,  $p < 0,00001$ ). Los resultados se representan en la Fig. 1.

#### Western Blot

Con la finalidad de determinar la presencia de las enzimas NOS 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, iNOS y GAPDH 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.

En la Fig. 2 se observó una banda de 140 kDa correspondiente a la proteína eNOS, de la fracción membranal solubilizada con CHAPS, tanto para los extractos de placentas sanas y PE (Fig. 2A). El control positivo para la expresión de eNOS (cultivos de células HUVEC) presentó una banda de 140 kDa. Asimismo se observaron dos bandas una de 130 y otra de 50 kDa correspondientes a la proteína iNOS, en la fracción soluble de los extractos de placentas sanas y PE (Fig. 2B). La banda de 45 kDa para

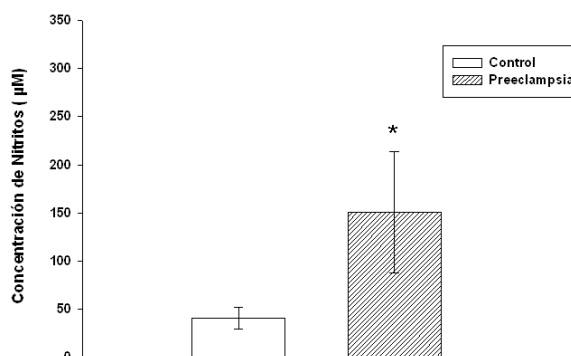


Fig. 1. Niveles de nitrito en suero de mujeres con PE (n=50) y mujeres sanas (n=46).

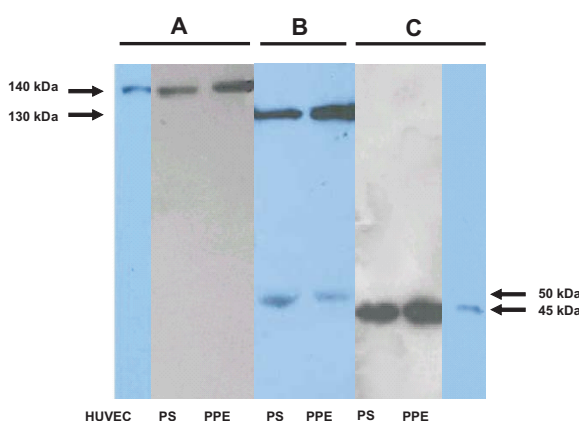


Fig. 2. Análisis de “Western Blot” para la expresión de eNOS, iNOS y GAPDH. HUVEC (células endoteliales de vena de cordón umbilical humano); PS: placenta de mujer sana; PPE: placenta de mujer con PE. 80  $\mu\text{g}$  de proteínas de tejido placentario de mujeres con PE y sanas fueron separadas por electroforesis en geles SDS-PAGE al 8% y los análisis de western blot con los anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios HRP-peroxidasa (materiales y métodos) permiten detectar bandas de 140 kDa eNOS, encontrada en la fracción particulada solubilizada con CHAPS (A), 130 kDa iNOS, fracción soluble (B) y 45 kDa GAPDH (C) en ambos grupos de pacientes. El control positivo para eNOS fue obtenido a partir de cultivo de células HUVEC. La banda pequeña de 50 kDa observada en iNOS (B) puede indicar presencia del dominio reductasa del isoforma iNOS.

GAPDH en la fracción soluble, que se utilizó como control interno en nuestros experimentos, fue obtenida tanto para placentas sanas como con PE igualmente en células HUVEC (Fig. 2C). En ninguno de los extractos de células de HUVEC utilizados se observó una banda del peso molecular esperado para la enzima iNOS.

### Determinación semi-cuantitativa de la expresión de las enzimas NOS

La determinación semi-cuantitativa se realizó en las muestras de extractos de placenta en los que se pudo detectar eNOS, iNOS y GAPDH, en ensayos diferentes con los correspondientes anticuerpos para cada una de las enzimas mencionadas sobre la misma membrana, realizando el lavado (*stripping*) de las membranas entre ensayos. Se analizó y se calculó un promedio de intensidad de banda para 5 muestras de extractos de proteína de placenta sana y 5 con PE para la enzima iNOS y 11 muestras de extractos de proteína de placenta sana y 8 con PE para eNOS.

Con los resultados obtenidos se elaboraron los gráficos mostrados en las Figs. 3 y 4. En ellos se observó una mayor expresión en los extractos de placenta con PE que en aquellos de placentas sanas, tanto para iNOS ( $4,29 \pm 1,51$  vs  $0,59 \pm 0,13$ ) como para eNOS ( $1,78 \pm 0,74$  vs  $0,46 \pm 0,22$ ). Esta diferencia para ambas proteínas fue estadísticamente significativa con una  $p < 0,005$ .

## DISCUSIÓN

La PE es una patología que afecta de un 2 a 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 cinco veces mayor (3, 4). Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materno-fetal. Su etiología es

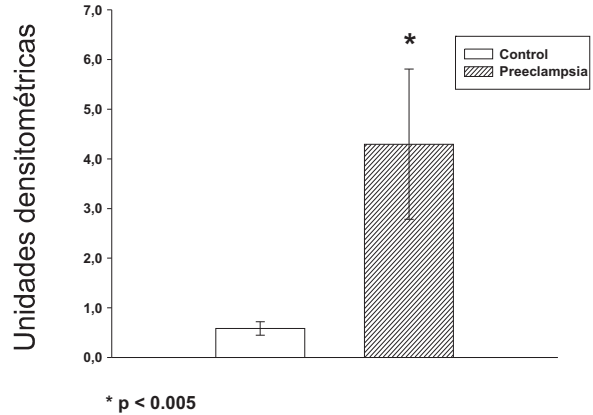


Fig. 3. Comparación de cambios en la expresión de iNOS en placenta sanas y con preeclampsia. La expresión de la iNOS se cuantificó a partir de la expresión de la proteína iNOS en relación a la expresión de la GAPDH (obtenidas por el software Kodak Digital Science) en placenta de pacientes con PE y controles. El promedio de cada grupo se obtuvo para cinco extractos de placenta. \* $p < 0,005$ .

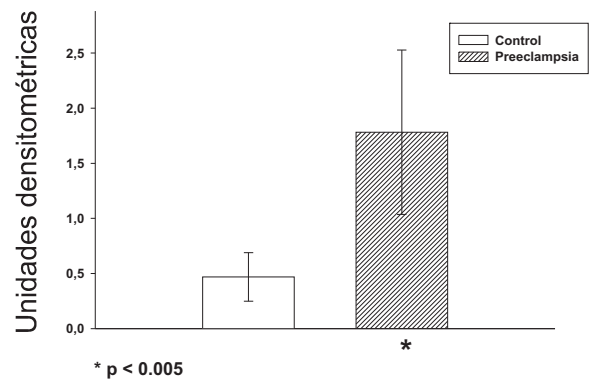


Fig. 4. Comparación de cambios en la expresión de eNOS en placentas sanas y con PE. La expresión de la eNOS se cuantificó a partir de la expresión de la proteína eNOS en relación a la expresión de la GAPDH (obtenidas con el software Kodak Digital Science) en placenta de pacientes con PE y controles. El promedio de cada grupo se obtuvo para 11 extractos de placentas normales y 8 de placenta con PE. \* $p < 0,005$ .

motivo de controversia y aún está por establecerse, aunque se han aducido numerosas causas para tratar de explicar la fisiopatología de la enfermedad.

Se ha propuesto que hay un incremento en la generación de ON que mantiene la vasodilatación en los embarazos normales, y que una alteración en la regulación de la síntesis, liberación o acción del ON podría producir las alteraciones vasculares observadas en la PE (10). Todo lo descrito, junto con la disminución de ON disponible, produce diferentes cambios, lo que lleva a un incremento en el estrés oxidativo, perpetúa la disfunción de las NOS y eventualmente produce la combinación de sustancias que genera el síndrome clínico (11).

En la presente investigación, encontramos que la concentración de nitritos en suero de sangre periférica se encuentra incrementada en mujeres con PE cuando la comparamos con las pacientes sanas (Fig. 1). Estos resultados están en concordancia con varios investigadores, quienes han reportado un incremento en la producción de ON en la circulación placentaria, fetal y/o materna en estados de PE (17-19). Smarason y col. (20) reportaron concentraciones significativamente más altas de nitratos en suero de sangre periférica de mujeres con PE. Ellos midieron la producción de ON en suero utilizando la reducción de nitratos por la nitrato reductasa y la detección de nitritos por la reacción de Griess.

Shaamash y col. (21) obtuvieron que tanto la actividad de las NOS como la concentración de los productos finales de ON en placenta fue significativamente más alta en el homogeneizado de placentas con PE, al compararlas con las de embarazo normal, de allí que, el incremento de la actividad de NOS y la producción de ON ha sido relacionada con la severidad de este síndrome.

Otros estudios han encontrado resultados diferentes a los nuestros. Seligman y col. (22) reportan niveles de nitritos en

plasma significativamente más bajos en PE. En un estudio en mujeres andinas ecuatorianas los niveles de nitratos urinarios y plasmáticos fueron bajos en mujeres que tenían hipertensión inducida por el embarazo (23). Teran y col. reportaron un aumento de ON, determinado por quimioluminiscencia, en embarazo normal en relación a embarazos con preeclampsia (24). Otros investigadores encontraron un incremento en la producción de ON durante el embarazo normal comparado con el embarazo con PE (25).

Es importante entender los mecanismos fisiopatológicos de la PE. Aunque la presión sanguínea elevada es una manifestación clínica, la PE no es solamente una hipertensión inducida en el embarazo, ya que se asocia a muchos factores que pueden conducir a una sobre expresión de las enzimas NOS, y por lo tanto a una mayor producción de ON.

Se detectó en las muestras de placenta para la iNOS una banda de 130 kDa y para eNOS una de 140 kDa (Fig. 2), tamaños semejantes a las encontradas por otros investigadores (13, 26, 27). Además, a pesar de que el anticuerpo primario para iNOS era monoclonal, observamos una banda de peso molecular pequeño (50 kDa). En el caso eNOS, sólo en dos de nuestros extractos de proteínas detectamos una banda de bajo peso molecular de aprox. 60 kDa (resultados no mostrados). Una posible explicación para la presencia de estas bandas, de bajo peso molecular, son los cortes de las enzimas NOS mediante proteasas durante la preparación de los extractos de proteínas. Posiblemente se necesitaban concentración o inhibidores diferentes ya que no fue suficiente para proteger a esas enzimas de la degradación proteolítica. De acuerdo con nuestros resultados, este corte pudo ocurrir en algún sitio dentro del dominio reductasa, ya que los anticuerpos primarios utilizados tanto para eNOS como para iNOS reconocen un

sitio en este dominio y las bandas obtenidas por nosotros presentan un peso molecular mas bajo que el reportado para el dominio reductasa completo (aprox. 74 kDa).

Estos resultados están en concordancia con los reportados por Bartlett y col. (28) quienes encontraron bandas para eNOS e iNOS de aproximadamente 47 kDa en extracto de tejido del miometrio. Estos autores justifican la aparición de estos fragmentos con el hecho de que las enzimas NOS son muy susceptibles a cortes proteolíticos durante la extracción y electroforesis. También Park y col. (13) a través de análisis de Western blot en testículo, intestino delgado, colon y placenta, encontraron para la iNOS, además de la banda de alto peso molecular, una más pequeña de 80 kDa. Ellos notaron que esta pequeña banda de 80 kDa era equivalente en tamaño al dominio reductasa y sugirieron que este dominio pudo haber sido cortado en el sitio de unión de calmodulina, lo que generaría la separación del dominio reductasa del dominio oxigenasa. Según Stuehr (29), el dominio reductasa presenta un tamaño de 74 kDa aproximadamente, valor que está muy cerca del tamaño reportado por Park y col. (13), para la banda de bajo peso molecular.

Cuando se estudió la expresión de eNOS y de iNOS en tejido de placenta de mujeres con PE, comparadas con las mujeres sanas (Figs. 3 y 4), se encontró un aumento significativo ( $p < 0,005$ ). Este aumento probablemente se deba a una respuesta a la elevada presión arterial, por el papel del ON como vasodilatador. Esta idea ha sido confirmada por el trabajo de Davidge y col. (30) para los que un incremento de ON en hipertensión en el embarazo es un mecanismo compensatorio de una presión sanguínea elevada. A pesar de ello, no se está generando una respuesta vasodilatadora por el ON en la PE, por lo que probablemente hay un daño en el endotelio en los pacientes con esta patología. En éste or-

den de ideas, Moncada y col. (9) demuestran que hay una disfunción endotelial, que se genera por un exceso de radicales libres del tipo peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ).

Se ha planteado que el aumento de la expresión de eNOS se deba al incremento de estrés por roce, causado por la corriente sanguínea sobre el endotelio, en una situación de hipertensión por lo que conduciría a un aumento de ON (31, 32). Además, se ha demostrado en bovino que el estrés por roce genera una fosforilación en la Ser<sup>635</sup> de la proteína eNOS localizada en el elemento autoinhibitorio (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  $\text{Ca}^{+2}$  y calmodulina (CaM) para la activación de la enzima lo que produce un aumento de su actividad (33).

En cuanto al incremento en la expresión de iNOS probablemente se deba a las condiciones de hipoxia presentes en la placenta. Diversos investigadores han estudiado esta última idea (34-37).

En nuestro trabajo existe una relación entre los niveles de nitritos en suero de sangre periférica y lo encontrado en la expresión de las enzimas (eNOS e iNOS) en extractos de proteínas de tejido de placenta. Se observó en ambos casos un aumento significativo en las pacientes con PE al compararlas con las de mujeres sanas.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Zury Domínguez, Cátedra de Fisiopatología del Instituto de Medicina Experimental, UCV, por su colaboración al suministrar los cultivos de células HUVEC. A la Dra. Enna Ciarletta y Dr. Iván Rodríguez, Cátedra de Bioquímica de la Escuela de Medicina "José María Vargas" por sus críticas oportunas en la revisión del trabajo.



## REFERENCIAS

1. **Herrera J, Hernández C, Bello F, Alex R, Téllez A, Herrera S.** Hipertensión inducida por el embarazo: revisión de la clasificación. Una nueva propuesta. En: Zíghelboim I, Guariglia D, eds. *Clínica Obstétrica*, Caracas, Disinlimed; p 451-454.
2. **Dekker G.** The partner's role in the etiology of preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2002; 57:203-215.
3. **Norris N, Perico N, Remuzzi G.** Mechanisms of disease: pre-eclampsia. *Nature Clin Pract* 2005; 1:98-114.
4. **Mohaupt M.** Molecular aspects of preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine* 2007; doi:10.1016/j.mam.2007.02.05
5. **López-Ramírez Y, Carvajal Z, Arocha-Piñango CL.** Parámetros hemostáticos en placenta de pacientes con embarazo normal y con preeclampsia severa. *Invest Clin* 2006; 47(3):233-240.
6. **López-Jaramillo P, Casas J, Serrano N.** Preeclampsia: from epidemiological observations to molecular mechanisms. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34:1227-1235.
7. **Weibezahn H, Serfati M, García M, Llovera A, Machado A, Fleitas F.** Hipertensión inducida por el embarazo en la Unidad de Sala de Partos: 1991-1993. *Rev Obstet Ginecol Venez* 1997; 57:237-242.
8. **Förstermann U, Boissel J, Kleinert H.** Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 1998; 12:773-790.
9. **Moncada S, Palmer R, Higgs E.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Am Soc Pharm Exp Ther* 1991; 143:109-141.
10. **Norman J, Cameron I.** Nitric oxide in the human uterus. *Rev Reprod* 1996; 1: 61-68.
11. **Lowe, D.** Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. *Nitric Oxide* 2000; 4(4):441-458.
12. **Schmidt H, Kelm M.** Determination of nitrite and nitrate by Griess reaction. In: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M, Stamler JS, eds), New York: Wiley. pp 491-497.
13. **Park C, Krishna G, Ahn M, Kang J, Chung W, Kim D, Hwang H, Lee J, Paik S, Cha Y.** Differential and constitutive expression of neuronal, inducible, and endothelial nitric oxide synthase mRNAs and proteins in pathologically normal human tissues. *Nitric Oxide* 2000; 4(5): 459-471.
14. **Merhi-Soussi F, Domínguez Z, Macovschi O, Dubois M, Savany A, Lagarde M, Prigent A.** Human lymphocytes stimulate prostacyclin synthesis in human umbilical vein endothelial cells. Involvement of endothelial ePLA2. *J Leukoc Biol* 2000, 68: 881-889.
15. **Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Klenk D.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.
16. **Hayner N, Driscoll J, Ferayorni L, Spies-Karotkin G, Jauregui H, Ponceau S.** A sensitive method for protein determination in freshly isolated and cultured cells. *J Tissue Cult Meth* 1982; 7:77-80.
17. **Cameron I, Van Papendorp C, Palmer R.** Relationship between nitric oxide synthesis and increase in systolic blood pressure in women with hypertension in pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 1993; 12:85-92.
18. **Davidge S, Billiar T, Roberts J.** Plasma nitrites and nitrates, stable end products of nitric oxide, are elevated in women with preeclampsia. In: *Proceeding of the 9th International Conference*. ISSHP 1994; p A60-A64.
19. **Baker P, Davidge S, Roberts J.** Plasma from women with preeclampsia increases cell nitric oxide production. *Hypertension* 1995; 26:244-248.
20. **Smarason A, Allman K, Young D, Redman C.** Elevated levels of serum nitrates, a stable end product of nitric oxide, in women with preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104:538-543.
21. **Shaamash A, Elsonosy E, Zakhari M, Radwan S, EL-Dien H.** Placental nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Gynaecol Obstet* 2001; 72(2):123-133.
22. **Seligman S, Abramson S, Young B, Bvyon J.** The role of nitric oxide in the patho-

- genesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 172:944-948.
23. **López-Jaramillo P.** Calcium, nitric oxide, and preeclampsia. *Semin Perinatol* 2000; 24(1):33-36.
  24. **Teran E, Escudero C, Vivero S, Molina G, Calle A.** NO in early pregnancy and development of preeclampsia. *Hypertension* 2006; 47(4): e17.
  25. **Choi J, Im M, Pai S.** Nitric oxide production increases during normal pregnancy and decreases in preeclampsia. *Ann Clin Lab Sci* 2002; 32:257-263.
  26. **Baylis S, Strijbos P, Sandra A, Russell R, Rijhsinghani A, Charles I, Weiner C.** Temporal expression of inducible nitric oxide synthase in mouse and human placenta. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(3):277-286.
  27. **Li H, Wallerath T, Förstermann U.** Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 2002; 7:132-147.
  28. **Bartlett S, Bennett P, Campa J, Denne W, Slater D, Mann G, Poston L, Poston R.** Expression of nitric oxide synthase isoforms in pregnant human myometrium. *J Physiol* 1999; 521(3):705-716.
  29. **Stuehr D.** Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 339-359.
  30. **Davidge S, Stranko C, Roberts J.** Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynaecol* 1996; 174:1008-1083.
  31. **Kublickiene K, Lindblom B, Krüger K, Nisell H.** Preeclampsia: Evidence for impaired shear stress-mediated nitric oxide release in uterine circulation. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:160-166.
  32. **De la Vega V, Rodríguez M, Quintana M.** La disfunción endotelial: Una propuesta hacia el cambio. <http://www.intermedicina.com/Publicaciones/Pub-08.pdf>. 14 de marzo del 2007.
  33. **Boo Y, Hwang J, Sykes M, Mitchell B, Kemp B, Lum H, Jo H.** Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser635 by a protein kinase A- depend mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H1819-H1828.
  34. **Keelan J, Mitchell M.** Cytokines, hypoxia, and preeclampsia. *J Soc Gynecol Invest* 2005; 12(6):385-387.
  35. **Takizawa T, Yoshikawa H, Yamada M, Morita H.** Expression of nitric oxide synthase isoforms and of nitric oxide in rat placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 282:C762-C767.
  36. **Palmer L, Semenza G, Stoler M, Johns R.** Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 1998; 274:L212-L219.
  37. **García R, López-Jaramillo P.** Reply to: Endotelial dysfunction and preeclampsia. *Am J Hypertens* 2007; 20(9):1027.