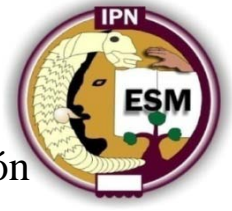




Instituto Politécnico Nacional  
Escuela Superior de Medicina  
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
DE LA ENZIMA ARGINASA  
DURANTE LA PREECLAMPSIA”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN FARMACOLOGÍA**

**P R E S E N T A :**

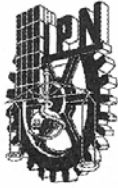
**NORMA ANGÉLICA HERNÁNDEZ SANTANA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. IVONNE MARÍA OLIVARES CORICHI**

**México, D.F.**

**2011**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12:00 horas del día 31 del mes de Octubre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

**"Evaluación de la Actividad de la enzima Arginasa durante la Preeclampsia"**

Presentada por la alumna:

<b>Hernández</b> Apellido paterno	<b>Santana</b> Apellido materno	<b>Norma Angélica</b> Nombre(s)
Con registro: <b>A 1 0 0 7 0 8</b>		

aspirante de:

**Maestría en Ciencias de Farmacología**

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

#### LA COMISIÓN REVISORA

Directora de tesis

**Dra. Ivonne Maria Olivares Corichi**

**Dra. Martha Cecilia Rosales Hernández**

**Dr. José Rubén García Sánchez**

**CALZADA MENDOZA  
CLAUDIA CAMELIA**

**Dra. Ruth Mery López Mayorga**

**Dra. Claudia Camelia Calzada Mendoza**

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

**Dr. Ejeazar Lara Padilla**



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
I.P.N.  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN  
CONTROL ESCOLAR



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México, D.F., el día 28 del mes Noviembre del año 2011, la que suscribe **Norma Angélica Hernández Santana** alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Farmacología con número de registro A100708, adscrita a la **Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Ivonne María Olivares Corichi** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Evaluación de la Actividad de la enzima Arginasa durante la Preeclampsia**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [nahs.amron@gmail.com](mailto:nahs.amron@gmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

**Norma Angélica Hernández Santana**  
Nombre y firma

*Esta tesis se realizó en:*

- ∞ Laboratorio de Bioquímica Inorgánica 102 de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional con la colaboración del especialista en Gineco-Obstetricia y M en C. José María Tovar Rodríguez del Hospital Juárez de México, del servicio de Gineco-Obstetricia.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de:

- ∞ Beca de maestría N° 332169 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**)
- ∞ Protocolo No 20100270 del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI)
- ∞ Protocolo No 20110240 del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI).

## AGRADECIMIENTOS



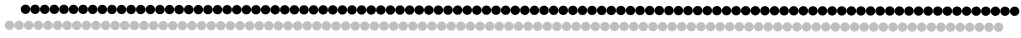
Agradezco a la Dra. Ivonne María Olivares Corichi por permitirme ser su alumna y por todo el apoyo profesionalmente y personalmente brindado para la realización del presente trabajo de investigación.

A los Doctores José Rubén García Sanchez, Claudia C. Calzada Mendoza, Ruth Mery López Mayorga, Martha Cecilia Rosales Hernández y José María Tovar Rodríguez por aceptar ser mis sinodales, por sus comentarios que enriquecieron el presente trabajo y por la confianza que me otorgaron.

A mis compañeros y amigos de la maestría, Mariana, Jazmin, Jessica, Elia y Said por todo su apoyo, por todos los momentos que compartimos tan gratos que llevaré conmigo toda la vida con mucho cariño.

A mis compañeras y amigas de laboratorio Liliana, María de Jesús y Brenda por su orientación y apoyo incondicional durante la realización del presente trabajo.

## DEDICATORIA



A mi mamá, por ser un ejemplo de fortaleza, lucha y sobre todo de amar la vida y no rendirse ante ningún obstáculo por más difícil que este sea. Te amo con todo mi corazón. Muchas gracias por escucharme, darme tanto amor y tantos consejos sabios que me has brindado.

A mi papá, por estar en todo momento a mi lado, por su amor incondicional y por ser una persona magnífica que admiro con todo mi ser. Mil gracias por todo lo que has hecho por mí, te lo agradeceré la vida entera. Te amo mucho.

A mi hermano Uri por ayudarme en el inglés y estar cuando lo necesito. A Linda por brindarme la satisfacción de estar con las chiquirrilis que quiero con todo mi ser.

A Jackie y Ani por quererme incondicionalmente y que con una mirada, una sonrisa o un abrazo hacen que se me olvide todo. Las quiero mucho hermosas.

A Lucy y a Kmen por apoyarme en todo momento y porque siempre han creído en mí.

A mi Abue y a todas aquellas personas importantes en mi vida que me brindaron sus consejos, cariño y que por cuestiones de espacio no puedo nombrar una por una.

GRACIAS

**ÍNDICE**

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>iii</b>
<b>Figuras</b> .....	<b>vi</b>
<b>Tablas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>viii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>x</b>
<b>I.INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
I.1. Trastornos Hipertensivos durante el embarazo.....	<b>1</b>
I.1.a. Clasificación.....	<b>1</b>
I.2. Preeclampsia.....	<b>2</b>
I.2.a. Definición.....	<b>2</b>
I.2.b. Epidemiología.....	<b>3</b>
I.2.c. Complicaciones.....	<b>4</b>
I.2.d. Factores de Riesgo.....	<b>4</b>
I.2.e. Cuadro clínico.....	<b>5</b>
I.2.f. Diagnóstico.....	<b>7</b>
I.2.g. Etiología.....	<b>8</b>
✓ Placentación anormal.....	<b>8</b>
✓ Disfunción endotelial.....	<b>9</b>
➤ Óxido Nítrico.....	<b>10</b>
▪ Estructura y Función.....	<b>10</b>
▪ Enzima óxido nítrico sintasa ( NOS ).....	<b>11</b>
▪ Síntesis de óxido Nítrico.....	<b>12</b>
✓ Estrés oxidativo.....	<b>14</b>
➤ Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno.....	<b>15</b>
➤ Defensas Antioxidantes.....	<b>18</b>
I.3. Disfunción endotelial y estrés oxidativo en la preeclampsia.....	<b>19</b>
I.4. Arginina.....	<b>20</b>
I.4.a. Estructura y función.....	<b>20</b>
I.4.b. Metabolismo de Arginina.....	<b>21</b>
I.5. Arginasa.....	<b>22</b>
I.5.a. Estructura y Función.....	<b>22</b>
I.5.b. Clasificación.....	<b>25</b>
I.6. Arginasa y síntesis de óxido nítrico.....	<b>26</b>
I.7. Arginasa e hipertensión.....	<b>27</b>



<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>29</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>30</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
V.1. Objetivo General.....	30
V.2. Objetivos Particulares.....	30
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
VI.1.a. Criterios de Selección de pacientes.....	31
VI.1.b. Tamaño de la muestra.....	32
VI.1.c. Diseño experimental.....	32
VI.1.d. Cuantificación de Proteínas.....	33
VI.1.e. Marcadores de estrés oxidativo.....	33
✓ Cuantificación de grupos carbonilo.....	33
✓ Cuantificación de productos de lipoperoxidación. Malondialdehído .....	34
✓ Cuantificación de grupos sulfidrilos totales.....	35
VI.1.f. Cuantificación de Nitritos/Nitratos.....	35
VI.1.g. Cuantificación de actividad de enzima Arginasa.....	36
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>X. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>49</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>50</b>





## ABREVIATURAS

**µl** - Microlitro

**•OH** - Radical Hidroxilo

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** – Oxígeno singulete

**ABH** - ácido 2(S)-amino-6-boronoheptanoico

**ACOG** – The American College of Obstetricians and Gynecologists

**ADMA** - Dimetil arginina asimétrica

**ANOVA (ANDEVA)** - Análisis de Varianza

**ASL** - Argininosuccinato liasa

**ASS** - Argininosuccinato sintasa

**ATP** – Adenosin Trifosfato

**BEC** - S-(2-boronoethyl)-L-cysteine

**BH<sub>4</sub>** - Tetrahidrobiopterina

**CID** – Coagulación Intravascular Diseminada

**dl** – Decilitro

**DNP** – 2,4-dinitrofenilhidrazina

**DPPNI** – Desprendimiento Prematuro de Placenta Normo Inserta

**DTNB** – 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico

**EE** – Error estándar de la muestra

**EGO** – Examen General de Orina

**EN** – Embarazo Normal

**eNOS** - Óxido Nítrico Sintasa endotelial

**ERN** – Especies Reactivas de Nitrógeno

**ERO** – Especies Reactivas de Oxígeno

**FAD** - Flavina adenina dinucleótido

**FMN** - Flavina adenina mononucleótido

**GMPc** – Guanidil Monofosfato cíclico

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de Hidrógeno

**Hb** - Hemoglobina

**Hto** - Hematocrito

**IMC** – Índice de Masa Corporal

**IMSS** – Instituto Mexicano del Seguro Social

**iNOS** - Óxido Nítrico Sintasa Inducible

**ISPF** – α-Isonitrosopropiophenone



**Kg.** - Kilogramo  
**L-Arg** – L-Arginina  
**L-NAME** - N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina metil ester  
**L-NMMA** - N<sup>0</sup>-mono-metil-L-arginina  
**L-NOHA** - N<sup>0</sup>-hydroxy-L-arginine  
**m** – Metro  
**MDA** - Malondialdehido  
**mg** – Miligramo  
**min.** - Minuto  
**ml** – Mililitro  
**mmHg** – Milímetro de mercurio  
**Mn** – Manganeso  
**MPI** – 1-Methyl-2-phenylindole  
**NADPH** - Nicotinamida adenina dinucleótido  
**NHBPEP** – National High Blood Pressure Education Program  
**nmol** - Nanomol  
**nNOS** - Óxido Nítrico Sintasa neuronal  
**NO<sup>•</sup>** – Óxido Nítrico  
**NO<sub>2</sub>** - Nitrito  
**NO<sub>2</sub><sup>•</sup>** – Dióxido de Nitrógeno  
**NO<sub>3</sub>** - Nitrato  
**NOS** - Óxido Nítrico Sintasa  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** - Anión Superóxido  
**OB** – Obesidad  
**OH<sup>-</sup>** - Ion Hidroxilo  
**OMS** – Organización Mundial de la Salud  
**ONOO<sup>-</sup>** - Peroxinitrito  
**PA** – Presión Arterial  
**PAD** – Presión Arterial Diastólica  
**PAS** - Presión Arterial Sistólica  
**PE** – Preeclampsia  
**RCIU** – Retraso en el Crecimiento Intrauterino  
**RL** – Radical Libre  
**rpm** – Revoluciones por minuto



**-SH** – Grupo tiol

**SOD** – Superóxido Dismutasa

**TCA** – Ácido Tricloroacético

**TGO** – Transaminasa Glutámico Oxalacética

**TGP** – Transaminasa Glutámico Piruvica

**VS** – Voluntarias Sanas



### *Relación de figuras:*

---

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Mortalidad Materna estimada al año 2007.	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Disfunción Endotelial	<b>10</b>
<b>Figura 3.</b> Reacción de la NOS, que produce NO <sup>•</sup> y Citrulina a partir de arginina	<b>12</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema que muestra el flujo de electrones en la eNOS acoplada y desacoplada	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b> Metabolismo de Arginina	<b>21</b>
<b>Figura 6.</b> Ciclo Citrulina/NO <sup>•</sup>	<b>22</b>
<b>Figura 7.</b> Centro binuclear de arginasa I de hígado de rata.	<b>23</b>
<b>Figura 8.</b> Mecanismo propuesto de arginasa humana I.	<b>23</b>
<b>Figura 9.</b> Estructura secundaria de arginasa.	<b>24</b>
<b>Figura 10.</b> Ribbon-plot del trímero de arginasa de rata.	<b>25</b>
<b>Figura 11.</b> Relación entre la actividad de arginasa y actividad de NOS.	<b>27</b>
<b>Figura 12.</b> Marcadores plasmáticos de estrés oxidativo.	<b>40</b>
<b>Figura 13.</b> Concentración de nitratos/nitritos (NO <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub> ).	<b>41</b>
<b>Figura 14.</b> Actividad de la enzima arginasa.	<b>41</b>
<b>Figura 15.</b> Correlación entre la actividad de la enzima arginasa y marcadores de estrés oxidativo.	<b>42</b>
<b>Figura 16.</b> Correlación entre metabolitos de NO <sup>•</sup> (NO <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub> ) y la actividad de la enzima arginasa.	<b>43</b>
<b>Figura 17.</b> Correlación entre la defensa antioxidante y la actividad de la enzima arginasa.	<b>43</b>

---



*Relación de tablas.*

---

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Factores de Riesgo en Preeclampsia.	<b>4</b>
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción	<b>19</b>
<b>Tabla 3.</b> Clasificación bioquímica de los antioxidantes	<b>19</b>
<b>Tabla 4.</b> Parámetros Clínicos de Embarazo Normal y Preeclampsia.	<b>38</b>
<b>Tabla 5.</b> Parámetros Clínicos de los cuatro grupos (EN, PE, OB y VS).	<b>39</b>
<b>Tabla 6.</b> Marcadores plasmáticos de estrés oxidativo y actividad de enzima arginasa	<b>42</b>

---



## RESUMEN

La Preeclampsia es la principal causa de mortalidad materno-fetal, caracterizada por hipertensión y proteinuria. Se ha descrito que la hipertensión es debida a la baja disponibilidad del óxido nítrico producido por la disfunción endotelial, estrés oxidativo y desacople de la óxido nítrico sintasa (NOS). Nosotros proponemos que otro posible evento ligado a baja disponibilidad del NO<sup>•</sup> es la actividad incrementada de la enzima arginasa; la cual, es una enzima que compite con la sintasa de óxido nítrico (NOS) por el sustrato L-arginina, como lo han mostrado reportes de otras enfermedades que cursan con hipertensión. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad de la enzima arginasa y su relación con el estrés oxidativo. Para ello participaron 4 grupos de mujeres: 1) voluntarias sanas (VS) con índice de masa corporal (IMC) de 18.5 a 24.9 Kg/m<sup>2</sup>; 2) con obesidad grado 1 (O1) con IMC 30 a 34.9; 3) con embarazo normal (EN); y 4) con preeclampsia (PE). El grupo 3 y 4 con embarazo de la semana 20 a la 40. El grupo PE fue captado en urgencias con presión arterial de 140/90 mmHg y proteinuria de 0.3 g de proteína en orina de 24 horas en 2 medicaciones con intervalo de 6 horas. Las edades de todas las participantes fueron entre 20 a 30 años sin ningún tratamiento. Se les tomó una muestra de sangre para obtener plasma, donde se determinó la actividad de enzima arginasa, así mismo se determinó daño por estrés oxidativo a lípidos mediante el método de 1-methyl-2-phenylindole y a proteínas cuantificando grupos carbonilos y como marcador de defensa antioxidante se cuantificaron grupos SH totales; además se realizó la cuantificación de nitritos/nitratos. Para analizar los resultados se utilizó ANOVA con una prueba pos hoc de Bonferroni. Los resultados fueron expresados como promedios +/- EE y se consideró significativo una  $p < 0.05$ . Donde resultó que todas las pacientes PE tenían obesidad en comparación a las de EN. También detectamos que las pacientes O1 y PE mostraron valores similares en la actividad de arginasa, la menor actividad se encontró en las pacientes O1 y PE ( $0.30 \pm 0.04$  y  $0.31 \pm 0.04$  nmol/mg proteína/minuto, respectivamente) en comparación con los grupos VS y EN ( $0.42 \pm 0.04$  y  $0.45 \pm 0.05$ , respectivamente). Interesantemente, hubo un comportamiento similar en los grupos SH ( $3.94 \pm 0.71$  y  $4.29 \pm 0.39$  nmol/mg proteína, respectivamente). Sin embargo, fueron valores menores a los grupos de VS y mujeres con EN ( $6.19 \pm 0.37$  y  $5.91 \pm 0.43$ , respectivamente), lo cual puede ser debido a las características oxidativas de la obesidad por las que cursan las pacientes preeclámpticas. Esta disminución de las concentraciones de SH puede ser debida a la nitración por parte de peroxinitrito, dando como resultado nitrosotioles.



Tomando en conjunto nuestros resultados apoyamos el papel del estrés oxidativo en la preeclampsia y su estrecha relación con la obesidad. Por lo que este trabajo abre la posibilidad de crear estrategias preventivas, por lo que se necesitan más estudios.



## ABSTRACT

Preeclampsia is the leading cause of maternal-fetal, characterized by hypertension and proteinuria. It has been reported that hypertension is due to the low availability of nitric oxide produced by endothelial dysfunction, oxidative stress and uncoupling of nitric oxide synthase (NOS). We propose that another possible event linked to low availability of NO<sup>•</sup> is the increased activity of the enzyme arginase, which is an enzyme that competes with nitric oxide synthase (NOS) for the substrate L-arginine, as shown by reports from other diseases with hypertension. The aim of this study was to evaluate the activity of the enzyme arginase and its relationship to oxidative stress. This involved four groups of women: 1) Healthy volunteer (HV) with Body Mass Index (BMI) of 18.5 to 24.9 Kg/m<sup>2</sup>, 2) Obese 1 (O1) with BMI of 30 to 34.9 (grade 1), 3) Normal pregnant (NP) women and 4) Pregnant women with preeclampsia (PE). Group 3 and 4 pregnancy week 20 to 40. The PE group was caught in the emergency room with blood pressure of 140/90 mmHg and proteinuria of 0.3 g of protein in urine for 24 hours in 2 mediations with an interval of 6 hours. The ages of all participants were between 20 and 30 years without any treatment. They provided a blood sample for plasma, which determines the arginase enzyme activity and damaged was also determined by oxidative stress to lipids by the method of 1-methyl-2-phenylindole and protein quantifying carbonyl groups as a marker of antioxidant defense total SH groups were quantified, also was realized the quantification of nitrite/nitrate. To analyze the results we used ANOVA with post hoc test of Bonferroni. The results were expressed as mean  $\pm$  EE and were considered significant at  $p < 0.05$ . Where the results showed that all PE patients were obese compared with NP. We also detected that the O1 and PE patients showed similar values for arginase activity, less activity was found in the O1 and PE ( $0.30 \pm 0.04$  and  $0.31 \pm 0.04$  nmol/mg protein/minute, respectively) than in HV and NP ( $0.42 \pm 0.04$  and  $0.45 \pm 0.05$ , respectively). From Interesting way, there was a similar pattern in the total SH group ( $3.94 \pm 0.71$  and  $4.29 \pm 0.39$  nmol/mg protein, respectively) however, these values were lower than HV and NP ( $6.19 \pm 0.37$  and  $5.91 \pm 0.43$ , respectively), which may be due to oxidative characteristics of obesity that preeclamptic patients enrolled. This decrease in SH concentration could be due to its nitration by peroxynitrite resulting nitrosothiols. Taken together our results support the role of oxidative stress in preeclampsia and its close relationship with obesity. So, this work opens the possibility of creating preventive strategies, It's for this, that more studies are needed in this subject.



## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. Trastornos Hipertensivos durante el embarazo.

Dentro de las enfermedades relacionadas con el embarazo, parto y puerperio, los trastornos hipertensivos del embarazo, en México ocuparon la primer causa de mortalidad materna en el 2005 (Díaz, 2006) seguida por las complicaciones hemorrágicas. Según el “Comitte on Terminology of The American College of Obstetricians and Gynecologists” (ACOG) constituyen de un 10 a un 15% de todos los embarazos; estos trastornos se agrupan en 4 categorías a saber: I. Hipertensión Gestacional; II. Preeclampsia-Eclampsia; III. Hipertensión Arterial Crónica y por ultimo; IV. Preeclampsia sobreañadida a Hipertensión Crónica (Ruiz et al., 2007; Meher et al, 2008)

#### I.1.a. Clasificación

La clasificación de la hipertensión en el embarazo fue propuesta al principio por el ACOG en 1972, después fue modificada por el National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP) Working Group en el año 2000 y ahora es la clasificación más utilizada (Roberts et al, 2003)

##### I. Hipertensión Gestacional:

Se define como la presencia de cifras tensionales elevadas ( $PAS \geq 140$  mmHg y  $PAD \geq 90$  mmHg), sin proteinuria ni otros signos de preeclampsia, en una paciente previamente normotensa, detectada durante o después de la semana 20 de gestación. La presión arterial vuelve a la normalidad, por lo general, en los primeros 12 días posparto (Sibai et al, 2003; Zamorski et al, 2001). La hipertensión gestacional ocurre del 6 al 7 % de los embarazos. Del 15 al 25% de estas pacientes pueden evolucionar a preeclampsia (Clarke, 2008).

##### II. Preeclampsia-Eclampsia

Se define como hipertensión arterial después de la semana 20 de gestación en una mujer previamente normotensa asociada con proteinuria. El edema actualmente no es considerado como un criterio diagnóstico de preeclampsia, ya que es un signo inespecífico y está presente en muchas embarazadas normales (Roberts et al, 2003).

La Preeclampsia-Eclampsia a su vez se divide en las siguientes categorías (ver anexo 1) (Romero et al, 2009).

- ✓ Preeclampsia Leve
- ✓ Preeclampsia Severa
- ✓ Síndrome de HELLP (**H**: Hemólisis, **E**: Enzimes elevated,



**L:** Liver, **L:** Low, **P:** Platelets)

✓ Eclampsia

En cuanto a la medición de la presión arterial y proteínas en orina, estas deben ser tomadas por lo menos 2 veces con una diferencia de 6 horas entre cada una de ellas, con la paciente en reposo en un lapso no mayor de 7 días, y para ser válida las proteínas en orina no debe presentar la paciente infección de vías urinarias.

III. Hipertensión Arterial Crónica <sup>(Vigil-De Gracia et al, 2009)</sup>

Se divide en:

- A. Hipertensión Crónica Pregestacional. Hipertensión  $\geq 140/90$  mmHg, Conocida o diagnosticada antes del embarazo
- B. Hipertensión Crónica Gestacional. Hipertensión  $\geq 140/90$  mmHg. Diagnosticada por primera vez en las primeras 20 semanas de embarazo.
- C. Hipertensión Crónica Posparto. Hipertensión  $\geq 140/90$  mmHg, que persiste luego de 12 semanas del parto o cesárea

IV. Preeclampsia sobreañadida a Hipertensión Crónica

Definida como el desarrollo de Preeclampsia-Eclampsia en pacientes con hipertensión arterial crónica preexistente. Este diagnóstico puede ser muy difícil de efectuar en pacientes con hipertensión crónica, particularmente en pacientes con nefropatía.

El diagnóstico será considerado en mujeres con hipertensión arterial crónica y sin proteinuria antes de las 20 semanas, si existe un descontrol súbito de presión arterial (previamente estable) con presión  $\geq 160/110$  mmHg o proteinuria  $\geq 300$  mg/24 horas, o trombocitopenia o elevación de las enzimas hepáticas o síntomas de vasoespasmo persistente <sup>(Zamorski et al, 2001)</sup>.

En mujeres con hipertensión crónica y con presencia de proteinuria previa antes de las 20 semanas, podrá considerarse diagnóstico cuando aparezca elevación súbita de la presión arterial, aumento de proteinuria, síntomas persistentes de vasoespasmo, elevación de enzimas hepáticas o trombocitopenia <sup>(Sibai et al, 2006)</sup>.

## I.2. Preeclampsia

### I.2.a. Definición

La preeclampsia (PE), se define como hipertensión arterial después de la semana 20 de gestación, en una mujer previamente normotensa asociada con proteinuria <sup>(Barton et al, 2008)</sup>.

### I.2.b. Epidemiología

La preeclampsia se observa en un 5-10% de todos los embarazos, de este porcentaje el 94% corresponde a preeclampsia leve, 3.75% a preeclampsia severa y 1.75% a eclampsia. En México, no se han publicado casos sobre morbilidad por preeclampsia-eclampsia, pero existen datos procedentes de sistemas nacionales e institucionales de información que resultan ilustrativos al respecto. Por ejemplo en el periodo de 2003-2007, la Secretaría de Salud informa una morbilidad hospitalaria de 3.75% para los trastornos hipertensivos del embarazo en su conjunto <sup>(Velazco et al, 2009)</sup>.

El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), informó que durante el periodo de 2000-2003 tuvo una morbilidad hospitalaria de 2.9%. Por lo que respecta a la morbilidad para eclampsia, la mayoría de los valores se encuentran entre 0.1% y 0.6% <sup>(Velazco et al, 2009)</sup>.

La diferencia de la información se debe a que los estudios se han realizado en poblaciones distintas y a los criterios que se utilizan.

En México, de las diferentes causas de muerte materna en 2007, 25.3% se atribuyen a los distintos trastornos hipertensivos durante el embarazo además de edema y proteinuria; las hemorragias son causantes de 24.3%; los abortos, las infecciones puerperales y los partos obstruidos causan 7.4, 2.6 y 1.3%, respectivamente. Estos padecimientos son responsables de más de 60% de las defunciones maternas. El resto, 39.1%, se debe a otras causas obstétricas indirectas <sup>(SSA, 2003-2008)</sup>.

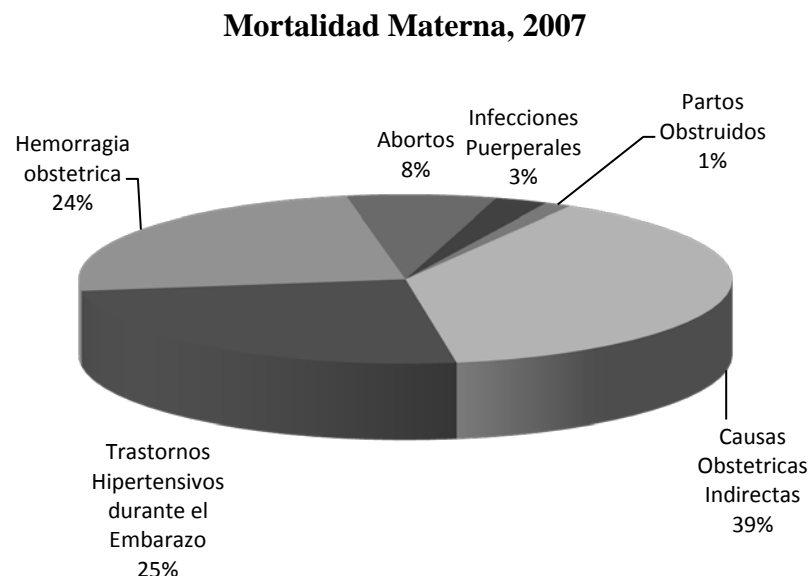


Figura 1. Mortalidad Materna estimada al año 2007 <sup>(SSA, 2003-2008)</sup>.

Los sistemas nacionales de información en salud revelan que el riesgo de muerte más elevado lo presentan las mujeres mayores de 35 años, cuya tasa específica de mortalidad

cuadruplica el de las mujeres menores de 20 años. Esto parece indicar que si bien la PE se presenta con mayor frecuencia en las primigestas jóvenes, la letalidad de la complicación es superior cuando afecta al embarazo en mujeres mayores de 35 años (Luke et al, 2007).

### I.2.c. Complicaciones

Dentro de las principales complicaciones maternas de la preeclampsia severa se encuentran las siguientes (Sibai et al, 2005): Síndrome de HELLP (10-20%), Coagulación Intravascular Diseminada (CID) (10%), Edema Agudo Pulmonar Cardiogénico (2-5%), Insuficiencia Renal Aguda (1-5%), Desprendimiento Prematuro de Placenta Normoinserta (DPPNI) (1-4%), Eclampsia (<1%), Insuficiencia Hepática o Hemorragia (<1%), Accidente Vascular Cerebral, Edema Cerebral y por último Insuficiencia Cardíaca. Con estos datos; la gravedad y la naturaleza multisistémica de este síndrome quedan ejemplificadas.

En cuanto a las complicaciones neonatales se encuentran: parto prematuro (15-67%), Retraso en el Crecimiento Intrauterino (RCIU) (10-25%), muerte perinatal (1-2%), lesiones neurológicas por hipoxia (<1%) y bajo peso al nacer (Sibai et al, 2005).

### I.2.d. Factores de Riesgo.

En el siguiente cuadro se señalan los factores de riesgo que se deben identificar en cada paciente. (Morgan et al, 2010; Barton et al, 2008).

Tabla 1. Factores de Riesgo en Preeclampsia.

Preconcepcionales	Enfermedades Médicas Preexistentes	Asociadas al Embarazo
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Nuliparidad (~70)</li> <li>✓ Primipaternidad</li> <li>✓ Exposición corta al semen (10-35%)</li> <li>✓ Donación de semen y embrión (10-35%)</li> <li>✓ Historia de resultado perinatal adverso</li> <li>✓ Historia previa de preeclampsia (15-65%)</li> <li>✓ Historia familiar de preeclampsia. (10-15%)</li> <li>✓ Intervalo entre nacimientos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Hipertensión Arterial Crónica (15-50%)</li> <li>✓ Diabetes Mellitus Pregestacional (10-35%)</li> <li>✓ Anticuerpos antifosfolípidos (11-48%)</li> <li>✓ Nefropatías Crónicas (25-50%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Edad Materna mayor de 40 años (10-20%)</li> <li>✓ Obesidad (10-15%)</li> <li>✓ Embarazo Múltiple (8-20%)</li> <li>✓ Mola Hidatiforme e hidrops fetal</li> <li>✓ Infecciones</li> <li>✓ Hipertensión Gestacional (15-46%)</li> <li>✓ Malformaciones Congénitas y cromosomopatías</li> </ul>

Modificado Morgan-Ortiz, 2010

La mayoría de los casos con preeclampsia ocurre en mujeres nulíparas, el resto de los casos sucede en mujeres con ciertos factores de riesgo como embarazo múltiple, historia previa

de preeclampsia, edad mayor de 40 años, obesidad o enfermedades médicas preexistentes como hipertensión arterial crónica, nefropatías, entre otras.

En cuanto a la nuliparidad tiene casi 3 veces más riesgo de desarrollar preeclampsia (RR 2.91 a 95%) y por lo general son mujeres que tienen alguna enfermedad pre-existente como hipertensión arterial. Una tasa incrementada de preeclampsia frente a la exposición de novo de antígenos paternos sugiere una etiología autoinmune.

El antecedente de haber presentado preeclampsia anteriormente, eleva siete veces el riesgo de presentarla de nuevo (RR 7.19 a 95%). En cuanto a la edad materna mayor de 40 años tiene un riesgo incrementado de padecerla (RR 1.96 a 95%).

La obesidad es un factor de riesgo importante, en el embarazo temprano las pacientes obesas tienen un riesgo mayor de aborto espontáneo (RR 1.77 a 95%) y anomalías congénitas fetales, como defectos del tubo neural, espina bífida y onfalocele; en la segunda mitad del embarazo pueden presentar diabetes gestacional, hipertensión arterial y trastornos lipídicos <sup>(Catalano, 2007)</sup>. Está descrito que las pacientes obesas y con obesidad mórbida tienen 2.5 y 3.2 veces más de riesgo de desarrollar hipertensión gestacional y 1.6 y 3.3 veces más de desarrollar preeclampsia respectivamente. Por lo tanto, la obesidad es un factor de riesgo definitivo para preeclampsia, incrementándose este riesgo conforme aumenta el IMC; además, la obesidad está relacionada con resistencia a la insulina, que también es un factor de riesgo para preeclampsia. Las tasas de hipertensión gestacional, preeclampsia, diabetes gestacional y macrosomía están incrementadas en la obesidad <sup>(Baeten et al, 2001; Lu et al, 2001)</sup>.

### **I.2.e. Cuadro clínico**

La preeclampsia es un síndrome con manifestaciones clínicas y de laboratorio heterogéneo. Los hallazgos clínicos pueden manifestarse como síndrome materno (hipertensión y proteinuria, con o sin manifestaciones multisistémicas) y/o síndrome fetal (retraso en el crecimiento intrauterino (RCIU), oligohidramnios) <sup>(Barton et al, 2008; Sibai et al, 2005)</sup>.

La hipertensión arterial en el embarazo se define como una presión sanguínea sistólica, mayor o igual de 140 mmHg o una diastólica, mayor o igual de 90 mmHg, o ambas, por lo menos en dos registros con un mínimo de diferencia de cuatro a seis horas entre uno y otro, en un lapso no mayor de siete días <sup>(Barton et al, 2008; SSA, 2007)</sup>.

Diversos factores están implicados en la fisiopatología de la hipertensión arterial. El elemento básico es la disfunción endotelial y la ruptura del equilibrio entre los factores



vasoconstrictores (endotelinas) y los vasodilatadores (óxido nítrico, factor hiperpolarizante derivado del endotelio) <sup>(Wagner, 2010)</sup>.

La presión arterial sistémica media (PAM) está determinada por el gasto cardiaco (GC) y las resistencias vasculares periféricas (RP) y responde básicamente a la ecuación:  $PAM = GC \times RP$ . El GC depende del volumen sistólico y de la frecuencia cardiaca (FC). A su vez, el volumen sistólico varía según la contractilidad cardiaca y el retorno venoso. Por su parte, las RP están reguladas por sistema nervioso autónomo, regulación de sodio, el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) en donde la Angiotensina II es un potente agente vasoconstrictor y es el principal determinante del mantenimiento de la HTA, otros son las prostaglandinas, factor natriurético atrial.

Las acciones de la angiotensina II incluyen: contracción del músculo liso vascular arterial y venoso, estimulación de la síntesis y secreción de aldosterona, liberación de noradrenalina en las terminaciones simpáticas, modulación del transporte del sodio por las células tubulares renales, aumento del estrés oxidativo por activación de oxidasas NADH, estimulación de la vasopresina/ADH, incremento de la producción de endotelina (ET1) y de prostaglandinas vasoconstrictoras (TXA<sub>2</sub>, PgF<sub>2</sub>α) <sup>(Wagner, 2010)</sup>. las endotelinas que son factores vasoconstrictores locales muy potentes, cerca de 10 a 100 veces más poderosos que la angiotensina II. La ET1 ejerce diversas acciones: sobre el tono vascular, la excreción renal de sodio y agua y la producción de la matriz extracelular <sup>(Schiffrin, 2005)</sup>.

La proteinuria, se define como la presencia de 300 mg o más de proteínas en una colección de orina de 24 horas. Si no está disponible este estudio, podrá considerarse, proteinuria con 30 mg/dl o más (1+ en la tira reactiva) en 2 muestras de orina al azar con diferencia de 6 horas entre cada una en un lapso no mayor de 7 días, sin evidencia de infección de vías urinarias <sup>(Sibai et al, 2005, SSA 2007)</sup>. Las tiras reactivas tienen un valor predictivo muy bajo y altas tasas de falsos positivos por lo que es recomendado confirmar la proteinuria significativa con una colección de orina de 24 horas <sup>(Airoldi et al, 2007)</sup>.

La proteinuria es considerada una característica importante de la preeclampsia, sin embargo, su presencia no debe considerarse como obligatoria para establecer el diagnóstico, ya que puede presentarse tarde en el curso clínico de dicha enfermedad <sup>(Airoldi et al, 2007)</sup>.

El edema ya no es considerado como un dato necesario para el diagnóstico ya que es un signo común en el embarazo normal hasta en el 50% de los casos, principalmente en extremidades inferiores. Hasta un tercio de las pacientes con eclampsia no tienen edema <sup>(Roberts et al, 2003)</sup>.



El Nacional High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy recomienda que cuando se eleve la tensión arterial, aun cuando no se demuestre proteinuria, si se acompaña de cefalea, visión borrosa, dolor abdominal o anormalidades en las pruebas de laboratorio (principalmente plaquetopenia o incremento de la enzimas hepáticas) se debe considerar como muy probable preeclampsia (Peralta et al, 2006).

Entre los años 1999 y 2000 Martín y colaboradores, encontraron que los síntomas más frecuentes en pacientes preeclámpicas son las náuseas con o sin vómito y el dolor epigástrico o en hipocondrio derecho. Hacen referencia también a acúfenos, fosfenos, cefalea e hiperreflexia, que se relacionan con vasoespasmo con o sin alteración neurológica (Peralta et al, 2006).

### **I.2.f. Diagnóstico.**

Es necesario determinar biometría hemática completa, creatinina sérica, ácido úrico, bilirrubinas, albumina sérica, uroanálisis, tiempo de protombina y tiempo parcial de tromboplastina (Peralta et al, 2006).

Los valores de Hb y Hto pueden incrementarse a causa de una hemoconcentración o en los casos más graves puede haber anemia secundaria por hemólisis y a menudo hay trombocitopenia. El ácido úrico suele exceder los 6 mg/dl. La creatinina sérica puede estar normal (0.8 a 1.2 mg/dl) pero puede elevarse en la preeclampsia grave. La deshidrogenasa láctica puede ser muy alta, debido a hemólisis o lesión del hígado. El EGO revela proteinuria y en ocasiones cilindros alcalinos.

Muchas de las alteraciones bioquímicas de las pacientes con preeclampsia se explican por la disminución relativa del volumen circulante que presentan, como consecuencia de la reducción de la presión oncótica plasmática (Ruiz et al, 2007).

Criterios Diagnósticos para Preeclampsia leve (SSA, 2007):

1. Hipertensión Arterial: presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg y/o presión arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg en una mujer previamente normotensa, después de la semana 20 de gestación. Son necesarias por lo menos 2 tomas con diferencia de 6 horas entre cada una con. La paciente en reposo en un lapso no mayor de 7 días.
2. Proteiuria.  $\geq 300$  mg en una recolección de orina de 24 horas, o  $\geq 30$  mg/dl (1+) en 2 muestras de orina tomadas al azar con diferencia de 6 horas entre cada una, pero en un lapso no mayor de 7 días.



3. Sin evidencia de compromiso multisistémico o de vasoespasmos persistentes.

Son necesarios 1 o más de los siguientes criterios para considerar el diagnóstico de Preeclampsia Severa<sup>(SSA, 2007)</sup>:

1. Presencia de tensión arterial  $\geq 160$  mmHg y/o  $110$  mmHg en 2 ocasiones por lo menos con un mínimo de 6 horas de diferencia.
2. Proteinuria  $\geq 2$  g en orina de 24 horas.
3. Oliguria: diuresis  $< 500$  ml en 24 horas
4. Creatinina sérica  $\geq 1.2$  mg/dl
5. Trastornos cerebrales graves persistentes o alteraciones visuales
6. Edema agudo pulmonar
7. Dolor epigástrico o en cuadrante superior derecho del abdomen.
8. Disfunción Hepática (TGO o TGP  $\geq 70$  UI)
9. Trombocitopenia (Cuantificación de Plaquetas  $< 100,000/mm^3$ )
10. Coagulación Intravascular Diseminada
11. Cianosis
12. Retraso en el Crecimiento Intrauterino (RCIU)

### **I.2.g. Etiología.**

Un aspecto que ha contribuido significativamente a la persistencia de la enfermedad, es que no existe una explicación aceptada universalmente acerca del origen de la enfermedad. La complejidad del proceso patológico y la diversidad de indicadores socio epidemiológicos, clínicos, bioquímica y molecular, que de algún modo se relacionan con la enfermedad, ha determinado lo infructuoso de los estudios realizados para identificar las variables causales. En esto ha influido la falta de conocimiento de todos los procesos que intervienen y de la forma en que interactúan para desencadenar la expresión clínica de la enfermedad<sup>(Salvador, 2009)</sup>.

Existen varias teorías que tratan de explicar la etiopatogenia de la preeclampsia, entre las que se encuentran: placentación anormal, disfunción endotelial y estrés oxidativo. Estas teorías no son necesariamente excluyentes entre sí, y la etiología de la preeclampsia pudiera resultar de una combinación de todas ellas.

- ✓ Placentación anormal

La preeclampsia, se cree que se debe a un defecto en la invasión del trofoblasto, a pesar de que la invasión es suficiente para anclar al embrión, no es suficiente para convertir su





totalidad de las arterias espirales en canales de baja resistencia, esta conversión incompleta da lugar a la retención de músculo liso dentro de sus paredes, por lo que la vasoreactividad persiste en el 30-50% del lecho vascular de la placenta, conduciendo a una perfusión disminuida <sup>(Jauniaux, 2006)</sup>.

Durante la placentación normal, las células citotrofoblásticas extravelosas en las primeras semanas de gestación, colonizan la decidua y el miometrio adyacente del lecho placentario. Este torrente citotrofoblástico en los vasos espirales, destruye y finalmente reemplaza el endotelio de los vasos maternos. El proceso continúa por la invasión de las paredes arteriales, donde también destruyen la estructura elástica muscular de los vasos maternos. Después, entre las 14 y 16 semanas de gestación, hay una segunda migración trofoblástica endovascular; dentro de este tiempo la porción intramiométrica de las arterias espirales, se extiende desde su origen hacia los vasos radiales. Al final del proceso las paredes gruesas de los vasos maternos son convertidas en vasos conductores uteroplacentarios, desprovistos del componente muscular. Estos vasos remodelados son capaces de dilatarse pasivamente y acomodarse al incremento del flujo sanguíneo para el desarrollo del embarazo normal y no responde a estímulos hormonales o neurogénicos en el sentido de proteger al feto <sup>(Rojo et al, 2003; Chamy et al, 2006)</sup>.

Existen muchas evidencias que apoyan que el fallo de este proceso normal de placentación ocurre en mujeres destinadas al desarrollo de la preeclampsia, mucho antes del desencadenamiento del síndrome clínico. En estas mujeres, una porción significativa de arterias del lecho placentario muestran una ausencia completa de trofoblasto endovascular. Además, hay un fallo completo del trofoblasto para avanzar en la porción miométrica de los vasos, los cuales resultan en la persistencia de su pared muscular, potencial para la vasoconstricción y restricción del flujo sanguíneo materno de la placenta, lo que puede interferir en el paso de los alimentos y oxígeno al feto, por lo que puede inhibir el crecimiento del mismo y que el niño nazca prematuro <sup>(Meher et al, 2007)</sup>.

#### ✓ Disfunción endotelial

Las células endoteliales vasculares constituyen un órgano estructuralmente simple, pero funcionalmente complejo que regula procesos tan diversos como la homeostasis, fibrinólisis, inflamación, presión arterial, metabolismo de las lipoproteínas y la angiogénesis, y de esta forma juega un papel fundamental en la homeostasis del sistema vascular. Las alteraciones que se presentan en uno o más de estos fenómenos fisiológicos es lo que se conoce como disfunción endotelial <sup>(Acosta et al, 2006)</sup>

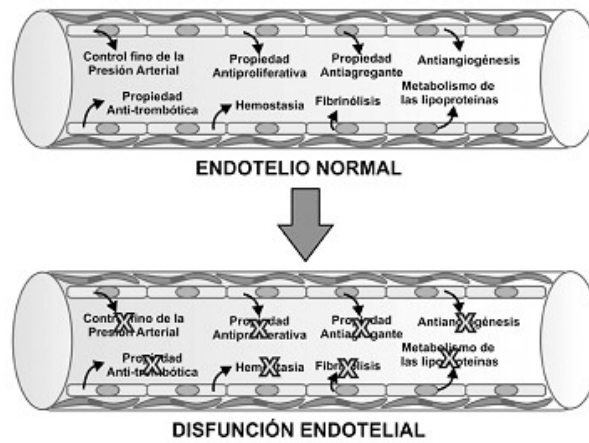


Figura 2. Disfunción Endotelial (Acosta et al, 2006)

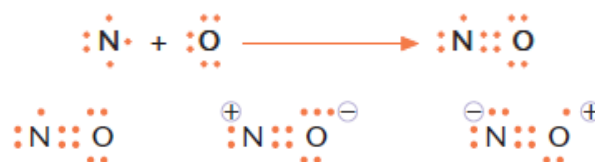
La alteración de la relajación dependiente del endotelio debido a la disminución de la síntesis y/o de la biodisponibilidad del óxido nítrico, constituye a la vez, el fenómeno más temprano y la más importante característica de la disfunción endotelial (O'Connell et al, 2001; Charterjee et al, 2008). Hay 2 mecanismos fundamentales para la baja bioactividad de NO<sup>•</sup>: síntesis disminuida y un incremento en la inactivación oxidativa por especies reactivas de oxígeno (Bode-Böger et al, 2007).

La preeclampsia es un trastorno multisistémico que se asocia con disfunción endotelial y deficiencia de óxido nítrico, pero las pruebas para apoyar esta indicación son contradictorias (Meher et al, 2007).

### ➤ Óxido Nítrico

#### ▪ Estructura y Función

El NO<sup>•</sup> es una molécula pequeña compuesta por 2 átomos, uno de nitrógeno y otro de oxígeno, el oxígeno tiene 8 electrones y el nitrógeno tiene 7 electrones (Lira et al, 2004), en la molécula de NO el número de oxidación del N es +2. Su estructura de Lewis es la que se muestra en la siguiente fórmula y muestras las estructuras de resonancia:



El átomo de N contiene un electrón desapareado, por tanto, el NO presenta propiedades paramagnéticas, radicalarias. El orden de enlace es de 2,5. La longitud de enlace de 1,151 Å, la fuerza de enlace de 1.840 cm<sup>-1</sup>(Centelles et al, 2004).

El electrón desapareado del NO se encuentra situado en un orbital  $\pi_x^* \pi_y^*$ . Al ser un orbital antienlazante el electrón es lábil. Al perder el electrón y formar NO<sup>+</sup> el orden de enlace de



la molécula aumenta y pasa de 2,5 a 3. La facilidad con que el NO se oxida tiene gran importancia en su función en los sistemas biológicos.

El NO<sup>•</sup> es un gas lipofílico <sup>(Chatterjee et al, 2008)</sup> de vida media breve (6-10 seg.) <sup>(Bravo et al, 2001)</sup>.

El NO<sup>•</sup> es una molécula apolar que se particiona bien en medios hidrofóbicos, lo que le permite difundir a través de membranas biológicas, por lo que funciona en muchas ocasiones como mensajero intracelular, que puede difundir rápidamente de un tipo celular a otro, por mecanismos pasivos <sup>(Rojo et al, 2003)</sup>.

El NO<sup>•</sup> cumple una serie de funciones relacionadas con la homeostasis del sistema vascular como: la regulación del tono de los vasos, inhibición de la agregación plaquetaria, inhibición de la adhesión y trasmigración leucocitaria, así como la ordenación de la proliferación y migración de células musculares lisas, neurotransmisión, entre otras <sup>(Kawashima et al, 2004)</sup>.

El NO<sup>•</sup> posee una acción antiinflamatoria importante, a la vez que tiene la capacidad de promover la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio, así pues un exceso de óxido nítrico es citotóxico, parte su toxicidad es debida al anión superóxido con el que reacciona para dar lugar a peroxinitrito, que no es un radical, pero si un intermediario altamente oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad de modo que es altamente reactivo. Es capaz de inducir la peroxidación lipídica, interferir con la señalización celular por nitración de residuos de tirosina, oxidar grupos tioles y guanosinas, de degradar carbohidratos, fragmentar ADN **(cita)**.

- Enzima óxido nítrico sintasa ( NOS )

El NO<sup>•</sup> es sintetizado enzimáticamente por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), de las cuales existen 3 diferentes variedades y son altamente homologas en su estructura primaria:

1. Óxido Nítrico Sintasa Neuronal (nNOS o tipo I).
2. Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS o tipo II).
3. Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (eNOS o tipo III).

Estas tres isoformas de la NOS, difieren tanto en su ubicación como en su regulación y en su función fisiológica: la isoforma neuronal (nNOS) se expresa constitutivamente en las neuronas del cerebro y en el sistema nervioso entérico; la isoforma endotelial (eNOS), la cual también es constitutiva y esta confinada a las células endoteliales y plaquetas; y su expresión esta alterada en muchos tipos de enfermedad cardiovascular tal como aterosclerosis, diabetes e hipertensión <sup>(Chatterjee et al, 2008)</sup> y por último la isoforma inducible (iNOS) que se expresa en respuesta a algunos estímulos inflamatorios como productos

bacterianos (endotoxinas), citocinas y mediadores lipídicos y no depende de un incremento en la concentración de calcio, en comparación con nNOS y eNOS que son calcio-dependientes<sup>(Tsutsui et al, 2009)</sup>. Una vez activada la iNOS puede producir grandes cantidades de NO<sup>•</sup> por períodos prolongados, este incremento sostenido en los niveles de NO<sup>•</sup> funciona como un mecanismo de defensa del organismo, sin embargo en ciertas situaciones puede tornarse peligroso y causar daño en algunos tejidos<sup>(Maldonado et al, 2008)</sup>.

Las isoenzimas NOS tienen distintos patrones de localización subcelular, que probablemente estén involucrados en la regulación de la actividad de NOS, por ejemplo la eNOS se asocia a la caveola en regiones localizadas en la membrana plasmática, esto permite una modulación eficiente de la actividad de la eNOS a través de los cambios locales producida por el flujo de calcio a través de la membrana, la nNOS se asocia principalmente al retículo endoplásmico rugoso y las membranas postsinápticas en el cerebro y con el sarcolema del músculo esquelético, como en el caso de eNOS, se cree que la localización subcelular de nNOS cerca de los canales de calcio permite una regulación precisa de la actividad. A diferencia de la nNOS y eNOS, iNOS es principalmente citosólica, aunque hay informe de su asociación con vesícula de membrana de los macrófagos<sup>(Wu et al, 1998)</sup>.

▪ Síntesis de Óxido Nítrico

La eNOS sintetiza el NO<sup>•</sup> a partir de L-arginina, es un proceso de oxidación-reducción en el que el átomo de nitrógeno del grupo guanidinio de la arginina se oxida de -3 a +2 (el estado de oxidación formal del carbono no varía). El agente oxidante es el oxígeno molecular, cuyo estado de oxidación pasa de 0 a -2. El proceso es complejo y requiere la participación de un segundo agente reductor el NADPH<sup>(Centelles et al, 2004)</sup>. La reacción transcurre en 2 etapas con formación del intermediario N<sup>o</sup>-hidroxi-L-arginina<sup>(Acosta et al, 2006)</sup>, el cual es un potente inhibidor de la enzima arginasa<sup>(Ash, 2004)</sup>.

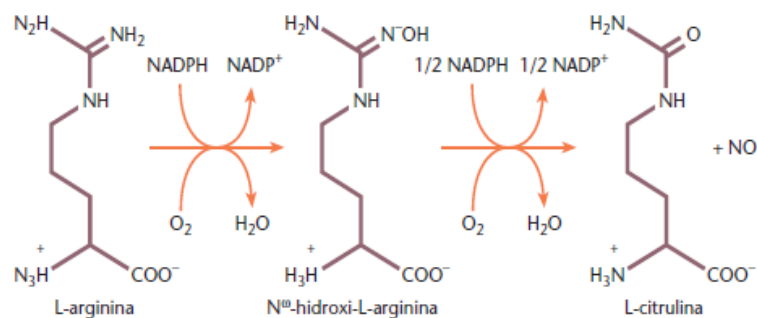
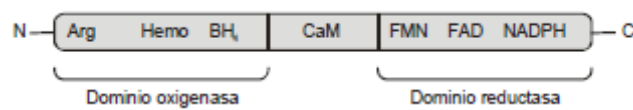


Figura 3. Reacción de la NOS, que produce NO y Citrulina a partir de arginina<sup>(Centelles et al, 2004)</sup>.

Los cofactores requeridos son la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), la flavina adenina mononucleótido (FMN) y la flavina adenina dinucleótido (FAD). Además, la enzima contiene sitios de enlace para el grupo hemo y la calmodulina, siendo ambos esenciales para su actividad. Después del enlace de la calmodulina cargada de calcio con la eNOS entre el dominio reductasa COOH-terminal y el dominio oxigenasa NH<sub>2</sub>-terminal de la enzima, los electrones son donados por el NADPH en el dominio reductasa, estos a su vez, son subsecuentemente transportado por intermedio del dominio del enlace a la calmodulina hacia el dominio oxigenasa que contiene el grupo hemo, lo cual resulta en la formación de los productos enzimáticos citrulina y NO<sup>•</sup> (Acosta et al, 2006).



En su forma catalíticamente activa las NOS son dímeros, este se forma en presencia de grupo hemo, BH<sub>4</sub> y L-arginina. La dimerización de la NOS es esencial para su actividad, porque permite que ocurra la transferencia de electrones desde el dominio reductasa de un monómero al dominio oxigenasa del otro, este dominio contiene el centro catalítico de la enzima. La dimerización ocurre por interacción de los dominios oxigenasa a través del cofactor BH<sub>4</sub>. Tanto L-arginina como BH<sub>4</sub> promueven la formación del dímero y lo estabilizan, por lo tanto bajas concentraciones de alguno de ellos desacopla la enzima y en esas condiciones se produce radical superóxido. La síntesis de NO<sup>•</sup> depende de la unión de la NOS a la proteína calmodulina. Para unir calmodulina y en consecuencia activarse, eNOS y nNOS requieren aumentos del Ca<sup>2+</sup> intracelular (Vittone et al, 2007).

Diversos mediadores como: bradicinina, ATP, acetilcolina, catecolaminas, angiotensina II, vasopresina, sustancia P, histamina, etc. estimulan la síntesis endotelial de NO<sup>•</sup>, además de las llamadas fuerzas de cizallamiento que es el principal factor físico para la liberación de NO<sup>•</sup> por las células endoteliales, que una vez producido difunde a través de las membranas hasta llegar a las células del músculo liso, donde activa la guanilato ciclasa, con la consecuente producción de GMPc, que participa en la activación de las bombas de calcio en el sarcoplasma, resultando un secuestro de calcio y su disminución intracelular, con lo que el músculo liso se relaja (Rojo et al, 2003).

La baja producción de óxido nítrico puede deberse a: deficiencia en el sustrato L-arginina, deficiencia en los cofactores necesarios para la actividad normal de eNOS, como el ion calcio y BH<sub>4</sub>, acumulación de dimetilarginina asimétrica (ADMA) -un inhibidor endógeno

de eNOS –, y por una presencia de alteraciones polimórficas de la eNOS que resultan en una baja actividad de la enzima (López-Jaramillo et al, 2008).

Bajo ciertas circunstancias, eNOS puede generar superóxido en lugar de NO• (Vázquez-Vivar et al, 1998), fenómeno que se debe fundamentalmente a la disminución de las cantidades de su cofactor BH4, denominado desacoplamiento de la oxidación de NADPH en la síntesis de NO• (Pou et al, 1999). La generación de superóxido es mediada a través del grupo hemo de su dominio de oxigenasa y es dependiente de la presencia de su sustrato arginina, y su cofactor BH4. Cuando la concentración de alguno de estos dos últimos es relativamente baja, eNOS genera superóxido (Wever et al, 1997).

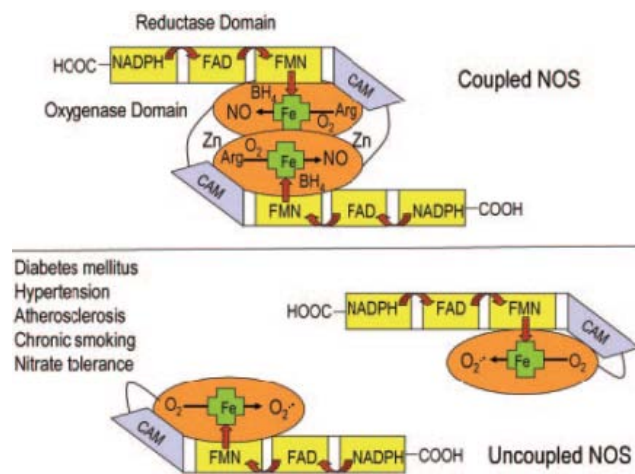


Figura 4. Esquema que muestra el flujo de electrones en la eNOS acoplada y desacoplada (Munzel, 2005)

Tanto el NO• como el superóxido son radicales libres. Cuando estos dos últimos son expuestos el uno al otro, experimentan una reacción que procede a una velocidad de  $6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}/\text{s}^{-1}$  (Acosta et al, 2006). Esta es una velocidad aproximadamente tres veces más elevada que aquella a la que se desarrolla la reacción entre superóxido y superóxido dismutasa (SOD) (Charterjee et al, 2008). De tal forma, que en un compartimiento en donde existan tanto NO•, como superóxido y SOD, el superóxido es susceptible de reaccionar con cualquiera de los otros compuestos, dependiendo de las concentraciones a las que se encuentren estos últimos. Los resultados de diversos estudios apoyan el papel del superóxido como el elemento esencial en la disminución de la biodisponibilidad del NO• durante los estados de estrés oxidativo (Acosta et al, 2006).

#### ✓ Estrés oxidativo

Se considera al concepto de estrés oxidativo, como el desequilibrio entre las especies oxidantes y antioxidantes, en el cual abundan las primeras (Peraza et al, 2008) en comparación con la situación establecida como normal.



### ➤ Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno

Los radicales libres se clasifican por grupos o por familias dependiendo del átomo o especie química que este relacionada su procedencia: Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) y Especies Reactivas del Nitrógeno (ERN). Bajas concentraciones de ERO estimulan el crecimiento de las células, incluso de las bacterias y de otros microorganismos. El  $H_2O_2$  y el  $NO^\bullet$ , funcionan como señales que determinan respuestas fisiológicas de adaptación al medio ambiente. Finalmente las ERO son indispensables para la diferenciación celular y para la muerte celular programada <sup>(Hansberg, 2008)</sup>. Las ERO y ERN son las responsables de generar muchas patologías humanas. Durante el metabolismo celular se generan normalmente las especies reactivas de oxígeno, como el superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ). Estas especies tienen una capacidad oxidante mayor que el  $O_2$ , por lo que su presencia en las células puede generar daños importantes, sin embargo las células cuentan con un gran repertorio de mecanismos antioxidantes que permiten su eliminación o previenen su formación <sup>(Peraza et al, 2008)</sup>. La ERN más importante es el Óxido Nítrico ( $NO^\bullet$ ), a partir del cual se forman otras especies como el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), anión nitroxilo ( $NO^-$ ), y el dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ).

Cuando el aumento del contenido intracelular de EROs sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

A continuación mencionaré algunas ERO y ERN:

#### ➤ Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )

Cuando el  $O_2$  capta un electrón éste se aparea con uno de los dos electrones libres de los orbitales  $\pi^*$  y forma así el  $O_2^{\bullet-}$ , que es a la vez un anión y un radical. El  $O_2^{\bullet-}$  se produce principalmente en la cadena respiratoria debido a que una parte de los electrones que pasan por ella es captada por el  $O_2$ . Esto ocurre principalmente a nivel de la ubiquinona (Coenzima Q). Otra fuente importante de  $O_2^{\bullet-}$  es la actividad de la NADPH oxidasa, que tienen la función específica de sintetizarlo <sup>(Clempus et al, 2006)</sup>. También la xantina oxidasa, la lipoxigenasa y algunas peroxidases inespecíficas forman  $O_2^{\bullet-}$ . En el hombre el 3% de su hemoglobina se oxida al día originando  $O_2^{\bullet-}$  y metahemoglobina <sup>(Hansberg, 2008)</sup>.

El  $O_2^{\bullet-}$  es poco reactivo, solo reacciona consigo mismo, con el hierro libre o el de los centros hierro-azufre (Fe-S) de varias proteínas, con el  $NO^\bullet$ , los radicales fenoxilo, las semiquinonas, los quinoles y con los difenoles <sup>(Clempus et al, 2006)</sup>.



El  $O_2^{\cdot-}$  es tóxico para la célula en parte porque a partir de él se puede originar el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). La dismutación espontánea del  $O_2^{\cdot-}$  genera  $^1O_2$  (Koppenol et al, 1992; Pou et al, 1999).

El  $O_2^{\cdot-}$  al reaccionar con el dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\cdot}$ ) origina peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que se descompone en ( $^1O_2$ ) y nitrito ( $2NO_2^-$ ). La vida media del  $^1O_2$  en la célula en la que hay muchos compuestos reducidos, es solo de 0.5  $\mu$ seg.

La eliminación del  $O_2^{\cdot-}$  es a través de las enzimas superóxido dismutasa (SOD). La actividad de la SOD es muy eficiente ( $10^9 M^{-1}seg^{-1}$ ) e independiente del pH (Hansberg, 2008).

En todas las células de los mamíferos, incluyendo las células endoteliales generan anión superóxido que es inactivado por la SOD. El primer mecanismo para la baja disponibilidad de  $NO^{\cdot}$  se cree que es debido a su interacción con superóxido. Si los niveles de superóxido incrementan significativamente, el  $NO^{\cdot}$  compite con la SOD por el superóxido y la reacción por  $NO^{\cdot}$  es aproximadamente 6 veces mayor que la dismutación de superóxido por SOD. Esta reacción tiene un triple efecto; de acarreamiento de  $NO^{\cdot}$ , reduciendo su biodisponibilidad y produciendo un potente oxidante el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Una vez formado el  $ONOO^-$  puede modificar químicamente los aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas y péptidos que contengan thiol (Koppenol et al, 1992). A pH fisiológico de 7.4, 20% del peroxinitrito es protonado para formar ácido peroxinitrito ( $ONOOH$ ) que se descompone para formar dióxido de nitrógeno  $NO_2^{\cdot}$  y radical hidroxilo  $\cdot OH$  (Zalva et al 2001).

#### ➤ Peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ )

El Peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) o agua oxigenada se forma cuando cada uno de los dos electrones libres del  $O_2$  se han apareado con un electrón de giro contrario.

La reacción de las SOD produce la mayor parte del  $H_2O_2$  en las células. El  $H_2O_2$  se puede difundir a través de compartimientos celulares, aunque también puede formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Es aun menos reactivo que el  $O_2^{\cdot-}$  y no interacciona con los compuestos como el NAD (P) H, los ácidos nucleicos, los aminoácidos de las proteínas, salvo algunos tioles particularmente reactivos.

No obstante, el  $H_2O_2$  es tóxico a concentraciones intracelulares por arriba de 1  $\mu$ M debido en parte a que puede formar  $^1O_2$  y  $\cdot OH$ .

Cuando el  $H_2O_2$  acepta un electrón desapareado, por ejemplo de un metal de transición como el Fe (II) o el Cu (I), entonces se fragmenta y forma el  $\cdot OH$  y el ion hidroxilo ( $OH^-$ ) (Reacción de Fenton). Este último se protona para formar agua y el  $\cdot OH$  interacciona con cualquier compuesto vecino (Zhang et al, 2005).





Algunas maneras de eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  son las catalasas monofuncionales ya que dismutan el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  y lo hacen con gran eficiencia. Las hemoperoxidasas reducen  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  (Hansberg, 2008).

➤ Radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ )

Tanto el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  son compuestos que interactúan poco con los compuestos celulares, sin embargo ambos son tóxicos, en parte porque generan  $^1\text{O}_2$  y  $\bullet\text{OH}$ .

El  $\bullet\text{OH}$  es uno de los compuestos más reactivos que existen. El  $\bullet\text{OH}$  no se puede difundir porque interactúa rápidamente ( $10^9\text{M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ ) y es capaz de reaccionar con todas las moléculas que se encuentren a su alcance (Kawashima et al, 2004).

La mayoría de los daños irreversibles en las proteínas son causados por el  $\bullet\text{OH}$ , porque reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se origina. La cantidad de proteína oxidada se puede medir determinando los carbonilos que se forman por la oxidación de la prolina y de la arginina y también por la ruptura de la cadena peptídica. Los carbonilos de las proteínas purificadas se detectan por la formación de la base Schiff con la difenilhidrazina. Otra manera de medir la oxidación de proteínas es determinando la cantidad de ditirosinas. El  $\bullet\text{OH}$  reacciona con la fenilalanina produciendo primero un radical tirosilo y luego la dihidroxifenilalanina, 2 radicales tirosilo pueden formar una ditirosina entre dos polipéptidos (Hansberg, 2008).

Los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles a la oxidación con el  $\bullet\text{OH}$  que los saturados y los monoinsaturados, esto se debe a que los metilenos entre dos doble ligaduras pueden perder fácilmente un hidrógeno. La pérdida de un hidrógeno produce un radical en el carbono. El radical puede migrar de un carbono a otro con lo cual hay un rearrreglo de las dobles ligaduras. En presencia del  $\text{O}_2$  se origina un radical peroxilo. El peroxilo a la vez puede tomar un hidrogeno alílico de otro lípido con lo cual se propaga la reacción de lipoperoxidación. El grado de lipoperoxidación puede determinarse por la cantidad de dienos conjugados, por los aldehidos formados (malondialdehido, 4-hidroxi-2-nonenal) (Hansberg, 2008).

- Especies Reactivas de Nitrógeno.

El  $\text{NO}^{\bullet}$  posee una acción antiinflamatoria importante a su vez que tiene la capacidad de promover la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio. Para entender este doble efecto proponen que los efectos reguladores y antiinflamatorios del  $\text{NO}^{\bullet}$  ocurren cuando este ejerce una acción directa sobre una molécula biológica, lo cual ocurre en condiciones fisiológicas, en la que la producción de  $\text{NO}^{\bullet}$  es baja. Sin embargo, cuando las concentraciones de  $\text{NO}^{\bullet}$  aumentan, el  $\text{NO}^{\bullet}$  tiene efectos indirectos, a través de



metabolitos derivados de él, pudiendo reaccionar con el oxígeno o con el superóxido, lo cual ocurre en situaciones de inflamación, así pues, un exceso de  $\text{NO}^\bullet$  es citotóxico. Parte de su toxicidad se cree que es debida al  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , con el que reacciona para dar  $\text{ONOO}^-$ , que no es un radical, pero sí un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad de modo que es altamente reactivo. Es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, interferir en la señalización celular por nitración de residuos de tirosina, oxidar grupos tioles y guanosinas, de degradar carbohidratos y de fragmentar ADN. La reacción del peroxinitrito con el  $\text{CO}_2$  es la vía más importante por la que se descompone el peroxinitrito in vivo, formando al final  $\text{N}_2\text{O}_3$ , que es un potente agente nitrante. Además de las reacciones de oxidación, el  $\text{ONOO}^-$  tiene la capacidad para nitrar compuestos fenólicos en condiciones fisiológicas, como los anillos de tirosina. Los residuos de tirosina son oxidados por los radicales derivados de  $\text{ONOO}^-$  formando el radical tirosilo, que a su vez reacciona con el  $\text{NO}^\bullet$  para formar 3-nitrotirosina<sup>(Zhang et al, 2005)</sup>.

#### ➤ Defensas Antioxidantes

Halliwell, define como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. Es decir, se oponen a la acción del oxígeno y especies oxidantes o cualquier sustancia que retarda o inhibe el daño oxidativo.

Se conocen 3 tipos principales de antioxidantes:

*Primarios:* Previenen la formación de nuevos RL, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de RL a partir de otras moléculas. Ej. Enzima superóxido dismutasa (SOD) que convierte el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  o la enzima glutatión peroxidasa (GPx) que convierte el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres. Entre otras enzimas se encuentran; catalasa, glutatión reductasa, glutatión S transferasa, proteínas que se unen a metales (ferritina, transferrina y ceruloplasmina) limitan la disponibilidad del hierro necesario para formar el radical  $\bullet\text{OH}$ .

*Secundarios.* Capturan los RL, evitando la reacción en cadena. Ej. Vitamina E o -tocoferol, vitamina C o ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno, ácido úrico, bilirrubina, albúmina, ubiquinol-10, metionina.

*Terciarios.* Reparar las biomoléculas dañadas por los RL. Ej. Enzimas reparadoras de ADN y metionina sulfóxido reductasa.

También se maneja la clasificación basada según el sitio donde ejercen su acción y por sus características bioquímicas:

Tabla 2. Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción:

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa Catalasa Peroxidasa DT-deafarasa Glutation reducido Proteínas que ligan metales Sistemas proteolíticos Vitamina C	Vitamina E B- carotenos Ubiquinol-10	Ceruplasmina Tranferinas Lactoferinas Albúminas Haptoglobinas Vitamina C Ácido Úrico Vitamina E

Tabla 3. Clasificación bioquímica de los antioxidantes:

Exógenos	Endógenos	
Vitamina E Vitamina C Flavonoides B- caroteno	Glutation Coenzima Q Ácido tiótico	
	Cofactor	Enzimas
	Lipopenos Cobre Zinc Hierro Manganeso Selenio	Catalasa Superóxido Dismutasa Glutación Peroxidasa

### I.3. Disfunción endotelial y estrés oxidativo.

El endotelio vascular es una estructura que reviste el interior de los vasos sanguíneos y posee diversas funciones, tales como: permitir el paso de moléculas hacia los órganos y tejidos, la coagulación sanguínea, la liberación de agentes vasoactivos y la angiogénesis (Kawashima et al, 2004). Estas funciones se realizan con la participación de moléculas, entre las que se encuentran receptores acoplados a proteínas G, la prostaciclina (inhibe la agregación plaquetaria), la endotelina (acción vasoconstrictora); el óxido nítrico (vasodilatador), entre otras moléculas (Vanhoutte, 2003).

Las células endoteliales responden a diferentes estímulos, como la presión sanguínea, la hipoxia y radicales libres. Se sabe que los radicales libres pueden modular la actividad del endotelio pero no se sabe con exactitud si son causa o consecuencia de patologías relacionadas con el sistema vascular (Ceballos et al, 2006).

Se piensa que en la pared vascular, el aumento de estrés oxidativo, principalmente por generación excesiva de O<sub>2</sub>, altera diversas funciones fisiológicas importantes como la



regulación del flujo sanguíneo, la inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición de la adhesión leucocitaria, y el control del crecimiento celular están influenciados por el estrés oxidativo. Estos fenómenos modulan en última instancia el diámetro de los vasos, el remodelado y la formación de las lesiones. Las especies reactivas del oxígeno que parecen tener relevancia en la biología vascular incluyen el  $O_2^{\bullet}$ , el  $OH^{\bullet}$ , el  $ONOO^-$ , los hidroperóxidos lipídicos, los radicales hidroperóxidos y probablemente los radicales tipo hidroxilo (Zalva et al, 2001).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son capaces de modular las PKC (proteína cinasa C), que influyen en el crecimiento celular; activan las citocinas y la angiogénesis y cuando se intensifican dan origen a diferentes patologías relacionadas con el lecho vascular como son la aterogénesis e hipertensión. Esto se debe a que los radicales de oxígeno actúan aumentando la expresión de endotelina-1 (ET-1), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Pavlovic et al, 2002). Dentro de los principales fuentes de producción de oxidantes en la pared vascular son: las enzimas NAD (P) H-oxidasa, xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa, lipooxigenasa, metales de transición y en la respiración mitocondrial (Ceballos et al, 2006).

Como ejemplo de patologías que están relacionadas con la disfunción endotelial y estrés oxidativo se encuentra, la hipertensión donde se ha encontrado que la presión se eleva por la acción de radicales libres, debido a que inhiben la producción del óxido nítrico en el endotelio (Yang et al, 2002).

Actualmente, se ha descrito que hay una enzima que ha sido implicada en la regulación de la síntesis de óxido nítrico y el desarrollo de enfermedad vascular (Durante et al, 2007), ya que es una enzima que compite con la sintasa de óxido nítrico por L-arginina, no solo reduciendo la formación de  $NO^{\bullet}$  si no que incrementa la producción de superóxido por desacoplamiento de NOS generando exceso de peroxinitrito (Sankaralingam et al, 2010); esta enzima es la arginasa.

## **I.4. Arginina**

### **I.4.a. Estructura y función**

La arginina (2-amino-5-ácido guanidinovalérico), es un aminoácido semiesencial (Bode-Böger et al, 2007), (condicionalmente esencial) con importantes funciones fisiológicas; está presente en sangre con una concentración  $\approx 100\mu M$  y es transportado dentro de las células por un transportador de aminoácidos, con una concentración de 0.5-2 mM en células endoteliales (Xu et al, 2004), sirve como precursor no solo para la síntesis de proteína además participa en forma importante en la síntesis de óxido nítrico, urea, poliaminas prolina,

glutamato, creatinina y agmatina,<sup>(Wu et al,1998; Durante et al, 2007)</sup>; es capaz de favorecer la secreción de diversas hormonas, como la insulina, glucagón, catecolaminas, prolactina y hormona del crecimiento<sup>(Duarte et al, 2008)</sup>.

El óxido nítrico sintasa tiene una gran afinidad por su sustrato, L-arginina, que se encuentra en concentraciones altas en el endotelio; por eso, resultaba sorprendente que el funcionamiento de esta enzima estuviera condicionado por las variaciones en las concentraciones de arginina debidas al aporte nutricional. A esto se le llamó "paradoja de la arginina"<sup>(Bode-Böger et al, 2007; Martínez et al, 2004)</sup>. Sin embargo, la síntesis de óxido nítrico por la L-arginina puede ser bloqueada por una gran variedad de análogos de arginina; en el sistema cardiovascular, estos inhibidores de la NOS pueden inducir vasoconstricción, formación de trombos y aterogénesis. Algunos de estos inhibidores son: N<sup>0</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), N<sup>0</sup>-mono-methyl-L-arginina (L-NMMA) y dimetilarginina asimétrica (ADMA)<sup>(Chatterjee et al, 2008)</sup>. Estos compuestos disminuyen la formación del óxido nítrico por inhibición competitiva con el sustrato natural, L-arginina.

#### I.4.b. Metabolismo de Arginina

De las enzimas que sintetizan y catabolizan a la arginina están la argininosuccinato sintasa, las 2 isoenzimas arginasas, las 3 isoenzimas sintasas de oxido nítrico y arginina descarboxilasa han sido reconocidos en años recientes como factores clave que regulan aspectos del metabolismo de arginina<sup>(Wu et al, 1998)</sup>.

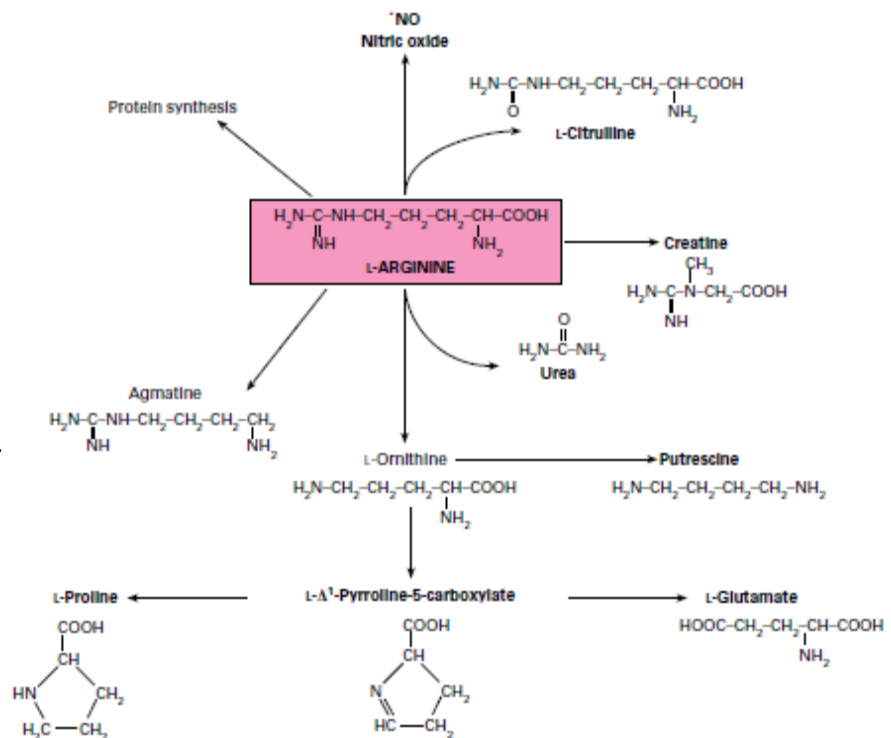


Figura 5. Metabolismo de Arginina<sup>(Wu et al, 1998)</sup>.

La citrulina, que es coproducida con NO<sup>•</sup>, puede ser reciclada a arginina por medio de una vía que se ha llamado ciclo de citrulina/NO<sup>•</sup> o el ciclo de arginina/citrulina, este reciclaje es consumado por la acción combinada de argininosuccinato sintasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL). La existencia del ciclo de citrulina/NO<sup>•</sup> es apoyado por el hecho de que la producción total de citrulina es menor que el total de la producción de NO<sup>•</sup>. También la L-glutamina es un regulador fisiológico de la síntesis de arginina (Wu et al, 1998).

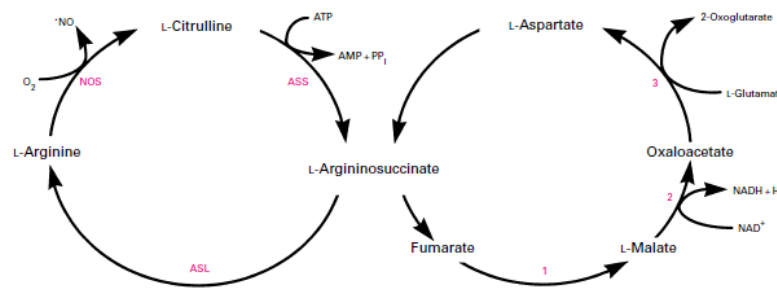


Figura 6. Ciclo Citrulina/NO<sup>•</sup> (Wu et al, 1998).

## I.5. Arginasa

### I.5.a. Estructura y Función

La arginasa es una metaloproteasa binuclear de manganeso, y es una enzima central del ciclo hepático de la urea, que cataliza la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina y urea.

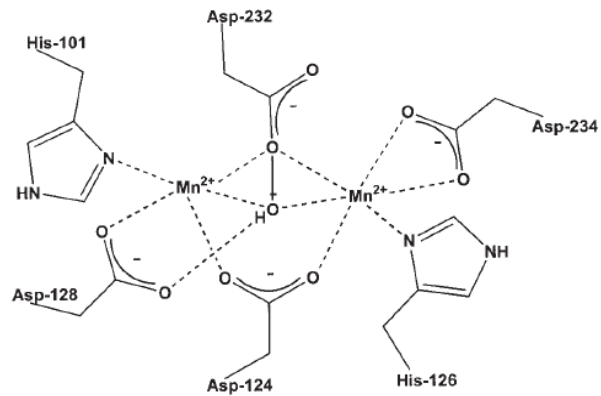
Una característica de la arginasa es su requerimiento de cationes divalentes para su actividad. Mn<sup>2+</sup> es el activador fisiológico, aunque el requerimiento de cationes divalentes ha sido reportado como Co<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup> y en algunas instancias por Fe<sup>2+</sup>, VO<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup>. La arginasa tiene un pH óptimo alcalino, con velocidades máximas observadas en el rango de pH de 9 a 9.5 (Ash, 2004).

La especificidad del sustrato de la arginasa depende de: 1) la presencia de un grupo intacto guanidino, 2) la longitud adecuada y la hidrofobicidad de la cadena lateral y 3) la estereoquímica y naturaleza de los sustituyentes en C $\alpha$  (Ash, 2004).

La arginasa hepática es un homotrimerio de 105 kDa y cada subunidad de 35 kDa contiene en el centro Mn (II) que es fundamental para la actividad catalítica, cada subunidad pertenece a la familia  $\alpha/\beta$ . Cada subunidad de la enzima trimerica contiene un sitio activo que se encuentra a 15 Å de profundidad. Los 2 iones de Mn (II) esenciales son localizados en la parte inferior de esta hendidura separados por ~ 3.3 Å (Ash, 2004).

La estructura de Mn (II) binuclear es casi idéntica la arginasa humana II a la arginasa I de rata, un hallazgo que no es de extrañar teniendo en cuenta que todos los ligandos de metal se conservan entre las dos secuencias.

Figura 7. Centro binuclear de arginasa I de hígado de rata (Ash, 2004)



Evidencia sugiere que la arginasa puede promover la proliferación del músculo liso vascular y deposición de la matriz extracelular, por generación de moléculas biológicamente importantes, como el incremento en la actividad de la ornitina descarboxilasa y síntesis de poliaminas (Durante et al, 2007). La actividad de la arginasa miometral durante el embarazo incrementa ~ 25 veces para el suministro de crecimiento rápido del feto con poliaminas para facilitar la proliferación de las células (Ash, 2004).

**Mecanismo Catalítico:**

El mecanismo catalítico propuesto por Kanyo y cols, consiste con la disposición bioquímica, enzimológica y datos estructurales:

Las principales características de este mecanismo incluyen: 1) Una cadena lateral precatalítica para arginina se vincula con la cadena lateral de Glu 277, juega un papel en el reconocimiento del sustrato. 2) Ataque de un ion hidróxido puente-metal nucleofílico. 3) Formación de un intermediario tetraédrico neutral que se estabiliza por el centro binuclear Mn (II) y 4) Un Posible papel para His141 como un servicio de transporte de protones transferido entre el sitio activo y la mayoría del solvente (Ash, 2004).

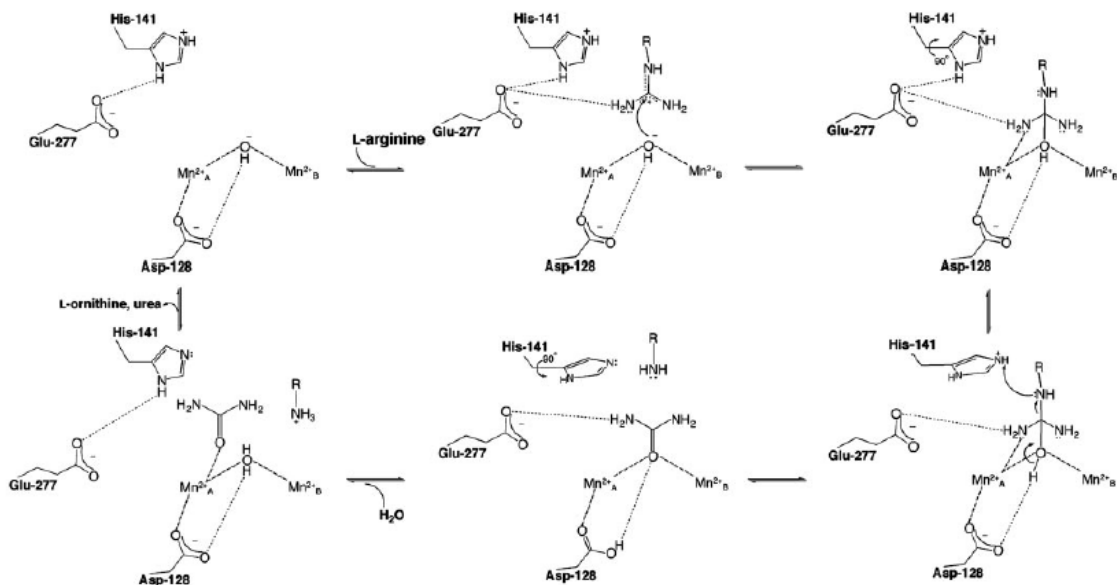


Figura 8. Mecanismo propuesto de arginasa humana I. (Di Costanzo et al, 2005)

His 141 se encuentra aproximadamente cerca de la hendidura del sitio activo y se ha propuesto que este residuo es un servicio de transporte de protones, de forma análoga His64 de anhidrasa carbónica II, que se sabe que facilita la transferencia de protones entre zinc y la mayoría del solvente, con el fin de regenerar la actividad catalítica de hidróxido de zinc (Ash, 2004).

Además, His141 es altamente reactivo hacia los reagentes modificados de histidina como es diethylpyrocarbonate y la enzima modificada solo tiene alrededor del 10% de actividad residual.

La arginasa I observada en la estructura de cristal de hígado de rata, revelo una estructura trimerica en la que cada monómero adopta una unidad  $\alpha\beta$  que consiste en una cadena paralela de 8 uniones de hojas  $\beta$  rodeada a ambos lados por varias  $\alpha$ -hélices.

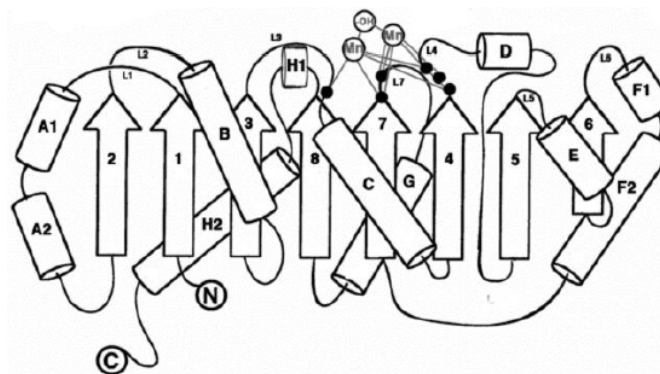


Figura 9. Estructura secundaria de arginasa. La posición de los iones metálicos, están ligados por residuos del extremo C-terminal de la cadena  $\beta$ , 4 y 7 (Dowling et al. 2008).

La cadena de aminoácidos que coordinan a los iones de manganeso en el sitio activo de la arginasa se encuentra en el borde de la cadena central  $\beta$  en el segmento inmediatamente adyacente a las cadenas 8, 7 y 4. El grupo binuclear  $Mn_A^{2+} - Mn_B^{2+}$  en la enzima exhibe una separación de  $\sim 3.3 \text{ \AA}$  (Dowling et al. 2008), de acuerdo con el estudio de resonancia paramagnética electrónica espectroscópica.

Cada monómero tiene aproximadamente dimensiones de  $40 \times 50 \times 50 \text{ \AA}$ . La subsecuente determinación de estructuras de cristal de arginasa I humana trimerica y arginasa humana II, así como arginasa hexamerica de *Bacillus caldovelox* y *Thermus Thermophilus*, revelan idénticas estructuras terciarias de los monómeros de cada especie.



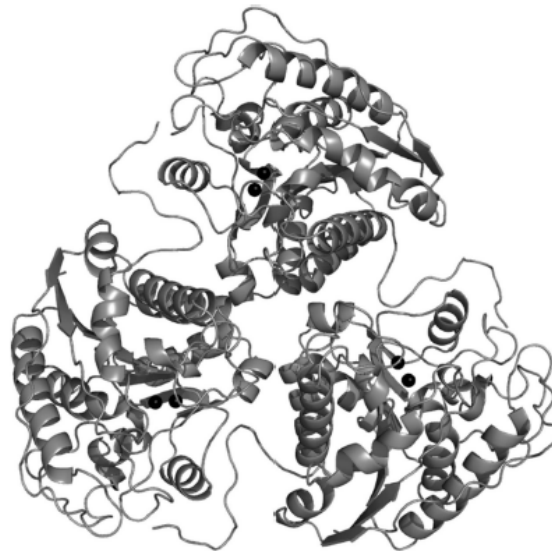


Figura 10. Ribbon-plot del trímero de arginasa de rata, el grupo  $Mn^{2+}-Mn^{2+}$  en el sitio activo de cada monómero es representado por un par de esferas (Dowling et al, 2008).

La identificación de arginasa en la LCA (Last Common Ancestor -último ancestro común), refleja la importancia de la homeostasis de la arginina en el funcionamiento metabólico y el reclutamiento de la arginasa para servir a otras funciones catalíticas en diversos ámbitos de la vida sugiere esta particular unidad  $\alpha/\beta$  plegada es fuertemente estable y fácilmente capaz de evolucionar (Dowling et al, 2008).

### I.5.b. Clasificación

La enzima arginasa se encuentra en el organismo en 2 isoformas (I y II) (Vanhoutte, 2008). Estas 2 isoformas comparten aproximadamente el 60% de homología de la secuencia de aminoácidos (Durante et al, 2007).

La arginasa I es una enzima citosólica que está abundantemente presente en el hígado y constituye la mayoría de la actividad de la arginasa total del cuerpo;

La arginasa tipo II es una proteína mitocondrial, principalmente extrahepática, siendo altamente presente en el riñón y la próstata y pobremente presente en el hígado (Durante et al, 2007), también se ha visto expresada en niveles bajos en cerebro, intestino delgado, glándula mamaria y macrófagos (Wu et al, 1998).

También han sido detectadas la arginasa I y II en varios vasos sanguíneos, incluyendo la aorta, carótida, arteria pulmonar, coronarias y arteriolas (Durante et al, 2007). En la vasculatura la arginasa I es expresada tanto en músculo liso vascular y endotelio, mientras que la arginasa tipo II es altamente expresada en el endotelio (Sankaralingam et al, 2010).

El desarrollo de N-hydroxy-guanidinium o derivados del ácido bórico, como  $N^G$ -hydroxy-nor-L-arginina, ácido 2(S)-amino-6-boronoheptanoico (ABH) y S-(2-boronoethyl)-L-



cysteine (BEC), son altamente específicos y efectivos inhibidores que pueden ser usados para probar la función de la arginasa<sup>(Christianson,2005)</sup>.

### **I.6. Arginasa y síntesis de óxido nítrico**

La disponibilidad del sustrato L- arginina que es compartido por la enzima óxido nítrico sintasa puede ser influenciada por la actividad de otra enzima la arginasa. Así se ha propuesto que el incremento en la actividad de arginasa y la utilización de L-arginina limita el acceso del sustrato común a la óxido nítrico sintasa, dirigiendo un desacoplamiento con producción reducida de óxido nítrico y producción aumentada de aniones superóxido.<sup>(Vanhoutte, 2008)</sup>

Considerando las propiedades bioquímicas, la afinidad de L-arginina es mucho más alta para NOS ( $K_m \sim 2\text{-}20 \mu\text{M}$ ) que para arginasa ( $K_m \sim 1\text{-}5 \text{ mM}$ ), la velocidad máxima de actividad de arginasa a pH fisiológico (aprox.  $1400 \mu\text{mol}/\text{min. por mg}$ ) es más de 1000 veces que de NOS (aprox.  $1 \mu\text{mol}/\text{min. por mg}$ ) sugiriendo tasas similares de utilización de sustrato a concentraciones fisiológicas de L-arginina<sup>(Chatterjee et al, 2008; Wu et al, 1998)</sup>.

La sobreexpresión de arginasa I y II suprime la generación de  $\text{NO}^\bullet$  en células endoteliales y esto está asociado a una disminución significativa en el contenido de L-arginina intracelular<sup>(Li et al, 2001)</sup> La presencia constitutiva de arginasa en células endoteliales microvasculares contrarrestan la dilatación mediada por  $\text{NO}^\bullet$ , sugiriendo que la arginasa tenga una función vasoconstrictora tónica<sup>(Zhang et al, 2001; Johnson et al, 2005)</sup>.

Los resultados de Li y cols indican que la expresión de la arginasa puede modular la síntesis de  $\text{NO}^\bullet$  en células endoteliales de bovino y que los niveles basales de arginasa I y II son limitantes para la síntesis de poliaminas, prolina y glutamato y puede tener importantes implicaciones para la cicatrización de heridas, angiogenesis y función cardiovascular<sup>(Li et al, 2001)</sup>.

A parte de bloquear la síntesis de  $\text{NO}^\bullet$  por la disminución del sustrato L-arginina, la arginasa inhibe la expresión de NOS inducible por la represión de la traducción, así como su estabilidad<sup>(Lee et al, 2003; El-Gayar et al, 2003)</sup>. Por otra parte la arginasa puede inhibir la producción de  $\text{NO}^\bullet$  mediado por iNOS a través de la generación de urea<sup>(Prabhakar et al, 1997)</sup>. Estos hallazgos sugieren que la arginasa regula a la baja la formación de  $\text{NO}^\bullet$ , a través de múltiples mecanismos.

Curiosamente, NOS y arginasa están recíprocamente reguladas a nivel transcripcional en macrófagos de murino y en células dendríticas por citocinas de TH1 y TH2, respectivamente. Por otra parte la NOS y arginasa son reguladas a nivel de de la actividad

de la enzima: la funcionalidad de la actividad de arginasa inhibe la NOS por disminución del sustrato L-arginina y la potente actividad de NOS inhibe a la arginasa por la generación y liberación de pequeña cantidad de N<sup>0</sup>-hydroxy-L-arginine (L-NOHA), un inhibidor competitivo de arginasa, con una K<sub>i</sub> de 10 a 42 μmol/L<sup>(Dowling et al, 2008; Ash,2004)</sup> sugiriendo que NOS también puede influir en la actividad de arginasa<sup>(Boucher et al,1994)</sup> y la generación de NO<sup>•</sup> en si puede nitrosilar el residuo cisteína de arginasa humana I y modular su actividad.

Por lo que, cantidades significativas del intermediario L-NOHA del sitio activo de NOS sirve como un inhibidor endógeno en macrófagos y células endoteliales<sup>(Ash, 2004)</sup>. La naturaleza y la importancia de estas interacciones de regulación recíproca entre estos 2 sistemas enzimáticos en la circulación, aun no se han determinado completamente.

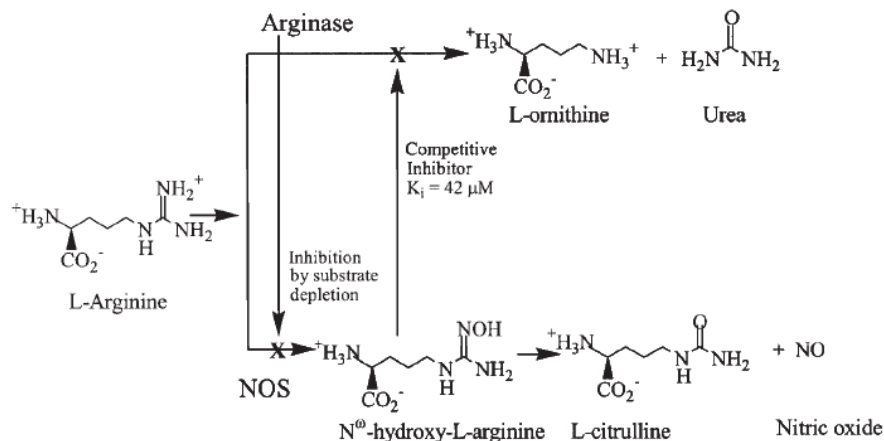


Figura 11. Relación entre la actividad de arginasa y actividad de NOS. La síntesis de L-NOHA por la NOS requiere O<sub>2</sub> como sustrato<sup>(Ash, 2004)</sup>.

Desde una perspectiva general varios autores mencionan que la disfunción endotelial es debida a una liberación disminuida de óxido nítrico. No hay duda en que la producción disminuida de este mediador endotelial juega un papel clave en la enfermedad vascular, sin embargo la función endotelial y la disfunción van más allá que la producción normal/anormal de oxido nítrico, ya que contribuyen a esta función otras sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras, como el factor hiperpolarizante derivado del endotelio y factor de contracción derivado del endotelio, respectivamente<sup>(Vanhoutte, 2008)</sup>.

### 1.7. Arginasa e Hipertensión.

Evidencia sugiere que la regulación de la arginasa juega un papel en la patofisiología de la hipertensión arterial esencial.

La disfunción endotelial y el deterioro asociado en la producción de NO en la vasculatura ha sido en gran parte implicada en la patogénesis de la hipertensión arterial.



Sorprendentemente el papel de la arginasa en la hipertensión ha sido poco documentada. El incremento en la expresión/actividad de la arginasa ha sido reportada en varios lechos vasculares en los modelos de hipertensión, la regulación positiva de la arginasa contribuye a la disminución de la vasodilatación cutánea en humanos hipertensos. Recientes estudios reportan que al inhibir la actividad de la enzima arginasa previene el desarrollo de hipertensión y mejora la función endotelial aortica vía óxido nítrico cuando se les administra a ratas espontáneamente hipertensas. A partir de estos experimentos ha surgido el concepto de que la inhibición de la arginasa puede representar una estrategia nueva en la hipertensión (Bagnost et al, 2010)



## **II. Planteamiento del Problema**

La preeclampsia es una enfermedad multifactorial, caracterizada principalmente por hipertensión y proteinuria. Las probables causas es la placentación anormal, la disfunción endotelial y estrés oxidativo, dando como consecuencia la disminución de óxido nítrico.

Sin embargo cabe la posibilidad de que otro factor que interviene en la función o disponibilidad del NO<sup>•</sup> y por lo tanto en el aumento de la presión, es la actividad de la enzima arginasa, la cual compite con la sintasa de óxido nítrico por el sustrato arginina.

Por lo tanto en este trabajo se planteo la posibilidad de que en la Preeclampsia, la actividad de la enzima arginasa esta aumentada en comparación con embarazo normal.

## **III. Justificación**

Según el Comité de Terminología del Colegio de Obstetricia y Ginecología, la preeclampsia constituye de un 10 a un 15% de todos los embarazos, el Sistema Nacional de Salud la detectó como la causa de muerte materno-fetal más frecuente para el 2007, por lo que una detección oportuna ayudaría a disminuir esta mortalidad. Es por esto, que este trabajo pretendió de primera instancia, determinar la participación de la arginasa en plasma. De ser cierto, en estudios posteriores se podrían tomar muestras de sangre en semanas previas a que se presente la preeclampsia y determinar si la actividad de la arginasa comienza a ser diferente en comparación al embarazo normal. Lo cual sería una herramienta que nos ayude a generar nuevas estrategias preventivas y así evitar las complicaciones.



#### **IV. Hipótesis**

La actividad de la enzima arginasa se encuentra aumentada en pacientes que presentan preeclampsia en comparación al embarazo normal, contribuyendo a la disminución de óxido nítrico.

#### **V. Objetivos**

##### **V.1.a. Objetivo General**

Evaluar si la actividad de la enzima arginasa en plasma participa en la preeclampsia y su relación con la disminución de óxido nítrico.

##### **V.1.b. Objetivos Particulares**

1. Determinar si las mujeres con preeclampsia presentaban estrés oxidativo en comparación con los embarazos normales.
2. Determinar en plasma la concentración del nitritos/nitratos como un marcador de la producción de NO<sup>•</sup>.
3. Determinar en plasma la actividad de la enzima arginasa y determinar si existe correlación con los marcadores de estrés oxidativo y nitritos/nitratos.

## VI. Material y Métodos

### Tipo de estudio

Este es un estudio comparativo, transversal, observacional, prospectivo con riesgo menor al mínimo.

### VI.1.a. Criterios de Selección de la población de estudio.

Se seleccionaron pacientes de consulta externa, tococirugía y hospitalización del servicio de Gineco-Obstetricia del Hospital Juárez de México y que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión.

*Criterios de inclusión de las mujeres con embarazo normal (EN).*

Edad reproductiva 20-30 años, con embarazo de la semana 20 a la 40, sin hipertensión arterial crónica o diabetes mellitus, sin tratamiento médico, que acepten participar en el proyecto.

*Criterios de inclusión de las pacientes con preeclampsia (PE).*

Edad reproductiva 20-30 años, con embarazo de la semana 20 a la 40, con preeclampsia (PA  $\geq$  140/90 mmHg más proteinuria  $\geq$  0.3 g de proteína en orina de 24 horas o 1+ (30 mg/dl) en tira reactiva en 2 mediciones con intervalo de 6 horas).

Que no se les haya aplicado tratamiento, que acepten participar en el proyecto y firme la carta de consentimiento informado.

*Criterio de inclusión de mujeres voluntarias sanas (VS).*

Edad reproductiva 20-30 años, sin embarazo, que tengan un Índice de Masa Corporal (IMC) de 18.50 a 24.99 kg/m<sup>2</sup>, de acuerdo a la clasificación de la OMS, que corresponde a peso normal, sin hipertensión arterial crónica, diabetes mellitus o alguna otra enfermedad, sin tratamiento médico, que acepten participar en el proyecto.

*Criterio de inclusión de mujeres obesas (OB).*

Edad reproductiva 20-30 años, sin embarazo, que tengan un IMC de 30.00 a 34.99 kg/m<sup>2</sup>, que corresponde a obesidad tipo I, sin hipertensión arterial crónica, diabetes mellitus o alguna otra enfermedad, sin tratamiento médico, que acepten participar en el proyecto.

*Criterio de exclusión.* Que no se compruebe el diagnóstico de preeclampsia.

*Criterio de eliminación.* Pacientes que quieran ya no participar en el protocolo.

### VI.1.b. Tamaño de muestra

El tamaño de la muestra se realizó basándose en el trabajo de Ruiz y colaboradores (2007), el cual fue un estudio de casos y controles, basado en casos incidentes. Se utilizó la siguiente fórmula para la estimación de media <sup>(León et al, 2003)</sup>.

$$n = \frac{(Z^2 \sigma^2)}{\varepsilon^2} \qquad \varepsilon = \frac{\sigma Z\alpha}{\sqrt{n}} = \frac{(2.7)(1.96)}{\sqrt{21}} = 1.15$$

n = No. de pacientes.

Z $\alpha$  = 1.96 donde  $\alpha$  = 95%.

$\sigma$  =  $\pm$  DE de la población = 2.7  $\mu$ M nitritos <sup>(Ruiz et al., 2007)</sup>

$\varepsilon$  = error estándar de la población = 1.15  $\mu$ M

$$n = \frac{(1.96^2)(2.7^2)}{(1.15)^2}$$

$$n = 21.17 \text{ más el } 10 \% \text{ de pérdida} = 23.17 = \mathbf{24}$$

Resultando que por cada grupo serían 24 personas.

### VI.1.c. Diseño Experimental

En el caso de embarazadas sin preeclampsia, se registró la medición de la tensión arterial y la muestra de sangre se tomó cuando a la paciente se le instaló la solución parenteral en vena periférica, en tubos de ensaye con anticoagulante, un tubo con EDTA se envió para análisis clínico de rutina (biometría hemática) y se solicitó examen general de orina para determinar proteinuria y el segundo tubo con Heparina, se centrifugó el plasma del paquete globular y el plasma se congeló a  $-20^\circ\text{C}$ . Se solicitó consentimiento para participar en el proyecto.

En el caso de las pacientes embarazadas con preeclampsia, se corroboró el diagnóstico de preeclampsia en el servicio de tococirugía y/o hospitalización, se registró la tensión arterial desde su ingreso hasta el nacimiento del recién nacido. Se corroboró si presentó proteinuria mayor a 3 g en 24 horas. Al momento de que se instaló la solución parenteral se tomaron dos tubos uno para exámenes de rutina y el segundo tubo con heparina, se utilizó para obtener plasma y se congeló a  $-20^\circ\text{C}$ . Se solicitó consentimiento verbal y si estaba en condiciones por escrito de su aceptación de participar en el protocolo.

En el caso de las pacientes voluntarias sanas y obesas, se realizó una breve historia clínica y se registró la tensión arterial, peso, talla, edad, gestas y se tomó la muestra con un tubo



con heparina, del cual se obtuvo el plasma y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se solicitó consentimiento para participar en el proyecto.

#### **VI.1.d. Cuantificación de Proteínas.**

Se realizó medición de proteínas totales por el método de Lowry (1951), el cual es un método colorimétrico de valoración cuantitativa, que consta de dos etapas: en la primera los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tienen un color azul claro, además provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo los residuos de tirosina que van a participar en la segunda fase de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato. En la segunda etapa, el cobre actúa como catalizador de la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por parte de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu, es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los fenoles da lugar a un complejo de color azul intenso.

Se tomó 1  $\mu\text{l}$  de plasma y se ajustó a un volumen de 250  $\mu\text{l}$  con agua destilada, se mezcló con 1 ml de solución cuproalcalina que contiene  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%, tartrato de sodio y potasio al 0.02% en  $\text{NaOH}$  0.1N y  $\text{CuSO}_4$  al 0.5% en agua destilada, posteriormente se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se agregó 100  $\mu\text{l}$  de reactivo Folin-Ciocalteu, (previamente diluido en una proporción 1:1 en agua destilada) y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Obteniendo lectura de absorbancia a 550 nm, se utilizó como estándar albúmina bovina. Reportándose los resultados en mg de proteína/ ml de plasma (Lowry et al, 1951)

#### **VI.1.e. Marcadores de estrés oxidativo**

##### **✓ Cuantificación de grupos carbonilo**

El daño a proteínas se determinó cuantificando grupos carbonilos. Uno de los biomarcadores más utilizados de daño a proteína por oxidación. Este método se basa en hacer reaccionar los grupos carbonilo presentes en la proteína con el compuesto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), formando dinitrofenilhidrazonas que son un producto estable, detectable a 370 nm de longitud de onda, con un coeficiente de extinción molar de  $22,000/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} = 22,000/10^6 \text{ nmol/ml}$  (Dalle-Donne et al, 2003)



Se tomaron 50  $\mu$ l de plasma y se mezclaron con 500  $\mu$ l de DNPH 10 mM, preparada con HCl 2.5M, teniendo cada problema con su respectivo blanco, el cual contenía 50  $\mu$ l de plasma y 500  $\mu$ l de HCl 2.5 M, posteriormente se incubaron a temperatura ambiente y protegidos de la luz, por una hora, agitándolos gentilmente cada 15 minutos. Al concluir el tiempo se agregó 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante se vació al recipiente de desechos, quedándonos una pastilla, la cual fue rota con una varilla de vidrio agregando 1 ml de TCA al 2.5% y se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos, eliminando el sobrenadante, la pastilla se disolvió en 2 ml de etanol/acetato de etilo (1:1), se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla 5 minutos, y finalmente fue disuelta en 1 ml de Guanidina 6M, pH 2.3 e incubado por 10 minutos a una temperatura de 37°C, las lecturas de absorbancia fueron medidas a una longitud de onda de 370 nm<sup>(Dalle-Donne et al, 2003)</sup>.

El coeficiente de extinción molar de la dinitrofenilhidrazina se utilizó para cuantificar los nmol de osazona y los resultados obtenidos se ajustaron por mg de proteína, para reportarse como nmol de osazonas/mg proteína.

#### ✓ **Cuantificación de productos de lipoperoxidación. Malondialdehído (MDA).**

La peroxidación lipídica es un mecanismo bien establecido de lesión celular y se utiliza como un indicador de estrés oxidativo. Los productos de lipoperoxidación incluyen aldehídos reactivos, de los cuales el más abundante es malondialdehído (MDA). Por lo que, la medición de MDA es ampliamente utilizado como un indicador de la peroxidación lipídica.

El daño a lípidos en plasma se determinó mediante el método de 1-methyl-2-phenylindole (MPI), descrito por Gérard-Monnier et al, 1998, en la cual se basa en una técnica espectrofotométrica basada en la reacción de dos moléculas del reactivo cromogénico 1 - methyl - 2 - phenylindole con una molécula de MDA a 45°C que conduce a un cromóforo estable.

Para lo cual se necesitaron 100  $\mu$ L de plasma adicionándole 100  $\mu$ l de agua destilada, 650  $\mu$ l de 1-methyl-2-phenylindole 10 mM en acetonitrilo/metanol (3:1) y por último se agregó 150  $\mu$ l de HCl 37%; Al adicionar todo se deja en un periodo de incubación a 45°C durante 40 minutos; transcurrido el tiempo se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos, tomando cuidadosamente el sobrenadante, volviendo a centrifugar a 3500 rpm, se tomó el

sobrenadante y se procedió a leer las absorbancias a una longitud de onda de 586 nm. Los resultados obtenidos se reportaron en  $\mu\text{M}$ .

Se utilizó como estándar 1, 1, 3,3-tetrametoxipropano (Malondialdehído bis (dimetilacetal)) (Sigma. S. Louis, MO, USA).

#### ✓ **Cuantificación de grupos sulfidrilos totales.**

Los grupos SH son cuantificados como parámetro de defensa antioxidante por la capacidad de inactivar a los radicales libres. La determinación se hizo mediante la técnica de Habeeb (1972) con el reactivo de Ellman y 100  $\mu\text{L}$  de plasma.

El reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico) o DTNB es utilizado para cuantificar grupos tiol, estos grupos reaccionan con el DTNB, rompiendo la unión disulfido generando 2-nitro-5-tiobenzoato ( $\text{TNB}^-$ ), el cual se ioniza con agua a pH alcalino o neutro generando el dianion  $\text{TNB}^{2-}$ , el cual es de color amarillo y es cuantificado a 412 nm, usando como coeficiente de extinción  $14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Ellman, 1959).

En esta técnica se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de plasma y se mezclaron con 450  $\mu\text{l}$  de Tris-Base 0.2 M pH 8.2, 50 $\mu\text{l}$  de DTNB 1.5 mM y 450  $\mu\text{l}$  de Metanol absoluto, teniendo cada problema su respectivo blanco, que consistía en 50  $\mu\text{l}$  de plasma, 500 $\mu\text{l}$  de Tris-Base 0.2 M pH 8.2 y 450  $\mu\text{l}$  de Metanol absoluto. Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y protegidos de la luz, al concluir el periodo de tiempo se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos, se recupero cuidadosamente el sobrenadante y se realizaron lecturas de absorbancias a una longitud de onda de 412 nm (Ellman, 1959). Se utilizó como estándar cisteína (Sigma St. Louis, MO, USA). Los resultados se ajustaron por mg de proteína y se reportaron en nmol/mg de proteína.

#### **VI.1.f. Cuantificación de Nitritos/Nitratos**

Se midieron las concentraciones de los metabolitos más estables del  $\text{NO}^{\bullet}$  los nitritos/nitratos, como una manera indirecta de determinar la formación de  $\text{NO}^{\bullet}$ , de acuerdo a la Reacción de Griess (Giustarini et al, 2008).

Esta determinación cuantitativa se realizó por medio del estuche comercial de “Análisis Colorimétrico Nitrato/Nitrito” (Cayman Chemical Company, USA).

Es un método para la medición de la concentración total de nitrato / nitrito y consta de dos pasos:



El primer paso es la conversión de nitrato a nitrito por la enzima nitrato reductasa. El segundo es la adición de los reactivos Griess, que convierten el nitrito en un color azo-púrpura.

Se tomaron 40  $\mu$ l de plasma y se le adicionó 40  $\mu$ l de Buffer, más 10  $\mu$ l del cofactor para nitrato reductasa y 10  $\mu$ l de enzima nitrato reductasa, se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas, cubriendo todos los pozos. Después de haber transcurrido el tiempo se adicionó 50  $\mu$ l del Reactivo de Griess R1 (Sulfanilamide) y 50  $\mu$ l del Reactivo de Griess R2 (N-(1-Naphthyl ethylenediamine), se deja en incubación a temperatura ambiente por 10 minutos para que desarrolle el color, una vez pasado el tiempo se leen las absorbancias a una longitud de onda de 540 nm.

#### **VI.1.g. Cuantificación de actividad de enzima Arginasa**

La arginasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de arginina en ornitina y urea. Se realizó la actividad de la enzima arginasa por la técnica descrita por Corraliza (1994), el cual es un método colorimétrico de valoración cuantitativa que consta primero de activar a la enzima con  $MnCl_2$ , posteriormente adicionar el sustrato arginina y detener la reacción con una mezcla de ácidos, agregando posteriormente  $\alpha$ -Isonitrosopropiophenone para determinar colorimétricamente la liberación de uno de los productos, la urea.

Se tomaron 20  $\mu$ l de plasma y se mezcló con 80  $\mu$ l de Tris Buffer 25mM pH 7.4 más  $MnCl_2$  5 mM, y la enzima fue activada por 10 minutos a 55°C, transcurrido el tiempo se agregó 100  $\mu$ l de Arginina 0.5M pH 9.7, como sustrato y se incubó a temperatura ambiente durante una hora, teniendo cada problema su respectivo blanco, consistiendo en 20 $\mu$ l de plasma y 180 $\mu$ l de agua destilada. Al concluir la incubación se les agregó 400  $\mu$ l de Mezcla de ácidos (Ácido Sulfúrico  $H_2SO_4$  + Ácido Fosfórico  $H_3PO_4$  +  $H_2O$ ) (1:3:7), para detener la reacción. Posteriormente la urea formada fue cuantificada colorimétricamente después de la adición de 25  $\mu$ l de  $\alpha$ -Isonitrosopropiophenone al 9% (ISPF) disuelto en etanol absoluto, dejándolos en incubación a 100°C por 45 minutos, transcurrido el tiempo se deja a oscuras por 10 minutos y se procede a leer las absorbancias a una longitud de onda de 540 nm <sup>(Corraliza et al, 1994)</sup>.

Los resultados obtenidos se ajustaron por miligramo de proteína y se reportaron como nanomoles de urea que se producen por minuto por mg de proteína.



### **Análisis Estadístico:**

Para determinar diferencias estadísticamente significativas se utilizó T-student y ANOVA con una prueba pos hoc de Bonferroni. Los resultados se expresaron como promedios  $\pm$  EE y se consideró significativo si  $p \leq 0.05$ . También se hizo el análisis descriptivo de variables como edad, semanas de gestación, peso. El software que se utilizó fue el Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

## VII. RESULTADOS.

Cabe señalar, que inicialmente el trabajo contemplaba únicamente comparar el grupo de embarazo normal con el de preeclampsia. Sin embargo, fue necesario adicionar dos grupos más: uno de mujeres sanas con un Índice de Masa Corporal (IMC) de 18.50 a 24.99 kg/m<sup>2</sup> y otro grupo de mujeres obesas grado 1 con IMC de 30.00 a 34.99 kg/m<sup>2</sup>. Las razones se explican más adelante.

Como se puede observar en la tabla 4, los valores de presión arterial y proteínas en orina, en el grupo con preeclampsia (PE) fueron mayores en comparación al grupo con embarazo normal (EN), comprobando que este grupo cumple con los criterios de inclusión de las mujeres preeclámpicas.

**Tabla 4. Parámetros Clínicos de Embarazo Normal y Preeclampsia.**

Parámetro Clínico	Embarazo Normal (n=24)	Preeclampsia Leve (n=22)	p < 0.05
Edad (años)	23.63 ± 1.23	25.23 ± 1.13	
Semanas de Gestación	35.11 ± 1.05	35.78 ± 0.90	
Gestas	1.92 ± 0.18	2.04 ± 0.25	
Presión Arterial Sistólica (mmHg)	111.3 ± 2.11	143.9 ± 1.74	Sí
Presión Arterial Diastólica (mmHg)	72.17 ± 1.86	95.91 ± 1.63	Sí
Proteinuria (mg/dl)	0	30	Sí
Talla (m)	1.59 ± 0.02	1.59 ± 0.01	
Peso (Kg)	71.14 ± 2.69	93.86 ± 6.48	Sí

Se realizó t-Students. Los valores representan promedios ± EE. Considerandose diferencia significativa p<0.05.

Un parámetro que sobresalió al comparar estos grupos fue el peso. Se encontró que las pacientes con preeclampsia tenían aproximadamente 20 Kg más que las de embarazo normal, esto de acuerdo a la *gráfica de incremento de peso para embarazadas de la Secretaría de Salud*, las pacientes con preeclampsia se encontraban obesas. Un peso absoluto en las mujeres grávidas por encima de 90.72 kg o IMC 30 kg/m<sup>2</sup> son definiciones de obesidad en el embarazo (Zalvalza-Gómez, 2011). Tomando en cuenta que existen características comunes entre la preeclampsia y la obesidad como la disfunción endotelial, la activación de marcadores inflamatorios y el estrés oxidativo, era probable que algunos

marcadores bioquímicos que se medieron en este trabajo como los de estrés oxidativo y nitritos/nitratos, fueran resultado del estado de obesidad y no por la preeclampsia. Para determinar la influencia de la obesidad en la preeclampsia se decidió incluir un grupo de mujeres obesas. Estas pacientes tenían un IMC de 30.00 a 34.99 kg/m<sup>2</sup> (OB) lo que corresponde a una obesidad grado 1. Además, consideramos que al estar las mujeres de embarazo normal en un peso normal, era necesario agregar un grupo más de voluntarias sanas (VS) sin embarazo con un IMC de 18.50 a 24.99 kg/m<sup>2</sup>. Esto con la finalidad de tener los controles adecuados de cada grupo (Tabla 5).

**Tabla 5. Parámetros Clínicos de los cuatro grupos (EN, PE, OB y VS).**

Parámetro Clínico	Embarazo Normal (n=24)	Preeclampsia Leve (n=22)	Obesidad I (n=13)	Voluntarias Sanas (n=14)	p < 0.05
Edad (años)	23.63 ± 1.23	25.23 ± 1.13	28.54 ± 1.52	27.71 ± 1.11	EN vs OB EN vs VS
Semanas de Gestación	35.11 ± 1.05	35.78 ± 0.90	0	0	
Gestas	1.92 ± 0.18	2.04 ± 0.25	0	0	
Presión Arterial Sistólica (mmHg)	111.3 ± 2.11	143.9 ± 1.74	113.8 ± 1.40	109.3 ± 2.66	EN vs PE PE vs OB PE vs VS
Presión Arterial Diastólica (mmHg)	72.17 ± 1.86	95.91 ± 1.63	80.00 ± 2.26	72.86 ± 2.44	EN vs PE EN vs OB PE vs VS OB vs VS PE vs OB
Proteinuria (mg/dl)	0	30	0	0	
Talla (m)	1.59 ± 0.02	1.59 ± 0.01	1.60 ± 0.02	1.61 ± 0.01	
Peso (Kg)	71.14 ± 2.69	93.86 ± 6.48	82.12 ± 2.84	64.00 ± 1.64	EN vs PE EN vs VS EN vs OB PE vs VS OB vs VS

Se realizó ANOVA con prueba pos hoc de Bonferroni. Los valores representan promedios ± EE. Considerándose diferencia significativa p<0.05.

Cuando se analizaron los datos obtenidos en los marcadores plasmáticos de daño molecular por estrés oxidativo en los diferentes grupos (**primer objetivo**) se obtuvo lo siguiente: Los grupos carbonilos plasmáticos (daño a proteínas) no muestran diferencia entre los 4 grupos (figura 12A). En cuanto a las concentraciones de MDA en plasma (daño a lípidos) fueron altas en los grupos OB, EN y PE en comparación con el grupo VS (figura 12B). Y las concentraciones de los grupos SH totales (defensa antioxidante) estaban disminuidos en el grupo de OB y PE en comparación con el grupo VS y EN (figura 12C). Este último marcador en particular es de llamar la atención, debido a que los resultados son muy similares. La concentración de SH en el grupo de EN fue de 5.91 ± 0.4 nmol/mg proteína y

del grupo VS, que consideramos como su control fue muy similar de  $6.19 \pm 0.3$  nmol/mg proteína. En el grupo de PE y OB las concentraciones de SH también fueron muy similares, en el grupo PE fue de  $4.29 \pm 0.39$  nmol/mg proteína y del grupo OB fue  $3.94 \pm 0.71$  nmol/mg proteína.

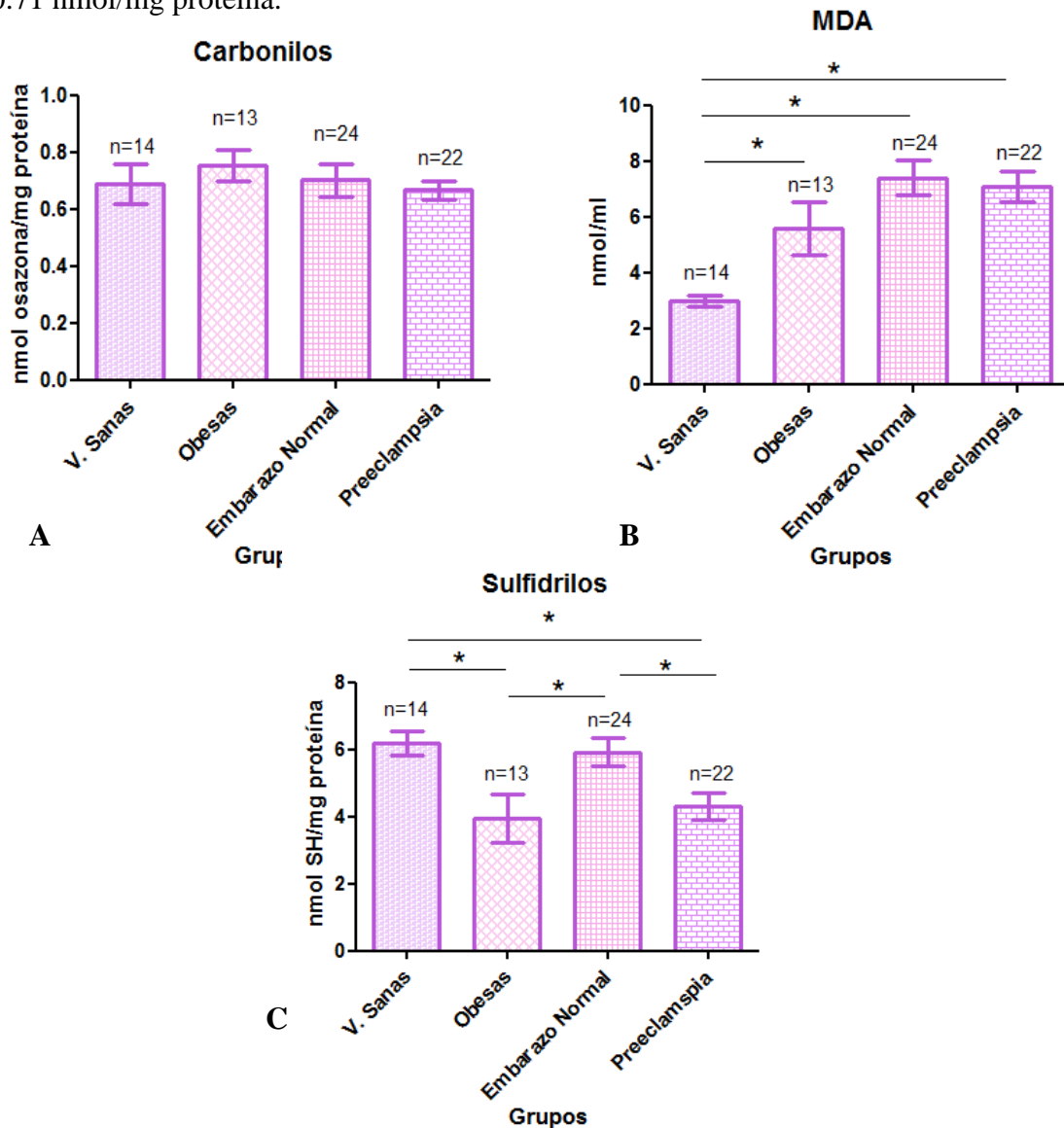


Figura 12. Marcadores plasmáticos de estrés oxidativo. A) Grupos carbonilo, marcador de daño a proteínas. B) Malondialdehido (MDA), un producto de lipoperoxidación. C) Grupos SH totales un marcador de defensa antioxidante. Se realizó ANOVA con una prueba pos hoc de Bonferroni, para determinar las diferencias entre grupos. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE.  $P < 0.05$ .

Posteriormente, se determinó la concentración de nitratos/nitritos plasmáticos (**segundo objetivo**), que es una manera indirecta de determinar la presencia de óxido nítrico, ya que estos son sus metabolitos. En la figura 13 se puede observar que la concentración de nitratos/nitritos ( $\text{NO}_3/\text{NO}_2$ ) son mayores en el grupo de las PE y OB ( $0.31 \pm 0.04$  y  $0.35 \pm$



0.03 nmol/mg proteína) en comparación con los grupos de VS y EN ( $0.24 \pm 0.02$  y  $0.22 \pm 0.02$  nmol/mg proteína, respectivamente).

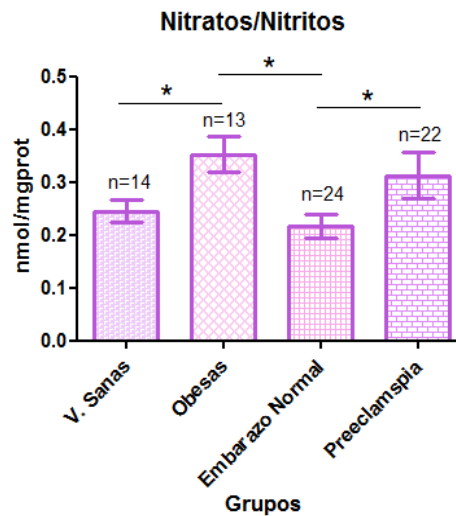


Figura 13. Concentración de nitratos/nitritos ( $\text{NO}_3/\text{NO}_2$ ). Se realizó ANOVA con una prueba pos hoc de Bonferroni, para determinar las diferencias con respecto al grupo control. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE.  $p < 0.05$

Al determinar la actividad de la enzima arginasa (**tercer objetivo**), esta actividad se encontró disminuida en el plasma de los grupos OB y PE ( $0.30 \pm 0.04$  y  $0.31 \pm 0.03$  nmol/mg proteína/min) en comparación con los grupos de VS y EN ( $0.42 \pm 0.04$  y  $0.45 \pm 0.05$  nmol/mg proteína/min, respectivamente) (figura 14). Contrario a lo que esperábamos.

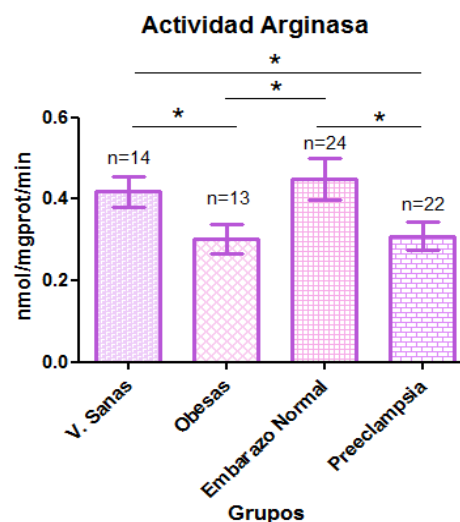


Figura 14. Actividad de la enzima arginasa. Se realizó ANOVA con una prueba pos hoc de Bonferroni, para determinar las diferencias entre grupos. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE.  $*p < 0.05$ .

Para analizar los resultados obtenidos de cada marcador, entre los cuatro grupos, se realizó una ANOVA y se presentan en la tabla siguiente.

**Tabla 6. Marcadores plasmáticos de estrés oxidativo y actividad de enzima arginasa.**

Marcadores	Embarazo Normal (n = 24)	Preeclampsia Leve (n= 22)	Obesidad I (n = 13)	Voluntarias Sanas (n = 14)	p < 0.05
<b>Carbonilos</b> (nmol osazonas/mg proteína)	0.70 ± 0.06	0.67 ± 0.03	0.75 ± 0.05	0.69 ± 0.07	
<b>Malondialdeído</b> (nmol/ml)	7.41 ± 0.64	7.07 ± 0.55	5.58 ± 0.93	2.99 ± 0.21	VS vs OB VS vs EN VS vs PE
<b>Sulfidrilos</b> (nmol/mg proteína)	5.91 ± 0.43	4.29 ± 0.39	3.94 ± 0.71	6.19 ± 0.37	VS vs OB EN vs OB EN vs PE PE vs VS
<b>Nitratos/Nitritos</b> (nmol/mg proteína)	0.22 ± 0.02	0.31 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.24 ± 0.02	VS vs OB EN vs OB EN vs PE
<b>Arginasa</b> (nmol/mgprot /min)	0.45 ± 0.05	0.31 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.42 ± 0.04	VS vs OB EN vs OB EN vs PE PE vs VS

Se realizó ANOVA con prueba pos hoc de Bonferroni. Los valores representan promedios ± EE. Considerandose diferencia significativa p<0.05.

Al realizar las correlaciones entre la enzima arginasa y carbonilos, arginasa y MDA encontramos que no se encuentra ninguna relación, (Figura 15); esto mismo se observa entre arginasa y los metabolitos del óxido nítrico (nitritos/nitratos); como se muestra en la figura 16.

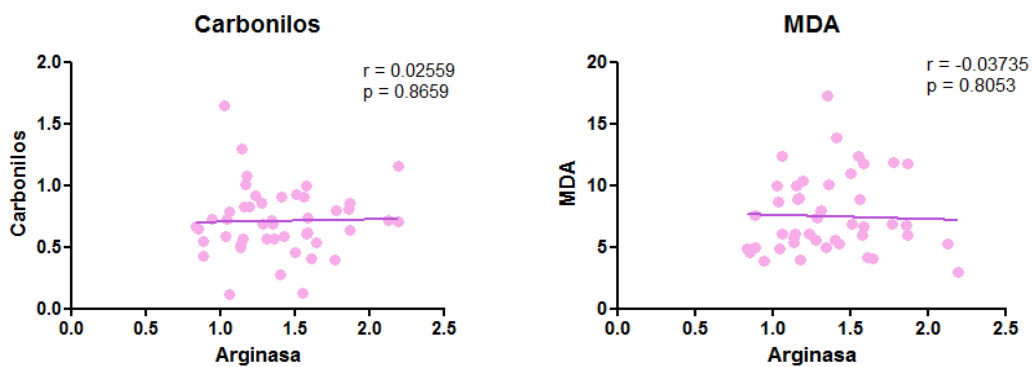


Figura 15. Correlación entre la actividad de la enzima arginasa y marcadores de estrés oxidativo.

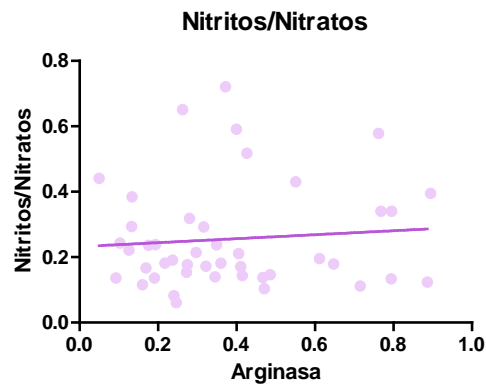


Figura 16. Correlación entre metabolitos de  $\text{NO}^\bullet$  ( $\text{NO}_3/\text{NO}_2$ ) y la actividad de la enzima arginasa

Sin embargo; como se puede observar en la figura 17, existe una correlación positiva entre la concentración de los grupos SH y la actividad de arginasa.

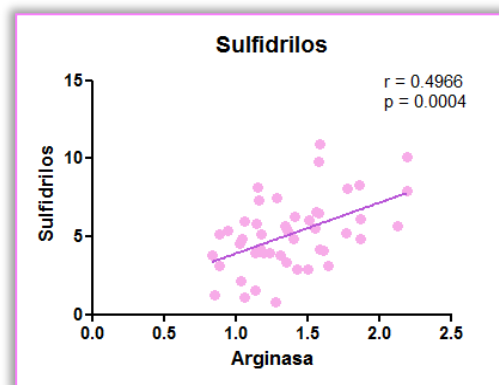


Figura 17. Correlación entre la defensa antioxidante y la actividad de la enzima arginasa

## VIII. DISCUSIÓN

La preeclampsia es un trastorno multisistémico, caracterizado por hipertensión y proteinuria. A pesar de su importancia, por la alta morbi-mortalidad que actualmente tiene, la etiología no está bien definida, entre ellas se encuentran: la placentación anormal, la disfunción endotelial y el estrés oxidativo. El estrés oxidativo en la preeclampsia se ha descrito por los valores altos en MDA (Zalvalza-Gómez, 2011; Hubel, 1999) y la disminución de las defensas antioxidantes (Atamer et al, 2005; Aydin et al 2004) en plasma y en tejido de placenta (Jauniaux et al, 2006). Los valores altos de MDA también están descritos en el embarazo normal (Loverro et al, 1996) pero aquí de forma paralela, el total de capacidad antioxidante (Hung, 2007) aumenta gradualmente durante el embarazo (Toescu et al, 2002), dando lugar a un equilibrio de oxidación mantenido durante toda la gestación.

En este trabajo pudimos corroborar lo descrito por la literatura, al encontrar que tanto las pacientes con embarazo normal como las pacientes con preeclampsia tienen las concentraciones elevadas de MDA en comparación de las voluntarias sanas. También pudimos observar que las defensas antioxidantes pueden estar disminuidas ya que encontramos que la concentración de los grupos SH totales (proteicos y no proteicos) en plasma son menores en los grupos OB y PE en comparación con los grupos VS y EN. La literatura menciona que el estrés oxidativo, en particular los radicales anión superóxido producidos pueden reaccionar con el vasodilatador  $\text{NO}^\bullet$  formando  $\text{ONOO}^-$  y de esta manera lo inactiva disminuyendo su disponibilidad (Chamy et al, 2006; Lowe, 2000; Poston et al, 2006), esto apoyado en que encuentran concentraciones de nitritos/nitratos parecidas a las de embarazo normal (Ranta, 1999), de hecho nosotros encontramos en este trabajo, que las concentraciones de nitritos/nitratos están altas en los grupos OB y PE. Esto se podría explicar con base en que cuando hay disfunción endotelial, la eNOS se desacopla y produce menos  $\text{NO}^\bullet$  pero se induce la iNOS (Sankaralingam et al, 2010; Levy et al, 2009) por lo tanto la producción de  $\text{NO}^\bullet$  entre las dos enzimas puede ser lo que nos este dando la concentración de nitritos/nitratos elevada. Sin embargo, hay otros autores que proponen que la falta de  $\text{NO}^\bullet$ , no es del todo por la formación del  $\text{ONOO}^-$ , sino que hay una disminución en la producción por parte de la eNOS (Vural, 2002; Ranta et al, 1999). Además, nosotros proponíamos un mecanismo adicional a la disfunción endotelial y al estrés oxidativo para que la producción de  $\text{NO}^\bullet$  fuera disminuida.

Existen diversos estudios que señalan que la actividad de la enzima arginasa esta incrementada en algunas enfermedades que cursan con hipertensión, entre ellas las

enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial sistémica (Levy, 2009; Roberts, 2003) y la hipertensión pulmonar (Xu, 2004), donde se ha descrito que la arginasa compite con la eNOS por el sustrato L-arginina, disminuyendo la producción de NO<sup>•</sup>, esto en células endoteliales. Por otro lado hay un reporte que menciona que la actividad de la enzima arginasa esta incrementada en tejido de placenta de mujeres que presentaron preeclampsia (Prieto et al, 2011). Con estos datos, nosotros hipotetizamos que la actividad de arginasa estaría incrementada en el plasma de mujeres preeclámpicas y que este seria un factor más para que se diera la hipertensión. Sin embargo, encontramos que la actividad de la enzima arginasa en plasma de las pacientes con preeclampsia estaba disminuida, contrario a lo que nosotros esperábamos. Interesantemente, la actividad de la arginasa en el grupo OB también estaba disminuida en comparación con nuestros grupos controles, VS y EN. El hallazgo encontrado en la disminución de la actividad de la enzima arginasa en el grupo PE, no corresponde con lo descrito en la literatura, esto puede ser debido a que los reportes donde mencionan el aumento de su actividad están realizados en tejidos, como en placenta, cordón umbilical, también lo han realizado en células endoteliales y macrófagos; y nosotros lo estudiamos en plasma. Debido a que pretendíamos utilizarlo como un biomarcador predictivo; las razones de haber utilizado plasma fueron que este material biológico lo podemos obtener antes de que la paciente entre a la semana 20 de gestación, y no tendríamos que esperar a que se presentara la operación y hasta entonces obtener el tejido de la placenta, que seria el paso final del tratamiento y es lo que se pretende evitar. Tomando en cuenta que la actividad de la arginasa fue similar entre OB y PE y que el mismo comportamiento fue observado con las concentraciones de los grupos SH y las de nitritos/nitratos, es probable que esto sea debido a la combinación del estrés oxidativo y la obesidad en el embarazo como lo describe recientemente Zalvalza-Gomez (2011) y no por la actividad incrementada de la arginasa en plasma. Esta bien descrito que la obesidad es un factor predisponente de preeclampsia. Bodnar y cols (2005), menciona que cuando la paciente se encuentra en obesidad grávida tiene mayor riesgo de tener complicaciones durante el embarazo; por lo que la ganancia de peso recomendada durante el embarazo es entre 10 y 12 Kg. Un peso absoluto en las mujeres grávidas por encima de 90.72 kg o IMC 30 kg/m<sup>2</sup> son definiciones variadas de obesidad en el embarazo (Zalvalza-Gómez, 2011). El riesgo de presentar preeclampsia comparado con un IMC de 21 kg/m<sup>2</sup> antes del embarazo, es aproximadamente el doble con IMC de 26 kg/m<sup>2</sup>, se triplica con un IMC de 30 kg/m<sup>2</sup> y se reduce a la mitad con un IMC de 18 kg/m<sup>2</sup> (Bodnar et al,

2005), por lo que refieren que el IMC antes del embarazo es un importante predictor de preeclampsia (Bodnar et al, 2005).

En la literatura se ha descrito que la obesidad está asociada con alteraciones en la concentración de lípidos, en particular los ácidos grasos libres son susceptibles a la oxidación y están incrementados en la preeclampsia (Lorentzen et al., 1994). Los productos de lipoperoxidación están directamente involucrados en la disfunción endotelial materna mediante el aumento de la producción de tromboxano A2 y la expresión de moléculas de adhesión celular en la vasculatura útero-placentaria y también en el vasculatura periférica materna. También, en la preeclampsia, los nutrientes antioxidantes se presume que son utilizados en mayor medida para contrarrestar los radicales libres, esta rápida disminución de la capacidad antioxidante propagaría la peroxidación lipídica que conduce a la cascada biológica de la activación de leucocitos, adhesión y agregación plaquetaria y la consecuente liberación de agentes vasoconstrictivos (Jauniaux et al, 2006).

Por otra parte, el mecanismo que proponemos por el cual la actividad de la arginasa se encuentra disminuida en los grupos OB y PE es la siguiente. Han sido publicados varios estudios (López-Jaramillo, 2008) que reportan, disminución (Var et al, 2003; Terán et al, 2006) aumento (Shaamash et al, 2002; Vural, 2002; Yoneyama et al, 2002, 2004; Pasaoglu et al, 2004) o ninguna alteración (Diejomaoh et al, 2004; Schiessl et al, 2006; McCord et al, 2006) en los niveles de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3$ ), dos productos terminales del metabolismo del  $\text{NO}^*$ . En este trabajo encontramos que las concentraciones de nitritos/nitratos esta incrementada en los grupos OB y PE en comparación a los grupos VS y EN, lo cual indica que hay producción de  $\text{NO}^*$ ; este óxido nítrico al reaccionar con los radicales anión superóxido que se están produciendo por el estrés oxidativo en el que se encuentran tanto el grupo OB como el de PE, forma peroxinitrito, el cual es capaz de nitrar a los grupos SH dando como resultado nitrosotioles. Es probable que por eso nosotros detectamos concentraciones bajas de grupos SH. Tyurin y cols en el 2001 describe que en el plasma de preeclampsia contiene concentraciones significativamente más altas de S-nitrosotioles que las muestras del embarazo normal.

Los efectos biológicos del óxido nítrico son en gran parte mediada por la S-nitrosilación (Foster et al, 2005) de péptidos y proteínas bioactivos para producir S-nitrosotioles (SNOs) (Foster et al, 2003). Se ha demostrado que los nitrosotioles pueden inhibir a la arginasa. Además, Iyamu (Iyamu et al, 2011) sugiere que la oxidación de proteínas tiol y tioles no proteicos, puede ser un mecanismo adicional para la modulación intracelular de arginasa. Aunque serán necesarios otros estudios para dilucidar el mecanismo de activación de la arginasa, así como los residuos de aminoácidos específicos implicados y los cambios estructurales que

impulsan esta activación, Iyamu demostró que existe una interacción entre los grupos tiol y actividad de la enzima arginasa. Debido a que el ascorbato es esencial para la descomposición de S-nitrosotioles y la liberación de NO<sup>•</sup>, el déficit de ascorbato en la preeclampsia puede resultar en disminución de las tasas de descomposición de S-nitrosotioles (Tyurin et al, 2001).

Por lo que podemos observar, la base de la interacción entre la arginasa y NOS es más complejo que el hecho de que utilizan un sustrato común. Por ejemplo, la iNOS que expresan los macrófagos y las células endoteliales puede producir suficiente N<sup>o</sup>-hidroxi-L-arginina para inhibir la actividad de la arginasa (Wu et al, 1998). En cuanto a la actividad de la enzima arginasa, se sabe que aparte de disminuir la síntesis de NO<sup>•</sup> por la disminución del sustrato L-arginina, la arginasa inhibe la expresión de NOS inducible, así como su estabilidad (Lee et al, 2003; El-Gayar et al, 2003). Por otra parte la arginasa puede inhibir la producción de NO<sup>•</sup> mediado por iNOS a través de la generación de urea (Prabhakar et al, 1997). Estos hallazgos sugieren que la arginasa regula a la baja la formación de NO<sup>•</sup>, a través de múltiples mecanismos. Curiosamente, N<sup>o</sup>-hydroxy-L-arginine (L-NOHA) (Wu et al, 1998), un intermediario formado durante la catálisis de L-arginina por NOS, es un potente inhibidor de arginasa, sugiriendo que NOS también puede influir en la actividad de arginasa (Boucher et al, 1994). La naturaleza y la importancia de estas interacciones de regulación recíproca entre estos dos sistemas enzimáticos en la circulación, aun queda por determinar.

En un estudio que realizó Huynh y cols sobre el fenotipo cardiovascular en ratones knockout arginasa II encontraron que este fenotipo se asocia con un aumento de la presión arterial sistólica y diastólica y llegaron a la conclusión de que sus datos sugieren que la pérdida global de actividad de la arginasa II resulta en hipertensión (Hyunh et al, 2009). Ellos refieren, que la respuesta constrictora en aorta aislada en ratones arginasa II KO puede atribuirse principalmente a una pérdida de actividad de Rho- Kinasa (Ming et al, 2004).

Ahora bien, por otra parte se debe saber que la urea inhibe la reabsorción de sodio en el túbulo proximal, así como a la bomba Na-K-2Cl en la rama ascendente gruesa por lo que la falta de urea producida por la arginasa, en consecuencia aumentaría la reabsorción de sodio, desplazando la curva de presión-natriuresis a la derecha (Iwata et al, 2002), aumentando así la presión arterial en mujeres con preeclampsia.

Finalmente, es importante mencionar, que si bien la actividad de la enzima arginasa en plasma no fue mayor en el grupo PE en comparación con el grupo de embarazo normal, si es diferente. Por lo tanto utilizar su actividad en plasma como marcador predictor podría ser relevante, debido a que nos sugieren que si tomamos muestra de sangre para obtener



plasma antes de la semana 20 de gestación y si encontramos que la paciente esta obesa, con alteración de la actividad de arginasa y los grupos SH totales disminuidos, además de encontrar las concentraciones de  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  aumentados, es probable que la paciente puede llegar presentar preeclampsia. Este estudio apoya la evidencia del papel del estrés oxidativo en la preeclampsia y su estrecha relación con la obesidad.





## IX. CONCLUSIONES

- ✓ Las mujeres con preeclampsia se encuentran en estado de estrés oxidativo, al aumentar los productos de lipoperoxidación y disminuir la defensa antioxidante.
- ✓ Se encuentran aumentados los metabolitos del óxido nítrico en las mujeres con preeclampsia.
- ✓ La actividad de la enzima arginasa se encuentra disminuida en mujeres con preeclampsia en comparación con el embarazo normal.
- ✓ Se observa una relación directa entre la actividad de la enzima arginasa y los grupos SH.
- ✓ La combinación de obesidad con estrés oxidativo puede ser un factor determinante para desarrollar preeclampsia.

## X. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos nos surge la necesidad de estudiar más a fondo la relación que existe entre los sulfidrilos y la actividad de la enzima arginasa en esta patología, por lo que se propone continuar con estudios como la medición de nitrosotioles. También se continuara con el estudio de cuantificación de arginasa en mujeres preclampticas con IMC normal, para complementar estudio y así utilizar la actividad de la enzima arginasa en plasma como un marcador predictivo.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- 📖 Acosta AG, Vermolen JA, Andara CV, Bermudez V, Bermudez F. Mecanismos moleculares de la disfunción endotelial: de la síntesis a la acción del óxido nítrico. *AVFT*, Vol.25, no.2, p.54-59, 2006.
- 📖 Airoidi J, Weistein L. Clinical significance of proteinuria in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*, 62:117-124; 2007
- 📖 Ash D. Structure and Function of Arginases. *J. Nutr.* 134:2760S-2764S, 2004.
- 📖 Atamer Y, Koçyigit Y, Yokus B, Atamer A, Erden AC. Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 119(1):60-6, 2005.
- 📖 Aydin S, Benian A, Madazli R, Uludag S, Uzun H, Kaya S. Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 113(1):21-5, 2004
- 📖 Baeten JM, Bukusi EA, Lambe M. Pregnancy complications and outcomes among overweight and obese nulliparous women. *Am J Public Health*; 91(3):436-40; 2001
- 📖 Bagnost T, Ling Ma, Da Silva R, Rezakhaniha R, Houdayer C, Stergiopoulos N, Andre C, Guillaume Y, Berthelot A, Demougeot C. Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension. *Cardiovascular Research*, 87, 569–577, 2010
- 📖 Barton JR, Sibai BM. Prediction and prevention of recurrent preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 112:359–72, 2008
- 📖 Berkowitz DE, White R, Li D, Minhas KM, Cernetich A, Kim S, Burke S, Shoukas AA, Nyhan D, Champion HC, Hare JM. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation*; 108: 2000–2006, 2003
- 📖 Bernardi F, Constantino L, Machado R, Petronilho F, Dal-Pizzol F. Plasma nitric oxide, endothelin-1, arginase and superoxide dismutase in pre-eclamptic women. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* Vol. 34, No. 6: 957–963, 2008.
- 📖 Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The l-arginine paradox: Importance of the l-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther*; 114:295. 2007.
- 📖 Bodnar LM, Ness RB, Harger GF, Roberts JM. Inflammation and Triglycerides Partially Mediate the Effect of Prepregnancy Body Mass Index on the Risk of Preeclampsia. *Am J Epidemiol*, 162:1198–1206, 2005.



- 📖 Bodnar LM, Ness RB, Markovic N, Roberts JM. The risk of preeclampsia rises with increasing prepregnancy body mass index. *Ann Epidemiol.*, 15(7):475-82, 2005
- 📖 Boucher J-L, Custot J, Vadon S, et al. N -hydroxy-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun*;203:1614–1621, 1994.
- 📖 Bravo ME, Araujo JM, Bustamante A, Trujillo JG. Toxicidad y efecto hipotensor de oxoborolidinona de L-arginina y su modulación por azul de metileno. Comparación con L-arginina, nitrito y nitrato. *Arch Cardiol Mex*; 71:193-198, 2001
- 📖 Catalano PM. Management of obesity in pregnancy. *Obstet Gynecol*, 109:419-433, 2007.
- 📖 Ceballos G, Ramírez I, Calzada-Mendoza C, Olivares Corichi I. Disfunción Endotelial y Estrés Oxidativo. *Rev. Endocrinología y Nutrición*, 14(4): 233-236, 2006
- 📖 Centelles J, Esteban C, Imperial S. Óxido Nítrico. Un gas tóxico que actúa como regulador de la presión arterial. *OFFARM*, 23(11): 96-102, 2004.
- 📖 Chamy V, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar J, Madrid E. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biol Res* 39:229-236, 2006.
- 📖 Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol*, 49(4-6): 134–140, 2008
- 📖 Christianson DW. Arginase: structure, mechanism, and physiological role in male and female sexual arousal. *Acc Chem Res*;38(3):191–201; 2005.
- 📖 Clarke SD. Preeclampsia and HELLP Syndrome. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 9:110-114, 2008
- 📖 Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*; 15;71(2):216-25; 2006
- 📖 Corraliza I M, Campo M L, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods*. 174: 231-235. 1994.
- 📖 Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein Carbonyl Groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*. 329:1-2, 23-38, 2003.
- 📖 Di Costanzo L, Sabio G, Mora A, Rodriguez PC, Ochoa AC, Centeno F, Christianson DW. Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*; 102:13058–13063, 2005



- 📖 Díaz Echeverría DF. Mortalidad Materna. Una tarea inconclusa. Fundar, Centro de Análisis e Investigación, A. C. 1-48 pp, 2006.
- 📖 Diejomaoh FM, Omu AE, Al-Busiri N, Taher S, Al-Othman S, Fatinikun T, Fernandez S. Nitric oxide production is not altered in preeclampsia. Arch Gynecol Obstet. 269(4):237-43, 2004.
- 📖 Dowling D, Costanzo L, Gennadios H, Christianson D. Evolution of the arginase fold and functional diversity. Cell Mol Life Sci; 65(13):2039-2055, 2008
- 📖 Duarte J, Espinosa RF, Díaz S, Sánchez G, Lee Eng Castro VE, Mijangos J, Barragán JA. Óxido nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas. Med Int Mex;24(6):397-406, 2008
- 📖 Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide Synthesis and vascular function, Clin Exp Pharmacol Physiol; 34(9): 906–911, 2007.
- 📖 El-Gayar S, Thuring-Nahler H, Pfeilschifter J, Rollinghoff M, Bogdan C. Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. J Immunol;171:4561–4568, 2003.
- 📖 Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups. Arc. Biochem. Biophys, 82(1), 70-77, 1959.
- 📖 Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. Trends Mol Med;9:160 –168, 2003
- 📖 Foster MW, Pawloski J, Singel D, Stamler J. Role of Circulating S-Nitrosothiols in Control of Blood Pressure. Hypertension;45:15-17, 2005
- 📖 Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. Chem Res Toxicol.; 11(10):1176-83, 1998.
- 📖 Habeeb F. Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. Methods in Enzymology Vol 25, Pag 457-464, 1972
- 📖 Hansberg W. El dioxígeno y sus especies reactivas. Radicales Libres y Estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. México DF. Ed Manual Moderno, 25-46 pp, 2008
- 📖 Hecker M, Schott C, Bucher B, Busse R, Stoclet JC. Increase in serum NG-hydroxy-L-arginine in rats treated with bacterial lipopolysaccharide. Eur J Pharmacol. 24;275(1):R1-3, 1995
- 📖 Hogg N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. Free Radic Biol Med;28:1478 –1486, 2000



- Hubel CA, Kagan VE, Kisin ER, McLaughlin MK, Roberts JM. Increased ascorbyl radical production and ascorbate depletion in plasma from women with preeclampsia: implications for oxidative stress. *Free Radic Biol Med*;23:596–609, 1997
- Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med.*;222(3):222-35, 1999
- Hung J-H. Oxidative Stress and Antioxidants in Preeclampsia. *J Chin Med Assoc* ; 70 (10): 430-432, 2007
- Iwata S, Tsujino T, Ikeda Y, Ishida T, Ueyama T, Gotoh T, Mori M, Yokoyama M. Decreased expression of arginase II in the kidneys of Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res*; 25: 411–418, 2002
- Iyamu E, Perdew H, Woods G. Oxidant-mediated modification of the cellular thiols is sufficient for arginase activation in cultured cells, *Mol Cell Biochem* [Epub ahead of print]
- Jauniaux E, Poston L, Burton G. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* *Hum Reprod Update*, 12(6): 747–755, 2006.
- Johnson FK, Johnson RA, Peyton KJ, Durante W. Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 288:R1057–1062, 2005.
- Johnson FK, Johnson RA, Peyton KJ, Durante W. Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 288: R1057–R1062, 2005
- Kawashima S; Mitsuhiro Y. Dysfunction of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;24:998-1005, 2004
- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol*;5:834, 1992.
- Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM Jr, Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginase paradox. *Proc Natl Acad Sci USA*;100:4843–4848, 2003.
- León Hernández S, Lara Padilla E, Camarena Olmedo J. El proceso de la Investigación Clínica. Distribuidora y Editora Mexicana, 2003.



- Levy A, Chung J, Kroetsch J, Rush J. Nitric oxide and coronary vascular endothelium adaptations in hypertension. *Vascular Health and Risk Management* 2009;5 1075–1087; 2009.
- Li H, Meininger CJ, Hawker JR, et al. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline synthesis in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 280:E75–E82, 2001.
- Li H, Witte K, August M, et al. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol*;47:2536–2544, 2006
- Lim HK, Ryoo S, Benjo A, Shuleri K, Miriel V, Baraban E, Camara A, Soucy K, Nyhan D, Shoukas A, Berkowitz DE. Mitochondrial arginase II constrains endothelial NOS-3 activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 293: H3317–H3324, 2007
- Lineamiento Técnico. Prevención, diagnóstico y manejo de la preeclampsia/eclampsia. México: Secretaría de Salud, 2007.
- López-Jaramillo P, Arenas W, Garcia R, Rincon M, López M. The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*; 2(4): 261-275, 2008.
- Lorentzen B, Endersen MJ, Clausen T, Henriksen T. Fasting serum free fatty acids and triglycerides are increased before 20 weeks of gestation in women who later develop preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*; 13:103–109, 1994
- Loverro G, Greco P, Capuano F, Carone D, Cormio G, Selvaggi L. Lipoperoxidation and antioxidant enzymes activity in pregnancy complicated with hypertension. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996 Dec 27;70(2):123-7.
- Lowe DT. Nitric Oxide dysfunction in the pathophysiology of pre-eclampsia. *Nitric Oxide Biol Chem*, 4:441-458; 2000
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 19, 265-275, 1951.
- Lu GC, Rouse DJ, DuBard M, Cliver S, Kimberlin D, Hauth JC. The effect of the increasing prevalence of maternal obesity on perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol*. 185(4):845-9, 2001
- Luke B, Brown MB. Elevated risks of pregnancy complications and adverse outcomes with increasing maternal age. *Human Reprod*, 22(5):1-9; 2007.

- 📖 Maldonado B, Meza G. El oxido nítrico y su papel en el daño en el oído. Radicales Libres y Estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. México DF. Ed Manual Moderno, 423-424 pp, 2008
- 📖 Martínez A, Sánchez F. Arginina, óxido nítrico y función endotelial. *Ars Pharm*; 45 (4): 303-317, 2004
- 📖 McCord N, Ayuk P, McMahon M, Boyd RC, Sargent I, Redman C. System y+ arginine transport and NO production in peripheral blood mononuclear cells in pregnancy and preeclampsia. *Hypertension*.;47(1):109-15, 2006
- 📖 Meher S, Duley L. Oxido Nítrico para la prevención de la preeclampsia y sus complicaciones. *Biblioteca Cochrane Plus*. Num 4, 2008
- 📖 Ming XF, Barandier C, Viswambharan H, Kwak BR, Mach F, Mazzolai L, Hayoz D, Ruffieux J, Rusconi S, Montani JP, Yang Z. Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation*; 110.: 3708–3714, 2004
- 📖 Morgan-Ortiz F, Calderón-Lara SA, Martínez-Félix JI, González-Beltrán A y Quevedo-Castro E. Factores de riesgo asociados con preeclampsia: estudio de casos y Controles. *Ginecol Obstet Mex*; 78(3):153-159; 2010
- 📖 Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ;25:1551–1557, 2005
- 📖 Nava E, Noll G, Luscher TF. Increased activity of constitutive nitric oxide synthase in cardiac endothelium in spontaneous hypertension. *Circulation*.;91:2310–2313, 1995
- 📖 O’Connell B; Genest J. High-Density Lipoproteins and Endothelial Function. *Circulation*;104:1978-1983, 2001
- 📖 Olivares-Corichi I, Rincón Viquez M, Gutierrez López L, Ceballos Reyes G, García Sanchez J. Oxidative Stress Present in the Blood from Obese Patients Modify the Structure and Function of Insulin. *Hormone and Metabolic Research*. (Epub ahead of print), 2011
- 📖 Paşaoğlu H, Bulduk G, Oğuş E, Paşaoğlu A, Onalan G. Nitric oxide, lipid peroxides, and uric acid levels in pre-eclampsia and eclampsia. *Tohoku J Exp Med*.;202(2):87-92, 2004
- 📖 Pavlovic D, Dordevic V, Kocic G. A “Cross-Talk” between oxidative stress and redox cell signaling. *Facta Universitatis*; 9(2): 131-137, 2002



- 📖 Peralta ML, Guzmán M, Basavilvazo MA, Sánchez S. Elaboración y validación de un índice para el diagnóstico de preeclampsia. *Ginecol Obstet Mex*; 74:205-14; 2006
- 📖 Peraza L. Catalasa. Konigsberg M. Radicales Libres y Estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. México DF. Ed Manual Moderno, 183 pp, 2008
- 📖 Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ, Shennan AH; Vitamins in Pre-eclampsia (VIP) Trial Consortium. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet*; 367(9517):1145-54, 2006.
- 📖 Pou S, Keaton L, Surichamorn W, Rosen G. Mechanism of Superoxide Generation by Neuronal Nitric-oxide Synthase. *J. Biol. Chem* Vol. 274, No. 14, pp. 9573–9580, 1999.
- 📖 Prabhakar SS, Zeballos GA, Montoya-Zavala M, Leonard C. Urea inhibits nitric oxide synthase in macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*;273:C1882–1888, 1997.
- 📖 Prieto CP, Krause BJ, Quezada C, San Martin R, Sobrevia L, Casanello P Hypoxia-reduced nitric oxide synthase activity is partially explained by higher arginase-2 activity and cellular redistribution in human umbilical vein endothelium. *Placenta*.;32(12):932-40. Epub 2011 Oct 1, 2011.
- 📖 Ranta V, Viinikka L, Halmesmaki E, Ylikorkala O. Nitric Oxide Production with Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 93(3):442-445.
- 📖 Roberts JM, Pearson G, Cutler J and Lindheimer M. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension*, 41:437-445, 2003.
- 📖 Rodriguez S, Schleiffer R, Raul F, Richert L, Berthelot A. How could aortic arginase activity enhancement be involved in DOCA-salt hypertension? *Clin Exp Hypertens*; 26: 1–12, 2004
- 📖 Rojo DM, García L, Clapés S, Álvarez MS. El óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas en la preeclampsia. *Rev Cubana Invest Biomed*; 22(2):130-40, 2003.
- 📖 Romero JF, Tena G y Jiménez GA. Preeclampsia. *Enfermedades Hipertensivas del Embarazo*. México McGraw-Hill, , 75-103, 121-173 pp, 2009
- 📖 Ruiz Álvarez MJ, Bouarich H, Oñate S, Rodríguez Puyol D y Arribas I. Diferencias en el patrón de síntesis de factores vasoactivos e la hipertensión gestacional y en la preeclampsia. *Nefrología* 27(3): 329-334, 2007.
- 📖 Salvador J. La dimensión biopsicosocial de la preeclampsia: un abordaje conceptual-empírico *Ginecol Obstet Mex*;77(5):231-7, 2009





- 📖 Sankaralingam S, Xu H, Davidge ST. Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. *Cardiovascular Research*; 85, 194–203, 2010.
- 📖 Schiessl B, Strasburger C, Bidlingmaier M, Mylonas I, Jeschke U, Kainer F, Friese K. Plasma- and urine concentrations of nitrite/nitrate and cyclic Guanosinemonophosphate in intrauterine growth restricted and preeclamptic pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.*;274(3):150-4, 2006
- 📖 Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol*; 43:19–29, 2005
- 📖 Secretaría de Salud. Cuentas en Salud Reproductiva y Equidad de Género. México: SSA, 2003 A 2008.
- 📖 Shaamash AH, Elsnosy ED, Makhlof AM, Zakhari MM, Ibrahim OA, EL-dien HM. Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.*;68(3):207-14, 2000
- 📖 Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 25: 1767–1775, 2005
- 📖 Sibai B, Dekker G y Kupferminc M. Preeclampsia. *Lancet*, 365:785-797, 2005
- 📖 Sibai BM, Diagnosis and Management of Gestational Hypertension and Preeclampsia, *Obstet Gynecol*; 102:181–92; 2003
- 📖 Sibai BM, Ghulmiyyah LM. Controlling chronic hypertension in pregnancy. *OBG management*, 18(2), 2006.
- 📖 Terán E, Escudero C, Vivero S, Molina G, Calle A. NO in early pregnancy and development of preeclampsia. *Hypertension*. 47(4):e17. Epub 2006 Feb 13, 2006
- 📖 Toescu V, Nutall SL. Oxidative Stress and Normal Pregnancy. *Clinical Endocrinology* 57: 609-613, 2002.
- 📖 Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Ueta Y, Sasaguri Y, Yanagihara N. Nitric Oxide Synthases and Cardiovascular Diseases Insights From Genetically Modified Mice. *Circ J*; 73: 986 – 993, 2009.
- 📖 Tyurin V, Liu SX, Tyurina Y, Sussman N, Hubel C, Roberts J, Taylor R, Kagan V. Elevated Levels of S-Nitrosoalbumin in Preeclampsia Plasma *Circ Res*; 88:1210-1215, 2001
- 📖 Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*; 389: 990–994,1997



- 📖 Usatyuk PV, Vepa S, Watkins T, He D, Parinandi NL, Natarajan V. Redox regulation of reactive oxygen species-induced p38 MAP kinase activation and barrier dysfunction in lung microvascular endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 5:723–730, 2003
- 📖 Vanderlelie J, Venardos K, Clifton VL, Gude NM, Clarke FM, Perkins AV. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta*, 26(1):53-8, 2005.
- 📖 Vanhoutte PM. Arginine and Arginase : Endothelial NO Synthase Double Crossed? *Circ Res*;102:866-868, 2008
- 📖 Vanhoutte PM. Endothelial control of vasomotor function from health to coronary disease. *Circ J*; 67: 572-575, 2003
- 📖 Var A, Yildirim Y, Onur E, Kuscu NK, Uyanik BS, Goktalay K, Guvenc Y. Endothelial dysfunction in preeclampsia. Increased homocysteine and decreased nitric oxide levels. *Gynecol Obstet Invest.*;56(4):221-4, 2003.
- 📖 Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA*;95: 9220 – 9225; 1998.
- 📖 Velasco V y Lezama E. Mortalidad materna por preeclampsia y eclampsia en México. Romero JF, Tena G y Jiménez GA. Preeclampsia. *Enfermedades Hipertensivas del Embarazo*. México McGraw-Hill, 37-47 pp, 2009
- 📖 Vigil-De Gracia P. Hipertensión Crónica en el Embarazo. Romero JF, Tena G y Jiménez GA. Preeclampsia. *Enfermedades Hipertensivas del Embarazo*. México McGraw-Hill, 235-237 pp, 2009.
- 📖 Vittone L. Mundiña-Weilenmann. Endotelio Vasculare e Hipertensión, 1-21, 2008
- 📖 Vural P. Nitric oxide/endothelin-1 in preeclampsia. *Clin Chim Acta.*;317(1-2):65-70, 2002
- 📖 Wagner-Grau P. Pathophysiology of arterial hypertension. *An Fac med*; 71(4):225-229, 2010.
- 📖 Wever RMF; van Vam T; van Rijn HJ; de Groot F; Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*; 237: 340-344, 1997.
- 📖 Wu G, Morris S. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J*;336, 1-17; 1998.
- 📖 Xu W, F. Takao F, Zheng S, Comhair S, Janocha A, Goggans T, Thunnissen F, Farver C, Hazen S, Jennings C, Dweik R, Arroliga A, Erzurum S. Increased arginase II and



- decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *The FASEB Journal*, 1-23pp, 2004.
- 📖 Yang D, Felétou M, Boulanger CM, Wu HF, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *B J Pharmacol*: 136 (1) 104-110; 2002
- 📖 Yoneyama Y, Suzuki S, Sawa R, Miura A, Doi D, Otsubo Y, Araki T. Plasma nitric oxide levels and the expression of P-selectin on platelets in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*.;187(3):676-80, 2002
- 📖 Zalva G, González A, Beaumont J, San José G, Moreno U, López B, Ravassa S, Muñoz P, Fortuño A, Fortuño M, Díez J. Estrés Oxidativo vascular y disfunción endotelial. *Nefrología*: 21 (1): 61-66, 2001
- 📖 Zalvalza-Gómez Ana Bertha. Obesity and oxidative stress: a direct link to preeclampsia, *Arch Gynecol Obstet*, 283:415-422, 2011.
- 📖 Zamorski MA, Green L, NHBPEP Report on High Blood Pressure in Pregnancy: A Summary for Family Physicians *Am Fam Physician* 64:263-70,273-4, 2001.
- 📖 Zhang C, Hein TW, Wang W, Chang C-I, Kuo L. Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. *FASEB J*;15:1264–1266, 2001.
- 📖 Zhang WZ, Kaye DM. Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a time-controlled orthophthaldialdehyde precolumn derivatization. *Anal Biochem*; 326: 87–92, 2004
- 📖 Zhang Y, Zhao S, Gu Y, Lewis DF, Steven Alexander J, Wang Y. Effects of peroxynitrite and superoxide radicals on endothelial monolayer permeability: potential role of peroxynitrite in pre-eclampsia. *J Soc Gynecol Invest*; 12: 586–592, 2005.



## Anexo 1.

## Clasificación Preeclampsia-Eclampsia (Romero, 2009)

Datos Clínicos	Preeclampsia Leve	Preeclampsia Severa	Síndrome de HELLP	Eclampsia
<b>Presión Arterial</b> Presión Arterial Sistólica (PAS) Presión Arterial Diastólica (PAD)	$\geq 140$ mmHg pero $< 160$ mmHg y/o $\geq 90$ mmHg pero $< 110$ mmHg	$\geq 160$ mmHg y/o $\geq 110$ mmHg	Hipertensión de reciente inicio	Puede ocurrir en presencia de hipertensión leve, severa o sin evidencia de hipertensión en 10-15% de los casos
<b>Proteinuria</b> Recolección de orina de 24 horas Tira reactiva	$\geq 300$ mg pero $< 2$ g  $\geq 1+$ (30 mg/dl)	2g o más  3+	Proteinuria de reciente inicio  3 o 4 +	$\geq 1+$ (30 mg/dl)
<b>Compromiso Multisistémico</b>	Sin evidencia de compromiso multisistémico o de vasoespasmo persistente	Epigastralgia o dolor en barra en cuadrante superior derecho. Creatinina sérica $\geq 1.2$ mg/dl. Oliguria $< 500$ ml/24 horas. Edema Pulmonar o cianosis Disfunción Hepática: TGO o TGP $\geq 70$ UI Trombocitopenia Trastornos cerebrales: cefalea persistente, acufenos, alteración de la conciencia, nauseas y/o vómitos Alteraciones visuales: fosfenos, escotomas, diplopía, visión borrosa. RCIU y/o oligohidramnios	Dolor en epigastrio o en el cuadrante superior derecho (síntoma más importante) Nauseas y/o vómito <b>H:</b> Hemólisis DHL total $\geq 600$ UI/L Esquistocitos en frotis de sangre periférica Bilirrubina Total en Suero: $\geq 1.2$ mg/dl <b>EL:</b> Enzimas Hepáticas Elevadas: TGO o TGP $\geq 70$ UI/L <b>LP:</b> Trombocitopenia Plaquetas $< 150\ 000$ $\mu$ l	Convulsiones Eclámpticas 2 fases (60-75 seg.): 1ª duración aprox. 15 seg. Movimientos faciales y/o desviación de la mirada no focal 2ª Convulsiones generalizadas con una rápida sucesión de contracciones musculares y relajación. Cefalea (región occipital o frontal) Visión borrosa Epigastralgia Confusión/edo. mental alterado.