



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES**

**T E S I S**

**“EVALUACIÓN DE SINTASAS DE ÓXIDO  
NÍTRICO EN TEJIDO PLACENTARIO DE  
MUJERES CON PREECLAMPSIA CON DATOS  
DE SEVERIDAD”**

**Que para obtener el título de especialista en:  
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA**

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

**DRA. CRISTINA ANAIS HERNANDEZ SALDAÑA**

**DR. RODRIGO ZAMORA ESCUDERO**  
Profesor titular del curso de especialización en  
Ginecología y Obstetricia

**DR. ARTURO ERNESTO FLORES PLIEGO**  
Director de tesis



**CIUDAD DE MÉXICO**

**2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

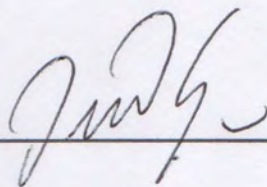
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

## AUTORIZACIÓN DE TESIS

### EVALUACIÓN DE SINTASAS DE ÓXIDO NÍTRICO EN TEJIDO PLACENTARIO DE MUJERES CON PREECLAMPSIA CON DATOS DE SEVERIDAD

DRA. VIRIDIANA GORBEA CHÁVEZ

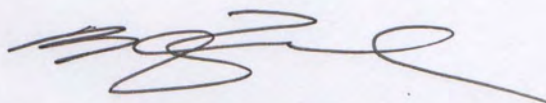
Directora de Educación en Ciencias de la Salud



---

DR. RODRIGO ZAMORA ESCUDERO

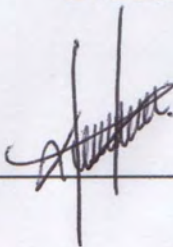
Profesor Titular del Curso de Especialización



---

DR. ARTURO ERNESTO FLORES PLIEGO

Director de Tesis



---

## INDICE

1. RESUMEN	4
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUCCIÓN	6
4. MATERIAL Y MÉTODOS	10
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSIÓN	18
7. CONCLUSIONES	23
8. BIBLIOGRAFÍA	24
9. FIGURAS	30
10. TABLAS	33
11. PIES DE FIGURA	34
12. TEXTO DE TABLAS	35

## RESUMEN

**Introducción:** La preeclampsia (PE) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y neonatal en todo el mundo, y uno de los mayores retos de la obstetricia ya que su etiopatogenia precisa aún no está clara. Según la hipótesis más reciente, esta enfermedad ocurre en dos etapas con disfunción placentaria en el embarazo temprano que conduce a los resultados clínicos maternos después de 20 semanas de la gestación, como consecuencia de la disfunción endotelial que se caracteriza por la disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO). De hecho el NO participa activamente en la invasión de trofoblasto, desarrollo placentario y representa el principal vasodilatador en este tejido. El NO es sintetizado por las sintasas de óxido nítrico (NOS). Se han secuenciado tres enzimas NOS: NOS I (nNos), NOS II (iNos) y NOS III (eNos). Sin embargo, el mecanismo asociado con la alteración de la formación de NO en los embarazos complicados por PE no se conoce bien. Los datos sugieren que la disfunción vascular de la PE se debe principalmente a alteraciones en la síntesis de NO.

**Objetivo:** El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de sintasas de óxido nítrico en la placenta de mujeres embarazadas complicadas con preeclampsia con datos de severidad.

**Diseño:** Estudio piloto

**Material y métodos:** El estudio se realizó en 15 pacientes con embarazo complicado por PE con datos de severidad después de las 37 + 0 semanas de gestación. El grupo control consistió de pacientes embarazadas normotensas sanas con embarazos únicos sin complicaciones. Se obtuvo tejido placentario de todo el espesor del cotiledón de ambos grupos de estudio, el cual fue procesado para extracción de mRNA y proteínas. La expresión de eNOS, iNOS y nNOS fue cuantificada mediante microarreglos de expresión. La concentración de ON en ambos grupos de estudio fue cuantificada indirectamente mediante ELISA *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay* y la concentración a nivel de proteína de eNOS, iNOS y nNOS fue determinada mediante ELISA. Las diferencias entre los grupos de estudio se establecieron mediante prueba T de Student.

**Resultados:** eNOS mostro disminución tanto a nivel de gen como de proteína en PE con datos de severidad respecto a embarazos sanos. iNOS aumento significativamente a nivel de gen como de proteína respecto a embarazos con desarrollo de PE con datos de severidad. La expresión de nNOS no mostro diferencia estadísticamente significativa al comparar los niveles de expresión del gen y proteína en cada uno de los grupos de estudio.

**Conclusiones:** La expresión disminuida de la eNOS en los embarazos complicados por preeclampsia con datos de severidad, sugiere ser causa de la disminución de los niveles de óxido nítrico en este grupo de estudio, secundario a una síntesis disminuida, con una respuesta compensatoria con sobreexpresión de la iNOS. El papel de la nNOS en la patogénesis de la PE aun es incierto. El conocimiento de la disponibilidad disminuida del óxido nítrico y la fuente puede dar lugar a estudios que vinculen la biodisponibilidad de las fuentes del mismo con posteriores beneficios clínicos.

**Palabras clave:** preeclampsia, placenta, óxido nítrico, sintasas de óxido nítrico

## ABSTRACT

**Introduction:** Preeclampsia (PE) is a major cause of maternal and neonatal morbidity and mortality worldwide, and remains amongst the biggest challenges in obstetrics, but its precise etiopathogenesis is still unclear. According to the most recent hypothesis this disease occur in two stages with placental dysfunction in early pregnancy leading to maternal clinical findings after 20 weeks of gestation, as consequence of endothelial dysfunction which is characterized by decreased nitric oxide (NO) bioavailability. Indeed NO actively participates in trophoblast invasion, placental development and represents the main vasodilator in this tissue. NO is synthesised by nitric oxide synthase (NOS). Three NOS enzymes have been sequenced: NOS I (nNos), NOS II (iNos) and NOS III (eNos). However, the mechanism associated with the alteration of nitric oxide formation in pregnancies complicated by PE is not well understood. The data suggest that the vascular dysfunction of preeclampsia is mainly due to alterations in NO synthesis.

**Objective:** The aim of this study was to determine the concentration of nitric oxide synthases in the placenta of pregnant women complicated with preeclampsia with severity features.

**Design:** pilot study

**Material and Methods:** The study was carried out on 15 patients with pregnancy complicated by preeclampsia with severity features after 37+0 weeks of gestation. The control group consisted of 15 healthy normotensive pregnant patients with singleton uncomplicated pregnancies. Placental tissue throughout the cotyledon thickness of both study groups was processed for mRNA and protein extraction. Expression of eNOS, iNOS and nNOS was quantified by expression microarrays. The concentration of NO in both study groups was quantified indirectly by ELISA Nitrate / Nitrite Colorimetric Assay and the protein level concentration of eNOS, iNOS and nNOS was determined by ELISA. The differences between the study groups were established by Student's t-test

**Results:** eNOS showed a decrease in both gene and protein levels in PE compared to healthy pregnancies. iNOS significantly increased at gene level as protein compared to pregnancies with development of PE with severity features. nNOS expression did not show statistically significant difference when comparing gene and protein expression levels in each of the study groups.

**Conclusions:** Decreased expression of eNOS in pregnancies complicated with preeclampsia suggests the cause of decreased nitric oxide levels in this group, secondary a diminished synthesis responsible for the biological association of endothelial dysfunction with preeclampsia, with a compensatory response with overexpression of the iNOS. The role of nNOS in the pathogenesis of PE is uncertain. Knowledge of decreased availability of NO and source may lead to studies linking the bioavailability of NO sources and positive benefits.

**Key words:** preeclampsia, placenta, nitric oxide, nitric oxide synthases

## INTRODUCCIÓN

La preeclampsia (PE) es un síndrome multisistémico de severidad variable, específico del embarazo, caracterizado por una reducción de la perfusión sistémica generada por vasoconstricción y activación de los sistemas de coagulación [1, 2]. Su prevalencia es del 3 al 8% y actualmente su incidencia está aumentando, lo que puede ser atribuido a la creciente prevalencia de los factores de riesgo [3-5]. La resolución del embarazo sigue siendo el único tratamiento curativo, pero no siempre es lo mejor para el feto, puesto que la mitad de las mujeres con PE tendrán un parto pretérmino, con las consecuencias propias del mismo [2]. Cuando no se trata, las mujeres embarazadas con PE pueden desarrollar complicaciones potencialmente mortales, que requieren una intervención urgente, en un entorno de alta especialidad [2, 6]. La PE no sólo tiene implicaciones importantes para la salud durante el embarazo, recientemente, las consecuencias a largo plazo han quedado establecidas, en particular la hipertensión arterial sistémica crónica y un aumento en el riesgo cardiovascular [7, 8].

Clínicamente la PE se establece después de las semanas 20 de gestación y se caracteriza por: 1) elevación de la presión arterial (presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg y diastólica  $\geq 90$  mmHg), y 2) proteinuria ( $\geq 300$  mg en 24 horas ó relación proteínas /creatinina  $\geq 0.3$  ó labastix 1+). En 2013, el Colegio Americano de Ginecólogos y Obstetras hace hincapié en que la proteinuria es suficiente pero no es necesaria para hacer el diagnóstico de PE. En ausencia de proteinuria la PE se diagnostica como hipertensión en asociación con trombocitopenia ( $< 100,000$ /ml), pruebas de función renal alteradas (elevación de transaminasas), daño renal (creatinina sérica  $\geq 1.1$  mg/dL), edema pulmonar, o reciente desarrollo de alteraciones visuales o cerebrales; cualquiera

de estos criterios o una presión arterial sistólica  $\geq 160$  y diastólica  $\geq 110$  mmHg basados en el promedio de al menos 2 mediciones, tomadas por lo menos 15 minutos de diferencia, utilizando el mismo brazo, establece el diagnóstico de PE con datos de severidad [7-10].

La PE es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y fetal, siendo uno de los mayores desafíos en la obstetricia. Esta patología es considerada una enfermedad multifactorial cuya fisiopatología precisa todavía no está clara [2, 11]. La mayoría de los estudios indican que es probable que la patogénesis se encuentre en la placenta [2, 12, 13]. Diversas teorías han sido formuladas al respecto de la PE, aunque ninguna completamente aceptada, no obstante parece haber un denominador común: disfunción endotelial [4, 14, 15]. Tradicionalmente la teoría más aceptada propone que los procesos patológicos subyacentes de la PE ocurren en dos etapas: La primera se caracteriza por una respuesta vascular anormal durante la placentación, con una invasión defectuosa del trofoblasto hacia las arterias espirales, que contribuye a una reducción del flujo sanguíneo útero-placentario, trayendo consigo una baja concentración de oxígeno y por consecuencia, una alta concentración del factor inducible por hipoxia-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ), del factor inducible por hipoxia-1 beta (HIF-1  $\beta$ ) y del factor de crecimiento transformante- $\beta 3$  (TGF- $\beta 3$ ), lo que conduce a un aumento del estrés oxidativo, que en combinación con una predisposición materna, da como resultado a la segunda etapa. La segunda etapa es caracterizada por disfunción endotelial, que se ha descrito inicia a partir de la semana 20 de la gestación y conlleva a daño endotelial, cambios metabólicos, vasoconstricción, aumento en la respuesta



inflamatoria, activación del sistema de coagulación y redistribución de los fluidos [16, 17].

Una de las moléculas activas reguladoras, consideradas de mayor importancia en la PE es el óxido nítrico (NO), el cual presenta alteraciones tanto en su producción como en su biodisponibilidad durante la PE [4, 18, 19]. El NO es un mediador vasoactivo derivado del endotelio que actúa como un potente vasodilatador que regula el tono vascular y el flujo sanguíneo, inhibe la agregación plaquetaria, la adherencia leucocitaria en la superficie endotelial y reduce la liberación de radicales libres de oxígeno [2, 4]. Durante la PE se ha reportado que los niveles de NO se encuentran disminuidos, favoreciendo la vasoconstricción, agregación plaquetaria y falla en la remodelación vascular, lo que se traduce en reducción de la perfusión placentaria, eventos característicos de la PE, y por consecuencia el establecimiento de hipoxia placentaria [20]. Esta falta de oxígeno regula de manera negativa la angiogénesis, promoviendo la casi nula diferenciación de células de trofoblasto y generación de nuevos vasos sanguíneos [21-23]

El NO es generado a partir del metabolismo del aminoácido L- arginina a L-citrulina, por la acción de una familia de enzimas conocida como sintasas de óxido nítrico (NOS) (Figura 1) [2, 4, 24] Se han identificado tres isoformas de NOS, las cuales son codificadas por distintos genes. La NOS neuronal (nNOS o tipo I) expresada principalmente en el cerebro, la NOS inducible (iNOS o tipo II) que se expresa en macrófagos y es inducida por estímulos inmunológicos o inflamatorios y la NOS endotelial (eNOS o tipo III), expresada en células endoteliales (Tabla 1) [4, 11, 25-28].

La nNOS ha sido documentada en células del músculo liso vascular de la circulación feto-placentaria, la cual se ha encontrado disminuida en PE [29]. La iNOS, se ha documentado que se expresa en la interfase feto-materna en estadios iniciales del embarazo y presenta un aumento progresivo de su actividad, alcanzando su máxima actividad a la mitad del embarazo [30, 31]. La eNOS es una enzima de la cual se ha descrito la expresión de su RNA de manera constitutiva durante todo el embarazo, siendo su mayor importancia el mantenimiento del tono vascular basal, que además es mediado por el NO [32]. Los niveles de eNOS en el endotelio placentario se han reportado aumentados durante restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) y en PE [33], en tanto que otros autores han encontrado niveles disminuidos, lo que debería de correlacionar con disfunción endotelial [34, 35]

Durante la PE se ha documentado tanto *in vivo* como *in vitro*, la existencia de un estado de vasoconstricción atribuido a la disminución de los niveles de ON (molécula reguladora del tono vascular), lo cual ha sido demostrado en suero, plasma y orina, dejando de lado el estudio del tejido placentario. Por lo anterior resulta importante establecer la contribución de las sintasas de óxido nítrico, enzimas responsables de generar el óxido nítrico en el tejido placentario, ya que actualmente su papel es controversial. En la PE, se ha sugerido que la explicación subyacente de la disfunción endotelial generalizada y típica de esta enfermedad es en su forma más severa, por lo que el objetivo de este estudio fue determinar las concentraciones de las NOS en la placenta de mujeres embarazadas complicadas con PE con datos de severidad.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Las pacientes fueron incluidas en el protocolo (No. de registro INPer 212250-3110-21001-0415) al momento de ingresar al Instituto Nacional de Perinatología en el área de urgencias y se dispuso de la placenta después del alumbramiento. Todas las pacientes firmaron carta de consentimiento informado para ser incluidas en el estudio. Se realizó un estudio observacional transversal de tipo analítico, por ser un estudio piloto, se incluyeron 15 pacientes con diagnóstico de PE con datos de severidad con embarazos a término y 15 controles para ser analizados.

Se definió PE con datos de severidad de acuerdo al Colegio Americano de Ginecólogos y Obstetras: presión arterial sistólica  $\geq 160$  y diastólica  $\geq 110$  mmHg basados en el promedio de al menos 2 mediciones, tomadas por lo menos 15 minutos de diferencia, utilizando el mismo brazo, ó elevación de la presión arterial (presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg y diastólica  $\geq 90$  mmHg), en asociación con trombocitopenia ( $< 100,000$ /ml), pruebas de función renal alterada (elevación de transaminasas), daño renal (creatinina sérica  $\geq 1.1$  mg/dL), edema pulmonar, o reciente desarrollo de alteraciones visuales o cerebrales [7-10]. La edad gestacional fue determinada por fecha de última menstruación segura y confiable o por ultrasonido de primer trimestre, considerando embarazo a término aquel  $\geq 37$  semanas de gestación. En el grupo control se incluyeron 15 pacientes con embarazos a término, con cesárea indicada. Los Criterios de exclusión: patologías de base que causen microangiopatías: Diabetes mellitus, hipertensión, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, lupus eritematoso sistémico y patologías que causen disminución significativa de la presión parcial de oxígeno: Asma,

EPOC, cardiopatías cianógenas, edema pulmonar, tromboembolia pulmonar, anemia menor de 7 g/dL. Así como antecedentes de PE en embarazo previo.

Las muestras de placenta de ambos grupos fueron tomadas de todo el espesor del cotiledón placentario inmediatamente después del alumbramiento y transportadas en nitrógeno líquido, hasta el Laboratorio de Inmunobioquímica de la Torre de Investigación, para extraer RNA y proteínas.

### **Homogenado de placenta.**

El tejido placentario una vez en el laboratorio, fue lavado con buffer de fosfatos 1X (PBS 1X), para retirar el exceso de sangre. Una vez limpio el tejido fue homogenizado mediante el uso de un homogenizador lab gen7 (Cole Parmer), utilizando el reactivo T-PER Tissue Protein Extraction Reagent e inhibidor de proteasas Halt 10X, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific). Este procedimiento se llevó a cabo a una temperatura de 4°C. Posteriormente el homogenado fue centrifugado a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su posterior uso.

### **Cuantificación de proteínas mediante ácido bicinconínico.**

Las proteínas totales obtenidas de los homogenados de tejido placentario se cuantificaron mediante el reactivo Pierce™ BCA Protein Assay Kit, (Thermo Scientific), mediante la construcción de una curva estándar a una absorbancia de 542 nm con el software Gen5 3.0 en el equipo Synergy HT Biotek.

### **Microarreglos de expresión para eNOS, iNOS y nNOS**

Las muestras de placenta se procesaron en el laboratorio para extracción de RNA antes de que transcurriera una hora desde su obtención, utilizando RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen). La calidad e integridad de los RNAs extraídos se evaluaron mediante electroforesis microcapilar utilizando el RNA 6000 Nano chip Kit (Agilent technologies) en el equipo Bioanalyzer (Agilent technologies). La transcripción reversa se llevo a cabo utilizando el RT2 First Strand kit (SaBiosciences) a partir de 500 ng del RNA extraído. Las muestras fueron incubadas a 42°C por 15 minutos y 95°C por 5 minutos para detener la reacción.

Las muestras fueron mezcladas con master mix RT2 (qPCR) SYBR Green ROX (SABiosciences) e incubadas en la placa de 96 pozos del microarreglo de PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleo el microarreglo de PCR Human Nitric Oxide Signaling Pathway (PAHS-062Z), para cuantificar la expresión de eNOS, iNOS y nNOS. Los arreglos fueron analizados en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Cada experimento se realizó por triplicado y los datos se analizaron mediante el software de SABiosciences disponible en el sitio web: (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>).

### **Cuantificación de nitratos y nitritos (cuantificación indirecta del óxido nítrico)**

La concentración de óxido nítrico en el tejido placentario se evaluó de manera indirecta mediante un ensayo comercial de E.L.I.S.A, utilizando el Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, de (Cayman Chemicals, Mi, USA), con un límite de detección de 2.5 µM. El volumen de muestra utilizado fue de 80 µL en cada uno de los pozos. La curva estándar

se construyó con siete estándares y un blanco que se usaron por duplicado: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35  $\mu\text{M}$  de nitratos. La placa fue leída a una absorbancia de 540 nm.

### **Cuantificación de eNOS**

Se cuantifico en los homogenados de tejidos de placenta la sintasa de óxido nítrico endotelial mediante inmunoadsorción ligado a enzimas (E.L.I.S.A), inmuno-ensayo comercial Human eNOS DuoSet ELISA tipo sándwich (R&D, Minneapolis, USA), con un rango de sensibilidad de 78.10 - 5,000 pg/mL. El volumen de muestra a utilizado fue de 100  $\mu\text{L}$  por pozo. La curva estándar se construyó con un blanco y siete estándares: 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 pg/mL de eNOS. La lectura de la placa se realizó a 450 nm en un lector de microplacas (BioTek Synergy™ HT Multi-Mode).

### **Cuantificación de iNOS**

La concentración de iNOS en la placenta fue determinado mediante ensayo de E.L.I.S.A, tipo sándwich utilizando el Kit Nitric Oxide Synthase 2, Inducible (Cloud-clone Corp, Houston, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante. El rango de detección del ensayo fue 1.56-100ng/mL. El volumen de muestra a utilizado fue de 100  $\mu\text{L}$  por pozo. Se utilizo una curva estándar de 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 ng/mL de iNOS. La lectura de la placa se realizo a 450 nm en un lector de microplacas (BioTek Synergy™ HT Multi-Mode).

### **Cuantificación de nNOS**

nNOS fue cuantificada en los homogenados de placenta mediante un ensayo de ELISA tipo sándwich human NOS1/nNOS (Nitric Oxide Synthase 1, Neuronal) ELISA Kit

(MyBioSource, San Diego, Cal.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El rango de detección del ensayo fue 0.156-10ng/mL, con una sensibilidad de 0.094ng/mL (lo mínimo detectable en este ensayo) y un rango de 0.156-10ng/mL. La densidad óptica fue medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm, la cual fue proporcional a la concentración de nNOS.

### **Análisis Estadístico.**

Los resultados fueron analizadas mediante pruebas de t de student, tomando en cuenta los valores de media y desviación estándar. Las pruebas estadísticas y los gráficos se realizaron mediante el software GraphPad Prism 6.

## RESULTADOS

### Expresión de sintasas de óxido nítrico.

La expresión de los genes que codifican para cada una de las sintasas de óxido nítrico, eNOS, iNOS y nNOS en el tejido placentario de mujeres embarazadas con PE con datos de severidad y mujeres embarazadas clínicamente sanas, mostro expresión diferencial para iNOS y eNOS, mientras que nNOS no mostro diferencia en el nivel de expresión en los dos grupos de estudio (Figura 2). iNOS aumento su expresión 2.4714 veces en el tejido placentario de mujeres embarazadas con PE con datos de severidad respecto a el tejido placentario de mujeres con embarazo sano (Tabla 2), esta diferencia a nivel de expresión fue estadísticamente significativa ( $p=0.042691$ ). El gen de eNOS mostro disminución en su expresión 104.7984 veces en las muestras de tejido placentario proveniente de mujeres con PE respecto de las muestras provenientes de embarazos sanos (Tabla 3), esta diferencia en la expresión del gene fue estadísticamente significativa ( $p=0.000073$ ). Sin embargo la expresión de nNOS no mostro diferencia estadísticamente significativa al comparar los niveles de expresión del gen en cada uno de los grupos de estudio.

Los resultados en la expresión de las NOS mostrados en las tablas 2 y 3 fueron graficados mediante diagrama de dispersión, que permitió ordenar los genes en dos dimensiones, una fue la estadística, donde  $-\text{Log}_{10}$  (valor de  $p$ ) es el eje vertical y la otra dimensión fue la biológica, las veces que cambia la expresión de los genes, representada en el eje horizontal. Se observo de igual manera que los genes de eNOS e iNOS son los que muestran cambio en su expresión, mientras que nNOS se



encuentra por debajo del punto de corte de la significancia estadística, indicando que su expresión no es diferente en ninguno de los grupos de estudio (Figura 3).

La magnitud de los cambios en la expresión de los genes analizados fue observada mediante la cuantificación relativa de su expresión, comparada con los genes de referencia o “housekeeping” utilizados en el microarreglo. Se observa que el RNAm del gen de eNOS muestra el mayor cambio en su expresión relativa.

#### **Óxido nítrico en el tejido placentario.**

La concentración de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el tejido placentario de mujeres embarazadas sana fue significativamente mayor ( $p < 0.005$ ) en comparación con las concentraciones que se detectaron en el tejido placentario de mujeres con PE con datos de severidad (Figura 4).

#### **Cuantificación de eNOS en tejido placentario.**

Se observó que existe una disminución estadísticamente significativa ( $p=0.0003$ ) de la sintasa de óxido nítrico endotelial (Figura 5), en las placentas del grupo de mujeres que presentaron preeclampsia con datos de severidad ( $24.74 \pm 10.69$  pg eNOS/ $\mu$ g de proteína) en comparación con las muestras control de mujeres que cursaron con un embarazo normal ( $50.08 \pm 21.02$  pg eNOS/ $\mu$ g de proteína).

#### **Cuantificación de iNOS en tejido placentario.**

El tejido placentario proveniente de mujeres con PE con datos de severidad, mostro que aumenta significativamente ( $p=0.025$ ) la concentración de proteína de la Sintasa de

óxido nítrico inducible ( $7.759 \pm 2.938$  pg iNOS/ $\mu$ g de proteína) respecto del grupo de mujeres que cursaron con un embarazo normal ( $5.664 \pm 1.128$  pg iNOS/ $\mu$ g de proteína) (Figura 6).

### **Cuantificación de nNOS en tejido placentario.**

Las concentraciones de proteína de la Sintasa de óxido nítrico neuronal en el tejido placentario de ambos grupos de estudio (mujeres con PE con datos de severidad y mujeres embarazadas normotensas), no pudieron ser detectadas cuantificadas mediante este ensayo.

## DISCUSIÓN

El óxido nítrico es el principal transmisor de la regulación del tono del endotelio vascular, elimina la actividad tóxica de los iones superóxido, inhibe la adhesión y activación de la agregación plaquetaria y actúa como sustancia antiaterogénica. Además, contribuye a la vasodilatación de los vasos sanguíneos y a la disminución de la resistencia vascular observada durante el embarazo normal. [2]. Sin embargo la preeclampsia es causante de daño en la barrera endotelial normal, estructura y función, dando como resultado un estado de disfunción endotelial que se caracteriza por una disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico. En consecuencia, hay un aumento en el tono y permeabilidad vascular, además de presentarse hipertensión resultando en proteinuria y edema [18]. No obstante el mecanismo asociado con la alteración de la formación de óxido nítrico en los embarazos complicados por PE no se conoce bien, sin embargo los datos sugieren que la disfunción vascular de la PE se debe principalmente a alteraciones en la síntesis de óxido nítrico. Por esta razón, varios estudios han caracterizado la alteración en la síntesis de óxido nítrico de la placenta en una oportunidad de explicar la disfunción vascular observada en la PE [23].

Los estudios sobre el papel que desempeñan las sintetasas de óxido nítrico en la síntesis del óxido nítrico, han generado resultados contradictorios [12]. Se ha demostrado que estas enzimas pueden estar disminuidas [36], sin embargo otros autores las han reportado sin cambios [37, 38], no obstante otros grupos de investigación las han reportado elevadas, o que tienen un papel poco claro [39-41]. En este estudio, los principales resultados que encontramos son que la expresión de los genes que codifican para eNOS e iNOS en el tejido placentario de mujeres embarazadas con

preeclampsia con datos de severidad y mujeres embarazadas clínicamente sanas mostraron una expresión significativamente diferencial, mientras que nNOS no mostro diferencia en el nivel de expresión en los dos grupos de estudio. Se ha documentado que la eNOS en la madre y en el feto contribuye a los cambios vasculares uteroplacentarios y al aumento del flujo sanguíneo arterial uterino. Mientras que en la PE anomalías en esta sintasa se asocian con alteraciones en la placentación, no logrando establecer claramente su papel causal [2]. Es importante resaltar que muy pocos estudios han abordado de manera conjunta tanto la expresión del mRNA de eNOS, así como la concentración de la misma proteína [38].

En este estudio nosotros encontramos que el gen de eNOS se encuentra disminuido significativamente ( $p=0.000073$ ) en el tejido placentario proveniente de mujeres con PE respecto al grupo control (Tabla 3). Es importante resaltar que muy pocos estudios han abordado de manera conjunta tanto la expresión del mRNA de eNOS, así como la concentración de la misma proteína [38], es por esto que resultan relevantes los resultados obtenidos en este trabajo, ya que pudimos establecer que los bajos niveles de expresión del RNAm del gen de eNOS resulta en la disminución de la concentración de la proteína funcional. Las concentraciones disminuidas de NO<sub>2</sub>-/NO<sub>3</sub>- ( $p < 0.005$ ) que pudimos determinar se relacionan con los resultados anteriores, ya que al disminuir la enzima eNOS, directamente disminuyen los niveles de NO<sub>2</sub>-/NO<sub>3</sub>- (determinación indirecta de la concentración de óxido nítrico). Sin embargo, se han reportado resultados contradictorios con respecto a la expresión de eNOS en paciente con preeclampsia por otros autores. Según Orange et al. [42], la intensidad placentaria y la localización de la tinción de eNOS y la expresión de mRNA placentaria fue similar entre

los controles embarazadas y los pacientes con preeclampsia. Napolitano et al. [43] mostró que la expresión de eNOS fue mayor en los casos de preeclampsia que en el tejido placentario de las embarazadas sanas, probablemente debido a un mecanismo de adaptación o compensación. Myatt et al [44] reportaron la sobreexpresión de eNOS en placentas de embarazo con preeclampsia y/o restricción de crecimiento intrauterino y por lo tanto una mayor producción de óxido nítrico, cabe señalar que estos autores no miden la expresión de mRNA, además de que las muestras analizadas fueron seleccionadas de embarazo con PR y/o RCIU sin establecer claramente una diferencia. Nuestros resultados, sugieren que la Preeclampsia se asocia con la reducción de la actividad placentaria de eNOS, los cuales son coherentes con los resultados de Brennecke et al. [45], Schonfelder et al. [29], Giannubilo et al [46], Wang et al [35], y Kim et al [47]. Estos resultados apoyan la noción de que, si la expresión y actividad de eNOS placentaria se reducen durante la preeclampsia, se correlaciona con la disfunción vascular lográndola demostrar in vivo, además observaron que la inhibición de eNOs aumenta la permeabilidad endotelial. Por lo tanto la disminución de la expresión de los eNOs debe ejercer un efecto adverso sobre funcionamiento hemodinámico de la placenta en la preeclampsia [31].

La iNOS, es una enzima inducible por ciertas citosinas proinflamatorias como el interferón gama ( $\text{INF-}\gamma$ ), la interleucina- $1\beta$  ( $\text{IL-}1\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  ( $\text{TNF-}\alpha$ ). Esta enzima fue identificada primeramente en macrófagos, sin embargo esta enzima puede ser expresada en diferentes células o tejidos provistos de los apropiados agentes inductores [30, 31, 48]. Wang X et al [49], demostraron una expresión elevada del

mRNA de iNOS por las células endoteliales de la vena umbilical en preeclampsia. Smith-Jackson et al [38], por su lado reportan que no hay evidencia significativa en la expresión de iNOS entre pacientes sanas y paciente con preeclampsia. En el presente estudio la expresión de iNOS aumento su expresión 2.4714 veces ( $p=0.042691$ ), en el tejido placentario de mujeres embarazadas con PE con datos de severidad (Tabla 2), ocurriendo también aumento en la concentración la proteína de iNOS. Una expresión similar de iNOS se ha demostrado en el tejido placentario de pacientes con preeclampsia en comparación con los embarazos normales. Sin embargo, la abundancia de iNOS en el tejido placentario de la preeclampsia sigue siendo controvertida [27], esta puede ser una respuesta adaptativa [48], ante sustancias inductora propias de la preeclampsia para contrarrestar la disminución de eNOs, la cual resulta ser insuficiente.

La isoforma neuronal (nNOS) fue identificada primeramente en el sistema nervioso central y periférico, siendo responsable de la generación de óxido nítrico. Esta isoforma se expresa constitutivamente y es dependiente de calcio/calmodulina, ejerciendo funciones de comunicación celular actuando como un neurotransmisor y un potente mediador del flujo sanguíneo en el cerebro. En este trabajo no fue posible detectar los niveles de expresión del gen de nNOS, y como consecuencia tampoco pudimos detectar la proteína de la enzima nNOS, no obstante que la sensibilidad del ensayo para cuantificar la proteína fue de  $0.094\text{ng/mL}$ , lo cual nos indico que en las muestras de ambos grupos de estudio existe una deficiencia de nNOS. Sin embargo existen autores que si han documentado la presencia de nNOS pero en células del musculo liso vascular de la circulación feto-placental [29], sin embargo la principal limitación de dicho

estudio es el hecho de que el significado funcional de la expresión de nNOS en las venas umbilicales sigue siendo indeterminado [27]. Esta discrepancia de resultados es debido a las diferencias entre los tejidos analizados. En nuestro estudio la expresión de nNOS no mostró diferencia estadísticamente significativa al comparar los niveles de expresión del gen en cada uno de los grupos de estudio, por lo que consideramos que el papel de esta enzima en la patogénesis de la preeclampsia aun es incierto y hacen falta mas evidencias acerca de su función en la preeclampsia.

## **CONCLUSIONES**

La disminución de nitritos/nitratos evidencia la existencia de una menor concentración del óxido nítrico en las placentas de mujeres con preeclampsia con datos de severidad, lo cual es responsabilidad principalmente de los bajos niveles de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Esto podría contribuir a la generación de hipoxia y al estado de vasoconstricción característico de las placentas preeclámpticas, por lo que el aumento en la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible iNOS se puede considerar como un mecanismo que intenta compensar la disponibilidad de óxido nítrico. El conocimiento de la disponibilidad del óxido nítrico y la fuente del mismo puede dar lugar a estudios que relacionen de manera directa la biodisponibilidad del óxido nítrico con posteriores beneficios clínicos.



## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Castellon Pasos RM, Hernandez Pacheco JA, Estrada Altamirano A, Chacon Solis RA, Rios Barba M. Criteria for birth delivery in women with severe preeclampsia in expectant management. *Ginecol Obstet Mex.* 2013;81:92-8.
2. Laskowska M, Laskowska K, Terbosh M, Oleszczuk J. A comparison of maternal serum levels of endothelial nitric oxide synthase, asymmetric dimethylarginine, and homocysteine in normal and preeclamptic pregnancies. *Med Sci Monit.* 2013;19:430-7.
3. Abalos E, Cuesta C, Grosso AL, Chou D, Say L. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;170:1-7.
4. Boger RH, Diemert A, Schwedhelm E, Luneburg N, Maas R, Hecher K. The role of nitric oxide synthase inhibition by asymmetric dimethylarginine in the pathophysiology of preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;69:1-13.
5. Pare E, Parry S, McElrath TF, Pucci D, Newton A, Lim KH. Clinical risk factors for preeclampsia in the 21st century. *Obstet Gynecol.* 2014;124:763-70.
6. Arulkumaran N, Lightstone L. Severe pre-eclampsia and hypertensive crises. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2013;27:877-84.
7. Naderi S, Tsai SA, Khandelwal A. Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19:15.
8. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013;122:1122-31.

9. Jackson JR, Gregg AR. Updates on the Recognition, Prevention and Management of Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2017;44:219-30.
10. Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2016;387:999-1011.
11. Redman CW. Preeclampsia: a multi-stress disorder. *Rev Med Interne.* 2011;32 Suppl 1:S41-4.
12. Rajagopal M, Moodley J, Chetty R. Nitric oxide: does it have an etiological role in pre-eclampsia? *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82:216-9.
13. Barrientos G, Pussetto M, Rose M, Staff AC, Blois SM, Toblli JE. Defective trophoblast invasion underlies fetal growth restriction and pre-eclampsia-like symptoms in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Mol Hum Reprod.* 2017.
14. Gao Q, Tang J, Li N, Zhou X, Zhu X, Li W, et al. New conception for the development of hypertension in preeclampsia. *Oncotarget.* 2016;7:78387-95.
15. Bermudez V, Bermudez F, Acosta G, Acosta A, Anez J, Andara C, et al. Molecular mechanisms of endothelial dysfunction: from nitric oxide synthesis to ADMA inhibition. *Am J Ther.* 2008;15:326-33.
16. Perucci LO, Correa MD, Dusse LM, Gomes KB, Sousa LP. Resolution of inflammation pathways in preeclampsia-a narrative review. *Immunol Res.* 2017.
17. Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta.* 2009;30 Suppl A:S32-7.
18. Everett TR, Wilkinson IB, Lees CC. Pre-eclampsia: the Potential of GSNO Reductase Inhibitors. *Curr Hypertens Rep.* 2017;19:20.

19. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:9265-9.
20. Pacora-Portella P. El origen de la preeclampsia y la eclampsia: la placentación. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*. 2006;52.
21. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*. 1997;277:1669-72.
22. Pijnenborg R, Vercruyssen L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*. 2006;27:939-58.
23. Krause BJ, Hanson MA, Casanello P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta*. 2011;32:797-805.
24. Khalil A, Hardman L, P OB. The role of arginine, homoarginine and nitric oxide in pregnancy. *Amino Acids*. 2015;47:1715-27.
25. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33:829-37, 37a-37d.
26. Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol*. 2008;49:134-40.
27. Escudero C, Sobrevia L. A hypothesis for preeclampsia: adenosine and inducible nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelium. *Placenta*. 2008;29:469-83.
28. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280:F193-206.

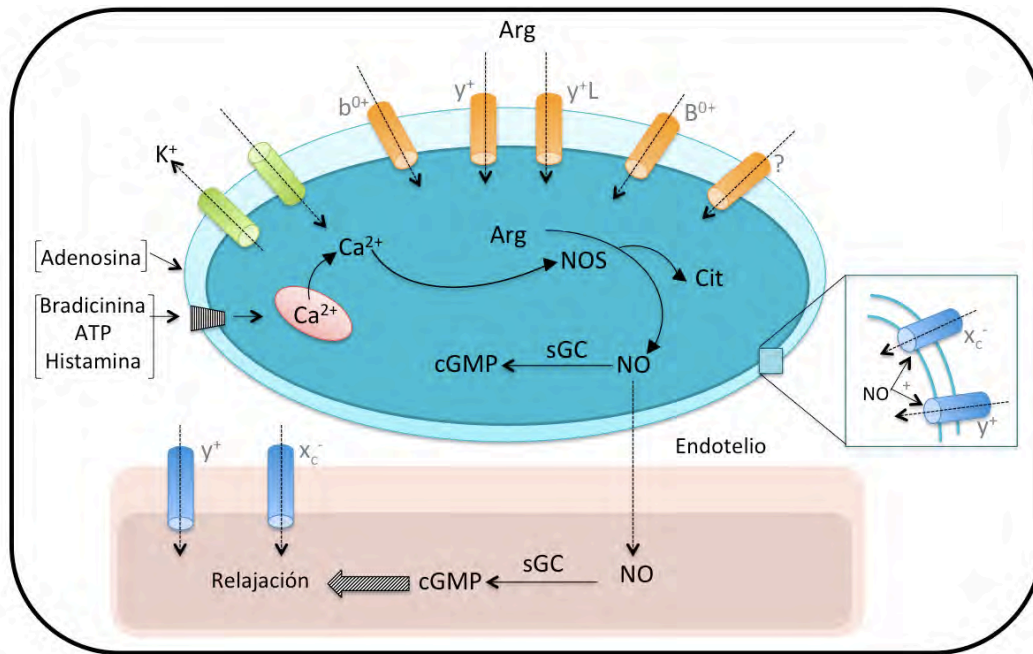
29. Schonfelder G, Fuhr N, Hadzidiakos D, John M, Hopp H, Paul M. Preeclampsia is associated with loss of neuronal nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells of the human umbilical cord. *Histopathology*. 2004;44:116-28.
30. Kao CK, Morton JS, Quon AL, Reyes LM, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. Mechanism of vascular dysfunction due to circulating factors in women with preeclampsia. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130:539-49.
31. Southan GJ, Szabo C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol*. 1996;51:383-94.
32. Bartlett SR, Bennett PR, Campa JS, Dennes WJ, Slater DM, Mann GE, et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in pregnant human myometrium. *J Physiol*. 1999;521 Pt 3:705-16.
33. Myatt L. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*. 2002;19:103-11.
34. Tong X, Li S, Zhao Y. [Expression of endothelial nitric oxide synthase gene in placental villus of preeclampsia]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 1998;33:527-8.
35. Wang Y, Gu Y, Zhang Y, Lewis DF. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia: decreased endothelial nitric oxide synthase expression is associated with increased cell permeability in endothelial cells from preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190:817-24.
36. Lee CN, Chang SW, Cho NH, Cho SH. Nitrous oxide synthase expression in placenta of preeclampsia. *J Korean Med Sci*. 1997;12:532-8.
37. Davidge ST, Stranko CP, Roberts JM. Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;174:1008-13.

38. Smith-Jackson K, Hentschke MR, Poli-de-Figueiredo CE, Pinheiro da Costa BE, Kurlak LO, Broughton Pipkin F, et al. Placental expression of eNOS, iNOS and the major protein components of caveolae in women with pre-eclampsia. *Placenta*. 2015;36:607-10.
39. Rutherford RA, McCarthy A, Sullivan MH, Elder MG, Polak JM, Wharton J. Nitric oxide synthase in human placenta and umbilical cord from normal, intrauterine growth-retarded and pre-eclamptic pregnancies. *Br J Pharmacol*. 1995;116:3099-109.
40. Faxen M, Nisell H, Kublickiene KR. Altered mRNA expression of ecNOS and iNOS in myometrium and placenta from women with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet*. 2001;265:45-50.
41. Shaamash AH, Elsonosy ED, Zakhari MM, Radwan SH, El-Dien HM. Placental nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*. 2001;72:127-33.
42. Orange SJ, Painter D, Horvath J, Yu B, Trent R, Hennessy A. Placental endothelial nitric oxide synthase localization and expression in normal human pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30:376-81.
43. Napolitano M, Miceli F, Calce A, Vacca A, Gulino A, Apa R, et al. Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2318-23.
44. Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Greer IA, Lyall F. Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Hum Reprod*. 1997;12:167-72.

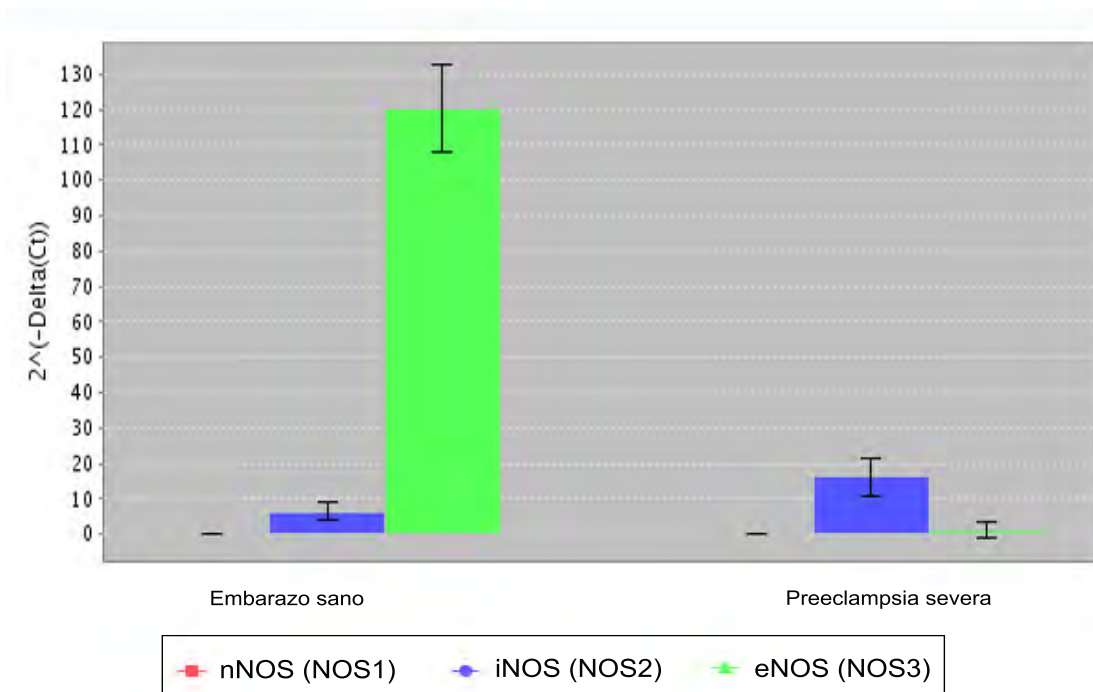
45. Brennecke SP, Gude NM, Di Iulio JL, King RG. Reduction of placental nitric oxide synthase activity in pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)*. 1997;93:51-5.
46. Giannubilo SR, Menegazzi M, Tedeschi E, Bezzeccheri V, Suzuki H, Tranquilli AL. Doppler analysis and placental nitric oxide synthase expression during fetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2008;21:617-22.
47. Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK, et al. Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta*. 2006;27:438-44.
48. Ghabour MS, Eis AL, Brockman DE, Pollock JS, Myatt L. Immunohistochemical characterization of placental nitric oxide synthase expression in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173:687-94.
49. Wang X, Wang J, Trudinger B. Gene expression of nitric oxide synthase by human umbilical vein endothelial cells: the effect of fetal plasma from pregnancy with umbilical placental vascular disease. *BJOG*. 2003;110:53-8.

## FIGURAS

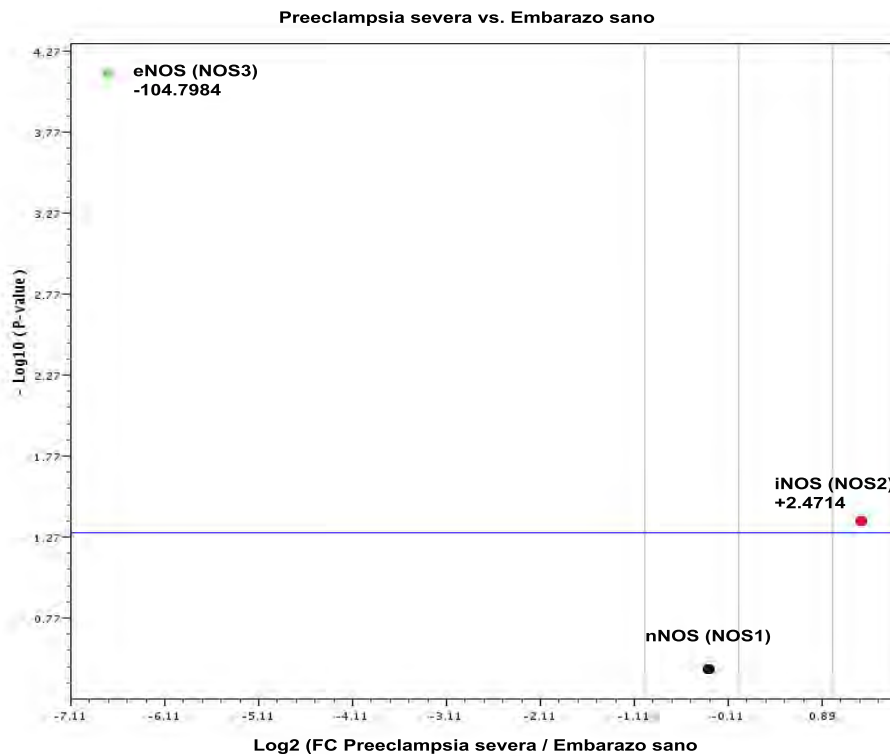
**Figura 1.** Representación esquemática la biosíntesis de óxido nítrico (NO).



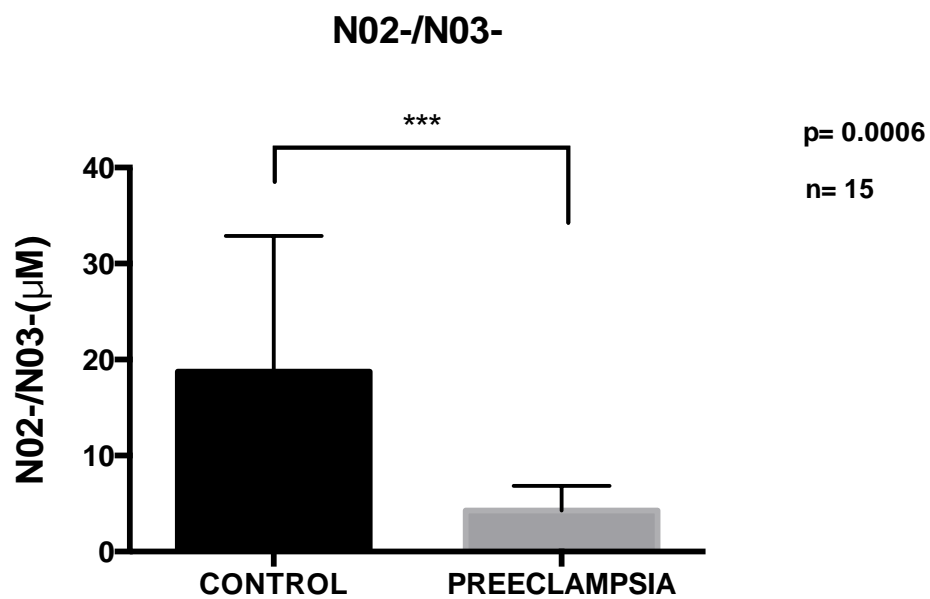
**Figura 2.** Grafico 2 delta-delta Ct para estimar la proporción relativa de la expresión genética en estudio.



**Figura 3.** Gráfica de volcán. Evaluación simultánea de la magnitud en los cambios de expresión de los genes de las NOS.

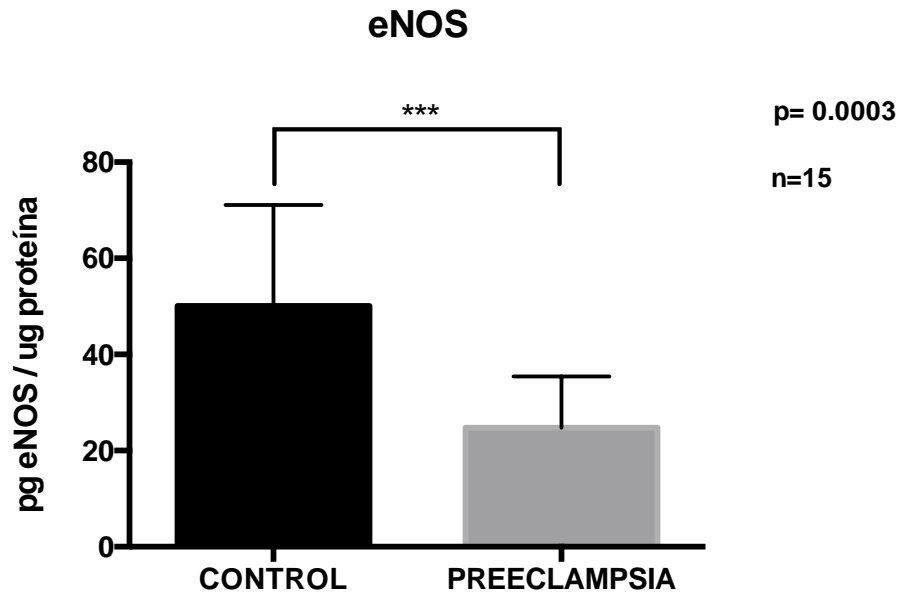


**Figura 4.** Concentraciones de oxido nítrico en pacientes con preeclampsia con datos de severidad vs pacientes sanas.

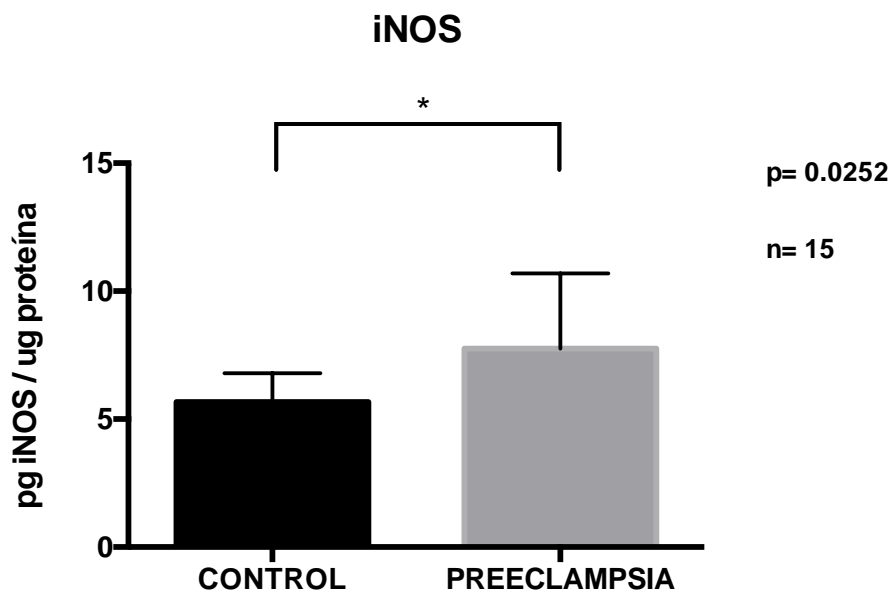




**Figura 5.** Concentraciones de sintasas de óxido nítrico endotelial en pacientes con preeclampsia con datos de severidad vs pacientes sanas.



**Figura 6.** Concentraciones de sintasas de óxido nítrico inducible en pacientes con preeclampsia con datos de severidad vs pacientes sanas.



## TABLAS

**Tabla 1.** Isoformas de sintasas de óxido nítrico.

<b>Isoforma</b>	<b>Otro nombre</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Regulación</b>	<b>Localización</b>
<b>NOS tipo I</b>	nNOS o bNOS	155 kDa	Ca <sup>++</sup> /calmodulina	Neuronas del SNC y SNP, neuroglías, islotes del páncreas
<b>NOS tipo II</b>	iNOS	125 kDa	Expresión inducida por citosinas y endotoxinas.	Macrófagos, hepatocitos, células musculares lisas neutrófilos y otros.
<b>NOS tipo III</b>	eNOS	135 kDa	Ca <sup>++</sup> /calmodulina	Endotelio vascular, riñón, plaquetas.

**Tabla 2.** Genes con aumento de expresión en pacientes con preeclampsia con datos de severidad vs pacientes sanas

<b>Gen</b>	<b>Cambio de expresión</b>	<b>Valor de p</b>
Sintasa de óxido nítrico inducible – iNOS (NOS2)	+2.4714	0.042691

**Tabla 3.** Genes con disminución de expresión en pacientes con preeclampsia con datos de severidad vs pacientes sanas

<b>Gen</b>	<b>Cambio de expresión</b>	<b>Valor de p</b>
Sintasa de óxido nítrico endotelial – eNOS (NOS3)	-104.7984	0.000073

## PIES DE FIGURAS

**Figura 1. Representación esquemática la biosíntesis de óxido nítrico (NO).** El óxido nítrico es generado a partir del metabolismo del aminoácido L- arginina (Arg) a L- citrulina (Cit), por la acción de una familia de enzimas conocida como sintasas de óxido nítrico, (NOS). El receptor primario de NO es la guanilato ciclasa soluble (sGC), con posterior activación de esta enzima y la producción de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), el cual actúa como segundo mensajero de múltiples vías intracelulares, y participa en la relajación del músculo liso [24-27].

**Figura 2. Grafico 2 delta-delta Ct.** Estimación de la proporción relativa de expresión genética en estudio.

**Figura 3. Gráfica de volcán. Evaluación simultánea de la magnitud en los cambios de expresión de los genes de las NOS.** Eje de “Y” muestra el  $-\text{Log}_{10}$  del valor de p; eje “X” muestra el impacto biológico del cambio de expresión de genes.

**Figura 4. Concentraciones de óxido nítrico.** Se observa una disminución de NO en pacientes con preeclampsia con datos de severidad comparado con pacientes sanas ( $p > 0.05$ ).

**Figura 5. Concentración proteica de sintasa de óxido nítrico endotelial.** El gráfico representa el valor de media  $\pm$  la desviación estándar de cada uno de los grupos de estudio,  $n = 15$ ;  $p < 0.005$ .

**Figura 6. Concentración proteica de sintasa de óxido nítrico inducible.** El gráfico representa el valor de media  $\pm$  la desviación estándar de cada uno de los grupos de estudio  $n = 15$ ;  $p < 0.05$ .

## TEXTO DE TABLAS

**Tabla 1. Isoformas de sintasas de óxido nítrico.** En mamíferos se ha descrito que el ON puede ser generado por una familia de enzimas denominadas sintasas de óxido nítrico (NOS), de las cuales existen tres diferentes isoformas que son altamente homologas en su estructura primaria: La NOS neuronal (nNOS o tipo I) expresada principalmente en el cerebro, la NOS inducible (iNOS o tipo II) que se expresa en macrófagos y es inducida por estímulos inmunológicos o inflamatorios y la NOS endotelial (eNOS o tipo III), expresada en células endoteliales. Las isoformas de NOS difieren en su ubicación, regulación y en su función fisiológica [25, 26].

**Tabla 2. Genes con aumento de expresión en pacientes con preeclampsia con datos de severidad vs pacientes sanas.** Número de veces que cambio la expresión de iNOS en preeclampsia con datos de severidad comparada con embarazos sanos.

**Tabla 3. Genes con disminución de expresión en pacientes con preeclampsia con datos de severidad vs pacientes sanas.** Número de veces que cambio la expresión de eNOS en preeclampsia con datos de severidad comparada con embarazos sanos.