



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“DETERMINACIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS ALFA-1 EN LA
PLACENTA DURANTE LA PREECLMPSIA”

Tesis que presenta

Alejandra Maricela Guzmán Valdés

Para obtener el Grado de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Directores de la Tesis:

M.C. Víctor Manuel Farías Rodríguez
Facultad de C.M. y “Dr. Ignacio Chávez”

M.C. Leticia Pérez Ordaz
Facultad de C.M. y “Dr. Ignacio Chávez”



Morelia, Mich. Septiembre de 2010

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Embarazo normal.	1
1. 1. Adaptaciones fisiológicas	1
2. Trastornos hipertensivos: Preeclampsia	3
3. Síndrome de HELLP	6
4. Epidemiología de la preeclampsia	8
5. Diagnóstico de la preeclampsia.	10
6. La placenta.	12
7. Receptores.	14
7.1. Receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G.	14
7.2. Receptores α_1 -adrenérgicos.	15
7.3. Receptores α_1 -adrenérgicos en el embarazo.	16
II. JUSTIFICACIÓN.	18
III. HIPÓTESIS.	19
IV. OBJETIVO GENERAL.	19
V. OBJETIVOS ESPECIFICOS.	19
VI. MATERIAL Y METODOS.	20
1. Protocolo experimental.	20
2. Aislamiento de la muestra.	20
3. Preparación de las muestras.	21
4. Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry modificado.	21

5. Análisis por western blot de los receptores α adrenérgicos en arterias de placenta.	22
5.1 Electroforesis	22
5.2 Transferencia.	22
5.3 Bloqueo de las membranas.	23
5.4 Reacción quimioluminiscente.	24
VII. RESULTADOS	24
1. Determinación de los niveles proteicos de los receptores α_1 -adenérgicos (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D})	24
1.1. Niveles proteicos del receptor α_{1A} en arterias placentarias en el embarazo normal y en la preeclampsia.	24
1.2. Niveles proteicos del receptor α_{1B} en arterias placentarias en el embarazo normal y en la preeclampsia.	26
1.3. Niveles proteicos del receptor α_{1D} en arterias placentarias en el embarazo normal y en la preeclampsia.	27
VIII. DISCUSIÓN.	28
IX. CONCLUSIONES.	31
X. REFERENCIAS.	32

I. INTRODUCCIÓN

1. EMBARAZO NORMAL

1. 1. Adaptaciones fisiológicas

El embarazo es un proceso natural y fisiológico que causa en la mujer una serie de cambios tanto anatómicos como funcionales, necesarios para el desarrollo fetal (Leal, 2005). Estos cambios afectan de modo general a todo el organismo. Cada órgano del cuerpo materno tiene que trabajar arduamente para reunir las demandas del feto, adaptándose en diferente manera y a diferente tiempo (Abbas et al., 2005).

Durante un embarazo normal se presentan cambios considerables en la presión arterial. Dentro del primer trimestre hay un descenso de la presión arterial causada por vasodilatación activa. Esta reducción de la presión arterial afecta principalmente a la presión diastólica y una disminución de 10 mmHg es habitual, por las semanas 13 a la 20 de gestación. La presión arterial continúa descendiendo de la semana 22 a la 24. Después de esto, hay un aumento gradual de la presión arterial, alcanzando los niveles previos al embarazo (Sibai, 1996).

Inmediatamente después del parto la presión arterial cae por lo general, pero aumenta en los primeros cinco días post-parto (James y Nelson-Piercy, 2004).

Incluso las mujeres cuya presión arterial era normal durante el embarazo pueden sufrir hipertensión transitoria en un período temprano después del parto, esto quizás reflejando un grado de inestabilidad en vasomotores.

En el embarazo también se produce un gran aumento del volumen sanguíneo. Comenzando en el primer trimestre, el volumen sanguíneo de la madre aumenta hasta aproximadamente un 50% más que antes del embarazo. El gasto cardíaco alcanza un máximo de 30-40% sobre el normal. Esto se asocia con una caída en la resistencia vascular periférica. La presión sanguínea disminuye para permitir el flujo de un mayor volumen sanguíneo. (Longo, 1983) El volumen circulante se incrementa, por aumento del plasma, desde los 40 a los 70 ml/kg lo cual representa un aumento del 40-50%. Existe además un aumento en la capacidad de transporte de oxígeno, debido a un incremento en la presión parcial de oxígeno, gasto cardíaco. De esta manera, las adaptaciones fisiológicas cardiovasculares representan un eficiente estado diseñado para proporcionar oxígeno y nutrientes al feto y a la madre (Abbas et al., 2005).

Durante el parto, el rendimiento cardíaco y volumen sistólico aumentan un 45% más. Luego del parto y el alumbramiento, éstos se incrementan un 80% sobre lo normal. En períodos tempranos del embarazo, aumentan la tasa de filtración glomerular, de aproximadamente el 50%, y el flujo plasmático renal, con un incremento en la depuración de creatinina. El embarazo es además un estado de hipercoagulabilidad, por aumento de los factores de la coagulación (Abbas et al., 2005).

2. Trastornos hipertensivos: Preeclampsia

La hipertensión, que es la complicación médica más común durante el embarazo, es una de las principales causas de morbilidad materna y perinatal. (Anyaegbunam y Edwards, 1994). Se define como la presión arterial sistólica de al menos 140 mmHg y presión arterial diastólica de 90 mmHg (Cnossen et al., 2006).

La preeclampsia es un síndrome que usualmente se manifiesta después de 20 semanas de embarazo, durante el parto o después del puerperio (hasta 14 días posteriores al parto) (Sánchez et al., 2005). Se caracteriza por hipertensión, o un incremento de la tensión arterial sistólica de por lo menos 30 mmHg del valor basal o de diastólica de por lo menos 15 mmHg sobre el valor basal (Hasbún, 1994), proteinuria (>300 mg en una colección de orina en 24 hrs.) (Sibai et al., 2005) asociada o no a edemas y a veces problemas de coagulación (Sánchez et al., 2005). A diferencia de otros trastornos hipertensivos del embarazo, la preeclampsia es una enfermedad multisistémica (Craici et al., 2008).

La preeclampsia pertenece a un grupo de trastornos hipertensivos en el embarazo, el cual se divide en hipertensión gestacional, hipertensión crónica, preeclampsia y preeclampsia superpuesta a hipertensión crónica (Cnossen et al., 2006). Los trastornos hipertensivos son causas importantes de parto prematuro, retardo del crecimiento intrauterino y muerte fetal intrauterina (Barron y Lindheimer, 2002). Los riesgos maternos incluyen: el accidente

cerebrovascular, el deterioro de la función renal, la insuficiencia cardiaca y la hemorragia secundaria al desprendimiento prematuro de la placenta (Sánchez et al., 2005).

Cuando hay una presión arterial sistólica y diastólica de 160 y 110 mmHg, respectivamente, o más, y una proteinuria de al menos 5 g en una colección de orina en 24 horas, se considera preeclampsia severa (Grill et a., 2009), además de presentarse alteraciones cerebrales (cefalalgia) o visuales, dolor epigástrico y oliguria (Guller et al., 2008).

Se le denomina hipertensión gestacional o hipertensión inducida por el embarazo, cuando el desarrollo de hipertensión se presenta durante la segunda mitad del embarazo en una mujer previamente normotensa, sin proteinuria significativa u otras características de la preeclampsia, y con regreso a la normalidad dentro de las 6 semanas luego del parto (James y Nelson-Piercy, 2004). El riesgo de que se superponga la preeclampsia va de 15% aun 26%, pero este riesgo es influenciado por la gestación en la que se desarrolla la hipertensión. Cuando este tipo de hipertensión es diagnosticada después de 36 semanas de embarazo, el riesgo de padecer preeclampsia se reduce a un 10% (Saudan et al., 1998). Es de curso benigno, tiende a recurrir e incrementa el riesgo de hipertensión ulterior.

En la hipertensión crónica, el diagnóstico de hipertensión se basa en una historia conocida de pre-hipertensión del embarazo o una hipertensión arterial de 140/90 mmHg antes de las 20 semanas de gestación (Brown et al., 2000).

Sin embargo, hay varias advertencias a este diagnóstico. Las mujeres hipertensas sin ser diagnosticadas, pueden aparecer como normotensas al comienzo del embarazo debido a la caída de la presión arterial normal, que comienza en el primer trimestre. Esto podría enmascarar la hipertensión preexistente y cuando la hipertensión se registra más tarde en el embarazo puede ser interpretada como gestacional (James y Nelson-Piercy, 2004).

La presencia de prehipertensión leve existente, aproximadamente duplica el riesgo de preeclampsia, pero también aumenta el riesgo de desprendimiento de la placenta y la restricción del crecimiento en el feto. Cuando la hipertensión crónica es grave, estamos hablando de una presión arterial diastólica > 110 mmHg antes de las 20 semanas de gestación, el riesgo de presentar preeclampsia es tan alta como 46% (McCowan et al., 1996), con los consiguientes riesgos tanto para la madre como para el feto.

Hipertensión crónica más preeclampsia agregada. A este grupo pertenecen aquellas pacientes a las cuales se les diagnóstico hipertensión crónica y luego se complica con una preeclampsia-eclampsia. Realmente estamos ante la presencia de dos enfermedades en una. Los criterios usados para diagnosticar preeclampsia agregada son hipertensión crónica con presiones diastólicas superiores a 160 ó 110 mmHg en más de dos ocasiones, sintomatología persistente y aparición de proteínas a nivel anormal en la orina.

La preeclampsia puede progresar a una fase convulsiva denominada eclampsia. Esta condición es usualmente precedida por varios síntomas y

signos premonitorios, entre los cuales se incluyen: cefalea, epigastralgia, hiperreflexia y hemoconcentración, aunque las convulsiones se pueden presentar súbitamente en una paciente estable sólo con una discreta elevación de la presión arterial. Para el diagnóstico preciso de la eclampsia deben excluirse otras causas de convulsiones, no atribuibles a ninguna causa subyacente, tales como epilepsia, accidentes cerebrovasculares (embolias, trombosis, hemorragias), síndromes de abstinencia por drogas o por alcohol, lesiones como tumores o abscesos, entre otros.

3. Síndrome de HELLP

Es sabido desde hace mucho tiempo que la preeclampsia puede estar asociada con la hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y plaquetopenia (Pritchard et al., 1954). El síndrome de HELLP (hemólisis, pruebas de funcionamiento hepático elevadas y recuento bajo de plaquetas), es una seria complicación que se caracteriza por hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y un bajo recuento de plaquetas, teniendo una incidencia del 0.5% al 0.9% de todos los embarazos y se presenta en 10-20% de los casos con preeclampsia severa (Kelly et al., 2009). Actualmente este síndrome es considerado como una variante de la preeclampsia grave o una complicación (Audibert et al., 1996).

En cerca del 70% de los casos, el síndrome de HELLP se desarrolla antes del parto (Sibai et al., 1993) con una frecuencia mayor entre las semanas de gestación de la 27^a y 37^a, 10% se producen antes de la semana 27, y 20%

más allá de la 37ª semana de gestación (Sibai et al., 1986). El síndrome HELLP puede ser completo o incompleto (Haram et al., 2009). El diagnóstico de la forma completa del síndrome HELLP requiere la presencia de los 3 principales componentes, mientras que la forma parcial o incompleta del síndrome de HELLP se compone de sólo 1 o 2 elementos de los 3 principales (hemólisis o enzimas hepáticas elevadas o plaquetas bajas) (Martin et al., 2006; Barton y Sibai, 2004). De acuerdo a la clasificación Tennessee, los criterios para el diagnóstico son de hemólisis con aumento de la deshidrogenasa láctica (DHL), > 600 U/l, elevación del aspartato aminotransferasa (AST), ≥ 70 U/l y el recuento plaquetario menor o igual a $100,000/\text{mm}^3$ (Parra-Ramírez et al., 2005). El recuento plaquetario y los niveles de DHL son los mejores marcadores de la gravedad del proceso en la enfermedad (Martín, 1999).

Por otra parte, la clasificación denominada Mississippi, el síndrome de HELLP se clasifica en tres clases en función del número de plaquetas: Clase 1: Plaquetas menor de $50,000/\text{mm}^3$; Clase 2: Plaquetas entre $50,000$ y $100,000/\text{mm}^3$ y Clase 3: Plaquetas mayor de $100,000/\text{mm}^3$ (Parra-Ramírez et al., 2005).

La ruptura hepática capsular es una complicación rara pero dramática del síndrome de HELLP. La mayoría de los casos ocurren en mujeres multíparas mayores de 30 (Kelly et al., 2009). En el período post-parto el síndrome de HELLP se desarrolla generalmente en las primeras 48 horas en

las mujeres que han tenido proteinuria y la hipertensión antes del parto (Sibai et al., 1993).

Los típicos síntomas clínicos son el cuadrante superior derecho del abdomen o dolor epigástrico, náuseas y vómitos. El dolor abdominal superior puede ser fluctuante, como de cólico (Sibai, 2004; Aarnoudse et al., 1986). Hasta el 30-60% de las mujeres tienen dolor de cabeza, síntomas de aproximadamente el 20% visual (Sibai, 2004). Sin embargo, las mujeres con el síndrome de HELLP también podrían tener síntomas inespecíficos (Kelly et al., 2009; Sibai, 2004) o signos sutiles de preeclampsia. Los síntomas por lo general están en constante progreso, y su intensidad a menudo sufre cambios de manera espontánea (Koenen et al., 2006).

4. Epidemiología de la preeclampsia

Como se ha mencionado anteriormente, la hipertensión es una de las mayores causas de mortalidad y morbilidad tanto materna como fetal en el mundo (Serrano, 2006; Thangaratinam et al., 2008; Greer, 2005).

La preeclampsia tiene una prevalencia entre el 5-10% de todos los embarazos y afecta de manera preponderante a primigestas (85%) (Sánchez et al., 2005). Algunos autores reportan una mayor incidencia de mujeres de raza negra sobre las de raza blanca (Walker, 2000).

Dependiendo de la región, entre el 9,1% (África y Asia), el 16,1% (países desarrollados) y 25,7% (América Latina) de las muertes maternas puede ser explicada por éstos trastornos (Khan et al., 2006). Hasta el 18% de las defunciones fetales se asocian con trastornos hipertensivos (Montan et al., 1987).

En México, la incidencia es de 47.3 por cada 1,000 nacimientos y es además, la primera causa de ingreso de pacientes embarazadas a las unidades de terapia intensiva (debido a hemorragia masiva).

Entre los factores importantes de riesgo asociados a la preeclampsia tenemos la edad materna, sobretodo en menores de 25 años o mayores de 35 años, gestaciones múltiples, el embarazo molar, enfermedad renal, obesidad, hipertensión crónica (Chesley, 1980), la nuliparidad (Broughton, 2001) y la diabetes mellitus preexistente (Sibai, 200).

Otro aspecto asociado a un riesgo elevado, es la evidencia de un componente genético proveniente de la observación de que existe un aumento marcado de preeclampsia en mujeres cuyas madres y hermanas padecieron de preeclampsia (Chesley, 1980). Asimismo, las hijas y nietas de estas mujeres son proclives a adquirir la enfermedad (Sutherlan et al., 1981).

5. Diagnóstico de la preeclampsia

El diagnóstico de preeclampsia se hace por la aparición de hipertensión en una embarazada, previamente normotensa, asociada con proteinuria (Khan et al., 2006), después de las 20 semanas de gestación. En muchas oportunidades la primera manifestación de la enfermedad es precisamente la elevación de las cifras tensionales (Leonor et al., 2007), de al menos una presión arterial sistólica de 140 mmHg y una presión arterial diastólica de al menos 90 mmHg (Cnossen et al., 2006; Report of the National High Blood Pressure, 2000). Las mediciones de la presión arterial citadas deben ser medidas al menos 2 ocasiones con por lo menos 6 horas de separación.

El otro componente del diagnóstico es una proteinuria (10) de al menos 300 mg de proteína en una colección de orina en 24 horas (o $\geq 1+$ en tiras reactivas (30 mg/dL) en una sola muestra de orina) (Brown et al., 2001; Hofmeyr y Belfort, 2009).

Se deben además solicitar pruebas de laboratorio para evaluar los siguientes sistemas: hematológico, hepático, renal, cardiovascular, neurológico y coagulación sanguínea (Leonor et al., 2007). Las pruebas bioquímicas incluyen ácido úrico sérico, excreción urinaria de calcio, hipoalbuminemia, microalbuminuria, fibronectina, creatinina (Hofmeyr y Belfort, 2009). Entre otras pruebas están las pruebas hematológicas como el conteo de plaquetas, el hematocrito, la hemoglobina, la antitrombina III, también hay que evaluar el

fibrinógeno, el tiempo parcial de tromboplastina y la protrombina para descartar una coagulación intravascular diseminada (Leonor et al., 2007).

Sin embargo, el diagnóstico se hace tardíamente en la mayoría de los casos, esto debido a la falta de información que se tiene sobre la etiología de la enfermedad, en esto radica lo importante que es elaborar una historia clínica perinatal detallada.

La atención prenatal reduce la mortalidad materna y perinatal, los partos prematuros y el número de productos con bajo peso al nacer, también permite identificar factores de riesgo, lo cual hace posible establecer acciones preventivas y terapéuticas oportunas durante el embarazo (Sánchez et al., 2005).

Por ello también es recomendable realizar estudios de ultrasonido, pruebas bioeléctricas de vitalidad fetal, amnioscopia, ecografía doppler. La ultrasonografía permite la evaluación del crecimiento fetal, la evaluación biofísica del feto y el diagnóstico de anomalías congénitas.

La ecografía Doppler constituye un método útil para determinar la velocidad del flujo sanguíneo de la arteria uterina durante el segundo trimestre. La onda de velocidad anormal se caracteriza por un índice de alta resistencia o la presencia de una muestra diastólica precoz (Chien et al., 2000).

Una vez que el diagnóstico de la preeclampsia se ha establecido, la gestión oportuna es esencial para evitar o reducir al mínimo la mortalidad y la morbilidad.

6. La placenta

La etiología exacta del síndrome materno de la preeclampsia es desconocida, pero es el resultado de cambios patológicos en el desarrollo de la placenta, en la invasión de las arterias espirales (Guller et al., 2008).

La placenta humana tiene la función de mantener el embarazo, además de considerarse de importancia central en la patogenia de la preeclampsia (Pijnenborg, 1991) Se desarrolla a partir de células derivadas del feto, los llamados trofoblastos, que se diferencian en dos tipos, los citotrofoblastos y los sinciotrofoblastos.

En un embarazo normal, se producen una serie de cambios a nivel de las arterias espirales. Así, durante la implantación el trofoblasto penetra en la decidua e invade la pared de dichas arterias espirales, de manera que el endotelio y la lámina elástica interna son sustituidas por células trofoblásticas.

Existen dos ondas de invasión trofoblástica, una al comienzo del embarazo y la otra en la etapa tardía del embarazo, alrededor de la décima cuarta semana de gestación (Wilson et al., 2002), completándose el proceso alrededor de las semanas 18 a la 20.

Al finalizar este proceso las arterias espirales quedan transformadas en las arterias utero-placentarias, con un ensanchamiento entre 4 y 6 veces del calibre original de estos vasos, aumentando por lo tanto el flujo de sangre a la placenta y por consiguiente al feto en crecimiento. La consolidación de una circulación materna eficaz es uno de los acontecimientos cruciales durante el desarrollo de la placenta. Esta infiltración trofoblástica es esencial para dilatar las arterias espirales, con el fin de modificar vasos de gruesas paredes a conductos flácidos de baja resistencia (Pijnenborg, 1983).

En las mujeres que desarrollarán preeclampsia, la invasión trofoblástica y el subsiguiente remodelado de las arterias espirales, es deficiente, especialmente durante la segunda onda de invasión. Esto hace que las arterias persistan con paredes gruesas y el diámetro de dichas arterias sea menos de la mitad que el de las arterias espirales de un embarazo normal, teniendo como resultado reducción del flujo sanguíneo placentario y aumento de la resistencia vascular uteroplacentaria (Pijnenborg, 1991).

La consecuencia de una deficiente placentación, es una isquemia placentaria, que va a ser la responsable de las manifestaciones clínicas de la preeclampsia, tanto del síndrome materno como del fetal (Van y Peeters, 1998).

Existe otra lesión que sufren muchas arterias espirales que se denomina aterosclerosis aguda. Se trata de una lesión endotelial característica de la preeclampsia que consiste en la obstrucción total o parcial de la luz de dichas

arterias por la formación de agregados de plaquetas y fibrina e invasión por macrófagos cargados de lípidos vecinos (lipófagos o células espumosas).

7. Receptores

Los receptores son proteínas presentes en la membrana plasmática a las que se unen específicamente a un ligando. La unión de estos ligandos a sus receptores específicos desencadena una cascada de reacciones en el interior de las células, lo que se conoce como transducción de señal.

Existen varios tipos de receptores, pero en el presente estudio nos enfocaremos a los receptores transmembrana. Son proteínas que se extienden por todo el espesor de la membrana plasmática de la célula, con un extremo del receptor fuera de la célula, dominio extracelular, y otro extremo del receptor dentro, dominio intracelular.

7.1. Receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G

Estas estructuras luego de unirse al ligando y de su activación, se acoplan a proteínas G que transmiten señales al interior de la célula mediante la disociación de las subunidades designadas como alfa y beta. Estas subunidades actúan sobre efectores (enzimas, canales iónicos) con lo cual se modifica la producción de segundos mensajeros: trifosfato de inositol y diacilglicerol. Estos segundos mensajeros participan en respuestas inmediatas

tales como secreción de hormonas, contracción muscular y metabolismo celular.

7.2. Receptores α_1 -adrenérgicos

Los tres subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos que se han identificado desde el punto de vista farmacológico y por clonación molecular son α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} (16). Ellos son codificados por distintos genes que se localizan en el cromosoma humano 8, 5 y 20, respectivamente (Michel et al., 1995).

Estos subtipos se distinguen por su farmacología, la estructura y la interacción con sistemas de segundo mensajero (Schwinn y Roehrborn, 2008). Median sus acciones a través de los miembros de la familia $G_{q/11}$ de las proteínas G, que estimula la actividad de la fosfolipasa C, promoviendo la hidrólisis de fosfato de inositol (fosfolípidos de membrana), donde cada subtipo demuestra diferente eficacia de acoplamiento a la hidrólisis: $\alpha_{1A} > \alpha_{1B} > \alpha_{1D}$ (Hawrylyshyn et al., 2004). Los tres subtipos de receptores existen en una amplia gama de tejidos humanos. El subtipo α_{1A} muestra los más altos niveles de expresión en el hígado humano, seguido por los niveles ligeramente más bajos en el corazón, el cerebelo y la corteza cerebral; el subtipo α_{1B} tiene la más alta expresión humana en el bazo, el riñón y el cerebro del feto, mientras que el subtipo α_{1D} tiene los niveles más altos en la corteza cerebral y de la aorta humana (Price et al., 1994).

7.3. Receptores α_1 -adrenérgicos en el embarazo

El embarazo se asocia con muchas adaptaciones cardiovasculares para garantizar el suministro adecuado de sangre al feto en crecimiento (Ross y Yallampalli, 2007). A pesar de un aumento en el volumen sanguíneo y del gasto cardíaco del 40% al 50%, el embarazo se caracteriza por una disminución de la presión arterial (Barron, 1987). Durante el embarazo, la disminución generalizada en la presión arterial es el resultado de una reducida resistencia vascular y vuelve a los niveles normales de la presión arterial, antes del embarazo, en el periodo de posparto (Yong et al., 1992).

Los cambios vasculares funcionales más marcados durante el embarazo se atribuyen a varias modificaciones fisiológicas de una amplia gama de factores. Estos incluyen aumento de sustancias vasodilatadoras, las modificaciones de las propiedades mecánicas y / o composición de los tejidos que conducen a mayor elasticidad de las paredes de los vasos sanguíneos, reducción de la respuesta para sustancias vasoconstrictoras como la angiotensina II, vasopresina y la norepinefrina (Ross y Yallampalli, 2007).

La regulación de receptores adrenérgicos son importantes mecanismos en el control del flujo sanguíneo uterino y la oxigenación fetal. Estudios previos han demostrado que el embarazo incrementa la contracción de arteriolas uterinas de rata mediado por receptores α_1 -adrenérgicos (Wang et al., 2002).

La mayoría de los estudios en los vasos sanguíneos de animales preñados han descrito una respuesta adrenérgica disminuida; sin embargo, otros autores han informado ninguna modificación o aumento de las respuestas adrenérgicas durante el embarazo (Bracho-Valdés et al., 2009).

II. JUSTIFICACIÓN

La preeclampsia continúa siendo una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad materno-fetal; sin embargo, aún no se conoce con precisión la etiología.

Por otra parte sabemos que el tono vascular es el resultado de un balance entre sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras. Si dicho balance se pierde ya sea por aumento en los vasoconstrictores o falta de oposición a las sustancias vasoconstrictoras, esto podría traducirse como hipertensión arterial.

Bajo este contexto poco se conoce sobre los mecanismos a respuestas vasoconstrictoras, por lo resulta necesario evaluar la expresión de los receptores α_1 -adrenérgicos en la placenta de mujeres preeclámpticas.

III. HIPÓTESIS

Existen cambios en los niveles de receptores α_1 –adrenérgicos en arterias placentarias de mujeres preeclámpticas.

IV. OBJETIVO GENERAL

Analizar los niveles proteicos de los receptores α_1 –adrenérgicos en arterias placentarias en el embarazo normal y en la preeclampsia.

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar los niveles proteicos de los receptores α_1 -adenérgicos (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) en arterias placentarias en el embarazo normal y en la preeclampsia.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se utilizaron placentas que fueron obtenidas, por parto natural o cesárea, de mujeres internadas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General “Dr. Miguel Silva” ubicado en la ciudad de Morelia, Michoacán.

Las placentas fueron clasificadas en 2 grupos:

- 1) Placentas de pacientes con embarazo sin complicaciones. (n= 15)

- 2) Placentas de pacientes con embarazo complicado con preeclampsia (n= 7)

2. AISLAMIENTO DE LA MUESTRA

Una vez obtenidas las placentas, las cuales se pusieron en solución Krebs fría para transportarlas, de las cuales se disecaron las arterias coriónicas superficiales.

3. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las arterias coriónicas de los dos grupos (sin complicación y complicado con preeclampsia), se homogenizaron en solución RIPA, [estabilizador de la fuerza iónica (NaCl 5 M), inhibidor de proteasas (PMSF), detergente para lisar la membrana (triton, SDS)], y se mantuvieron en frío la solución.

Se colocaron 50 mg de tejido en 1 ml de solución RIPA, donde se homogenizó, seguido de centrifugación por 5 minutos a 10000 rpm, se desechó la pastilla y se recuperó el sobrenadante, el cual fue separado en alícuotas y se almacenó a -80°C.

4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE PROTEÍNA POR EL METODO DE LOWRY MODIFICADO

Se construyó una curva patrón a partir de una serie de soluciones de concentración conocida de albúmina sérica bovina (BSA) contra la absorbancia correspondiente. Estos valores fueron graficados utilizó el programa de Microsoft Office Excel, se ajustó la curva por regresión lineal y se calculó su coeficiente de correlación. A partir de esta gráfica y por interpolación se determinó la cantidad de proteínas totales presentes en las muestras.

5. ANALISIS POR WESTERN BLOT DE LOS RECEPTORES α ADRENÉRGICOS EN ARTERIAS DE PLACENTA

5.1 Electroforesis

Se cargó 100 μ g de proteína de cada una de las muestras con un volumen igual de buffer de carga (Laemilli 2x), el cual contenía un 2% de β -mercaptoetanol (agente reductor), se hirvieron durante 5 minutos, se centrifugaron a 10000 rpm por 1 minuto y se agregó urea 5M, con la finalidad de desnaturalizar las proteínas.

Se prepararon geles SDS-PAGE (10%) y después se montó el equipo de electroforesis (Biorad). Se cargó una cantidad constante de proteína (100 μ g) de la muestra y en otro pozo se cargó el marcador de peso (10 μ l). La electroforesis se llevó a cabo durante 2 horas a 110 Voltios, para separar las proteínas.

5.2 Transferencia

Una vez concluida la electroforesis, las proteínas separadas presentes en el gel se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinildieno (PVDF), las cuales previamente fueron humectadas con metanol, agua desionizada, posteriormente estas fueron colocadas entre capas de papel filtro humectado

con buffer de transferencia. El sándwich fue colocado sobre un Trans-blot Semi-Dry (Biorad) durante 45 minutos a 15 voltios.

5.3 Bloqueo de las membranas

Finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con una solución de 5% leche -TBS-Tween, durante 24 horas a temperatura ambiente y agitación constante.

Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween durante 15 minutos en cada lavada, después se incubaron con anticuerpo primario policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology) contra los receptores α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} (≈ 50 kDa) y la proteína constitutiva α -actina, a una dilución de 1:1000, en 5% leche-TBS-Tween, durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante.

Se recuperó el anticuerpo primario y se lavaron las membranas 2 veces con TBS-Tween durante 15 minutos en cada lavada y se incubaron con anticuerpo secundario anti-cabra el cual tiene acoplada la enzima peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology), se utilizó una dilución 1:1000 en 5% leche-TBS-Tween, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante. Por último se lavaron 2 veces las membranas con TBS-Tween y una vez con TBS.

5.4 Reacción quimioluminiscente

Las membranas se impregnaron con sustrato quimioluminiscente (Western Blotting Luminol Reagente; Santa Cruz Biotechnology), se colocaron en un cassette de radiografía y se expusieron a una placa radiográfica durante 3 minutos. Las placas fueron reveladas y digitalizadas un escáner (ScanJet; Hewlett Packard). Posteriormente la intensidad de las bandas se determinó con un software de análisis de imágenes (Image 1) y se normalizaron con la intensidad de las bandas de α -actina.

VII. RESULTADOS

1. Determinación de los niveles proteicos de los receptores α_1 -adenérgicos (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D})

1.1 Niveles proteicos del receptor α_{1A} en arterias placentarias en el embarazo normal y en la preeclampsia.

Los resultados mostraron que el receptor α_{1A} se detectó en ambos grupos de estudio, tanto en las arterias placentarias de las pacientes normotensas como en las pacientes con preeclampsia, sin embargo el receptor α_{1A} tendió a disminuir en el grupo de mujeres preeclámpicas, disminución que, estadísticamente, no fue significativa.

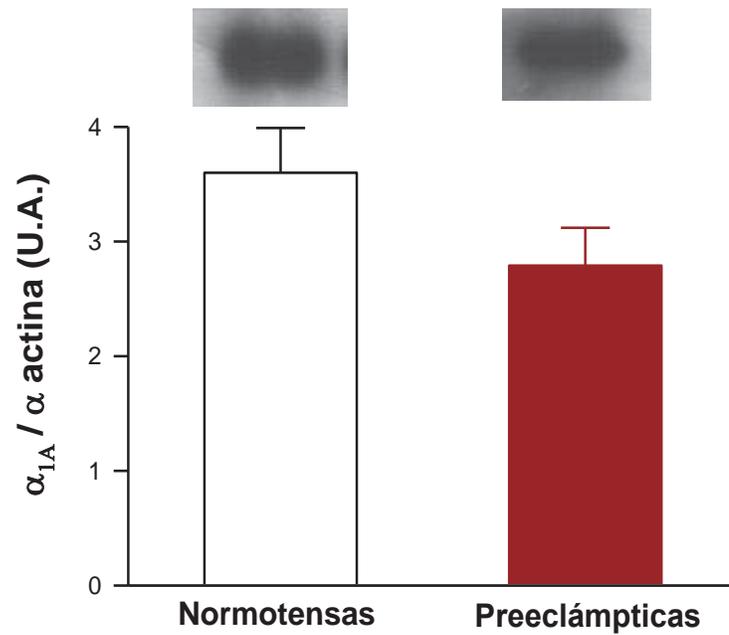


Figura 1. Niveles proteicos del receptor adrenérgico α_{1A} en arterias placentarias provenientes de pacientes con embarazo sin complicaciones y de pacientes con preeclampsia. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control (α -actina). En la parte superior se muestran las bandas representativas de un experimento típico. Cada valor representa el promedio \pm el error estándar de 15 pacientes normotensas y 7 pacientes preeclámpticas y son expresados en unidades arbitrarias (U.A.).

1.2 Niveles proteicos del receptor α_{1B} en arterias placentarias en el embarazo normal y en la preeclampsia.

Los resultados mostraron que el receptor α_{1B} se detectó en ambos grupos de estudio, tanto en las arterias placentarias de las pacientes normotensas como en las pacientes con preeclampsia, sin embargo, los niveles del receptor α_{1B} en el grupo de mujeres preeclámpticas fueron significativamente mayores ($p < 0.05$).

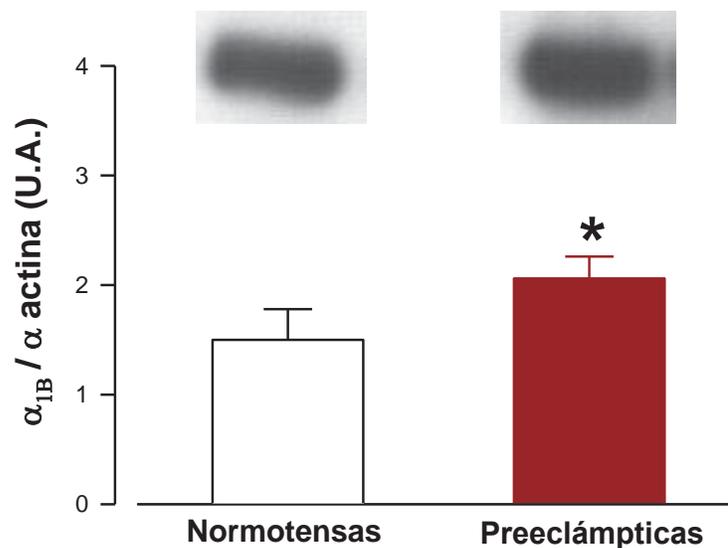


Figura 2. Niveles proteicos del receptor adrenérgico α_{1B} en arterias placentarias provenientes de pacientes con embarazo sin complicaciones y de pacientes con preeclampsia. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control (α -actina). En la parte superior se muestran las bandas representativas de un experimento típico. Cada valor representa el promedio \pm el error estándar de 15 pacientes normotensas y 7 pacientes preeclámpticas y son expresados en unidades arbitrarias (U.A.). * $p < 0.05$ vs. normotensas.

1.3 Niveles proteicos del receptor α_{1D} en arterias placentarias en el embarazo normal y en la preeclampsia.

Los resultados mostraron que el receptor α_{1D} se detectó en ambos grupos de estudio, tanto en las arterias placentarias de las pacientes normotensas como en las pacientes con preeclampsia, sin embargo, los resultados no mostraron diferencias significativas de los niveles del receptor α_{1D} entre ambos grupos.

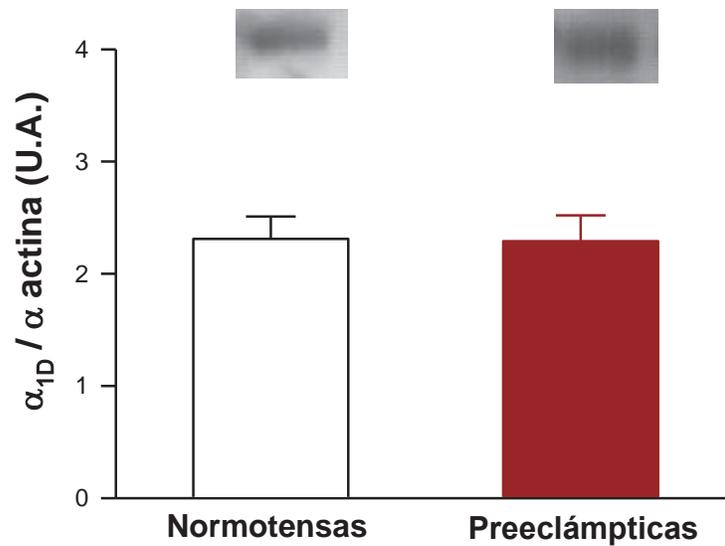


Figura 3. Niveles proteicos del receptor adrenérgico α_{1D} en arterias placentarias provenientes de pacientes con embarazo sin complicaciones y de pacientes con preeclampsia. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control (α -actina). En la parte superior se muestran las bandas representativas de un experimento típico. Cada valor representa el promedio \pm el error estándar de 15 pacientes normotensas y 7 pacientes preeclámpticas y son expresados en unidades arbitrarias (U.A.).

VIII. DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de este trabajo fueron los siguientes: hubo una disminución de los receptores α_{1A} que, estadísticamente, no fue significativa; por otro lado, tenemos un notorio aumento en la cantidad de receptores α_{1B} , en cuanto a los receptores α_{1D} no se encontró ningún cambio significativo.

Existen varios factores que intervienen en el desarrollo de un embarazo normal, que son esenciales para un buen crecimiento fetal, como un suficiente flujo sanguíneo uteroplacentario, que se logra por la completa remodelación de la circulación uterina, así como la creación de un nuevo órgano vascular, la placenta (Osol y Mandala, 2009).

Además de los cambios que sufre la estructura de los vasos sanguíneos, la reactividad vascular uterina también se ve afectada durante el embarazo, eventos que hasta el momento no están totalmente esclarecidos. Diferentes investigadores han propuesto diversos mecanismos por los cuales se explique este fenómeno. Entre ellos tenemos aumento en la relajación vascular dependiente del endotelio, aumento de sustancias vasodilatadores o reducción de la reactividad vascular a agonistas vasoconstrictores como los agonistas α_1 adrenérgicos (Khalil y Granger, 2002).

Se ha establecido que, el tono vascular es el resultado de un equilibrio entre sustancias tanto vasodilatadoras como vasoconstrictoras sobre el músculo liso. Constantemente el endotelio produce óxido nítrico (NO), junto con

otras moléculas vasodilatadoras, tales como prostaciclina (PGI_2) y factor hiperpolarizante derivado del endotelio, en contraposición a otras sustancias vasoconstrictoras, como angiotensina II, la endotelina I. En diversas situaciones donde el endotelio es dañado, la primera respuesta que se presenta es la inhibición de la producción del NO, teniendo por resultado un aumento del tono vascular, o falta de oposición a las sustancias vasoconstrictoras, lo cual se puede traducir clínicamente en hipertensión arterial.

Existen estudios controversiales respecto a la reactividad vascular en diversos lechos vasculares durante el embarazo, hay quienes reportan que en el embarazo existe un marcado aumento en la contracción mediada por receptores α_1 en arteriolas uterinas (Wang et al., 2002). Dichos resultados contrastan con la mayoría de los reportes donde exhiben que la respuesta vasoconstrictora en diferentes lechos vasculares a la estimulación α_1 adrenérgica está disminuida durante el embarazo tanto en animales como en humanos (McLaughlin et al., 1989).

En este sentido, nuestros resultados muestran un aumento significativo del receptor α_{1B} , que puede contribuir a la hiperreactividad adrenérgica observada en la preeclampsia, además, se observó una disminución no significativa por parte del receptor α_{1A} y finalmente cambios no significativos del receptor α_{1D} . A diferencia de los receptores α_{1A} y α_{1B} , el α_{1D} posee un N-terminal extra largo (90-95 aminoácidos) (Graham et al., 1996), lo que puede contribuir a su pobre expresión en la superficie celular. Desafortunadamente, la biogénesis del receptor α_{1D} ha sido poco estudiada, pero hay evidencia de

estudios que muestran que la expresión en la superficie celular aumenta marcadamente si la N-terminal del receptor es truncada (Hague et al., 2004; Pupo et al., 2003). Además de la pobre expresión en la superficie celular del receptor α_{1D} , lo que ha llevado a algunos a cuestionar si la proteína del receptor incluso existe en tejidos de la rata (Yang et al., 1998 ; Yang et al., 1997), también se ha sugerido por algunos tener una maquinaria de señalización intracelular menos eficiente que la de los receptores α_{1A} y α_{1B} (García y Villalobos, 2004).

Así, el embarazo normal esta asociado con diferencias regionales en las respuestas vasculares de los receptores α_1 -adrenérgicos (Wang et al., 2002). Estos cambios son probablemente causados por cambios en el número de receptores α_1 adrenérgicos, pues estudios previos han demostrado una mayor densidad de los receptores α_1 adrenérgicos de la circulación uterina y una disminución en la densidad de receptores en los lechos vasculares sistémicos durante el embarazo (D' Angelo et al., 1993).

Lo anterior nos sugiere que los cambios en el número de receptores en el músculo liso podrían dar como resultado el desarrollo de hipertensión inducida por el embarazo. Esta modulación de receptores adrenérgicos podría desarrollarse por alteraciones moleculares a nivel receptor o bien por mecanismos de adaptación por parte del organismo, mecanismos aún no bien estudiados.

IX. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran un aumento significativo del receptor α_{1B} , que puede contribuir a la hiperreactividad adrenérgica observada en la preeclampsia.

X. REFERENCIAS

Aarnoudse JG, Houthoff HJ, Weits J, et al. A syndrome of liver damage and intravascular coagulation in the last trimester of normotensive pregnancy. A clinical and histopathological study. *Br J Obstet Gynaecol.* 1986;**93**:145–155.

Abbas AE, Lester SJ, Connolly H. Pregnancy and the cardiovascular system. *Int J Cardiol* 2005;**98**(2):179-189.

Anyaegbunam A, Edwards C. Hypertension in pregnancy. *J Natl Med Assoc* 1994; 86(4): 289-293.

Audibert F, Friedman SA, Frangieh AY, et al. Clinical utility of strict diagnostic criteria for the HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets) syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;**175**:460–464.

Barron William M, Lindheimer Marshall D. *Trastornos médicos durante el embarazo.* 3ª ed. Madrid: Ediciones Harcourt, 2002. 2 p.

Barron **WM.** Volume homeostasis during pregnancy in the rat. *Am J Kidney Dis* 1987; 9:296–302.

Barton JR, Sibai BM. Diagnosis and management of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Clin Perinatol.* 2004;**31**:807–33.

Bracho-Valdés I, Godínez-Hernández D, et al. Increased alpha-1 adrenoceptor expresión in pregnant rats with subrenal aortic coartation. *Hypertension in Pregnancy* 2009; 00:1-15.

Broughton Pipkin F. Risk factors for pre-eclampsia. *N Engl J Med* 2001;**344**:925–6.

Brown MA, Hague WM, Higgins J, et al. The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: full consensus statement. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2000;**40**:139–55.

Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, et al. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy* 2001;**20**:IX–XIV.

Chesley LC. Hypertension in pregnancy: definitions, familial factor, and remote prognosis. *Kidney Int* 1980;**18**:234-240.

Chien PF, Arnott N, Gordon A, et al. Uterine artery Doppler flow velocimetry in the prediction of preeclampsia, intrauterine growth retardation and perinatal death? An Overview. *Br J Obstet Gynaecol* 2000; 107: 196–208.

Cnossen J, van der Post J, Mol B, Khan KS, et al. Prediction of pre-eclampsia: a protocol for systematic reviews of test accuracy. *BMC Pregnancy Childbirth* 2006; 6: 29.

Craici I, Wagner S, Garovic V. Preeclampsia and future cardiovascular risk: formal risk factor or failed stress test? *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2008; 2(4):249-259.

D'Angelo G, Osol G, Cipolla M. Interaction of myogenic and adrenergic mechanisms in isolated, pressurized uterine radial arteries from late-pregnant and nonpregnant rats. *Am J Obstet Gynecol.* Feb 1993;168(2):697-705.

Garcia-Sainz JA and Villalobos –Molina. The elusive alpha(1D)-adrenoceptor: molecular and cellular characteristics and integrative roles. *Eur J Pharmacol* 2004 500: 113-20.

Graham RM, Perez DM, Hwa J, et al. Alpha (1)-Adrenergic receptor subtypes- Molecular structure, function and signaling. *Circulation Research.* 1996; 78: 737-749.

Greer I. Pre-eclampsia matters New guideline is simple, evidence based, and clinical, and should be used. *BMJ* 2005; 330(7491): 549–550.

Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dällenbach R, et al. Potential markers of preeclampsia – a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 70.

Guller S, Buhimschi C, Ma Y, et al. Placental expression of ceruloplasmin in pregnancies complicated by severe preeclampsia. *Lab Invest.* 2008; 88(10): 1057-1067.

Hague C, Chen Z, Pupo AS, et al . The N-terminus of the human alpha1D-adrenergic receptor prevents cell surface expression. *J Pharmacol Exp Ther* 2004a; 309: 388-97.

Haram K, Syendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: Clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy Childbirth* 2009; 9: 8.

Hasbún AJ. Preclampsia-eclampsia. En: Botero J, JubizA, Henao G, ed. *Obstetricia y ginecología texto integrado 5ta edición* Medellín: Intermedicina: 1994: 167-177

Hawrylyshyn KA, Michelotti GA, Coge F, et al .Update on human alpha1-adrenoceptor subtype signaling and genomic organization. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:449–55.

Hofmeyr G, Belfort M. Proteinuria as a predictor of complications of pre-eclampsia. *BMC Med* 2009; 7: 11.

James P, Nelson-Piercy C. Management of hypertension before, during, and after pregnancy. *Heart* 2004; 90(12): 1499–1504.

- Kelly J, Ryan D, O'Brien, et al.** Second trimester hepatic rupture in a 35 year old nulliparous woman with HELLP syndrome: a case report. *World J Emerg Surg.* 2009; 4: 23.
- Khalil RA, Granger JP.** Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Jul 2002;283(1):R29-45.
- Khan KS, Wojdyla D, Say L, et al.** WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet.* 2006; **367**:1066–1074.
- Koenen SV, Huisjes AJ, Dings J, et al.** Is there a diurnal pattern in the clinical symptoms of HELLP syndrome? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2006;**19**:93–99.
- Leal M.** Los efectos de un embarazo sobre el sistema cardiovascular. *La verdad* 2005.
- Leonor J, Loerin Verónica, Doznor L, et al.** Preeclampsia eclampsia. *Revista de Posgrado de la Via Cátedra de Medicina* 2007; 165.
- Longo LD.** Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. *Am J Physiol* 1983;245:720-729.
- Martin JN, Jr, Rose CH, Briery CM.** Understanding and managing HELLP syndrome: the integral role of aggressive glucocorticoids for mother and child. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;**195**:914–934.
- Martín, J.** Twelve steps to optimal management of HELLP syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 1999; 42:532-550
- McCowan LME, Buist RG, North RA, et al.** Perinatal morbidity in chronic hypertension. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:123–9.
- McLaughlin MK, Keve TM, Cooke R.** Vascular catecholamine sensitivity during pregnancy in the ewe. *AM j Obstet Gynecol* 1989; 160:47-53.
- Michel MC, Kenny B, Schwinn DA.** Classification of alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Jul 1995;352(1):1-10.
- Montan S, Sjoberg NO, Svenningsen N.** Hypertension in pregnancy - Fetal and infant outcome. A cohort study. *Clinical & Experimental Hypertension - Part B, Hypertens Pregnancy.* 1987;**6**:337–348.
- Osol G, Mandala M.** Maternal Uterine Vascular Remodeling During Pregnancy. *Physiology* 2009; 24(1):58-71
- Parra-Ramírez, Pablo y Beckles- Maxwell, Mario.** Diagnóstico y Manejo Oportuno del Síndrome de HELLP. *Acta méd. Costarric* 2005; 47(1):07-14.

Pijnenborg, R. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol* 1991;98: 648–655.

Pijnenborg, R. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 1983;4: 397–414.

Price DT, Lefkowitz RJ, Caron MG. Localization of mRNA for three distinct alpha 1-adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human alpha-adrenergic physiology. *Mol Pharmacol.* 1994;45:171–5.

Pritchard JA, Weisman R, Jr, Ratnoff OD, et al. Intravascular hemolysis, thrombocytopenia and other hematologic abnormalities associated with severe toxemia of pregnancy. *N Engl J Med.* 1954;250:89–98.

Pupo AS, Uberti MA and Mihneman KP. N-terminal truncation of human alpha(1D)-adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein. *European Journal of Pharmacology* 2003; 462:1-8.

Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:S1–S22.

Ross G, Yallampalli Ch. Vascular Hyperresponsiveness to Adrenomedullin During Pregnancy Is Associated with Increased Generation of Cyclic Nucleotides in Rat Mesenteric Artery. *Biology of Reproduction* 2007; 76(1): 118-123.

Sánchez E, Gómez J, Morales VD. Preeclampsia severa, eclampsia, síndrome de HELLP. *Rev Fac Med UNAM* 2005; 48(4) : 145-150.

Sánchez Nuncio HR, Pérez Toga G, Pérez Rodríguez P, et al. Impacto del control prenatal en la morbilidad y mortalidad neonatal. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 2005;43 (5): 377-380.

Saudan P, Brown MA, Buddle ML, et al. Does gestational hypertension become pre-eclampsia? *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:1177–84.

Schwinn D, Roehrborn C. α_1 -Adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms. *Int J Urol.* 2008; 15(3): 193-199.

Serrano N. Immunology and genetic of preeclampsia. *Clinical & Developmental Immunology* 2006; 13(2–4): 197–201.

Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365:785–799.

Sibai BM, Ramadan MK, Usta I, et al. Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169:1000–1006.

Sibai BM, Taslimi MM, EI-Nazer A. Maternal-perinatal outcome associated with the HELLP Syndrome in severe preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155:501- 509.

Sibai BM. Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol.* 2004;**103**:981–991.

Sibai BM. Risk factors, pregnancy complications, and prevention of hypertensive disorders in women with pregravid diabetes mellitus. *J Matern Fetal Med* 2000; 9(1):62-5.

Sibai BM. Treatment of hypertension in pregnancy. *N Engl J Med* 1996;335:257–65.

Sutherland A, Cooper DW, Howie PW et al. The incidence of severe preeclampsia amongst mothers and mothers-in-law of preeclamptics and controls. *Br J Obstet Gynaecol* 1981; 88:785–791.

Thangaratinam S, Coomarasamy A, Sharp S, et al. Tests for predicting complications of pre-eclampsia: A protocol for systematic reviews. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2008; 8: 38.

Van Beck E, Peeters LL. Pathogenesis of preeclampsia: A comprehensive model. *Obstet Gynecol Surv* 1998;53:233– 239.

Walker JJ. Pre-eclampsia. *Lancet* 2000;356:1260–5.

Wang SY, Datta S, Segal S. Pregnancy alters adrenergic mechanisms in uterine arterioles of rats. *Anesth Analg* 2002;94(5):1304-1309.

Wilson ML, Murphy Goodwin T, Pan VL, et al. Molecular Epidemiology of Preeclampsia. *Obstetrical and Gynecological Survey* 2002;58:39-66.

Yang M, Reese S, Cotecchia S and Michel MC. Murine alpha(1)-adrenoceptor subtypes. I. Radioligand binding studies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1998; 286: 841-847.

Yang M, Verfurth F, Buscher R and Michel MC. Is alpha 1D-adrenoceptor protein detectable in rat tissues? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 355: 438-46.

Yong EM, Mano MT, Head RJ. Neurovascular function during pregnancy in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992:415–423.