TESIS
ED2000
M6

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO

FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN

ESCUELA DE EDUCACIÓN

ESPECIALIDAD CIENCIAS BIOLÓGICAS.

Universidad Católica Andrés Bello
BIBLIOTECA
Caracas

POSIBLE PAPEL PROTECTOR DE ANTIOXIDANTES EN EL DESARROLLO DE LA PREECLAMPSIA.

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas.

NANCY C. MOYA GARCIA

FULGENCIO PROVERBIO

REINALDO MARIN.

Caracas, julio de 2000

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO

FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN

ESCUELA DE EDUCACIÓN

ESPECIALIDAD CIENCIAS BIOLÓGICAS

POSIBLE PAPEL PROTECTOR DE ANTIOXIDANTES EN EL DESARROLLO DE LA PREECLAMPSIA

Trabajo de grado presentado ante la ilustre Universidad Católica Andrés Bello por la Bachiller Nancy C. Moya García para optar al título de LICENCIADO EN EDUCACIÓN, mención Ciencias Biológicas, bajo la dirección del Dr. Fulgencio Proverbio.

Caracas, Julio 2000

El Presente Trabajo de Grado ha sido realizado en el Laboratorio de Bioenergética Celular del I.V.I.C, bajo la Dirección del Dr. Fulgencio Proverbio.

En nuestro carácter de Tutor y Cotutor del Trabajo Especial de Grado titulado: "POSIBLE PAPEL PROTECTOR DE ANTIOXIDANTES EN EL DESARROLLO DE LA PREECLAMPSIA", realizado por Nancy Cecilia Moya García para optar al título de Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas, consideramos que dicho trabajo reune los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del jurado examinador designado.

En Caracas a los tres días del mes de Julio de 2000.

Dr. Fulgencio Proverbio
C.I. 4.812.508

Dr. Reinaldo Marín
C.I.4.245.480

El trabajo de grado de NANCY CECILIA MOYA GARCÍA titulado "POSIBLE PAPEL PROTECTOR DE ANTIOXIDANTES EN EL DESARROLLO DE LA PREECLAMPSIA", ha sido aprobado por el jurado, quien no se hace responsable de su contenido, pero lo ha encontrado correcto en su calidad y en su forma de presentación, en fe de lo cual firman:

_____

_____

_____

Caracas, Julio 2000

RESUMEN DEL TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR

AL TÍTULO DE LICENCIADO EN EDUCACIÓN

MENCIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS

POSIBLE PAPEL PROTECTOR DE ANTIOXIDANTES EN EL DESARROLLO DE LA PREECLAMPSIA

por

NANCY MOYA

Universidad Católica Andrés Bello

Caracas, Julio 2000

Dr. FULGENCIO PROVERBIO
Director del Trabajo

La preeclampsia, patología que afecta cerca de un 5-10% de los embarazos, se caracteriza por la presencia de hipertensión, proteinuria y edema, y se presenta en embarazadas con 20 semanas o más de edad gestacional. La enfermedad puede involucrar otros órganos, convirtiéndose en una enfermedad multisistémica, capaz de alterar diversas funciones corporales, como la función renal, hepática, cardíaca, proceso de coagulación, etc. El cuadro clínico mejora e inclusive desaparece, inmediatamente después del parto. La

causa de la enfermedad es desconocida, aunque se han descrito toda una serie de condiciones que pudieran estar involucradas de alguna manera en la incidencia de la enfermedad. Entre ellas: alteraciones en el establecimiento de un adecuado circuito vascular útero placentario; lesiones del endotelio vascular; peroxidación lipídica elevada en el plasma y, alteraciones en el metabolismo del ión calcio, habiéndose descrito en este último particular, aumento en la concentración de calcio intracelular en eritrocitos y en plaquetas, así como una disminución de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} en membranas plasmáticas de eritrocitos, de células de músculo uterino y, de sincitiotrofoblasto de placenta.

En el presente trabajo, se estudió actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de membranas plasmáticas de glóbulos rojos de pacientes embarazadas preeclámpticas y normotensas, así como el grado de peroxidación lipídica de estas membranas. Posteriormente, se estudió el efecto producido por irradiación de fantasmas de glóbulos rojos de pacientes embarazadas normotensas con luz UV por distintos períodos de tiempo, conocido método para producir *in vitro* peroxidación lipídica de membranas biológicas, sobre los dos parámetros considerados: actividad de ATPasa de Ca^{2+} y grado de peroxidación lipídica de las membranas. Finalmente, se estudió el posible papel protector contra la peroxidación lipídica de agentes antioxidantes como el hidroxitolueno butilado, y otro de uso común, como lo es la Vitamina C.

Nuestros resultados pueden ser resumidos de la siguiente manera:

1. La actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de fantasmas de glóbulos rojos de pacientes preeclámpticas, está disminuída en cerca de un 50% con respecto a la de pacientes embarazadas normotensas.

2. El grado de peroxidación lipídica de fantasmas de glóbulos rojos de pacientes preeclámpticas aparece aumentado en cerca de un 100%, cuando es comparado con aquel de pacientes embarazadas normotensas.

3. Se encontró una relación inversa lineal, entre el grado de peroxidación lipídica de las membranas y la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de las mismas.

4. Se demostró que agentes antioxidantes como el hidroxitolueno butilado y, más importante todavía, uno de uso común como lo es la Vitamina C, son capaces de proteger el efecto de peroxidación lipídica en membranas de glóbulos rojos inducido por el tratamiento con luz UV, evitando de esta manera su efecto inhibitorio sobre la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de las mismas.

Nuestros resultados nos llevan a sugerir la realización de estudios consistentes en el suministro periódico de Vitamina C u otro agente antioxidante a un grupo de pacientes embarazadas, desde el comienzo de la gestación, con el fin de determinar qué porcentaje de embarazadas desarrollan preeclampsia y, dado el caso, la severidad de la misma.

A Dios, mi luz y voluntad para seguir adelante.

A mis padres y hermana. Es muy bueno saber que siempre están conmigo.

A Jaime Ramírez, con todo mi amor.

A Jaime y Rodolfo, gracias por existir.

A Fulgencio Proverbio, mi amigo y maestro siempre.

A Teresa Proverbio, mi Consejera, con mucho cariño.

A Reinaldo Marín, mi orientador.

Yo contemplaba siempre al Señor delante de mí, como quien está a mi diestra para sostenerme.
Salmo 15.8

AGRADECIMIENTOS

-A mis padres María E. García y Jorge Moya R., por su confianza en mí, su ayuda, su cariño y apoyo incondicional.

-A mi hermana Gladys, por su ayuda y amistad.

-A Jaime, por su comprensión, apoyo, amor y amistad brindada durante toda mi carrera.

-A mis pequeños Jaime y Rodolfo, por su ternura, cariño y por ser el motivo que guía mi vida.

-Al Dr. Fulgencio Proverbio, por saber ser siempre maestro e investigador, por compartir y prodigarme su sabiduría, comprensión, dedicación, ayuda y calidad humana en todo momento. Reciba usted mi profundo respeto, admiración y gratitud siempre.

-A la Sra. Teresa Garófalo de Proverbio, quien con su optimismo, ayuda técnica, su total confianza y dosis de amor y comprensión, me enseñó que con esfuerzo, todo es posible.

-A Reinaldo Marín, por sus certeras orientaciones y su excelencia.

-A Néstor Oviedo, por su compañerismo y ayuda en el laboratorio.

-Al Centro de Biofísica y Bioquímica (CBB) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, por haberme permitido sus laboratorios para la realización de este trabajo de grado.

-A la ilustre Universidad Católica Andrés Bello (U.C:A:B), por la formación profesional que allí adquirí.

-Al Centro de Estudios Avanzados (CEA) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, por aceptarme para la realización de este trabajo.

-A la maternidad Concepción Palacios, por el suministro de las muestras utilizadas para la realización de mi trabajo.

-A todas aquellas personas que me apoyaron y, de alguna manera me ayudaron, en la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

página

RESUMEN 5

DEDICATORIA 8

AGRADECIMIENTO 9

LISTA DE TABLAS 13

LISTA DE FIGURAS 14

INTRODUCCIÓN 16

MATERIALES Y MÉTODOS 25

1. Muestras de sangre 25

2. Preparación de membranas de glóbulos rojos (fantasmas) 26

3. Determinación de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} 27

4. Determinación de proteínas 28

5. Determinación de niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRAT) 29

6. Tratamiento de las membranas con luz ultravioleta (UV) 30

1. 7. Análisis Estadístico 32

RESULTADOS 33

1. Determinación de actividades ATPásicas de Mg^{2+} y de Ca^{2+}, en fantasmas de glóbulos rojos de sangre humana 35

2. Estudio comparativo de las actividades ATPásicas de Mg^{2+} y de Ca^{2+}, en fantasmas provenientes de pacientes normotensas y de pacientes preeclámpticas 37

3. Estudio comparativo de los niveles de sustancias reactivas al

ácido tiobarbitúrico (SRAT), en fantasmas provenientes de pacientes normotensas y de pacientes preeclámpticas..... 37

4. Efecto del tratamiento con luz UV sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} y la peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas..... 40

5. Efecto del tratamiento con luz UV, en presencia de agentes antioxidantes, sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} y la peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas..... 44

6. Estudio del grado de correlación entre la actividad ATPásica de Ca^{2+} y los niveles de peroxidación lipídica de fantasmas de glóbulos rojos de pacientes normotensas, sometidos a distintos tiempos de irradiación con luz UV..... 50

DISCUSIÓN..... 52

BIBLIOGRAFÍA..... 56

LISTA DE TABLAS

Tabla página

I Actividades ATPásicas de magnesio y de calcio en fantasmas de glóbulos rojos de sangre humana..... 36

II Actividades ATPásicas de magnesio y de calcio, en fantasmas de glóbulos rojos de sangre de pacientes embarazadas normotensas y preeclámpticas..... 38

III Niveles de peroxidación lipídica, determinada por presencia de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRAT), en fantasmas de glóbulos rojos de sangre de pacientes normotensas y preeclámpticas... 39

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema del tratamiento con luz UV (254 nm) de fantasmas de glóbulos rojos humanos.....	31
2	Efecto del tratamiento con luz UV sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas.....	42
3	Efecto del tratamiento con luz UV sobre los niveles de SRAT de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas.....	43
4	Efecto del tratamiento por 30 min con luz UV, en presencia o ausencia de BHT, sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas.....	45
5	Efecto del tratamiento por 30 min con luz UV en presencia o ausencia de BHT, sobre el grado de peroxidación lipídica de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas.....	47
6	Efecto del tratamiento por 30 min con luz UV en presencia o ausencia de 200 mg/lt ácido ascórbico, sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas.....	48

7 Efecto del tratamiento por 30 min con luz UV en presencia o ausencia de 200 mg/lt ácido ascórbico, sobre el grado de peroxidación lipídica de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas..... 49

8 Actividad ATPásica de Calcio de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas. en función de los niveles de SRAT de los mismos..... 51

INTRODUCCIÓN

La preeclampsia, enfermedad que se presenta en un 5 al 10% de los embarazos (Ramin y Ramin, 1997; Weibezahn y col., 1997; Duley, 1992), es exclusiva del ser humano (Zeeman y Dekker,1992). El diagnóstico de la enfermedad se fundamenta en la presencia de hipertensión arterial sistémica, edema y proteinuria, en embarazadas con más de 20 semanas de gestación (Roberts, 1984). El estado hipertensivo se define para pacientes que presentan un valor de 90 mm de Hg o mayor de presión diastólica, y de 140 mm de Hg o mayor de presión sistólica. También, cuando se produce un incremento igual o mayor de 30 mm de Hg en presión sistólica, y de 15 mm de Hg en presión diastólica, con respecto a las cifras registradas en la primera mitad del embarazo (Cavanagh y Knuppel, 1992). La proteinuria es definida como la excreción de proteínas en orina superior a los 300 mg/24 h (Pritchard y col., 1990). El edema, finalmente, es el resultado de la acumulación excesiva de líquido en el tejido subcutáneo. Si bien el embarazo normal puede ir acompañado con frecuencia de cierto grado de edema, el que se presenta en la preeclampsia es más severo y difuso. (Pritchard y col., 1990).

La preeclampsia es una enfermedad que puede ser bastante severa, como lo indica el hecho de que ha llegado a constituirse como la causa directa o indirecta del 25% de las muertes perinatales (fetales y neonatales) (Zeeman y Dekker, 1992), y por producir aproximadamente 50.000 muertes maternas al año en todo el mundo (Roberts, 1984). De hecho, la preeclampsia es considerada como la principal causa aislada de muerte materna en todo el mundo (Redman,1991).

En su forma más benigna, la preeclampsia se denomina "leve", y se caracteriza por su aparición más bien tardía en el embarazo, por una hipertensión arterial moderada y, por una evolución satisfactoria. La preeclampsia "severa", discurre con una hipertensión más elevada (niveles de presión sistólica superiores a 160 mm de Hg y/o niveles de presión diastólica superiores a 110 mm de Hg); con una proteinuria que va más allá de los 3 g/24 h . Además, pueden aparecer síntomas y signos de afectación del sistema nervioso central como cefalea intensa, trastornos de la visión, hiperreflexia osteotendinosa, así como dolor en el hipocondrio derecho o el epigastrio, probablemente por congestión hepática. En este estadío, es frecuente la elevación de las enzimas hepáticas, la aparición de trombocitopenia y otros trastornos de la coagulación. En estadios más avanzados, la preeclampsia se transforma en eclampsia, en cuyo caso aparecen convulsiones y/o coma materno, con gran riesgo de muerte materna y fetal (Lindheimer y Katz,1985). Si bien la patogenia de la preeclampsia no está muy bien entendida (Redman,1990), su fisiopatología si es bien conocida, caracterizándose por daño endotelial, en especial a nivel microvascular, con la generación de vasoespasmos y la activación de factores de coagulación de la sangre.

Es importante señalar que si bien la preeclampsia es una patología propia de la gestación (Redman, 1991), en alteraciones del trofoblasto, como la mola hidatidiforme, puede observarse una sintomatología semejante (Chun y col., 1964). Este fenómeno de la ocurrencia de preeclampsia en los embarazos molares, donde el útero sólo contiene tejido placentario, indica claramente que no se requiere del feto para su aparición (Rote, 1985), por lo que sólo sería necesaria la placenta, para que pueda desarrollarse la enfermedad (Scott, 1958; Chun y col., 1964). La placenta es un órgano transitorio de forma discoide, a través del cual se realiza el intercambio gaseoso y de nutrientes entre la sangre materna y

fetal, las cuales nunca entran en contacto. Más aún, la placenta es un órgano endocrino complejo, responsable, en gran medida, de la respuesta inmune materna hacia el embarazo, el cual es considerado un hemialoinjerto (Roberts, 1984; Stirrat,1987). Además del hecho de que la presencia de placenta es requisito necesario y suficiente para la aparición de la preeclampsia, se ha encontrado que en modelos animales se logra inducir un sindrome parecido a la preeclampsia, al provocar isquemia placentaria (McKay y col., 1967). La patología y fisiopatología de la preeclampsia definen una serie de cambios en la mujer gestante, los cuales en general, son inducidos muy probablemente por la interacción del aloinjerto fetal (paterno) y el tejido materno, traduciéndose todo ello en la aparición de una tolerancia inmunológica (Stirrat, 1987). La situación que se deriva de ello, llevaría a cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en la circulación sistémica y utero-placentaria (Zeeman y Dekker, 1992).

Se han postulado distintas hipótesis para tratar de explicar la etiología de la enfermedad. Entre ellas tenemos: transmisión genética de susceptibilidad a la preeclampsia (Watermann y col., 1997); presencia de factores tóxicos en el suero de pacientes preeclámpticas (Robert y col., 1991); deficiencia nutricional o desbalance de algunos nutrientes específicos (Vasiljevic y col., 1996); alteraciones en el metabolismo del ión calcio (Belizán y col., 1988). Ninguna de ellas es concluyente y, requieren de mayor investigación. La hipótesis más considerada en los actuales momentos, se basa en considerar una perfusión placentaria disminuida, como responsable inicial de los fenómenos que se presentan con la enfermedad. Una reducción del riego sanguineo placentario puede ser el resultado de diversas causas. Entre ellas, se destaca la incapacidad del tejido placentario de llevar a cabo de forma satisfactoria el mecanismo de implantación,

mediante el cual la placenta asegura la sujeción al útero, además de una irrigación adecuada. Para esto último, se produce una transformación de la circulación miometrial de alta resistencia y, por ello, de bajo flujo, a una circulación de baja resistencia y, consecuentemente, de alto flujo sanguíneo (Pritchard y col., 1990). Durante el período embrionario, las células del trofoblasto (placenta primitiva), desplazan las células epiteliales del endometrio y atraviesan la membrana basal hacia el estroma. Las arterias más profundas del útero se denominan espirales, y representan las últimas ramificaciones del sistema vascular uterino. Desde la semana 6 a la 12 de gestación, las células del trofoblasto invaden las arterias espirales para sustituir su endotelio y ensanchar su luz, lo cual se conoce como la primera invasión trofoblástica o primera "oleada". En una segunda invasión trofoblástica, que se produce entre la semana 14 a la 20 de gestación, las células trofoblásticas avanzan más profundamente, llegando incluso a arterias bastante superficiales como las radiales, que representan sólo la tercera o cuarta ramificación de las arterias principales llamadas uterinas. Esto, como ya se dijo, reduce grandemente la resistencia al flujo del sistema arterial miometrial en el sitio de implantación placentaria, al aumentar el área de corte transversal de los vasos arteriales (Pritchard y col., 1990). Se ha encontrado que la segunda invasión u oleada de implantación, que es la más profunda y relevante, no se produce en pacientes afectadas por preeclampsia, lo que se traduciría en hipoperfusión placentaria (Hustin y col., 1983; Zeeman y Dekker,1992). La causa de este defecto de implantación no es clara, pero se cree que existe una alteración en el reconocimiento inmune de la madre hacia el feto (Zeeman y Dekker,1992). En este particular, es importante mencionar que la enfermedad microvascular que se produce en ciertas enfermedades como la diabetes, la ateroesclerosis o la hipertensión arterial crónica,

producen una inadecuada irrigación uterina y predisponen a la preeclampsia (Roberts y Redman, 1993).

Un estado hipóxico se traduce necesariamente en daños en el tejido endotelial. El endotelio es un tejido que recubre el interior de los vasos sanguíneos, por lo que se encuentra diseminado en todos los órganos vascularizados. Actualmente, se conoce que el endotelio no sólo constituye una barrera física que regula el transporte de sustancias a nivel capilar, sino que además cumple funciones metabólicas como la regulación de los lípidos del plasma, y participa en la hemostasia y la activación plaquetaria (Zeeman y Dekker, 1992). Además, el endotelio es un regulador del tono vascular, al producir tanto sustancias vasodilatadoras (la prostaciclina y el óxido nítrico) (Zeeman y Dekker, 1992), como vasoconstrictoras (el tromboxano A2 y la prostaglandina H2) (Lüsher, 1990). La presencia en la preeclampsia de sensibilidad vascular aumentada a la angiotensina II (Gant y col., 1973); la activación de la cascada de la coagulación, incluyendo activación plaquetaria (Socol y col., 1985) y, la reducción de la producción vascular de prostaciclina (Dadak y col., 1982), pueden ser explicados satisfactoriamente aduciendo una disfunción endotelial. La disfunción endotelial también podría explicar el carácter multisistémico de la enfermedad. En este particular, se ha sugerido que un defecto primario en la perfusión de la placenta puede provocar hipoxia del tejido trofoblástico, con posterior liberación de hidroperóxidos lipídicos que serían transportados por el plasma a todo el organismo, pudiendo así afectar directamente al endotelio de cualquier órgano (Hubel y col. 1989). La hipoxia placentaria; la disminución de la actividad antioxidante del suero; la disminución de los niveles plasmáticos de vitamina E y de betacaroteno (agentes antioxidantes), que se produce en las pacientes preeclámpticas (Davidge y col., 1992; Jain y Wise, 1995; Cueto y

col., 1997), se traducirían en un aumento en el contenido plasmático de hidroperóxidos lipídicos y otros productos de la acción de radicales libres en pacientes preeclámpticas, los cuales pudieran mediar la disfunción celular endotelial, según ha sido indicado por diversos autores (Chirico y col., 1993; Hubel y col., 1989; Walsh, 1994). De hecho, un aumento en los niveles de productos de peroxidación lipídica circulante en plasma sanguíneo, ha sido descrito para pacientes preeclámpticas (Redman, 1991).

La peroxidación lipídica afecta la organización ultraestructural de las membranas celulares, disminuyendo su fluidez (Kagan y col., 1983), produciendo cambios de permeabilidad y, modificando la actividad de proteínas unidas a la membrana (Marshansky y col., 1983). También, puede afectar directamente a dichas proteínas de membrana mediante la oxidación de grupos sulfidrilo (Kako y col., 1988). Como mencionábamos anteriormente, la fuente principal de peróxidos lipídicos en preeclámpticas sería entonces el trofoblasto (Walsh y Wang, 1995), a partir del cual, los hidroperóxidos alcanzarían la circulación sistémica materna y la circulación fetal, propagándose la enfermedad a todo el organismo, con la consecuente producción de daños a nivel del endotelio vascular. Además, en altas concentraciones, los peróxidos lipídicos actúan sobre la prostaciclina sintetasa endotelial, disminuyendo la producción de prostaciclina (Warso y Lands, 1983).

Daños endoteliales se traducirían en daños a estructuras y procesos celulares, incluyendo mecanismos de transporte, tanto activos como pasivos. En este particular, como mencionábamos anteriormente, se han descrito alteraciones del metabolismo del calcio en pacientes preeclámpticas. Así, se ha encontrado un aumento del calcio iónico intracelular en eritrocitos, plaquetas, linfocitos y placenta (Pitkin, 1985; Sowers y col., 1989;

Matsubara y col., 1998; Hojo y col., 1999), sin encontrarse concentraciones alteradas de sodio, potasio o magnesio (Sowers y col., 1989) en las mismas células. Más aún, a diferencia del embarazo normal, los niveles de paratohormona están elevados y los de la 1,25-dihidroxivitamina D3 están bajos en pacientes preeclámpticas, lo que explica la menor excreción de calcio en orina que se ha reportado en estas pacientes, así como la reducción en la absorción de calcio de su dieta, que conduce a una reducción sérica del calcio iónico (Kovacs y Kronenberg, 1997). Más aún, un aumento en la concentración del calcio intracelular a nivel de tejido muscular, se traduciría en un aumento del tono vascular y de la resistencia vascular periférica, con la consiguiente aparición de hipertensión arterial diastólica, casi siempre presente en la enfermedad. Por otro lado, el incremento del contenido de calcio de las plaquetas, favorecería su activación y agregación, lo que conduciría a la formación de microtrombos, consumo de fibrinógeno y un estado de coagulación intravascular diseminada, todo lo cual se encuentra comúnmente en la forma severa de la preeclampsia (Zeeman y Dekker, 1992).

El control de la concentración intracelular de calcio es un proceso múltiple. El calcio puede entrar pasivamente a las células a través de canales específicos de la membrana plasmática, y puede ser activamente expulsado de las células por dos sistemas de extracción de calcio: el intercambiador Na^+/Ca^{2+} y la bomba de calcio (ATPasa de Ca^{2+}). Además, las células cuentan con mecanismos internos para el control del calcio citoplasmático, como lo son el retículo endoplasmático, las mitocondrias y las proteínas secuestradoras de calcio. De todos ellos, la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática, que es un sistema de poca capacidad pero de una gran afinidad por el ión calcio, es la

responsable, en última instancia, de mantener en forma precisa los niveles de calcio iónico intracelular (Carafoli, 1991).

Basándose en las premisas indicadas anteriormente, nuestro laboratorio se dedicó a la tarea de estudiar la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática de células de diferentes tejidos de mujeres preeclámpticas. En este particular, se ha encontrado que la ATPasa de Ca^{2+} presenta una disminución en su actividad hidrolítica del ATP, de aproximadamente un 40-50% en comparación con su actividad en fantasmas de glóbulos rojos de gestantes sanas (Nardulli y col., 1994); en membranas plasmáticas de sincitiotrofoblasto de placenta (Casart, 1995) y, en membranas plasmáticas del músculo uterino (Carrera, 1995). Concomitantemente con la disminución de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} observada en la preeclampsia, en el laboratorio se ha encontrado un incremento importante en los niveles de peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas de las células de los tejidos mencionados (Casart, 1995; López, 1998; Matteo y col., 1998). En este particular, se hace importante recordar que la actividad de muchas enzimas de membrana, entre ellas la ATPasa de Ca^{2+}, presentan una fuerte dependencia de la interacción lípido-proteína, por lo que son muy afectadas por los procesos de peroxidación lipídica (Ohta y col., 1989; Matteo y col., 1998). De hecho, en estudios previos, hemos podido demostrar una relación directamente proporcional entre el grado de peroxidación lipídica de las membranas celulares, inducida *in vitro* con luz ultravioleta en fantasmas de glóbulos rojos, y la inhibición de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} (Matteo y col., 1998). Estos resultados llevaron a proponer la posibilidad de que la disminución observada en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de las membranas celulares que se presenta

con la preeclampsia, sea debida a una consecuencia directa de la elevación de los niveles de peroxidación lipídica de estas membranas (Matteo y col., 1998).

En función de todo lo expuesto, en el presente trabajo se determinará la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} en fantasmas de glóbulos rojos de pacientes preeclámpticas, así como el grado de peroxidación lipídica de las mismas. Por otro lado, con técnica de irradiación con luz UV, se procederá a aumentar el grado de peroxidación lipídica de membranas de glóbulos rojos de pacientes embarazadas normotensas, con el fin de determinar si hay o no correlación con la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} y, de encontrarse algún efecto, estudiar la posibilidad de prevenirlos con el uso de agentes antioxidantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue autorizado por la Comisión de Bioética del IVIC y la Comisión de Investigaciones de la Maternidad "Concepción Palacios". Todas las participantes, firmaron un consentimiento escrito.

1. MUESTRAS DE SANGRE.

Sangre venosa periférica era tomada de pacientes primigestas, edad promedio 22 años, cuyas edades gestacionales estaban comprendidas entre 38 y 40 semanas (embarazos a término). Como controles, se seleccionaron pacientes con embarazos normales (normotensas), sin ninguna patología asociada. Como pacientes preeclámpticas, se seleccionaron aquellas con preeclampsia severa, la cual se definía por cumplimiento de los criterios establecidos al respecto: hipertensión (140/90 mm Hg o más), proteinuria (excreción de 1 g o más de proteína en 24 horas) y/o edema. A las pacientes de ambos grupos, se les tomaban 15 ml de sangre al momento de ser reclutadas para el estudio. Ninguna de las pacientes seleccionadas estaba recibiendo algún tratamiento médico para el control de la hipertensión arterial, para el momento de la toma de la muestra de sangre. Ni las pacientes normotensas, ni las preeclámpticas, presentaban historia médica de hipertensión arterial crónica, diabetes, insuficiencia renal, desórdenes en el metabolismo del calcio o cualquier otro tipo de enfermedad crónica.

Las muestras de sangre venosa eran recogidas en tubos heparinizados, los cuales se colocaban sobre hielo para su traslado. El procesamiento de las muestras, se llevó siempre a cabo antes de que transcurrieran 4 horas de haber sido tomadas.

2. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS DE GLÓBULOS ROJOS (FANTASMAS).

La preparación de fantasmas se llevó a cabo mediante una modificación del método de Heinz y Hoffman (1965). Se siguió el siguiente procedimiento: la sangre heparinizada se centrifugaba a 12.000 x g a 4°C por dos minutos, usando para ello una centrífuga marca Sorval RC-5B. El suero y la capa de glóbulos blancos eran removidos completamente por aspiración. Los glóbulos rojos empaquetados eran resuspendidos en una solución salina isosmótica de NaCl (150 mM) y Tris-HCl (10 mM), pH 7,5 a 0°C. Posteriormente, se hacían dos lavadas consecutivas con la misma solución, removiendo cada vez el sobrenadante y, junto con él, aquellos glóbulos blancos que pudiesen haber quedado luego de la primera centrifugación.

Los eritrocitos eran hemolizados durante 10 min a 0°C en una solución hipoosmótica conteniendo Tris-HCl (17 mM) a pH 7,5, manteniéndose en agitación constante durante ese tiempo. La relación para la hemólisis fue de 1 volumen de glóbulos rojos empaquetados por 9 volúmenes de solución de hemólisis. La suspensión se centrifugaba a 48.000 x g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante era aspirado, el precipitado se volvía a resuspender en la misma solución de hemólisis y se procedía a centrifugarlo de nuevo, hasta obtener los "fantasmas" de glóbulos rojos libres de hemoglobina. Esto es, un precipitado color crema, constituido por membranas de glóbulos rojos. La preparación así obtenida, contiene menos del 0,1% de hemoglobina, con respecto a la muestra original de glóbulos rojos intactos, según Dodge (1963).

3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE Ca^{2+}.

La actividad de la ATPasa de Ca^{2+} se determinaba según modificación del método descrito por Proverbio y col. (1986). El fosfato inorgánico liberado durante la reacción, se determinaba siguiendo el método descrito por Marín y col. (1986). El medio donde se realizaba la reacción enzimática tenía un volumen final de 0,5 ml con un pH de 7,4 y constaba de: 0,4 ml del medio específico a utilizar (ver abajo), y 0,1 ml de la suspensión de membranas de glóbulos rojos a la cual, previamente, se le había determinado la concentración de proteína, según el método de Bradford (1976). En el volumen final de 0,5 ml, los medios contenían (mM):

MEDIO 1		MEDIO 2	
$MgCl_2$	3 mM	$MgCl_2$	3 mM
NaCl	80 mM	NaCl	80 mM
KCl	15 mM	KCl	15 mM
EGTA	0,1 mM	EGTA	0,1 mM
Tris-ATP	2 mM	Tris-ATP	2 mM
Ouabaína	0,1 mM	Ouabaína	0,1 mM
Tris-HCl	50 mM	Tris-HCl	50 mM
Calmodulina	0,1 µM	Calmodulina	0,1 µM
		$CaCl_2$	0,3 mM

En el medio 2, la concentración de calcio libre era de 115 µM.

Se seguía el siguiente procedimiento: se preincubaban 0,4 ml del medio durante dos minutos a 37°C. La reacción se comenzaba al añadirle a dicho medio 0,1 ml de la suspensión de membranas, y se terminaba a los 30 min, mediante la adición de 0,3 ml de una solución (solución I), que contenía: dodecil sulfato de sodio (SDS), 1,43%; ácido ascórbico, 2,86%; ácido molíbdico, 0,48% y ácido clorhídrico, 1,76%. Una vez finalizada la reacción, los tubos eran colocados sobre hielo durante 10 min.

Luego de transcurrido este tiempo, se le añadía a cada uno de los tubos 0,2 ml de una solución (solución II) que contenía: Arsenito de sodio, 5%; ácido acético, 5%; y citrato de sodio, 5%. Los tubos eran calentados a 37°C durante 10 min y, una vez transcurrido ese tiempo, se medía la absorbancia en un espectrofotómetro marca Spectronic 1201 a 705 nm. Todos los ensayos eran realizados por triplicado.

La actividad específica de la ATPasa de Ca^{2+}, se calculó como la diferencia entre la actividad ATPásica medida en el medio 2, menos la medida en el medio 1. Se expresa como nmoles de fosfato liberado, por mg de proteína, por minuto; luego de la sustracción de los respectivos blancos incubados en paralelo, a los cuales se les añadía la suspensión de membrana luego de haberse detenido la reacción con la solución I.

4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

La determinación del contenido protéico de las muestras, se realizaba siguiendo el método de Bradford (1976). Para ello, se utilizaba el reactivo concentrado de azul brillante

de Coomasie (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A). Este reactivo se mantiene almacenado, hasta el momento de su uso, a 5°C.

El procedimiento es el siguiente: Se prepara una curva de calibración usando 100, 200 y 400 µl de albúmina, 25 µg/ml; llevando luego a un volumen final de 800 µl con agua destilada. Se preparan cuatro blancos para calibrar el espectrofotómetro, los cuales llevan 790 µl de agua destilada y 10 µl del medio de resuspensión. Las muestras se preparan por cuadruplicado, y llevan 10 µl de la suspensión de membranas y 790 µl de agua destilada. Tanto a las muestras, como a los blancos y curva de calibración se les añade 200 µl del reactivo, se agitan y se dejan a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm. La densidad óptica es lineal para un rango de concentración de proteína entre 0,07 mg/ml y 2,7 mg/ml.

5. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (SRAT).

Los niveles de SRAT se determinaban de acuerdo al método descrito por Feix y col. (1991). Para ello, se seguía el siguiente procedimiento: a tubos de centrífuga se les agregaba 50 µl de hidroxitolueno butilado (50mM); 750 µl de ácido tricloroacético al 10% y, 250 µl de la suspensión de membranas, las cuales habían sido lavadas previamente en 10 ml de buffer fosfato 10 mM, centrifugadas a 48.000 x g y resuspendidas en 1 ml del mismo buffer. Los tubos así preparados se mantenían sobre hielo a una temperatura de 4°C, aproximadamente por 10 min. Luego, eran centrifugados a 1.500 r.p.m. en una centrífuga

clínica, durante 10 min; se tomaban 750 µl del sobrenadante y se colocaban en tubos de vidrio, en donde se les añadían 750 µl de reactivo de ácido tiobarbitúrico al 0,5%. Inmediatamente, los tubos eran colocados en un baño de agua hirviente durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, eran colocados en hielo a 4°C por 3 min. Se determinaba su absorbancia a una longitud de onda de 532 nm, contra un blanco tratado de igual forma, pero que no contenía la suspensión de membranas.

En cada caso, se preparaba una curva de calibración usando como estándar el 1,1-3,3-tetrametoxipropano ($C_7H_{16}0_4$) (Feix y col.,1991). Los resultados son expresados como nmoles de malondialdehído (MDA)/mg de proteína.

6. TRATAMIENTO DE LAS MEMBRANAS CON LUZ ULTRAVIOLETA (UV).

Se utilizó el método de Lieberman (1967), modificado por Kako y col, (1988). Alícuotas de 250 µl de la suspensión de membranas (0,6-0,8 mg proteína/ml), eran colocadas en viales de vidrio (40 mm x 25 mm), los cuales se colocaban dentro de un vaso de precipitado con hielo (Figura 1). Las membranas eran irradiadas por tiempos variables con una lámpara de UV Mineralight (USA), situada a una distancia de 4 cm de la preparación, a una longitud de onda de 254 nm. El espesor de la suspensión no era mayor de 1 mm en todos los casos. Como control, se utilizaban membranas tratadas de la misma manera, pero sin irradiación con luz UV.

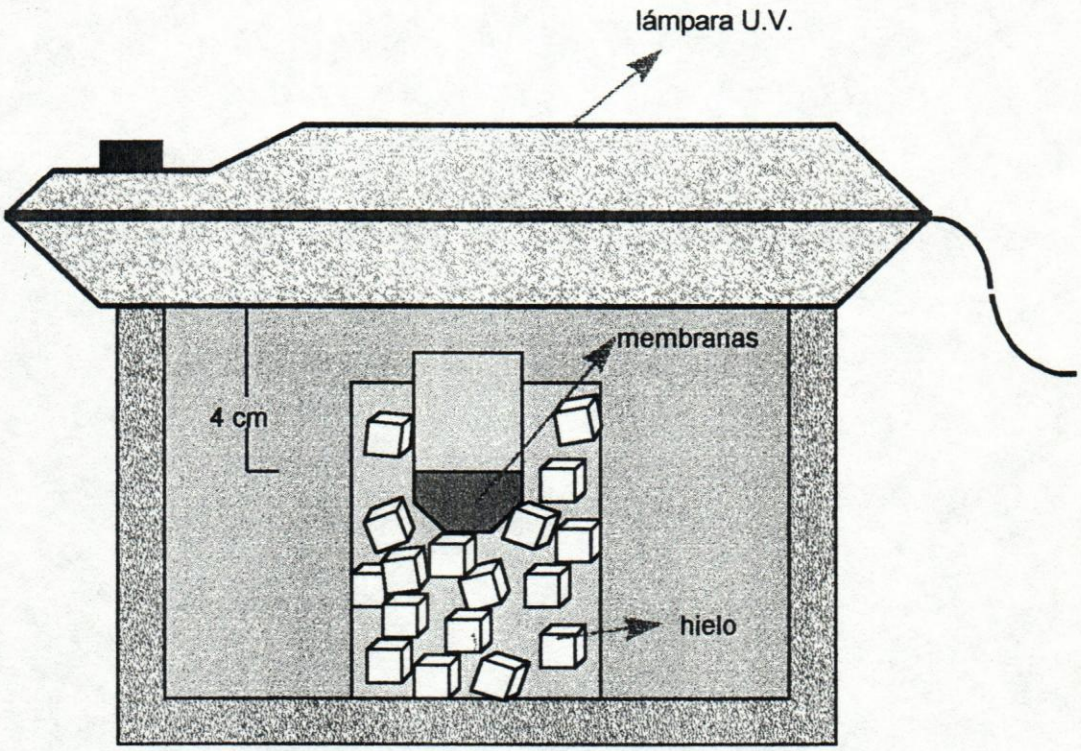

Figura 1

Esquema del tratamiento con luz UV (254 nm) de fantasmas de glóbulos rojos humanos.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los datos presentados en este trabajo, fue realizado utilizando la prueba "*t*" de student para datos agrupados, siendo (*n*), el número de veces que se repitieron los ensayos, utilizando preparaciones diferentes. Se aceptó como nivel de significancia estadística una probabilidad menor a 0,05.

RESULTADOS

La presentación de los resultados se realizará en el siguiente orden:

1. Determinación de actividades ATPásicas de Mg^{2+} y de Ca^{2+}, en fantasmas de glóbulos rojos de sangre humana.

2. Estudio comparativo de las actividades ATPásicas de Mg^{2+} y de Ca^{2+}, en fantasmas provenientes de pacientes normotensas y de pacientes preeclámpticas.

3. Estudio comparativo de los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRAT), en fantasmas provenientes de pacientes normotensas y de pacientes preeclámpticas.

4. Efecto del tratamiento con luz UV sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} y la peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas.

5. Efecto del tratamiento con luz UV, en presencia de agentes antioxidantes, sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} y la peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas.

6. Estudio del grado de correlación entre la actividad ATPásica de Ca^{2+} y los niveles de peroxidación lipídica de fantasmas de glóbulos rojos de pacientes normotensas, sometidos a distintos tiempos de irradiación con luz UV.

1. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ATPásicas DE Mg^{2+} Y DE Ca^{2+}, EN FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS DE SANGRE HUMANA.

La ATPasa de Ca^{2+} responsable del transporte del ión, al igual que otras ATPasas asociadas al transporte de otros iones, requieren de la presencia de magnesio para poder expresar su actividad. Como sea que las preparaciones de membranas biológicas siempre presentan una cierta actividad ATPásica basal estimulada por magnesio, la actividad específica de la ATPasa de Ca^{2+} asociada al transporte del ión, sólo puede determinarse como la diferencia en hidrólisis de ATP que se produce cuando las membranas son ensayadas en presencia de magnesio más calcio, menos aquella que se produce en presencia tan sólo de magnesio. Esto queda ilustrado por los resultados que se muestran en la Tabla I. Nótese que los fantasmas de glóbulos rojos de sangre humana muestran una actividad ATPásica de 3,86 nmoles Pi/mg prot. min cuando son ensayadas en un medio adecuado, en presencia de magnesio y, como este valor pasa a 21,76 nmoles Pi/mg prot. min cuando el ensayo se realiza en el mismo medio, al cual se ha añadido una cierta cantidad del ión calcio. La diferencia entre las dos cantidades, es decir, 17,90 nmoles Pi/mg prot. min, constituye la actividad específica de la ATPasa de Ca^{2+} de estas membranas.

TABLA I

ACTIVIDADES ATPásicas DE MAGNESIO Y DE CALCIO EN FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS DE SANGRE HUMANA

Medio de Incubación	Actividad ATPásica: nmoles de P*i* / mg de prot.min	
Magnesio	3,86	Mg-ATPasa = 3,86
Magnesio + Calcio	21,76	Ca-ATPasa = 17,90

Valores promedio de una muestra, determinada en triplicado.

2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ACTIVIDADES ATPásicas DE Mg^{2+} Y DE Ca^{2+}, EN FANTASMAS PROVENIENTES DE PACIENTES NORMOTENSAS Y DE PACIENTES PREECLÁMPTICAS.

La Tabla II muestra claramente lo ya comentado en la Introducción: mientras no se encontró diferencia significativa alguna entre la actividad de la ATPasa de Mg^{2+} entre las pacientes normotensas y las preeclámpticas (normotensas, 3,58 ± 0,19 nmoles de Pi/mg prot.min, vs 3,69 ± 0,17, en las preeclámpticas), la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} mostró una fuerte reducción de cerca del 50% en las pacientes preeclámpticas (normotensas 19,54 ± 0,98 nmoles de Pi/mg prot.min, vs 9,83 ± 0,56, en las preeclámpticas).

3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (SRAT), EN FANTASMAS PROVENIENTES DE PACIENTES NORMOTENSAS Y DE PACIENTES PREECLÁMPTICAS

Los resultados que se presentan en la Tabla III, muestran claramente un contenido estadísticamente mayor de las SRAT en fantasmas de glóbulos rojos provenientes

TABLA II

ACTIVIDADES ATPásicas DE MAGNESIO Y DE CALCIO, EN FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS DE SANGRE DE PACIENTES EMBARAZADAS NORMOTENSAS Y PREECLÁMPTICAS

Paciente	Actividad ATPásica: nmoles de P*i* / mg de prot.min	
	Magnesio	Calcio
Normotensas	3,58± 0,19	19,54 ± 0,98 *
Preeclámpticas	3,69± 0,17	9,83 ± 0,56 *

Valores expresados como la media ± el error estándar de 6 determinaciones, realizadas con muestras diferentes. Para ambos grupos, n=6.
*$p<0.001$

TABLA III

NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA, DETERMINADA POR PRESENCIA DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (SRAT), EN FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS DE SANGRE DE PACIENTES NORMOTENSAS Y PREECLÁMPTICAS

Pacientes	SRAT(nmoles de MDA/mg de prot.)
Normotensas	0,44 ± 0,03 *
Preeclámpticas	0,84 ± 0,04*

Valores expresados como la media ± el error estándar de 6 determinaciones realizadas con muestras diferentes. Para ambos grupos, n=6.
*p<0.001
MDA=malondialdehído.

de pacientes preeclámpticas, cuando se comparan con los niveles presentes en pacientes normotensas (0,84 ± 0,04 nmoles MDA/mg prot, preeclámpticas, vs 0,44 ± 0,03 nmoles MDA/mg prot, normotensas). Muy bien pudiera explicarse la disminución en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} que se produce en las pacientes preeclámpticas, como consecuencia del mayor grado de peroxidación lipídica de las membranas celulares de estas pacientes.

4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LUZ UV SOBRE LA ACTIVIDAD ATPásica DE Ca^{2+} Y LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS PROVENIENTES DE PACIENTES EMBARAZADAS NORMOTENSAS.

El tratamiento de membranas celulares con luz UV, es uno de los métodos utilizados *in vitro* para generar peroxidación lipídica de dichas membranas. La irradiación con luz ultravioleta (UV) de soluciones acuosas produce radicales libres (Gutteridge y Haliwell, 1990). Esto sucede de la siguiente manera: la energía de la luz UV ioniza las moléculas de agua y las excita. Esto produce la formación subsiguiente, mediante varios pasos, de un "electrón hidratado" y un "radical hidroxilo" ($^{\bullet}OH$), que son especies radicales primarias muy reactivas (Karel y col., 1975), las cuales atacan entonces componentes de las membranas celulares.

$$H_2O \xrightarrow{UV} H_2O^* + e^- \xrightarrow{H_2O} H^+ aq + {}^{\bullet}OH + e^- aq$$

Los radicales formados de esta manera, pueden atacar a distintas biomoléculas como carbohidratos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos orgánicos y lípidos de las membranas (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Para los fines de nuestro estudio, fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas fueron sometidos a tiempos crecientes de exposición a luz UV, determinándose posteriormente su actividad de ATPasa de Ca^{2+}, así como su grado de peroxidación lipídica. Los resultados de estos experimentos, se muestran en las Figuras 2 y 3. Nótese en la Figura 2 que, con el aumento del tiempo de exposición a la luz UV, se produce una disminución progresiva de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}, pasando ésta de valores de 20,18 ± 1,09 nmoles de Pi/mg prot.min, a valores de 6,60 ± 0,24 nmoles de Pi/mg prot. min, después de 120 minutos de irradiación.

Paralelamente, como se muestra en la Figura 3, los niveles de peroxidación lipídica (SRAT), experimentan un aumento progresivo con el aumento del tiempo de irradiación, pasando de valores de 0,47 ± 0,02 nmoles de MDA/mg de proteína, a valores de 1,68 ± 0,05 nmoles de MDA/mg de proteína, después de 120 minutos de irradiación. En las mismas Figuras 2 y 3, puede apreciarse también que tanto la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}, como el grado de peroxidación lipídica de las membranas controles, es decir, no irradiadas con luz UV, se mantuvieron constantes a lo largo de todo el tiempo experimental.

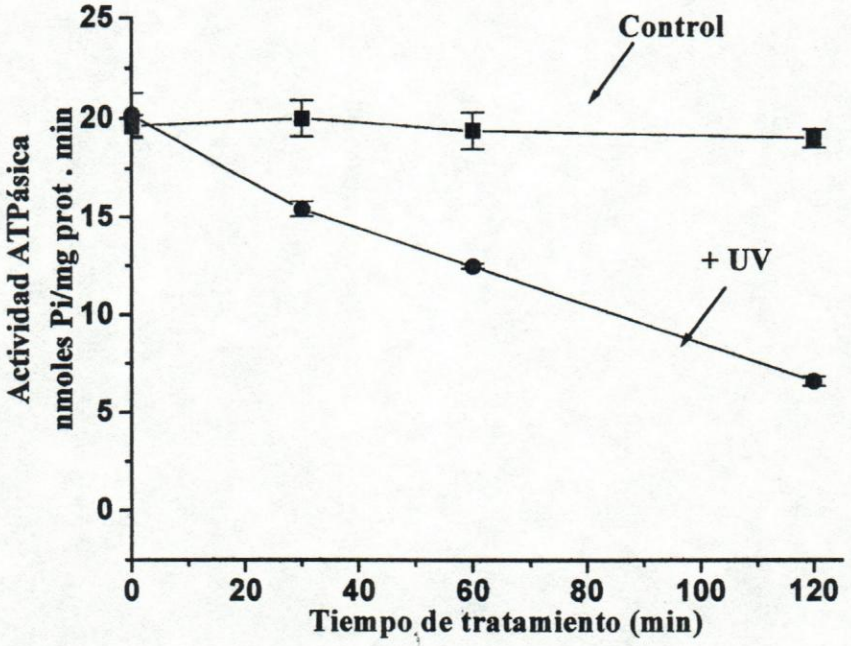

Figura 2

Efecto del tratamiento con luz UV sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas. Los valores, expresados como nmoles de Pi/mg prot.minuto, representan la media ± el error estándar de cuatro determinaciones, con preparaciones de pacientes diferentes.

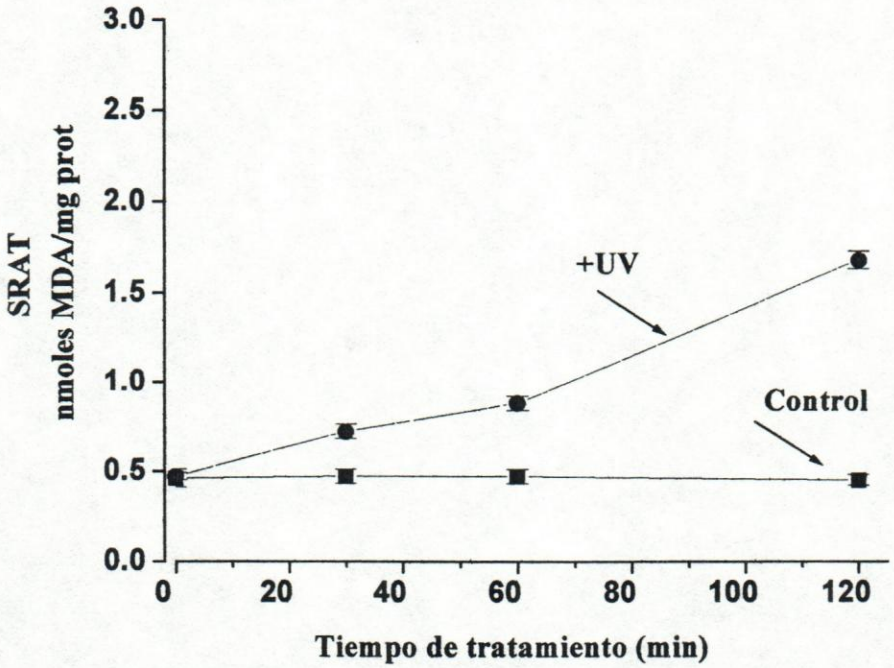

Figura 3

Efecto del tratamiento con luz UV sobre los niveles de SRAT de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas. Los valores, expresados como nmoles de MDA/mg proteína, representan la media ± el error estándar de cuatro determinaciones, con preparaciones de pacientes diferentes

5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LUZ UV, EN PRESENCIA DE AGENTES ANTIOXIDANTES, SOBRE LA ACTIVIDAD ATPásica DE Ca^{2+} Y LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS PROVENIENTES DE PACIENTES EMBARAZADAS NORMOTENSAS.

La presencia de agentes antioxidantes durante el tiempo de irradiación con luz UV, debiera traducirse en un efecto protector de las membranas contra el ataque de los radicales libres, evitándose así los efectos de los mismos. Para este estudio, se procedió a irradiar fantasmas de pacientes normotensas con luz UV, a semejanza del experimento anterior, pero esta vez por 30 minutos, en presencia o ausencia de una concentración 50 µmolar de un conocido agente antioxidante, como lo es el hidroxitolueno butilado (BHT). Terminado el proceso de irradiación, los fantasmas eran ensayados para ATPasa de Ca^{2+} y, niveles de peroxidación lipídica. Los resultados de estos experimentos, se muestran en las Figuras 4 y 5.

Como se puede ver en la Figura 4, los 30 minutos de irradiación con luz UV se tradujeron, como ya se ha mostrado anteriormente, en una disminución de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de fantasmas de glóbulos rojos de pacientes embarazadas normotensas, de alrededor de un 32%, en aquellas muestras que fueron irradiadas en ausencia de BHT. Por otro lado, si bien la presencia de BHT durante el tratamiento no mostró efecto alguno sobre la actividad ATPásica de las muestras controles, si previno, prácticamente en un 100%, la disminución que se presentó en las muestras irradiadas en ausencia del agente antioxidante. El mismo efecto protector del agente antioxidante se produjo, en lo que

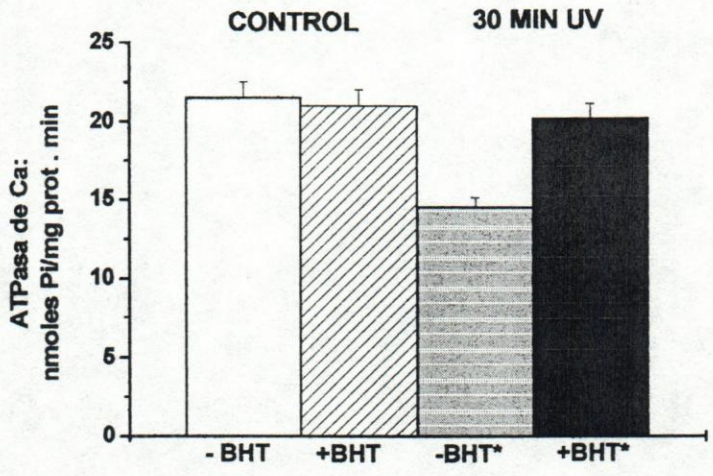

Figura 4

Efecto del tratamiento por 30 min con luz UV, en presencia o ausencia de BHT, sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas. Los valores, expresados como nmoles de Pi/mg prot.minuto, representan la media ± el error estándar de cuatro determinaciones, con preparaciones de pacientes diferentes.

*$p < 0,01$

respecta al grado de peroxidación lípidica de las membranas: como se puede apreciar en la Figura 5, la presencia de BHT en el medio durante la irradiación con luz UV de las muestras, se tradujo en un efecto de total protección, ya que estas membranas mostraron un grado de peroxidación lipídica similar al de las membranas controles, a diferencia de aquellas irradiadas en ausencia del agente antioxidante, las cuales mostraron un grado de peroxidación lipídica mayor, según lo ya mostrado anteriormente.

Nuestro próximo paso fue el estudiar si dosis adecuadas de algún agente antioxidante de uso popular, como por ejemplo el ácido ascórbico (vitamina C), son capaces de ejercer un efecto protector contra la peroxidación lipídica semejante o cercano al producido por el hidroxitolueno butilado. Si suponemos que 500 mg de vitamina C (una pastilla comercial) se disuelve en 2,5 lts de plasma sanguíneo de una persona, la concentración de la misma será de 200 mg/ lt de plasma En base a ello, resuspendimos membranas de glóbulos rojos de pacientes embarazadas normotensas en un medio conteniendo 200 mg de ácido ascórbico/lt, y procedimos a irradiarlas por 30 min con luz UV, del mismo modo que en los experimentos relatados anteriormente, para después determinar la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}, así como el grado de peroxidación lipídica de las membranas. Los resultados de estos experimentos, se muestran en las Figuras 6 y 7. Se obtuvieron idénticos resultados que con el hidroxitolueno butilado: la presencia del ácido ascórbico en el medio durante la irradiación de las membranas con luz UV, se tradujo en un efecto fuertemente protector. La disminución de la actividad ATPásica de Ca^{2+} y el aumento del grado de peroxidación lipídica de las membranas irradiadas con la luz UV no se producen, cuando la irradiación es realizada en presencia del ácido ascórbico.

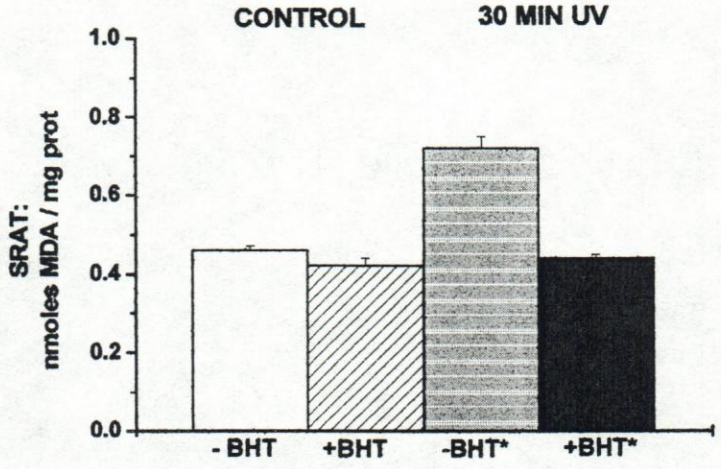

Figura 5

Efecto del tratamiento por 30 min con luz UV en presencia o ausencia de BHT, sobre el grado de peroxidación lipídica de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas. Los valores, expresados como nmoles de MDA/mg prot., representan la media ± el error estándar de cuatro determinaciones, con preparaciones de pacientes diferentes.
*$p < 0,001$

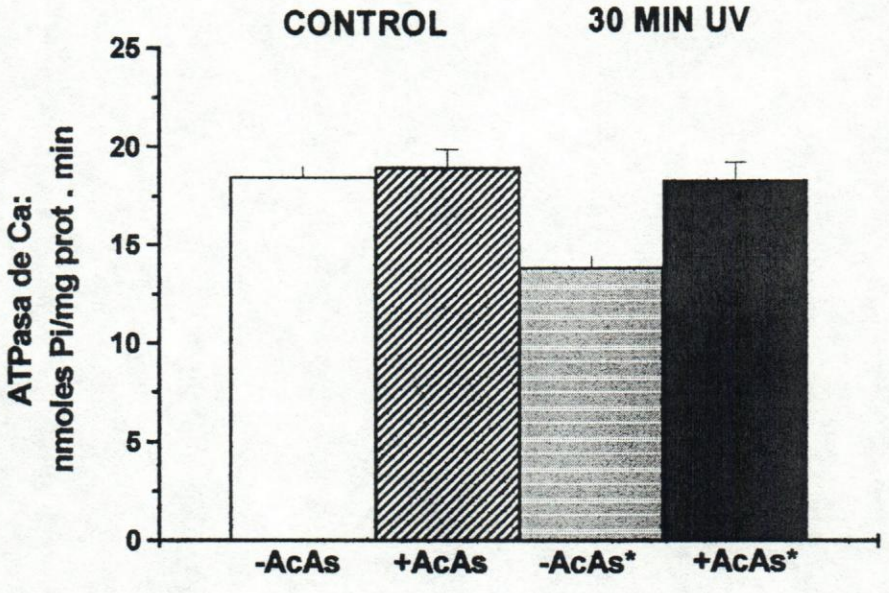

Figura 6

Efecto del tratamiento por 30 min con luz UV en presencia o ausencia de 200 mg/lt ácido ascórbico, sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas. Los valores, expresados como nmoles de Pi/mg prot.minuto, representan la media ± el error estándar de cuatro determinaciones, con preparaciones de pacientes diferentes.
*$p < 0,01$

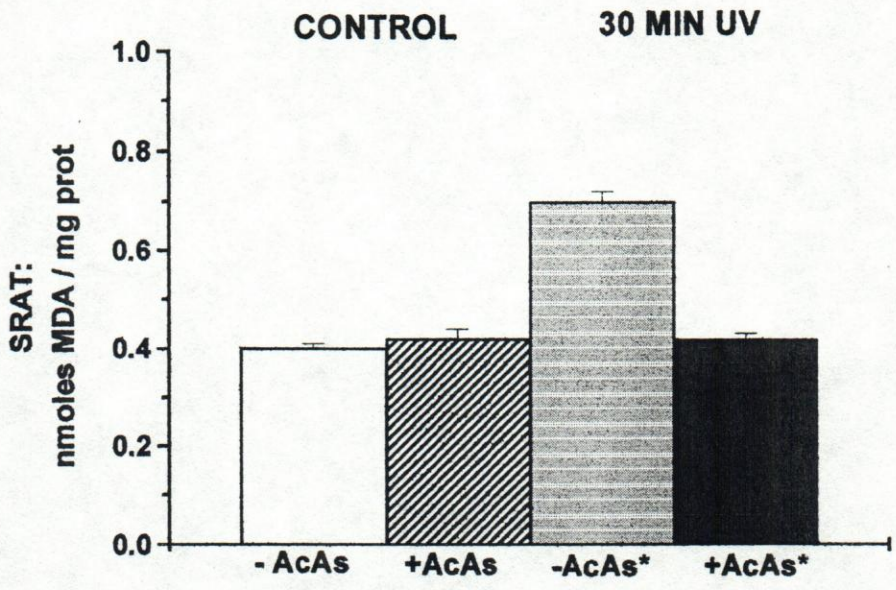

Figura 7

Efecto del tratamiento por 30 min con luz UV en presencia o ausencia de 200 mg/lt ácido ascórbico, sobre el grado de peroxidación lipídica de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas. Los valores, expresados como nmoles de MDA/mg prot., representan la media ± el error estándar de cuatro determinaciones, con preparaciones de pacientes diferentes.
*$p < 0,001$

6. ESTUDIO DEL GRADO DE CORRELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ATPásica DE Ca^{2+} Y LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DE FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS DE PACIENTES NORMOTENSAS, SOMETIDOS A DISTINTOS TIEMPOS DE IRRADIACIÓN CON LUZ UV.

Los resultados hasta aquí presentados, indican la existencia de una clara relación inversa entre el grado de peroxidación lipídica de las membranas de los glóbulos rojos y la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de las mismas, en el sentido de que para un mayor grado de peroxidación lipídica de las membranas, una menor actividad ATPásica de Ca^{2+} de las mismas. De ser esto cierto, se pudiera esperar un alto grado de correlación entre estos dos parámetros. Con el fin de realizar este estudio, se utilizaron todos los datos de las figuras 2, 3, 4, 5, 6 y 7, graficándose la actividad ATPásica de Ca^{2+} en cada caso, contra el grado de peroxidación lipídica de las membranas. Los resultados de esta gráfica, se muestran en la Figura 8. Se nota una clara relación proporcionalmente inversa entre ambos parámetros, encontrándose un coeficiente de correlación altamente significativo de –0.87 ($p< 0,001$).

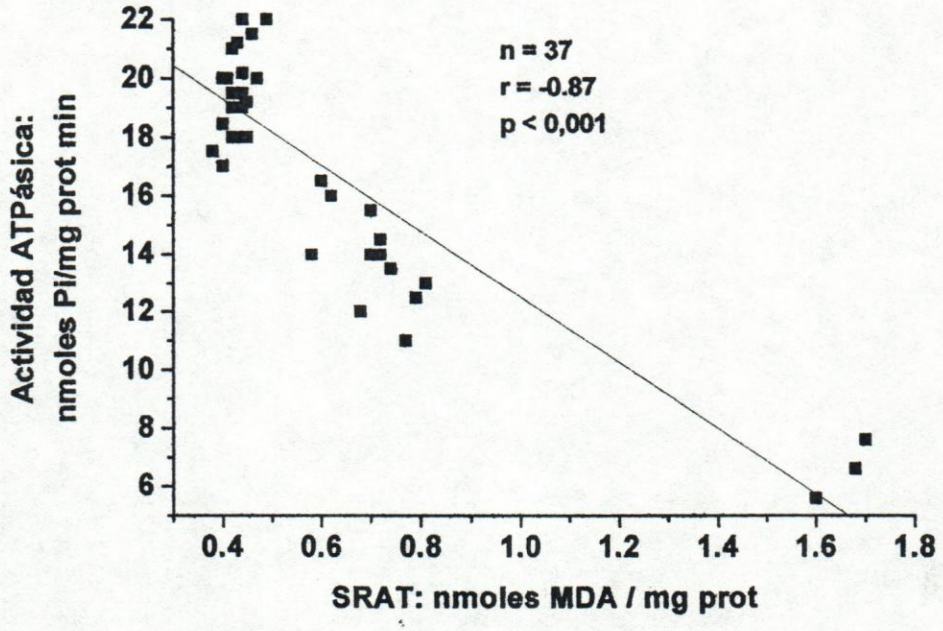

Figura 8

Actividad ATPásica de Calcio de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes embarazadas normotensas., en función de los niveles de SRAT de los mismos. Datos tomados de las figuras 2, 3 , 4, 5, 6 y 7.

DISCUSIÓN

Durante la preeclampsia se producen una serie de alteraciones en diferentes procesos corporales, las cuales llevan hacia la aparición de un cuadro patológico característico de la enfermedad. De particular importancia, está el hecho de la existencia de una alteración en el manejo del ión calcio, tanto desde un punto de vista sistémico: hipocalciuria (Taufield, 1987), niveles elevados de hormona paratiroidea (Seely y col.,1992), disminución de la 1,25 dihidroxi vitamina D (August y col., 1992); como en el ámbito molecular: aumento en la concentración intracelular del ión calcio en eritrocitos (Sowers y col., 1989), y en plaquetas (Haller y col., 1989). El aumento en la concentración del calcio intracelular, podría deberse a una disminución en la capacidad de la célula para el manejo fino a largo plazo de éstas concentraciones, las cuales están bajo el control de la ATPasa de calcio de la membrana plasmática, cuya alta afinidad por el calcio la capacita para interactuar con él hasta en muy bajas concentraciones, como las existentes en las células en reposo. En el laboratorio se han realizado trabajos, los cuales demuestran que la actividad de la ATPasa de calcio de pacientes preeclámpticas está disminuida en membranas plasmáticas de glóbulos rojos (Tabla II; Nardulli y col., 1994), de placenta (Casart, 1995) y, de músculo uterino (Carrera, 1995).

Una disminución en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de, las membranas plasmáticas, pudiera llevar a un aumento en la concentración del calcio intracelular, lo cual pudiera ser el gatillo para el disparo de algunos de los síntomas de la enfermedad. Así por ejemplo, la hipertensión arterial que se manifiesta durante la preeclampsia, pudiera explicarse como consecuencia de un aumento en la concentración intracelular de calcio

en el músculo vascular liso, ya que esta situación conduciría a un menor potencial umbral y, en consecuencia, a un aumento del tono vascular y por ende, de la resistencia vascular periférica. Más aún, cualquier incremento adicional sobre los valores normales de concentración intracelular de calcio, que en el caso de la paciente preeclámptica estaría ya elevada, traería enormes consecuencias en el proceso de relajación-contracción del músculo, pudiendo éste ser el origen de las convulsiones que se manifiestan en la eclampsia. Por último, la trombocitopenia y el cuadro de coagulación intravascular diseminada, que puedan aparecer y complicar el estado de algunas pacientes preeclámpticas, pudieran ser explicadas como consecuencias de un incremento en la concentración del calcio intracelular en las plaquetas, lo cual llevaría a un aumento de la agregabilidad plaquetaria, a la formación de microtrombos y, al consumo de plaquetas y de fibrinógeno (de Boer, 1989).

Experimentos preliminares realizados en el laboratorio, demuestran que la magnitud del fosforilado intermediario de la ATPasa de Ca^{2+} de fantasmas de glóbulos rojos, no es alterada por la preeclampsia. Este resultado evidencia que con la preeclampsia no hay cambios en el número de ATPasas o Bombas de calcio en el eritrocito, sino que lo que se está produciendo es una modificación en la velocidad de reciclaje de la enzima. Tampoco se producen con la preeclampsia variaciones en el comportamiento de la enzima frente a parámetros cinéticos como el K_m para ligandos, o valores de temperatura y de pH óptimos de funcionamiento. La disminución en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} que se produce en las membranas de glóbulos rojos de pacientes preeclámpticas, tiene que ser luego la consecuencia de cambios estructurales que sufre la enzima, lo cual bien puede ser producido por el mayor grado de peroxidación lipídica que se encuentra en las membranas

de estas pacientes (Tabla 3). En este particular, como se comentaba en la Introducción, esta condición es capaz de afectar la organización ultraestructural de las membranas celulares, disminuyendo su fluidez y con ello, modificando la actividad de numerosas enzimas asociadas a las mismas, siendo la ATPasa de Ca^{2+}, particularmente sensible a cambios de fluidez de la membrana a la cual está asociada (Ohta y col., 1989).

Como ya también fue comentado en la Introducción, el plasma sanguíneo de pacientes preeclámpticas posee mayor cantidad de productos de peroxidación lipídica que pacientes embarazadas normotensa (Walsh y Wang , 1993), lo cual pareciera ser debido a una mayor producción de peróxidos lipídicos por el tejido placentario de la paciente preeclámptica como consecuencia de las condiciones hipóxicas a que es sometido (Walsh y Wang, 1995); así como de la insuficiencia de los mecanismos antioxidantes de sus células para amortiguar los efectos lesivos de los productos de la peroxidación lipídica (Dadak y col., 1982). A través del plasma sanguíneo, los productos de peroxidación lipídica pudieran alcanzar todo el organismo, explicándose así el alcance general de la enfermedad.

Nuestros experimentos con fantasmas de glóbulos rojos de pacientes normotensas, irradiados con luz UV, demuestran claramente una importante relación inversa entre el grado de peroxidación lipídica de la membrana plasmática del glóbulo rojo y la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} (Figuras 2, 3 y 8). Por otro lado, también demostramos que si la irradiación se realiza en presencia de un agente antioxidante, se produce una protección prácticamente completa, en el sentido de que no se produce aumento alguno en el grado de peroxidación lipídica de las membranas, ni disminución alguna en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de las mismas (Figuras 4 y 5). De gran importancia en este particular, es

el hecho de que este poder protector puede ser logrado con cantidades relativamente bajas de un antioxidante de uso común, como los es la vitamina C (Figuras 6 y 7).

Los resultados presentados en este trabajo, indicando que el mayor grado de peroxidación lipídica de las membranas celulares de pacientes preeclámpticas parece ser el responsable de la disminución de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de estas membranas y, que, por lo menos a través de estudios *in vitro,* la peroxidación excesiva de la membrana celular puede ser prevenida por la presencia de cantidades no dañinas de agentes antioxidantes como la Vitamina C, nos llevan a proponer se estudie la posibilidad de suministrar regularmente una cierta cantidad de vitamina C, u otro agente antioxidante, a toda paciente embarazada, desde el comienzo de la gestación, en la esperanza de que se pueda de esta manera, no sólo incidir sobre el número de pacientas que desarrollen preeclampsia, sino también incidir sobre el grado de severidad de la misma, cuando aún así apareciera.

BIBLIOGRAFÍA

August, P.; Marcacci, B.; Gertner, J.; Druzin, M.; Resnick, L.; Laragh, J. Abnormal 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in preeclampsia. Am. J. Obstet. Gynecol. 1992; 166: 1295-1299.

Cueto, S.M.; Rommey, A.D.; Wang, Y.; Walsh, S.W. Beta-carotene attenuates peroxide-induced vasoconstriction in the human placenta. J. Soc. Gynecol Invest. 1997; 4: 64-71.

Chirico, S.; Smith, C.; Merchant, C.; Mitchinson, M.J.; Halliwell, B. Lipid peroxidation in hyperlipidemic patients : a study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. Free Radic. Res. Commun. 1993; 19: 51-57.

Dadak, C.; Kefalides, A.; Sinzinger, H.; Weber, G. Reduced umbilical artery prostacyclin formation in complicated pregnancies. Am. J. Obstet. Gynecol. 1982; 144: 792-795.

De Boer, C.; ten Cate, J.W.; Sturk, A.; Born, J.J.J.; Treffers, P.E. Enhanced thrombin generation in normal and hypertensive pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 1989; 160: 95-100.

Dodge, J.T.; Mitchell, C.; Hanahan, D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. Archiv. Biochem. Biophys. 1963; 100: 119-131.

Hojo, M.; Suthanthiran, M.; Helseth, G.; August P. Lymphocyte intracellular free calcium concentration is increased in preeclampsia. Am. J. Obstet. Gynecol. 1999; 180: 1209-1214.

Jain, S.K.; Wise, R. Relationship between elevated lipid peroxides, vitamin E deficiency and hypertension in preeclampsia. Mol. Cell. Biochem. 1995; 151:33-38.

McKay, D.G.; Goldenberg, V.; Kaunitz, H.; Csavossy, H. Experimental eclampsia. An electron microscope study and review. Arch. of Pathol. 1967; 84: 557-597.

Ohta, A.; Mohri, T.; Ohyashiki, T. Effect of lipid peroxidation on membrane-bound Ca^{2+}-ATPase activity of the intestinal brush-border membranes. Biochim. Biophys. Acta. 1989; 984:151-157.

Pitkin, R. Calcium metabolism in pregnancy and the perinatal period: a review. Am. J. Obstet. Gynecol. 1985; 151: 99-109.

Pritchard, J.A.; MacDonald, P.C.; Gant, N.E. Williams Obstetricia. Tercera edición. Barcelona: Salvat Editores, 1990.

Proverbio, F.; Proverbio, T.; Marín, R. Na^+-ATPase is a different entity from the Na^+-K^+-ATPase in the rat kidney basolateral plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta. 1986; 858: 202-205.

Ramin, K.D.; Ramin, S.M. Prevention and treatment of eclamptic seizures. Postgrad. Obstet. Gynecol. 1997; 17: 1-6.

Redman, C. Platelets and the beginning of preeclampsia. N. Engl. J. Med. 1990; 323: 478-480.

Redman, C. Pre-eclampsia and the placenta. Placenta. 1991; 12: 301-308.

Roberts, J.M. Pregnancy related hypertension. In: Creasy RK, Resnik R, eds. Maternal-fetal medicine: Principles and practice. Philadelphia: WB Saunders, 1984.

Roberts, J.M.; Redman, C.W.G. Preeclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. The Lancet. 1993; 341: 1447-1451.

Roberts, J.; Taylor, R.; Goldfien, A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. Am. J. Hypertens. 1991; 4: 700-708.

Rote, N.S. The immune response. In: Scott, J.R.; Rote, N.S.; Immunology of Obstretics and Gynecology, Norwalk, CT: Apleton-Century-Crofts. p. 27.

Seely, E.; Wood, R.; Brown, E.; Graves, S. Lower serum ionized calcium and abnormal calciotropic hormone levels in preeclampsia. J. Clin. Endocrin. Metabolism. 1992; 74: 1436-1440.

Socol, M.L.; Weiner, C.P.; Louis, G.; Rehnberg, K.; Rossi, E.C. Platelet activation in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1985; 151: 494-497.

Sowers, J.; Zemel, M.; Brousteen, R.; Zemel, P.; Walsh, M.; Standley, P.; Sokol, R. Erythrocyte cation metabolism in preeclampsia. Am. J. Obstet. Gynecol. 1989; 161: 441-445.

Scott, J.S. Pregnancy toxaemia associated with hydrops foetalis, hydatidiform mole and hydramnios. J.Obstret. Gynaecol. Br. Emp. 1958; 65:689-701.

Stirrat, G.M. The inmunology of hypertension in pregnancy. In Sharp F. Symonds EM, eds. Hypertension in pregnancy. Ithaca, NY: Perinatology Press, 1987. p. 249.

Taufield, P.A.; Ales, K.L.; Resnick, L.A.; Druzin, M.; Gertner, J.; Laragh, J. Hipocalciuria in preeclampsia. N. Engl. J. Med. 1987; 316: 715-718.

Vasiljevic, N.; Vasiljevic, M.; Plecas, D. The role of nutritional factors in preeclampsia and eclampsia. Srp. Arch. Celok. Lek. 1996; 124 (5-6): 156-159.

Walsh, S.C. Lipid peroxidation in pregnancy. Hypertens. Preg. 1994; 13: 1-25.

Walsh, S.C.; Wang, Y. Deficient glutathione peroxidase activity in preeclampsia is associated with increased placental production of thromboxane and lipid peroxides. Am. J. Obstet. Gynecol. 1993; 169: 1456-1461.

Walsh, S.C.; Wang, Y. Trophoblast and placental villous core production of lipid peroxides, thromboxane, and prostacyclin in preeclampsia. J. Clin. Endocrin. Metab. 1995; 80: 1888-1893.

Wang, Y.; Walsh, S.W.; Guo, J.; Zhang, J. The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. Am J Obstet Gynecol 1991; 165: 1701-1704.

Warso, M.A.; Lands, W.E.M. Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and patho-physiology. Br. Med. Bull. 1983; 39: 277-280.

Weibezahn, H.; Serfati, M.; García, M.; Llovera, A.; Machado, A.; Fleitas, F. Hipertensión inducida por el embarazo en la Unidad de Sala de Partos: 1991-1993. 1997; 57: 237-242.

Zeeman, G.G.; Dekker, G.A. Pathogenesis of preeclampsia: A hypothesis. Clin. Obstet. Gynecol. 1992; 35: 317-337.