AAS 2633
Tesis
ED 2011
N8.

Universidad Católica Andrés Bello
Facultad de Humanidades y Educación
Escuela de Educación
Mención: Biología y Química

Niveles de peroxidación lipídica de homogenizados de explantos de placenta humana a término cultivados bajo condiciones de hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al Título de Licenciado en Educación Mención Biología y Química, en la Universidad Católica Andrés Bello

Autor: Elías Alberto Núñez Avellaneda

Tutor: Dra. Cilia Abad

Co-Tutor: Dr. Reinaldo Marín

Caracas, Septiembre 2011

UCAB Universidad Católica ANDRÉS BELLO
CENTRO CULTURAL PADRE CARLOS G. PLAZA S.J.
BIBLIOTECA CENTRAL - SALA P. PLAZA S.J.
PLANTA BAJA - SALA - TESIS

CARTA DE APROBACIÓN

Por medio de la presente hago constar que acepto ser el tutor del Trabajo Especial de Grado, presentado por el bachiller: Elías Alberto Núñez Avellaneda, para optar al Grado de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química, cuyo título es: **"Niveles de peroxidación lipídica de homogenizados de explantos de placenta humana a término cultivados bajo condiciones de hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio".**

En la ciudad de Caracas a los veintitrés días del mes de septiembre del año dos mil once.

Tutora: Dra. Cilia Abad

C.I.: 6.750.168

Co-Tutor: Dr. Reinaldo Marín

C.I.: 4.245.480

A Dios, por darme las fuerzas, la paciencia y sabiduría

A mis padres, con todo el amor del mundo y agradecimiento

A todos mis profesores, amigos y compañeros por creer en mi

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por ser mi guía, mentor, y ayuda.
- A mi madre, por ser única en el mundo, que con su esfuerzo, trabajo y corazón pudimos lograr un sueño, gracias mama.
- A mi hermana Rosmery, por ser esa pequeña niña que yo cuide y por prestarme tu ayuda y apoyo siempre.
- A toda mi familia por su gran apoyo y consideración durante toda la elaboración de este proyecto, y en especial a mis madrinas Evelyn León y Olga Avellaneda por su dedicación y buenos consejos. Las quiero.
- A la Dra. Cilia Abad, tutora, por todos los conocimientos entregados y el apoyo durante toda la tesis.
- Al Dr. Reinaldo Marín, por ser guía y apoyo en cualquier circunstancia. Gracias por compartir sus conocimientos, útiles consejos y tiempo.
- Al Dr. Fulgencio Proverbio, un pedazo del cielo que Dios nos dio. Maestro, amigo, compañero, de verdad gracias. Por todo el apoyo, consejos, chistes y cuentos que hicieron más enriquecedora mi experiencia en el laboratorio.
- A mi querida profesora Maricarmen, por enseñarme a ver las cosas desde otra perspectiva, por su incondicional apoyo, ayuda, confianza y amistad.
- A Rafael Muñiz, por sus enseñanzas, consejos y anécdotas históricas. Gracias a usted, despertó en mí el querer vivir la experiencia científica.
- A Heliantaly Freitas, por ser mí amiga, compañera y columna en la elaboración de mi tesis, en la universidad y en la vida.
- A Desirée Botana, por su paciencia, dedicación y ayuda, supo encarrilar y guiar mi vida en el laboratorio. Gracias.
- A Sandy, Indira, Carlitos, por su amistad, ayuda, consejos y enseñanzas y las anécdotas experimentadas.
- A mis amigos, Giannina Rodríguez y Luis Muñoz, por prestarme la mano siempre bajo cualquier circunstancia de la vida, de verdad mil gracias por todo.

- A mis demás compañeros de la Universidad, Orquídea, María T, Duiney, Jheyson, José, por su amistad, apoyo y todos los buenos momentos juntos. Siempre estarán presentes en mi corazón.
- A la Universidad Católica Andrés Bello (U.C.A.B.), por darme la oportunidad de estudiar, aprender y crecer en una ilustre y reconocida academia formadora de excelentes profesionales.
- Al Comité de Bioética del IVIC.
- Al Comité de Ética de la Maternidad Concepción Palacios.
- Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).
- Al Centro de Estudios Avanzados (C.E.A.) del IVIC.
- A la Biblioteca "Marcel Roche" del IVIC.
- A todas aquellas personas que, de forma indirecta, fueron parte del grupo que hizo posible la realización de mi proyecto.

ÍNDICE GENERAL

Página

DEDICATORIA..... iii
AGRADECIMIENTO..... iv
LISTA DE TABLAS..... viii
LISTA DE FIGURAS..... ix
LISTA DE ANEXOS..... x
RESUMEN..... ix
INTRODUCCIÓN..... 1
CAPÍTULO I 3
Planteamiento del problema..... 3
Objetivo General..... 5
Objetivos Específicos..... 5
Justificación de la investigación..... 6
CAPÍTULO II..... 8
Marco Teórico..... 8
CAPÍTULO III..... 17
Materiales y Métodos..... 17
1 Placentas Humanas..... 17
2 Preparación de Explantos y cultivos de los mismos..... 17
3 Homogenizados de Explantos de Placenta Humana..... 18
4 Determinación de Proteínas..... 18
5 Determinación de niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)..... 19
6 Análisis Estadístico..... 20
CAPÍTULO IV..... 21
Resultados..... 21

1 Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados, o preincubados bajo condiciones de normoxia 22

2 Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia o de hipoxia 24

3 Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia o de hipoxia, en presencia de 4 mM $MgSO_4$..... 26

4 Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$..... 28

5 Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia de distintas concentraciones de $MgGl_2$..... 30

6 Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia, o de normoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$..... 32

CAPÍTULO V..... 34

Discusión..... 34

Conclusiones..... 40

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 41

ANEXO 1..... 49

LISTA DE TABLAS

TABLA Página

1 Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados, o preincubados bajo condiciones de normoxia..... 23

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Página

1. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia.o de hipoxia..... 25
2. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 4 mM $MgSO_4$..... 27
3. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$..... 29
4. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia de distintas concentraciones de $MgGl_2$..... 31
5. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia, o de normoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$.... 33

LISTA DE ANEXOS

ANEXO Página

1 Bioquímica y Mecanismos de Acción de los Radicales Libres..... 49

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO

Trabajo especial de grado para optar al Título de Licenciado en Educación

Mención Biología y Química

Niveles de peroxidación lipídica de homogenizados de explantos de placenta humana a término cultivados bajo condiciones de hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio

Autor: Elías Núñez

Tutora: Dra. Cilia Abad

Cotutor: Dr. Reinaldo Marín

Fecha: Septiembre 2011

RESUMEN

Uno de los síndromes que se presentan durante el embarazo y ocasiona más de 75.000 muertes maternas al año, con una incidencia de 5 a 10% a nivel mundial, es la preeclampsia. Éste es un síndrome clínico multisistémico, exclusivo del embarazo en el ser humano. Su diagnóstico, se fundamenta en la presencia concomitante de hipertensión arterial, edema y proteinuria, y su etiología, parece derivarse de la combinación de factores genéticos, inmunológicos y ambientales, que convergen hacia fallas en la invasión trofoblástica normal y en la remodelación de las arterias uterinas. El proceso se traduce en una reducción del flujo placentario y, consecuentemente, en una producción de factores circulantes que alteran la función endotelial. Se genera así un aumento en el grado de peroxidación lipídica de membranas plasmáticas del tejido placentario. Este proceso, posteriormente, puede alcanzar todo el organismo a través de la sangre.

En este trabajo, explantos placentarios de gestantes a término fueron incubados bajo condiciones de normoxia o hipoxia, para determinar luego el grado de peroxidación lipídica de sus homogenizados. El estudio se realizó tanto en presencia como ausencia de gluconato de magnesio en el medio donde se incubaron los explantos bajo condiciones de hipoxia, para poder determinar si este agente es capaz, al igual que el sulfato de magnesio, de proteger al tejido placentario contra los daños producidos por el período de hipoxia.

Se encontró que el aumento en los niveles de peroxidación lipídica de las membranas placentarias, producidos durante el período de hipoxia, no se produce cuando se colocan 4 mM de gluconato de magnesio en el medio donde se incubaron los explantos bajo condiciones de hipoxia.

En conclusión, se puede afirmar que el gluconato de magnesio trabaja como agente antioxidante contra la peroxidación lipídica de membranas celulares, protegiéndolas contra períodos de hipoxia.

Descriptores: Preeclampsia, placenta humana, explanto, hipoxia, peroxidación lipídica, gluconato de magnesio.

INTRODUCCIÓN

Uno de los síndromes que se presenta durante el embarazo y ocasiona más de 75.000 muertes maternas al año, con una incidencia de 5 a 10% a nivel mundial, es la preeclampsia. Éste es un síndrome clínico multisistémico, exclusivo del embarazo en el ser humano (Zeeman & Dekker, 1992). El diagnóstico de este síndrome se fundamenta en la presencia concomitante de hipertensión arterial, edema y proteinuria, en gestantes sin historia previa de hipertensión arterial.

La etiología de este síndrome aún se desconoce. Se cree que sus causas pueden ser múltiples, y que en ellas influyen factores genéticos, inmunológicos y ambientales, los cuales convergen hacia fallas en la invasión trofoblástica normal y en la remodelación de las arterias uterinas (Kharfi *et al.*, 2003). La fisiopatología de la preeclampsia es bien entendida, afirmándose que la disfunción endotelial juega un rol principal en muchos de los síntomas clínicos, ya que se derivan de cambios dentro del endotelio vascular materno o involucran disfunción endotelial generalizada (Roberts, 1998; Davison *et al.*, 2004).

Para que se produzca el síndrome de preeclampsia es necesaria la presencia de la placenta, la cual es un órgano fundamental para el desarrollo y crecimiento fetal. Esta estructura está constituida por dos caras (la cara materna y la cara fetal), y posee tanto tejido materno como tejido embrionario, lo que le otorga la característica de poseer genotipos diferentes. Su función principal es la regulación del transporte de iones, nutrientes, inmunoglobulinas, intercambio de gases y transporte de solutos entre la madre y el feto (Silver *et al.*, 1990).

El tratamiento estándar para la preeclampsia severa consiste principalmente en reposo, administración de agentes antihipertensivos y drogas anticonvulsivantes para la prevención de la eclampsia (1 de cada 80 gestantes con preeeclampsia severa padecen convulsiones). Uno de los tratamientos usados durante más de 60 años para prevenir las convulsiones durante la preeclampsia severa, es el sulfato de magnesio (Scardo *et al.*, 1995).

Se considera que la hipoperfusión placentaria es uno de los factores que desencadenan la preeclampsia. Esta condición provoca hipoxia placentaria y, con ello, se elevan los procesos de peroxidación lipídica en el mismo tejido. Por ello, el modelo de hipoxia de muestras de tejido placentario, constituye una buena vía para indagar sobre los procesos celulares y moleculares que se dan en la preeclampsia.

En el estudio que estamos proponiendo, se prepararán homogenizados a partir de cultivos de explantos placentarios, después de ser incubados bajo condiciones de normoxia (explantos incubados con 8% de oxígeno), o de hipoxia, (explantos incubados con 2% de oxígeno), en presencia o ausencia de gluconato de magnesio. Luego, se determinarán los niveles de peroxidación lipídica en las preparaciones, con el fin de constatar si se produce o no algún efecto protector del gluconato de magnesio, al incubar el tejido bajo condiciones de hipoxia.

CAPÍTULO I

Planteamiento del problema

En todos los seres vivos, en condiciones fisiológicas normales, ocurren constantemente procesos de peroxidación lipídica, a niveles controlados. Estos procesos involucran la conversión oxidativa de ácidos grasos insaturados a productos primarios conocidos como hidroperóxidos, lo cual surge de un proceso de ataque por radicales libres (Hubel *et al.*, 1989). Durante el síndrome de preeclampsia, los procesos de peroxidación lipídica se presentan en mayores niveles, debido a que ocurre un desbalance entre los sistemas oxidantes y antioxidantes (Halliwell & Gutteridge, 1989), a favor de los oxidantes.

Uno de los tratamientos de elección para prevenir la eclampsia durante la preeclampsia severa, es el sulfato de magnesio, que aparte de proporcionar a la paciente un incremento del flujo sanguíneo cerebral, rápida disminución del índice de resistencia sistémica vascular, incremento del flujo sanguíneo uterino y renal y liberación de prostaciclinas por las células endoteliales (Sibai, 1990), también se ha descrito que tiene propiedades antioxidantes. Específicamente, a nivel de la peroxidación lipídica a nivel celular, esta sal se ha reportado que estabiliza la membrana celular peroxidada (Abad, 2005). Sin embargo, el sulfato de magnesio en dosis tóxicas, posee efectos perjudiciales para la mujer. Entre ellos, se pueden mencionar: pérdida de los reflejos patelares, náuseas, aumento de la temperatura corporal, somnolencia, visión doble, dificultad para hablar, debilidad (Abad, 2005). Cabe también destacar, que esta sal posee la limitación que no puede ser suministrada por vía oral, ya que produce una importante diarrea osmótica.

El magnesio es considerado como el responsable de los efectos benéficos del sulfato de magnesio sobre la madre preeclámptica y su neonato (Abad *et al.*, 2005). En función de lo mencionado anteriormente, se ha planteado la substitución del sulfato por otras sales de magnesio, de uso oral. El gluconato de magnesio es una de estas sales. Este agente tiene una capacidad antioxidante mayor que la mostrada por el sulfato de magnesio (Martin *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1998; Mak *et al.*, 2000). De hecho, se ha demostrado que posee una capacidad de remoción de radicales hidroxilos y alcoxilos por encima de la que presenta el sulfato de magnesio, según demostrado en procesos de isquemia-reperfusión cardiaca (Murthi *et al.*, 2003). En otros estudios, se ha demostrado que el gluconato de magnesio es capaz de inhibir la peroxidación lipídica en membranas microsomales tratadas *in vitro* con la reacción de Fenton (Mak *et al.*, 2000). En este estudio, se propone evaluar los niveles de peroxidación lipídica de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio.

De este propósito, surgen las siguientes interrogantes:

- *¿Podrá la presencia del gluconato de magnesio proteger o prevenir el aumento en los niveles de peroxidación lipídica de membranas celulares, que se produce al cultivar explantos de placenta humana a término, bajo condiciones de hipoxia?*

- *¿Será el efecto del gluconato de magnesio sobre los niveles de peroxidación lipídica de homogenizados de explantos de placenta humana a término cultivados bajo condiciones de hipoxia, similar al observado con sulfato de magnesio?*

Objetivo General

Estudiar el efecto del gluconato de magnesio sobre los niveles de peroxidación lipídica de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio.

Objetivos Específicos

1. Obtener placentas humanas a término de gestantes normotensas, para aislar explantos.

2. Incubar los explantos bajo condiciones de normoxia (8% oxígeno) o hipoxia (2% oxígeno), en presencia y ausencia de gluconato de magnesio, durante 18 horas a 37°C.

3. Preparar homogenizados de explantos de placenta humana a término, e incubarlos bajo las condiciones indicadas.

4. Determinar los niveles de peroxidación lipídica de los homogenizados, utilizando el método de cuantificación de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

Justificación

La preeclampsia es un síndrome multisistémico que se caracteriza por elevación de la presión arterial, proteinuria, vasoespasmo arterial generalizado y edema. Estos signos aparecen, generalmente, luego de las 20 semanas de gestación. La hipoperfusión úteroplacentaria que se produce en la mujer preeclámptica por fallas en la invasión trofoblástica, provoca hipoxia placentaria, con lo cual se elevan los procesos de peroxidación lipídica en el tejido, lo que va a traducirse en un desbalance entre fuerzas oxidantes y antioxidantes, a favor de las primeras (Carreiras *et al.*, 2002). El aumento en el grado de peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas de las células de la placenta conlleva a una liberación aumentada de productos de peroxidación lipídica hacia el plasma sanguíneo, a través del cual pueden alcanzar todo el organismo, pudiendo dañar membranas de células endoteliales y de distintos órganos y tejidos (Carrera *et al.*, 2003).

Unos de los tratamientos más usados como terapia y profilaxis contra las convulsiones eclámpticas, es el sulfato de magnesio (Scardo *et al.*, 1995). Este tratamiento ha llegado a ser el más utilizado durante los últimos 30 años, y está asociado con una dramática reducción de la morbilidad materna y neonatal relacionada con la eclampsia. Actualmente, en la literatura se reportan una serie de efectos benéficos del sulfato de magnesio sobre la madre preeclámptica, entre los que cabe mencionar: incremento del flujo sanguíneo cerebral, rápida disminución del índice de resistencia sistémica vascular, incremento del flujo sanguíneo uterino y renal y, liberación de prostaciclinas por las células endoteliales. (Sibai, 1990). Pero así como ofrece beneficios, un aumento de su concentración en plasma por encima de los valores máximos, se puede reflejar en una serie de problemas para el organismo: pérdida de los reflejos patelares, náuseas, aumento de la temperatura corporal, somnolencia, visión doble, dificultad para hablar, debilidad. Si la pérdida de los reflejos patelares es ignorada, el deterioro de los músculos involucrados en la respiración puede llevar a una peligrosa hipoxia, paro respiratorio y paro cardiaco

(Sibai, 1990). Además, el sulfato de magnesio posee la gran limitación que no puede ser suministrado por vía oral, ya que produce una fuerte diarrea osmótica.

Considerando el hecho de que los atributos del sulfato de magnesio se consideran debidos fundamentalmente al Mg^{2+} (Aranda P, 2000) decidimos realizar este estudio utilizando otra sal del ión, específicamente, el gluconato de magnesio ($MgGl_2$) . Esta sal de magnesio es de uso oral y pudiera representar una alternativa como tratamiento o suplemento diario a la mujer embarazada, para prevenir o reducir los riesgos de padecer de preeclampsia. La finalidad de este trabajo, es establecer si el gluconato de magnesio posee una capacidad parecida a la del sulfato de magnesio, para evitar o disminuir el proceso de peroxidación lipídica que se produce al incubar tejido placentario normal bajo condiciones de hipoxia (Benyo *et al.*, 1997). Como mencionado anteriormente, el gluconato de magnesio posee una ventaja muy importante sobre el sulfato de magnesio, ya que puede ser ingerido oralmente, sin ningún inconveniente, en dosis terapéuticas (Mendoza, 2004).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

La placenta es un órgano fundamental para el desarrollo y crecimiento fetal, particularmente en la regulación del transporte de iones, nutrientes, inmunoglobulinas, intercambio de gases y transporte de solutos entre la madre y el feto (Silver *et al.*, 1990). La placenta presenta dos caras discoideas: una que se encuentra apoyada al lado materno (miometrio), que recibe el nombre de placa decidual, y otra que está relacionada con el lado fetal (cavidad amniótica) que se denomina placa coriónica. La capa decidual está compuesta por dos estructuras fundamentales para la placenta: el sinciciotrofoblasto y el citotrofoblasto. De estas estructuras, emergen numerosas paredes perpendiculares denominadas tabiques placentarios los cuales, a pesar de que no llegan a establecer contacto con la placa coriónica, dividen a la laguna sanguínea y por extensión a la placenta, en varios compartimientos que se conocen con el nombre de cotiledones (Langman, 1976).

La membrana plasmática de las células del sinciciotrofoblasto de la placenta juega un papel muy importante en la relación entre la madre y el feto. Variaciones que se produzcan entre las propiedades de la membrana plasmática basal (MB) y de la membrana plasmática de las microvellosidades (MVM), pudiera traducirse en un mal funcionamiento celular y, con ello, en el desarrollo de anomalías y enfermedades, tanto para la madre como para el feto (Redman, 1990).

Se ha encontrado que la presencia de la placenta es condición necesaria para que la mujer grávida desarrolle preeclampsia, un síndrome que afecta de 7 a 10% de las gestantes a nivel mundial. La preeclampsia se caracteriza por una elevación de la presión arterial, proteinuria y edema, síntomas estos que empiezan a aparecer luego de las 20 semanas de gestación (Zeeman & Dekker, 1992). El síndrome puede

clasificarse en dos estadios con respecto a su severidad, lo que representa probablemente la evolución de una condición progresiva hacia una forma más grave, llamada eclampsia (Kosch *et al.*, 2000).

La preeclampsia, en su forma más benigna se denomina leve. Esta forma se caracteriza por una evolución satisfactoria y una aparición más bien tardía en el embarazo, con una hipertensión arterial moderada, no sobrepasando los 140/90 mm Hg y una proteinuria no mayor de 300 mg en 24 horas (Kosch *et al.*, 2000).

La preeclampsia se considera severa, cuando las gestantes presentan una presión arterial $\geq$ 160/110mm Hg y una proteinuria de al menos 5 g en 24 horas. Durante la preeclampsia severa, pueden verse afectados varios órganos, por lo que puede desarrollarse edema pulmonar, oliguria (menos de 400 ml de orina diaria), o síntomas persistentes de alteraciones del sistema nervioso central, como dolores de cabeza, visión borrosa o ceguera. Otras señales asociadas a la preeclampsia severa, son el retardo del crecimiento del feto y la elevación de la creatinina sérica (Lipstein *et al.*, 2003).

El síndrome HELLP (acrónimo que viene de Hemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low Platelet Count), es una complicación, que puede ser encontrada en pacientes con preeclampsia severa. Este síndrome consiste en hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y trombocitopenia (conteo de plaquetas menor a 100.000/mm^3). El aumento de enzimas hepáticas, está asociado a un dolor epigástrico persistente o dolor de la parte superior derecha del abdomen (Sibai, 2003).

Uno de los signos más corrosivos que se pudiera llegar a tener durante la preeclampsia severa son las convulsiones, y/o coma materno. En este caso, se habla de eclampsia, la que conlleva un gran índice de riesgo de muerte materno-fetal (Lindheimer & Katz, 1985). Cabe destacar que la preeclampsia desaparece varios días después del parto (Zeeman & Dekker, 1992).

Desde hace muchos años se conoce la preeclampsia - eclampsia, pero aún en la actualidad se desconoce aún con exactitud su etiología, existiendo aún una serie de interrogantes sobre cuáles serían los factores que desencadenan el mecanismo de desarrollo del síndrome. No obstante, los conocimientos acumulados en este particular, permiten creer que dicha patología es el resultado de una combinación de factores genéticos, inmunológicos y ambientales, los cuales llevan a fallas en la invasión trofoblástica normal y en la remodelación de las arterias uterinas (Roberts & Cooper, 2001; Kharfi *et al.*, 2003).

Una de las hipótesis de la patogenia de la preeclampsia, se basa en el hecho de que en el desarrollo de la vascularización de la placenta pueden surgir irregularidades, que provocan una perfusión placentaria insuficiente. Esta insuficiencia del riego sanguíneo placentario, puede surgir como consecuencia de la incapacidad del tejido placentario de llevar a cabo de forma satisfactoria el mecanismo de implantación. Por medio de este mecanismo, la placenta asegura su sujeción al útero y asegura su irrigación, al transformar la circulación miometrial, desde un sistema de alta resistencia y bajo flujo sanguíneo, a un sistema de baja resistencia y alto flujo sanguíneo (Pritchard *et al.*, 1990).

La implantación ocurre durante las primeras semanas de gestación, y es llevada a cabo por la colonización de numerosas células del citotrofoblasto extravelloso, a la decidua y miometrio adyacente. La llegada de esta migración de células del citotrofoblasto a los vasos espirales (arterias más profundas del útero), las lleva a reemplazar células del endotelio de los vasos maternos, destruyendo y reemplazando por citotrofoblasto, las capas elásticas y musculares de los mismos (Buhimschi *et al.*, 1998). Posteriormente, una segunda invasión, más profunda y endovascular, alcanza las arterias radiales, convirtiendo de esta manera a los vasos maternos en el conducto útero-placentario, en el que se permite la dilatación de los vasos de forma pasiva, suministrando así el flujo sanguíneo requerido en el embarazo

(De Wolf *et al.*, 1973; Pijnenborg *et al.*, 1981). Las dos migraciones trofoblásticas son determinantes en el establecimiento de una baja presión y, con ello, una alta conductancia del compartimiento vascular, lo que asegura un suministro constante de oxígeno y nutrientes a la placenta y, por ende, al feto (Buhimschi *et al.*, 1998).

Las células trofoblásticas proliferan dando lugar a una capa interna de citotrofoblasto, formada por células separadas, y a una capa más externa de sinciciotrofoblasto, que representa una capa multinucleada y continua de protoplasma en la que no se pueden distinguir limites celulares. El citotrofoblasto comienza a sufrir mitosis de forma continua, formando células que se van incorporando y que se fusionan con el sinciciotrofoblasto en desarrollo. El sinciciotrofoblasto erosiona activamente el endometrio, permitiendo al blastocisto, en conjunto, introducirse más profundamente en el endometrio (implantación); el proceso de proliferación e invasión continúa, hasta que el sistema vascular sanguíneo materno forme las lagunas del laberinto sincicial, y las vellosidades que se dirigen hacia el lado fetal, que quedan inmersas en dichas lagunas. Estas microvellosidades se encuentran envueltas por las células del sinciciotrofoblasto, por lo que dicho tejido epitelial constituye la barrera más próxima de intercambio de nutrientes entre la madre y el feto (Mendoza, 2004).

Como consecuencia de una implantación anormal durante las primeras semanas de gestación, se producen cuadros de hipoxia que generan estrés oxidativo. Esta situación se presenta por el hecho de que en estas condiciones, la acción de los mecanismos antioxidante es sobrepasada por los procesos de oxidación, siendo la peroxidación lipídica una manifestación del mismo proceso (Hubel *et al.*, 1989).

Las especies reactivas de oxígeno interactúan fácilmente con los lípidos, las proteínas y los carbohidratos que forman la membrana plasmática de las células, afectando la integridad de la misma (Maulik *et al.*, 2001). Un aumento en productos de peroxidación lipídica circulantes, como en el caso de la preeclampsia, puede

provocar la peroxidación de lípidos de membrana plasmática de células de diferentes tejidos en todo el organismo (Sotnikova, 1986).

Más aún, durante la preeclampsia, se produce claramente un desorden del sistema vascular, del cual los eritrocitos constituyen un componente fundamental. Si bien es cierto que los eritrocitos no contribuyen en la etiología del síndrome, también es cierto que, como mencionado anteriormente, pueden realizar una labor importante en el proceso de llevar el estrés oxidativo a otros órganos y tejidos del organismo. Así mismo, otras células sanguíneas (plaquetas y leucocitos) pueden ser oxidadas durante su paso por la placenta, pudiendo convertirse también en distribuidores de la peroxidación lipídica a otras regiones del organismo.

Al afectar la integridad de la membranas celulares (Halliwell & Gutteridge, 1989), la peroxidación lipídica puede reducir la fluidez de las mismas y, con ello, disminuir la actividad de enzimas presentes en ellas.

El tratamiento de la preeclampsia no ha cambiado en décadas (Watson *et al.*, 1986), y consiste en: reposo, administración de agentes antihipertensivos para la preeclampsia leve y, administración de agentes anticonvulsivantes o antiepilépticos, para la profilaxis y prevención de las convulsiones. Entre estos últimos, encontramos drogas antiepilépticas convencionales, tales como diazepam y fenitoína, y el tratamiento de elección, que es la infusión endovenosa de sulfato de magnesio.

El uso del sulfato de magnesio en clínica data de 1618 (McCall, 1956), cuando un agricultor de nombre Henry Wickes descubrió una fuente de agua de manantial en Epson en el sur de Inglaterra, la cual contenía grandes cantidades de sulfato de magnesio, constituyéndose en las llamadas sales de Epson. Al inicio, éstas eran empleadas sólo para "bañar úlceras abiertas y afecciones dolorosas"; más tarde, Epson llegó a ser uno de los más importantes balnearios en el mundo y el sulfato de magnesio, llegó a ser uno de los más importantes medicamentos. En 1905 y 1906, se

publican los primeros reportes sobre la eficacia del sulfato de magnesio para tratar las convulsiones del tétano. Veinte años después, aparecen en la literatura algunos artículos, reportando sus propiedades anticonvulsivantes en eclampsia (Lazard, 1925).

Los primeros estudios notables del efecto del sulfato de magnesio sobre la preeclampsia, fueron realizados entre 1925 y 1926 por Dorsett, Lazard, Alton y Lincoln (Lazard, 1925). En 1929, con la introducción del uso del sulfato de magnesio para la prevención de convulsiones eclámpticas en el Hospital Chicago Lying, la incidencia de eclampsia descendió desde un 36% a un 7% (Greene, 2003). Así, el sulfato de magnesio, es usado desde hace más de 60 años como terapia y profilaxis contra las convulsiones eclámpticas (Scardo *et al.*, 1995). Ha llegado a ser el tratamiento estándar en los últimos 30 años, y está asociado con una dramática reducción de la morbilidad materno y neonatal relacionada con eclampsia (Pritchard & Stone, 1967). Si bien el uso del sulfato de magnesio ha sido criticado como algo irracional, ya que esta sal no es un anticonvulsivante *per se,* por lo que pudiera esperarse que fuese inefectiva para corregir las convulsiones que se producen durante la preeclampsia, su uso ha sido defendido por los obstetras "porque simplemente funciona" y, porque su administración es relativamente segura para el feto (Sibai, 1990). Debido a ello, el uso del sulfato de magnesio ha sido considerado más bien como un "tratamiento empírico" (Pritchard & Pritchard, 1975), en vez de un tratamiento científicamente comprobado.

Estudios más recientes (Sibai, 1990), indican que el sulfato de magnesio, independientemente de su eficacia como anticonvulsivante, tiene una serie de efectos benéficos para la madre preeclámptica (Lucas *et al.*, 1995; Nelson & Grether, 1995). Entre ellos podemos mencionar: incremento del flujo sanguíneo cerebral; rápida disminución del índice de resistencia sistémica vascular; incremento del flujo sanguíneo uterino; incremento del flujo sanguíneo renal; incremento de la liberación de prostaciclinas por células endoteliales; disminución de la actividad de la renina plasmática; disminución de los niveles de enzima convertidora de angiotensina;

atenuación de la respuesta vascular a sustancias vasopresoras; protección contra daño isquémico; reducción de la agregación plaquetaria. En el caso de los neonatos, se ha demostrado que disminuye el riesgo de parálisis cerebral en prematuros (Lucas *et al.*, 1995; Nelson & Grether, 1995).

Aunque las causas fundamentales responsables de la aparición de convulsiones en la eclampsia no han sido establecidas definitivamente (Roberts, 1995), la condición preeclampsia–eclampsia está caracterizada por un intenso vasoespasmo, así como por una sensibilidad aumentada a agentes vasopresores, lo que ha llevado a la suposición de que las convulsiones pudieran ser el resultado de un reducido flujo sanguíneo cerebral (Roberts & Redman, 1993). En este particular, el magnesio es un potente vasodilatador, especialmente de la red vascular cerebral, y se sabe que la administración de sulfato de magnesio a mujeres preeclámpticas, incrementa su flujo sanguíneo cerebral (Belfort & Moise, 1992). Este efecto del sulfato de magnesio pudiera ser debido a su capacidad de incrementar, tanto *in vivo* como *in vitro*, la producción de prostaciclinas, las cuales son potentes vasodilatadores endoteliales (Watson *et al.*, 1986).

Por otro lado, existen reportes que indican que el magnesio actúa como un anticonvulsivante bloqueando los canales de N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor de aminoácidos excitatorios que, cuando es estimulado, puede dirigir a convulsiones tanto electroencefalográficas como tónicas – clónicas (Cotton *et al.*, 1993).

El magnesio, ha sido demostrado *in vitro* que puede actuar como agente protector contra el daño mediado por radicales libres en células endoteliales (Dickens *et al.*, 1992), siendo capaz de disminuir la vasoconstricción inducida por peróxidos en la placenta humana (Walsh *et al.*, 1998).

El uso prenatal del sulfato de magnesio protege al feto al disminuir la incidencia de hemorragias intraventriculares en neonatos de embarazadas preeclámpticas (Kuban *et al.*, 1992). Del mismo modo, se conoce que disminuye el riesgo de parálisis cerebral en prematuros (Nelson & Grether, 1995). Otros estudios, demuestran una reducción en los índices de mortalidad neonatal, cuando se emplea sulfato de magnesio para tratar la preeclampsia (Farkouh *et al.*, 2001). Por otro lado, empleando cotiledones aislados de placenta, se ha reportado que la presión de la perfusión arterial fetoplacental es mayor en placentas provenientes de pacientes preeclámpticas, disminuyendo la presión de la perfusión en las mismas, cuando son tratadas con sulfato de magnesio (Kovac *et al.*, 2003). Todos estos hallazgos, sugieren que la incrementada vasoconstricción fetoplacental que se produce en la preeclampsia, puede ser revertida por el sulfato de magnesio. La disminución de los índices de morbilidad y mortalidad neonatal que se observa para las embarazadas preeclámpticas que son tratadas con sulfato de magnesio, puede ser explicada en parte por el efecto vasodilatador de este agente, a nivel del lecho vascular fetoplacentario.

Los niveles plasmáticos de sulfato de magnesio considerados terapéuticos, basados en la experiencia clínica, oscilan entre 4 a 8 mg/dl (Sibai, 1990). La primera señal de intoxicación por sulfato de magnesio es la pérdida de reflejos patelares, lo que ocurre con niveles plasmáticos entre 9 –12 mg/dl del agente. Los signos tempranos de intoxicación con magnesio incluyen náusea, aumento de la temperatura corporal, somnolencia, visión doble, dificultad para hablar y debilidad. Si la pérdida de reflejos patelares es ignorada y la concentración en plasma incrementa por encima de 12 mg/dl, el deterioro de los músculos involucrados en la respiración puede llevar a una peligrosa hipoxia. A niveles plasmáticos de sulfato de magnesio entre 15 a 17 mg/dl, se puede desarrollar parálisis muscular y paro respiratorio, mientras que a niveles entre 30 a 35 mg/dl, puede desarrollarse un paro cardiaco.

El antídoto ante la intoxicación con sulfato de magnesio es el gluconato de calcio, siendo el tratamiento muy efectivo cuando ocurre compromiso respiratorio

(Chesley, 1979). La debilidad neuromuscular inducida por la hipermagnesemia y revertida por el gluconato de calcio, pareciera estar relacionada con la habilidad del calcio de desplazar al magnesio desde las membranas celulares (Henninger & Horst, 1997).

Es importante destacar que existen otras sales de magnesio, que pueden ser absorbidas por vía gastrointestinal, como lo son el cloruro de magnesio y el gluconato de magnesio. En el caso de este último, se dice que proporciona ventajas a la mujer preeclámptica, ya que estudios realizados por Li (Li & Tian, 1997), sugieren que el gluconato de magnesio en dosis bajas, por vía oral, puede prevenir eficazmente la preeclampsia en mujeres de alto riesgo. Se sugiere que el mecanismo de acción del gluconato de magnesio, consiste en mantener el equilibrio de PGI2 y TXA2.

Más aún, hay estudios que refieren el uso de sales orales de magnesio, como el gluconato de magnesio, que poseen una capacidad antioxidante mayor que la mostrada por el sulfato de magnesio (Martin *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1998; Mak *et al.*, 2000). Específicamente, el gluconato de magnesio es capaz de remover radicales hidroxilos y alcoxilos, por encima de la capacidad antioxidante que presenta el sulfato de magnesio (Murthi *et al.*, 2003). Así por ejemplo, en procesos de isquemia-reperfusión cardiaca, el gluconato de magnesio disminuye los daños oxidativos, a través de la disminución significativa de los niveles de radicales alcoxilos, por encima del efecto mostrado por el sulfato de magnesio (Murthi *et al.*, 2003). En otros estudios, se ha demostrado que el gluconato de magnesio es capaz de inhibir la peroxidación lipídica en membranas microsomales tratadas *in vitro* con la reacción de Fenton (Mak *et al.*, 2000).

En función de todo lo relatado anteriormente, en la elaboración de este trabajo se decidió estudiar el efecto del gluconato de magnesio sobre los niveles de peroxidación lipídica de membranas de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de hipoxia.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

El siguiente estudio fue autorizado por las comisiones de Bioética del IVIC, del Hospital Universitario de Caracas y de la Maternidad Concepción Palacios. Todas las participantes firmaron un consentimiento escrito.

1. Placentas Humanas.

Se recolectaron placentas humanas a término (38-41 semanas) de pacientes sin ninguna patología asociada. Las placentas obtenidas inmediatamente después del alumbramiento por parto vaginal, eran colocadas sobre hielo y trasladadas al laboratorio, donde se procesaban. Todo esto, en un lapso menor a 4 horas.

2. Preparación de Explantos y cultivo de los mismos.

Una vez en el laboratorio, se aislaban de la placenta cotiledones observados en buen estado, y se les removía la placa coriónica y la decidua (0,25cm aproximadamente). Luego, se colocaban los cotiledones en una placa de *Petri* y se cortaban en trozos pequeños de 0,5 cm x 0,5 cm aproximadamente, removiendo los vasos sanguíneos. Todo el proceso de preparación y lavado era realizado sobre hielo, a una temperatura de 4°C. Los explantos primarios de placenta fresca se lavaban con solución salina estéril durante 5 veces consecutivas. Luego, se transferían a placas Nunclon ™ Surface® de 12 pozos, que contenían 2ml del medio DMEM-F12 (Medio Eagle Modificado Dulbecco) + 10% Suero Fetal Bovino (SFB) en cada pozo. Este medio se encontraba a 37°C, y era complementado con agentes antimicrobianos: Penicilina cristalina 100.000 UI/ml, Gentamicina 48μg/ml y Anfotericina B 3μg/ml.

Todos los explantos eran incubados a 37°C, bajo condición de normoxia, durante las primeras 4 horas. Una vez concluido este tiempo, el medio de cultivo era removido y se les proporcionaba medio fresco a 37°C (2 ml/pozo). Luego, los explantos se incubaban bajo condiciones de normoxia o hipoxia, en presencia y ausencia de 4 mM gluconato de magnesio, durante un período de 18 horas, a 37°C, en una incubadora estéril (Shel Lab Model IR2424 CO_2 Incubator), a presiones constantes de los gases, los cuales, según la condición de incubación eran:

- Normoxia: 8% O_2, 5% CO_2, 87% N_2
- Hipoxia: 2% O_2, 5% CO_2, 93% N_2

3. Homogenizado de explantos de placenta humana.

Los explantos se removieron del medio de cultivo y se lavaron con solución salina. Una vez lavado, el tejido se pesó y se procedió a suspenderlo en 3 volúmenes (ml/g) de una solución fría (solución 1) que contenía (mM): sacarosa, 250; Tris-Hepes (pH 7,2); etilenglicol-bis-(β-amino-etil ester) N,N-ácido tetraacético (EGTA), 5; ácido etilendiamin tetraacético (EDTA), 5; fenilmetil-sulfonil fluoruro (PMSF), 1. Esta suspensión se homogenizaba durante dos minutos con un homogenizador Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel,IKA-Labortechinick) a 24.000rpm, con una hojilla S25N, obteniéndose los homogenizados totales (HT) de los explantos de placenta humana (Illsley *et al.*, 1990).

4. Determinación de proteínas.

La cuantificación del contenido de proteínas de los fantasmas, se realizó según el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se utilizó el reactivo concentrado de azul brillante de Coomasie (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). El procedimiento era el siguiente: se preparaba una curva de calibración empleando 100, 200 y 400 μl de albúmina, 25 μg/ml; llevando luego a un volumen final de 800 μl con agua destilada. Se preparaban cuatro blancos para calibrar el espectrofotómetro, los cuales llevaban 790 μl de agua destilada y 10 μl del medio de resuspensión. Las muestras se preparaban por cuadruplicado, llevando 10 μl de suspensión de membranas y 790 μl de agua destilada. Tanto a las muestras, como a los blancos y curva de calibración se les añadía 200 μl del reactivo, se agitaban y dejaban a temperatura ambiente durante 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se tomaban 200 μl de cada uno de los tubos y se colocaban en placas de ELISA de 96 pozos para luego medir la absorbancia en un lector ELISA Sunrise (Tecan) a 595 nm. La densidad óptica es lineal para un rango de concentración de proteínas entre 0,07 mg/ml y 2,7 mg/ml.

5. Determinación de niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

Los niveles de TBARS se determinaban de acuerdo al método descrito por Feix y col. (Feix *et al.*, 1991). A tubos de microcentrífuga Eppendorf 5415C se les agrega 50 μl de hidroxitolueno butilado (50mM); 375 μl de ácido tricloroacético al 20% y, 250 μl de la suspensión de membranas. Los tubos de ensayo se mantienen sobre hielo a una temperatura de 4°C, aproximadamente durante 10 min. Luego, se centrifugan a 1.500 rpm en una microcentrífuga Eppendorf 5415 C durante 10 minutos; se toma 500 μl del sobrenadante y se colocan en tubos de vidrio, en donde se les añade 250 μl de reactivo de ácido tiobarbitúrico al 1,5%. Inmediatamente, los

tubos se colocan en un baño de agua hirviente durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se colocan en hielo a 4°C por 3 min. Se determina su absorbancia a una longitud de onda de 532 nm, contra un blanco tratado de igual forma, pero que no contiene la suspensión de membranas. En cada caso, se prepara una curva de calibración empleando como estándar el 1,1-3,3-tetrametoxipropano ($C_7H_{16}0_4$) (Feix *et al.*, 1991). La absorbancia fue medida en placas de ELISA de 96 pozos, en un lector ELISA Sunrise (Tecan). Los resultados son expresados como nmoles de malondialdehído (MDA)/mg de proteína.

6. Análisis estadístico.

Los resultados se expresan como las medias ± el error estándar, para el número de ensayos indicado en cada caso. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando la *"t"* de Student, siendo *"n"* el número de veces que se repitieron los ensayos, con preparaciones diferentes. Se acepta como nivel de significancia estadística, una probabilidad menor a 0,05.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Para la presentación de los resultados, se seguirá el siguiente esquema:

1. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados, o preincubados bajo condiciones de normoxia.

2. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia.o de hipoxia.

3. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 2 mM $MgSO_4$.

4. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$.

5. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia de distintas concentraciones de $MgGl_2$.

6. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia, o de normoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$.

1. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados, o preincubados bajo condiciones de normoxia.

Veamos, en primer lugar, si la simple incubación del tejido placentario bajo condiciones de normoxia, es capaz de producir algún efecto sobre el grado de peroxidación lipídica de sus membranas.

Para ello, se incubaron explantos de placenta humana a término bajo condiciones de normoxia, según indicado en la sección de Materiales y Métodos, y se determinó el grado de peroxidación lipídica de sus homogenizados. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 1, comparados con valores correspondientes a homogenizados de explantos recién preparados. Evidentemente, la incubación, "*per se*", no produjo mayor variación en el grado de peroxidación lipídica de las membranas de los explantos, ya que el material proveniente de los explantos incubados bajo condiciones de normoxia, presenta valores similares al material proveniente de los explantos recién preparados.

A continuación, vamos a determinar que sucede, cuando el tejido placentario es incubado de la misma forma que en el experimento anterior, pero ahora bajo condiciones de hipoxia.

Tabla 1

Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados, o preincubados bajo condiciones de normoxia.

Condiciones explantos	TBARS homogenizados nmoles MDA / mg prot
Recién preparados (frescos)	9,3 ± 0,33
Preincubados bajo condiciones de normoxia	11,3 ± 0,78*

*p = n.s.

Preincubaciones de los explantos realizadas como indicado en materiales y métodos. Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

2. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia o de hipoxia.

Para este estudio, explantos de placenta humana a término fueron incubados de la misma manera que en el experimento anterior, pero esta vez bajo condiciones de hipoxia, es decir, bajo condiciones en las cuales el oxígeno bombeado al medio de incubación constituye tan sólo 2% de la mezcla de gases , en vez de 8% de la mezcla que se utilizó para las incubaciones de normoxia.

Los resultados de este experimento, comparados con los obtenidos cuando se incuban los explantos bajo condiciones de normoxia, se muestran en la Figura 1. Como esperado, el estado de hipoxia se tradujo en un aumento significativo en el grado de peroxidación lipídica de las membranas, indicando que efectivamente las situaciones de hipoxia se traducen en un efecto degenerador de las membranas celulares, lo que pudiera influir negativamente, tanto sobre aspectos estructurales, como funcionales de las mismas.

A continuación, se procedió a determinar el efecto que pudiera producir la presencia de sulfato de magnesio en el medio de incubación, en concentración 2 mM, cuando los explantos de placenta son sometidos a condiciones de hipoxia.

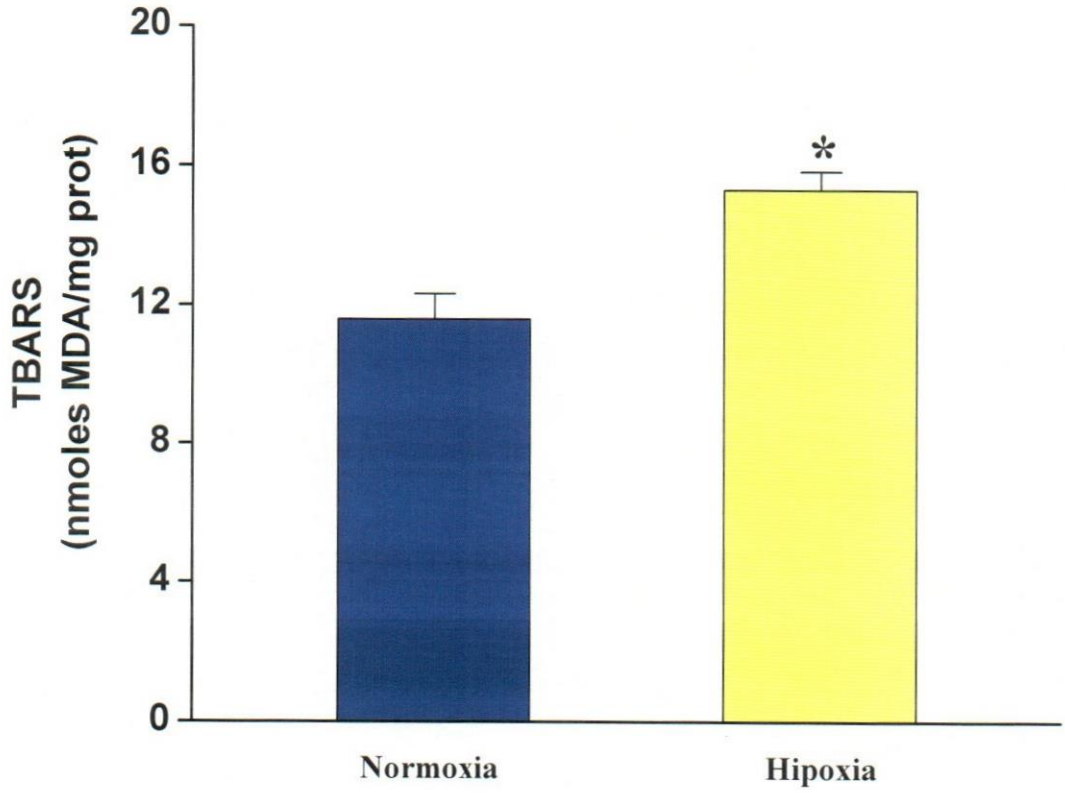

Figura 1. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia o de hipoxia. Preincubaciones de los explantos realizadas como indicado en Materiales y Métodos. Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

*$p < 0,01$

3. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia o ausencia de 2 mM $MgSO_4$.

Siguiendo el mismo esquema metodológico, se procedió a incubar explantos de placenta humana a término bajo condiciones de hipoxia, pero ahora en presencia de 2 mM sulfato de magnesio en el medio de incubación. Los resultados de este experimento, comparados con aquellos obtenidos cuando el experimento es realizado en ausencia de sulfato de magnesio, pueden ser vistos en la Figura 2.

Los datos de esta Figura indican claramente que, el aumento en el grado de peroxidación lipídica de las membranas celulares, que experimenta el tejido al ser expuesto a condiciones de hipoxia no sucede, si la incubación es realizada en presencia de 2 mM sulfato de magnesio en el medio. De hecho, el grado de peroxidación lipídica de estas membranas se mantiene dentro de valores similares a los valores presentados, cuando los explantos son incubados bajo condiciones de normoxia (Figura 1).

Pasemos ahora a determinar si el gluconato de magnesio, objetivo fundamental de nuestro trabajo, es capaz de ejercer el mismo efecto protector del sulfato de magnesio contra las condiciones de hipoxia utilizadas en nuestras condiciones experimentales.

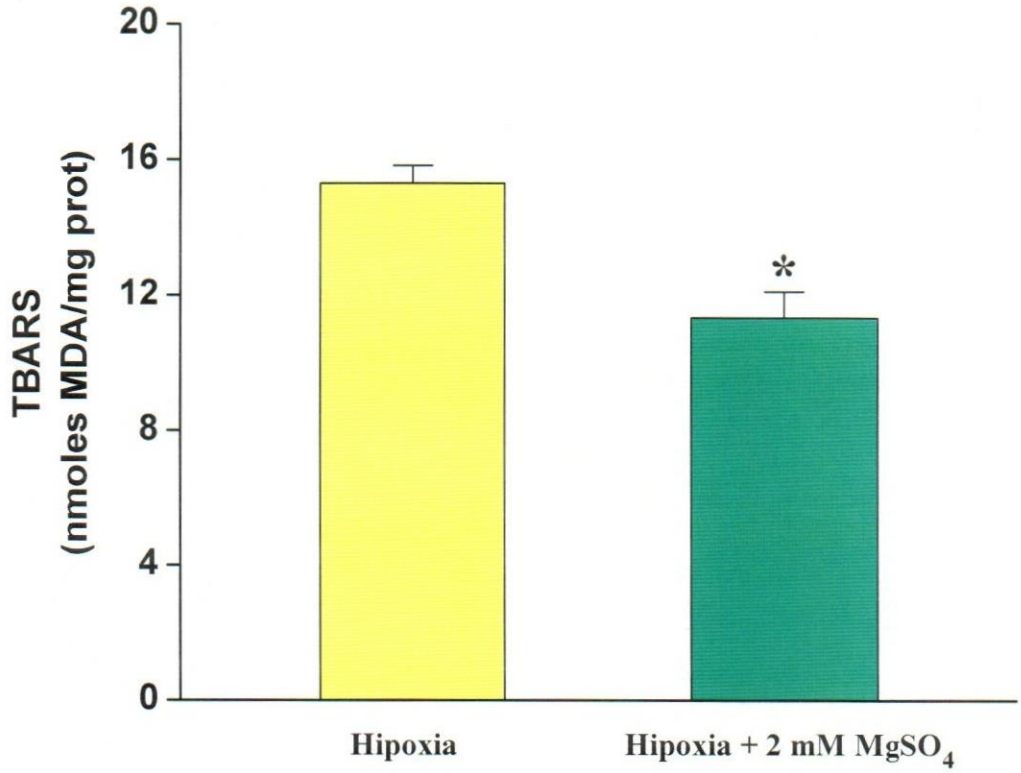

Figura 2. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia o de hipoxia en presencia de 2 mM $MgSO_4$. Preincubaciones de los explantos realizadas como indicado en Materiales y Métodos. Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

$*p < 0,01$

4. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$.

Este experimento se realizó de igual manera que el anterior, pero colocando 4 mM gluconato de magnesio, en vez de 2 mM sulfato de magnesio en el medio de incubación bajo las condiciones de hipoxia.

Los resultados del experimento se presentan en la Figura 3, comparados con aquellos obtenidos al incubar explantos bajo condiciones de hipoxia. Como esperado, el gluconato de magnesio mostró una capacidad de protección muy parecida a la ejercida por el sulfato de magnesio. Nótese que los valores de peroxidación lipídica, determinados cuando los explantos son incubados bajo condiciones de hipoxia en presencia de gluconato de magnesio, son muy parecidos a aquellos encontrados cuando el tejido se incuba bajo condiciones de hipoxia en presencia de sulfato de magnesio o, también, cuando se incuba bajo condiciones de normoxia. Estos valores, son significativamente más bajos que los obtenidos cuando la incubación de los explantos es realizada bajo condiciones de hipoxia.

A continuación, se procedió a estudiar la posibilidad de obtener el mismo efecto protector del gluconato de magnesio, pero a concentraciones menores del mismo en el medio donde se realizó la incubación bajo hipoxia.

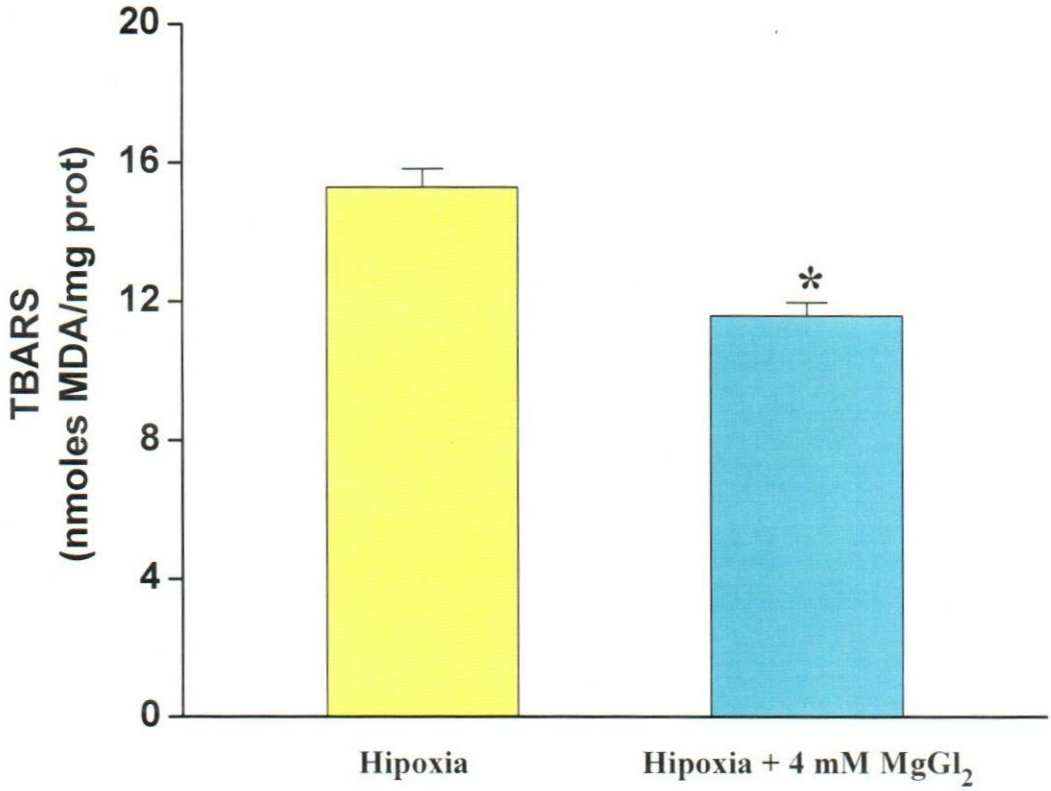

Figura 3. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia o de hipoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$. Preincubaciones de los explantos realizadas como indicado en Materiales y Métodos. Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

$^*p < 0{,}01$

5. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia de distintas concentraciones de $MgGl_2$.

Los datos presentados en la Figura 3, indican claramente que la presencia de 4 mM de gluconato de magnesio en el medio hipóxico, es suficiente para proteger totalmente las membranas celulares en el aspecto considerado, que es el grado de peroxidación lipídica de las mismas. Es importante ahora determinar si pueden lograrse iguales resultados, pero con concentraciones inferiores del fármaco. La investigación se realizó, incubando explantos de placenta bajo condiciones de hipoxia, en presencia de distintas concentraciones de gluconato de magnesio. Específicamente, en ausencia o en presencia de 1 mM; 2 mM, o 4 mM gluconato de magnesio.

Los resultados del experimento, mostrados en la Figura 4, indican claramente que la concentración de 4 mM gluconato de magnesio parece ser la más adecuada para lograr nuestro propósito, de proteger las membranas celulares contra el aumento de peroxidación lipídica inducido por el período de hipoxia.

Se hace importante ver, a continuación, si el efecto del gluconato de magnesio se ejerce específicamente como protección ante situaciones dañinas para la célula, como lo es la hipoxia, o si también se puede apreciar en situaciones normales, como en el caso de incubaciones bajo condiciones de normoxia.

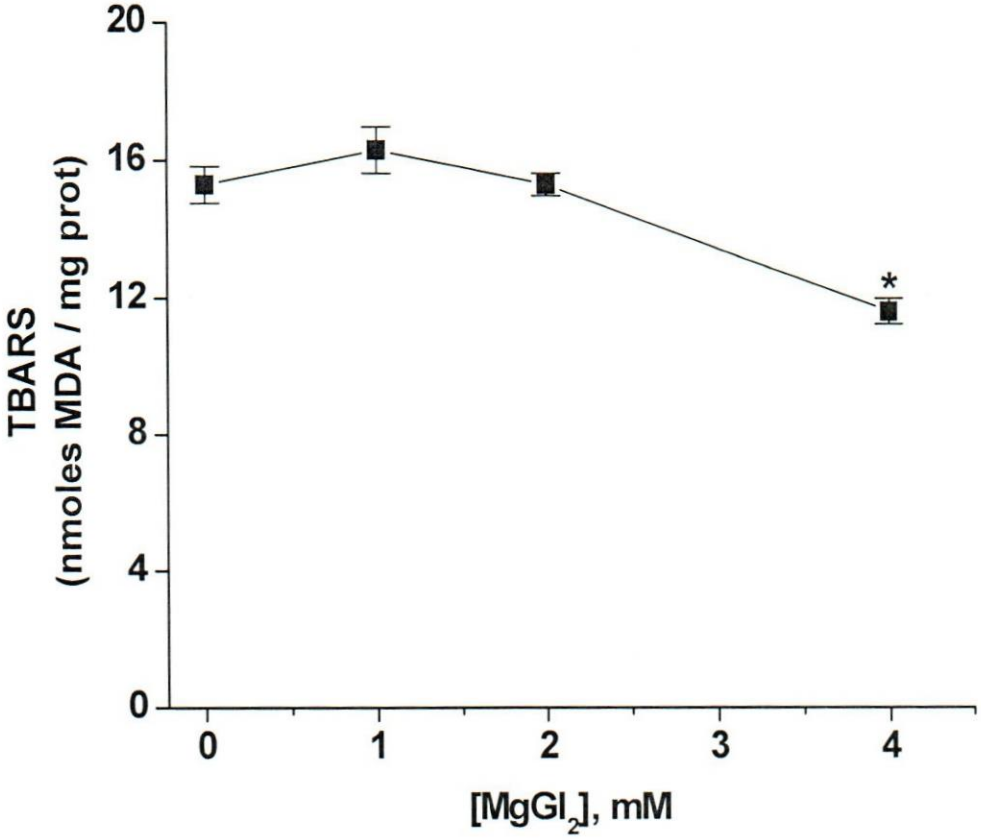

Figura 4. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia de distintas concentraciones de $MgGl_2$. Preincubaciones de los explantos realizadas como indicado en Materiales y Métodos. Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

*$p < 0,01$ con respecto a todas las demás condiciones

6. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia o de normoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$.

Para realizar este experimento, se incubaron explantos de placenta recién preparados bajo condiciones de normoxia, en presencia o ausencia de 4 mM gluconato de magnesio. Los resultados mostrados en la Figura 5, indican claramente que el grado de peroxidación lipídica de las membranas es semejante en ambos casos, no evidenciándose papel alguno del gluconato de magnesio cuando el tejido es incubado bajo condiciones de normoxia.

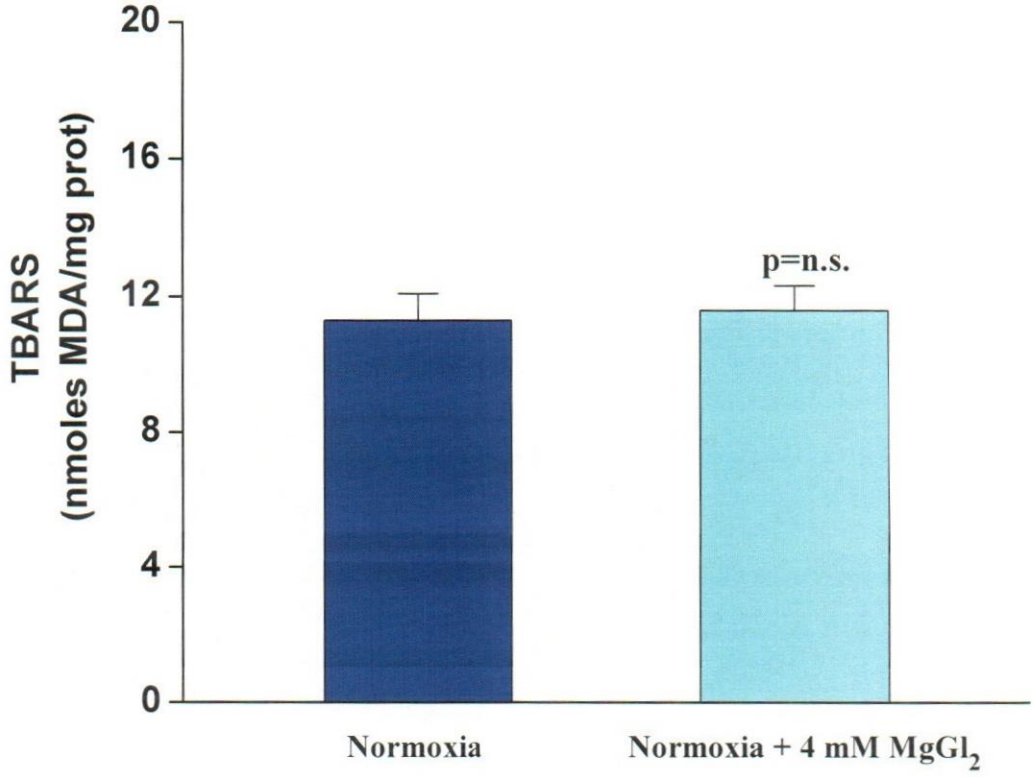

Figura 5. Niveles de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia o de normoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$. Preincubaciones de los explantos realizadas como indicado en Materiales y Métodos. Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

La placenta es un órgano fundamental para el desarrollo y crecimiento fetal, particularmente en la regulación del transporte de iones, nutrientes, inmunoglobulinas, intercambio de gases y transporte de solutos entre la madre y el feto (Silver *et al.*, 1990). Se dice que la preeclampsia es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad, tanto materna como fetal, a nivel mundial (MacGillivray, 1958), constituyendo una causa importante de prematuridad y de mortalidad neonatal (Sibai *et al.*, 1995). Si bien la causa principal de la preeclampsia no ha sido definida aún, se conoce que la presencia de la placenta es requisito necesario y suficiente para la aparición de esta enfermedad (Myatt, 2002).

La preeclampsia es un síndrome que afecta de 7 a 10% de las gestantes a nivel mundial. Se caracteriza por una elevación de la presión arterial, proteinuria y edema, signos que empiezan a aparecer luego de las 20 semanas de gestación (Zeeman & Dekker, 1992). El síndrome puede clasificarse en dos estadios con respecto a su severidad, lo que representa probablemente la evolución de una enfermedad progresiva hacia una forma más grave, llamada eclampsia (Kosch *et al.*, 2000).

La membrana plasmática de las células del sinciciotrofoblasto de la placenta juega un papel muy importante en la relación entre la madre y el feto. Variaciones que se produzcan entre las propiedades de la membrana plasmática basal (MB) y de la membrana plasmática de las microvellosidades (MVM), pudiera traducirse en un mal funcionamiento celular y, con ello, en el desarrollo de anomalías y enfermedades, tanto para la madre como para el feto (Redman, 1990).

Una de las hipótesis de la patogenia de la preeclampsia, se basa en el hecho de que en el desarrollo de la vascularización de la placenta pueden surgir irregularidades, que provocan una perfusión placentaria insuficiente. Esta insuficiencia del riego sanguíneo placentario, puede surgir como consecuencia de la incapacidad del tejido placentario de llevar a cabo de forma satisfactoria el mecanismo de implantación. Por medio de este mecanismo, la placenta asegura su sujeción al útero y asegura su irrigación, al transformar la circulación miometrial (Pritchard *et al.*, 1990). Debido a la mala implantación de la placenta, la misma puede llevar a fallas trofoblásticas (Pijnenborg *et al.*, 1981) ocasionando una perfusión placentaria insuficiente, generando así cuadros de hipoxia/reoxigenación, lo que se traduciría en un aumento en la producción de especies reactivas al oxígeno (ERO).

Las especies reactivas de oxígeno interactúan fácilmente con los lípidos, las proteínas y los carbohidratos que forman la membrana plasmática de las células, afectando la integridad de la misma (Maulik *et al.*, 2001). Un aumento en productos de peroxidación lipídica circulantes, como en el caso de la preeclampsia, puede provocar la peroxidación de lípidos de membrana plasmática de células de diferentes tejidos en todo el organismo (Sotnikova, 1986).

Más aún, durante la preeclampsia, se produce claramente un desorden del sistema vascular, del cual los eritrocitos constituyen un componente fundamental. Si bien es cierto que los eritrocitos no contribuyen en la etiología del síndrome, también es cierto que, como mencionado anteriormente, pueden realizar una labor importante en el proceso de llevar el estrés oxidativo a otros órganos y tejidos del organismo. Así mismo, otras células sanguíneas (plaquetas y leucocitos) pueden ser oxidadas durante su paso por la placenta, pudiendo convertirse también en distribuidores de la peroxidación lipídica a otras regiones del organismo.

Al afectar la integridad de la membranas celulares (Halliwell & Gutteridge, 1989), la peroxidación lipídica puede reducir la fluidez de las mismas y, con ello, disminuir la actividad de enzimas presentes en ellas.

En trabajos anteriores (Abad *et al.*, 2010; Spickett *et al.*, 1998), se ha demostrado que la fragilidad osmótica de los eritrocitos, medida como incremento de la susceptibilidad de los mismos a lisis bajo un estrés hiposmótico, está aumentada en gestantes preeclámpticas, cuando se comparan con gestantes normotensas. Estos resultados son compatibles con la hipótesis del incremento del estrés oxidativo en la preeclampsia, que resulta en daño peroxidativo de las membranas celulares y, con ello, en una disminución de la fluidez de las mimas y de la actividad de las enzimas de membrana que dependen de dicha fluidez.

El tratamiento de la preeclampsia no ha cambiado en décadas (Watson *et al.*, 1986), y consiste en: reposo, administración de agentes antihipertensivos para la preeclampsia leve y, administración de agentes anticonvulsivantes o antiepilépticos, para la profilaxis y prevención de las convulsiones. Entre estos últimos, encontramos drogas antiepilépticas convencionales, tales como diazepam y fenitoína, y el tratamiento de elección, que es la infusión endovenosa de sulfato de magnesio.

En investigaciones realizadas sobre el sulfato de magnesio, ha sido demostrado que, *"in vitro"*, puede actuar como agente protector contra el daño mediado por radicales libres en células endoteliales (Dickens *et al.*, 1992), siendo capaz de disminuir la vasoconstricción inducida por peróxidos en la placenta humana (Walsh *et al.*, 1998). Otra investigación, realizada por Abad (Abad *et al.*, 2005), demuestra que este agente es capaz de prevenir la peroxidación lipídica en membranas celulares. Por otra parte Maulik (Maulik *et al.*, 2001), ha demostrado que la hipoxia cerebral en cobayos produce un incremento en los niveles de peroxidación lipídica en las membranas plasmáticas de estos tejidos, y que el tratamiento post-

hipoxia con sulfato de magnesio, revierte estos efectos y regresa los niveles de peroxidación lipídica a valores normales.

Considerando el hecho de que el sulfato de magnesio posee limitaciones con respecto a su administración, ya que tiene que ser administrado vía endovenosa y no oral, ya que puede ocasionar una importante diarrea osmótica, se hace importante el tratar de encontrar otras sales de magnesio, que tengan efectos similares a los del sulfato de magnesio, pero que pueden ser suministradas vía oral. En este particular, el gluconato de magnesio pudiera llegar a ser un sustituto del sulfato. Así, en investigaciones realizadas con gluconato de magnesio, se encontró que el mismo posee una capacidad antioxidante mayor que la mostrada por el sulfato de magnesio (Martin *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1998; Mak *et al.*, 2000). Específicamente, el gluconato de magnesio es capaz de remover radicales hidroxilos y alcoxilos, por encima de la capacidad antioxidante que presenta el sulfato de magnesio (Murthi *et al.*, 2003). En procesos de isquemia-reperfusión cardiaca, el gluconato de magnesio disminuyó los daños oxidativos producidos por el proceso, a través de una disminución significativa en los niveles de radicales alcoxilos, por encima del efecto mostrado por el sulfato de magnesio (Murthi *et al.*, 2003). En otros estudios, se ha demostrado que el gluconato de magnesio es capaz de inhibir la peroxidación lipídica en membranas microsomales, tratadas *in vitro* con la reacción de Fenton (Mak *et al.*, 2000).

En función de todo lo relatado anteriormente, en la elaboración de este trabajo se decidió estudiar el efecto del gluconato de magnesio sobre los niveles de peroxidación lipídica de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de hipoxia y normoxia durante 18 horas a 37°C, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio.

Una vez demostrado que los niveles de peroxidación lipídica, determinada en homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados, es semejante a los niveles de peroxidación lipídica de preparaciones provenientes de explantos incubados bajo condiciones de normoxia (Tabla 1), se procedió a corroborar el efecto de la hipoxia sobre el grado de peroxidación lipídica de homogenizados de explantos placentarios incubados bajo esas condiciones.

La condición de hipoxia, se tradujo en un aumento significativo en los niveles de peroxidación lipídica de los homogenizados de los explantos (Figura 1). Esto no sucede, cuando los explantos son incubados bajo condiciones de hipoxia, pero en presencia de 2 mM sulfato de magnesio (Figura 2). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Abad (Abad, 2005), quien demostró que el aumento en los niveles de peroxidación lipídica que se produce en fantasmas (membranas) de glóbulos rojos de gestantes normales, al ser éstos irradiados con luz UV, no se producen, si la irradiación es realizada en presencia de sulfato de magnesio en el medio de suspensión de los fantasmas. Esto sugiere que el $MgSO_4$ es capaz de actuar como agente antioxidante, interactuando con los radicales hidroxilos, presentando un comportamiento similar al de un antioxidante conocido, como el BHT (Hidroxi Tolueno Butilado).

Interesantemente, encontramos que el gluconato de magnesio es capaz de ejercer una acción protectora contra la peroxidación lipídica que se produce al incubar los explantos bajo condiciones de hipoxia, muy similar a la ejercida por el sulfato de magnesio (Figuras 2 y 3). La concentración óptima de gluconato de magnesio para ejercer sus efectos antioxidantes en nuestras condiciones de hipoxia. Resultó ser de 4 mM, (Figura 4), ya que con esta concentración logramos protección total, lo cual no se logró al colocar concentraciones menores del fármaco en el medio de hipoxia.

Los resultados de la Figura 5, descartan la posibilidad de que el efecto del sulfato de magnesio pudiera deberse a alguna cualidad del mismo, que bien pudiera expresarse en otras situaciones, diferentes a las presentadas por incubación bajo condiciones de hipoxia. Este no es el caso, ya que los explantos incubados bajo condiciones de normoxia presentan el mismo grado de peroxidación, cuando la incubación se realizó en presencia, como cuando se realizó en ausencia del gluconato de magnesio.

Queremos terminar esta discusión expresando nuestra inquietud de que se continúen las investigaciones sobre preeclampsia y gluconato de magnesio, ya que estamos convencidos que en un futuro no muy lejano el gluconato de magnesio, pudiera ser administrado oralmente como dieta suplementaria durante el embarazo, y llegar a tener un papel fundamental como agente profiláctico contra la preeclampsia.

CONCLUSIONES

Los estudios presentados en este trabajo, demuestran claramente que la presencia de gluconato de magnesio (al igual que el sulfato de magnesio) es capaz de evitar el incremento de los niveles de peroxidación lipídica, que se producen en membranas de explantos de placenta humana a término, cuando estos son incubados bajo condiciones de hipoxia.

El nivel de protección del gluconato de magnesio contra el período de hipoxia practicado en nuestro estudio, es máximo cuando se encuentra a una concentración de 4 mM en el medio de incubación.

Considerando su posible uso futuro en la lucha contra la preeclampsia, pareciera ser importante que se inicien estudios para determinar la posibilidad de que el gluconato de magnesio no solo posea efectos protectores como agente antioxidante, sino que, al igual que el sulfato de magnesio, presente la capacidad de revertir, los parámetros determinados en este trabajo, daños ocasionados por el período de hipoxia placentaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad C (2005) Efectos del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Ca^{+2} y la peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos de gestantes preeclámpticas, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

Abad C, Carrasco MJ, Piñero S, Delgado E, Chiarello DI, Teppa-Garrán A, Proverbio T, Proverbio F & Marín R (2010) Effect of magnesium sulfate on the osmotic fragility and lipid peroxidation of intact red blood cells from pregnant women with severe preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy* 29, 38-53.

Abad C, Teppa-Garran A, Proverbio T, Pinero S, Proverbio F & Marín R (2005) Effect of magnesium sulfate on the calcium-stimulated adenosine triphosphatase activity and lipid peroxidation of red blood cell membranes from preeclamptic women. *Biochem. Pharmacol* 70, 1634-1641.

Aranda P PE, Llopis J (2000) Magnesio. In *Ars Pharmaceutica*, pp. 91-100.

Belfort MA & Moise KJ, Jr. (1992) Effect of magnesium sulfate on maternal brain blood flow in preeclampsia: a randomized, placebo-controlled study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167, 661-666.

Benyo DF, Miles TM & Conrad KP (1997) Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1582-1588.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.

Buhimschi I, Saade G, Chwalisz K & Garfield R (1998) The nitric oxide pathway in preeclampsia: pathophysiological implications. *Human Reprod. Update* 4, 25-42.

Bulkley, G. B. (1983). The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 94, 407-411.

Carreiras MM, Proverbio T, Proverbio F & Marín R (2002) Preeclampsia and calcium-ATPase activity of red cell ghosts from neonatal and maternal blood. *Hypertens. Pregnancy* 21, 97-107.

Carrera F, Casart Y, Proverbio T, Proverbio F & Marín R (2003) Preeclampsia and calcium-ATPase activity of plasma membranes from human myometrium and placental trophoblast. *Hypertens. Pregnancy* 22, 295-304.

Cotton DB, Hallak M, Janusz C, Irtenkauf SM & Berman RF (1993) Central anticonvulsant effects of magnesium sulfate on N-methyl-D-aspartate-induced seizures. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 168, 974-978.

Chesley LC (1979) Parenteral magnesium sulfate and the distribution, plasma levels, and excretion of magnesium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 133, 1-7.

Davison JM, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad KP, Karumanchi SA, Quaggin S, Dechend R & Luft FC (2004) New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 2440-2448.

De Wolf F, De Wolf-Peeters C & Brosens I (1973) Ultrastructure of the spiral arteries in the human placental bed at the end normal pregnacy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 117, 833-848.

Dickens BF, Weglicki WB, Li YS & Mak IT (1992) Magnesium deficiency in vitro enhances free radical-induced intracellular oxidation and cytotoxicity in endothelial cells. *FEBS Lett.* 311, 187-191.

Farkouh LJ, Thorp JA, Jones PG, Clark RH & Knox GE (2001) Antenatal magnesium exposure and neonatal demise. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185, 869-872.

Feix JB, Bachowski GJ & Girotti AW (1991) Photodynamic action of merocyanine 540 on erythrocyte membranes: structural perturbation of lipid and protein constituents. *Biochim. Biophys. Acta* 1075, 28-35.

Greene MF (2003) Magnesium sulfate for preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 348, 275-276.

Halliwell B & Gutteridge JMC (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, U.K.: Clarendon Press.

Henninger RW & Horst J (1997) Magnesium toxicosis in two horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 211, 82-85.

Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rogers GM & McLaughlin MK (1989) Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161, 1025-1034.

Illsley NP, Wang ZQ, Gray A, Sellers MC & Jacobs MM (1990) Simultaneous preparation of paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human placenta. *Biochim. Biophys. Acta* 1029, 218-226.

Kharfi A, Giguere Y, Sapin V, Masse J, Dastugue B & Forest JC (2003) Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. *Clin. Biochem.* 36, 323-331.

Kosch M, Hausberg M, Louwen F, Barenbrock M, Rahn KH & Kisters K (2000) Alterations of plasma calcium and intracellular and membrane calcium in erythrocytes of patients with pre-eclampsia. *J. Hum. Hypertens.* 14, 333-336.

Kovac CM, Howard BC, Pierce BT, Hoeldtke NJ, Calhoun BC & Napolitano PG (2003) Fetoplacental vascular tone is modified by magnesium sulfate in the preeclamptic ex vivo human placental cotyledon. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189, 839-842.

Kuban KC, Leviton A, Pagano M, Fenton T, Strassfeld R & Wolff M (1992) Maternal toxemia is associated with reduced incidence of germinal matrix hemorrhage in premature babies. *J. Child Neurol.* 7, 70-76.

Langman J (1976) *Embriología médica. Desarrollo humano normal y anormal.* México: Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V.

Lazard EM (1925) A preliminary report on the intravenous use of magnesium sulphate in puerperal eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 9, 178-188.

Li S & Tian H (1997) [Oral low-dose magnesium gluconate preventing pregnancy induced hypertension]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 32, 613-615.

Lindheimer MD & Katz A (1985) Hypertension in pregnancy. *N. Eng. J. Med.* 313, 675-680.

Lipstein H, Lee CC & Crupi RS (2003) A current concept of eclampsia. *Am. J. Emerg. Med.* 21, 223-226.

Lucas MJ, Leveno KJ & Cunningham FG (1995) A comparison of magnesium sulfate with phenytoin for the prevention of eclampsia. *N. Engl. J. Med.* 333, 201-205.

MacGillivray I (1958) Some observations on the incidence of preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Emp.* 65, 536-539.

Mak IT, Komarov AM, Kramer JH & Weglicki WB (2000) Protective mechanisms of Mg-gluconate against oxidative endothelial cytotoxicity. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 46, 1337-1344.

Martin RW, Gaddy DK, Martin JN, Jr., Lucas JA, Wiser WL & Morrison JC (1987) Tocolysis with oral magnesium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156, 433-434.

Martin RW, Perry KG, Jr., Martin JN, Jr., Seago DP, Roberts WE & Morrison JC (1998) Oral magnesium for tocolysis: a comparison of magnesium gluconate and enteric-coated magnesium chloride. *J. Miss. State Med. Assoc.* 39, 180-182.

Maulik D, Qayyum I, Powell SR, Karantza M, Mishra OP & Delivoria-Papadopoulos M (2001) Post-hypoxic magnesium decreases nuclear oxidative damage in the fetal guinea pig brain. *Brain Res.* 890, 130-136.

McCall MLS, D. (1956) The action of magnesium sulfate on cerebral circulation and metabolism in toxemia of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 71, 1089-1096.

Mendoza M (2004) Peroxidación lipídica y actividad de la ATPasa de Na,K en membrana plasmática de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

Murthi SB, Wise RM, Weglicki WB, Komarov AM & Kramer JH (2003) Mg-gluconate provides superior protection against postischemic dysfunction and oxidative injury compared to Mg-sulfate. *Mol. Cell Biochem.* 245, 141-148.

Myatt L (2002) Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine* 19, 103-111.

Nelson KB & Grether JK (1995) Can magnesium sulfate reduce the risk of cerebral palsy in very low birthweight infants? *Pediatrics* 95, 263-269.

Pijnenborg R, Robertson W, Brosens I & Dixon G (1981) Trophoblast invasion and the establishment of haemochorialplacentation in man and laboratory animals. *Placenta* 2, 71-91.

Pritchard J, MacDonald P & Gant N (1990) Williams Obstetricia. *Tercera edición Barcelona: Salvat Editores.*

Pritchard JA & Pritchard SA (1975) Standardized treatment of 154 consecutive cases of eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 123, 543-552.

Pritchard JA & Stone SR (1967) Clinical and laboratory observations on eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 99, 754-765.

Redman CWG (1990) The fetal allograft. *Fetal Med. Rev.* 2, 21-27.

Roberts JM (1995) Magnesium for preeclampsia and eclampsia. *N. Engl. J. Med.* 333, 250-251.

Roberts JM (1998) Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 16, 5-15.

Roberts JM & Cooper DW (2001) Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 357, 53-56.

Roberts JM & Redman CWG (1993) Preeclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 341, 1447-1451.

Scardo JA, Hogg BB & Newman RB (1995) Favorable hemodynamic effects of magnesium sulfate in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173, 1249-1253.

Sibai B, Gordon T, Thon E, Caritis S, Klebanoff M, McNellis D & Paul R (1995) Risk factors for preeclampsia in healthy nuliparous women: A prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172, 642-648.

Sibai BM (1990) Magnesium sulfate is the ideal anticonvulsant in preeclampsia-eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 162, 1141-1145.

Sibai BM (2003) Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 102, 181-192.

Silver RK, Turbov JM, Beaird JA & Golbus J (1990) Soluble factors produced by isolated first-trimester chorionic villi directly inhibit proliferation of T cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163, 1914-1919.

Sotnikova EI (1986) Short and long-term results of pregnancy termination by different methods. *Acta Med. Hung.* 43, 139-143.

Southorn, P. & Powis, G. (1988). Free Radicals in Medicine. I.- Chemical Nature and Biological Reactions. *Mayo Clin. Proc.* 63, 381-389.

Spickett CM, Reglinski J, Smith WE, Wilson R, Walker JJ & McKillop J (1998) Erythrocyte glutathione balance and membrane stability during preeclampsia. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1049-1055.

Walsh SW, Romney AD, Wang Y & Walsh MD (1998) Magnesium sulfate attenuates peroxide-induced vasoconstriction in the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178, 7-12.

Watson KV, Moldow CF, Ogburn PL & Jacob HS (1986) Magnesium sulfate: rationale for its use in preeclampsia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1075-1078.

Zeeman GG & Dekker GA (1992) Pathogenesis of preeclampsia: a hypothesis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 35, 317-337.

ANEXO 1

Bioquímica y Mecanismos de Acción de los Radicales Libres

Un radical libre ($R^{\cdot}$) constituye una molécula o fragmento molecular que contiene uno o más electrones no apareados en su orbital más externo. Una molécula puede convertirse en radical libre, tanto por ganancia como por pérdida de electrones, y también por fisión de enlaces homolíticos (Halliwell & Gutteridge, 1989). Cuando un enlace covalente se rompe simétricamente, ambos fragmentos retienen un electrón, y por lo tanto, se convierten en radicales libres. El estudio de los radicales libres se ha enfocado desde el punto de vista médico y biológico, ya que las interacciones de los radicales libres con moléculas orgánicas han sido implicadas en un gran número de estados patológicos, los cuales pueden jugar un papel significante en el daño tisular (Bulkley, 1983).

Muchos organismos requieren del oxígeno para su sobrevivencia, en donde el oxígeno es utilizado por las células para oxidar compuestos orgánicos. El oxígeno molecular (O_2) actúa como elemento oxidante al aceptar hasta cuatro electrones en su orbital más externo (reducción tetravalente) para dar lugar a dos moléculas de agua:

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2\,H_2O \quad [1]$$

El oxígeno también puede sufrir reducción univalente, divalente o trivalente (al aceptar uno, dos o tres electrones) dando lugar a la formación de especies activadas de oxígeno. Los productos respectivos son: radical anión superóxido ($^{\cdot}O_2^-$), el intermediario peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($^{\cdot}OH$):

$$O_2 \xrightarrow{e^-} {}^{\cdot}O_2^- \xrightarrow[2H^+]{e^-} H_2O_2 \xrightarrow{e^-} 2\,{}^{\cdot}OH \xrightarrow[2H^+]{e^-} 2\,H_2O \quad [2]$$

A lo largo de la evolución, mientras las células desarrollaban los mecanismos de utilización de oxígeno, desarrollaban simultáneamente mecanismos de defensa contra la toxicidad del mismo. Un incremento o una disminución significativa del oxígeno disponible para las células, resulta en alteraciones bioquímicas profundas, las cuales pueden culminar en daño estructural e inclusive hasta la muerte celular (Halliwell & Gutteridge, 1989).

En condiciones normales, las células cuentan con mecanismos de protección, enzimáticos y no enzimáticos, contra los radicales libres.

Proceso de peroxidación lipídica

El ataque a los fosfolípidos de membrana por los radicales libres se centra fundamentalmente en el proceso de peroxidación lipídica de los residuos de ácidos grasos de los fosfolípidos.

Se considera que el proceso de peroxidación lipídica ocasiona cambios en la composición química y deterioros en la organización ultraestructural de las membranas celulares (Gutteridge & Halliwell, 1990), disminuyendo la fluidez de las mismas, alterando su permeabilidad e inactivando receptores y enzimas unidas a la membrana (Halliwell & Gutteridge, 1989).

El proceso de peroxidación lipídica como tal es complejo y puede entenderse como un mecanismo por el cual los lípidos insaturados reaccionan con el oxígeno para producir hidroperóxidos lipídicos (Southorn & Powis, 1988):

$$LH + O_2 \longrightarrow LOOH \quad [3]$$

Donde LH es un lípido y LOOH es el hidroperóxido resultante.

El mecanismo intrínseco de peroxidación lipídica puede describirse como sigue: la reacción es iniciada por el ataque de radicales libres, los cuales sustraen un átomo de hidrógeno de un carbono metileno en la cadena lateral de un ácido graso de un fosfolípido. El átomo de hidrógeno es un radical libre de por sí (puesto que tiene un electrón singlete desapareado) y su remoción deja un electrón desapareado en el átomo de carbono atacado. A este proceso descrito se le ha denominado iniciación de la peroxidación lipídica.

El radical carbonilo ($L^{\cdot}$) resultante sufre rearreglos moleculares originando un dieno conjugado, y en presencia de oxígeno molecular da lugar al radical peróxilo. Los radicales peróxilo pueden sustraer un átomo de hidrógeno de otra molécula vecina (LH), la cual puede ser otro ácido graso poliinsaturado, formándose así un hidroperóxido (LOOH) y un nuevo radical lipídico ($L^{\cdot}$), entrando la peroxidación lipídica en un proceso de propagación. El grado de propagación de la reacción depende de muchos factores, entre ellos, la relación lípido/proteína en la membrana (la oportunidad de reaccionar un radical con una proteína se incrementa cuando el contenido de proteína aumenta), de la composición de ácidos grasos, concentración de oxígeno y de la presencia dentro de la membrana de antioxidantes que inhiban la propagación de la reacción. El hidroperóxido lipídico puede en adelante degradarse a una variedad de productos. Además, en presencia de metales de transición, como Fe^{++}, Cu^{+}, el hidroperóxido produce un radical alcóxilo ($LO^{\cdot}$) y un radical hidróxilo ($^{\cdot}OH$), los cuales causan la ramificación de la reacción, involucrando un mayor número de moléculas del sustrato en el proceso de peroxidación. Cuando la concentración de moléculas de sustrato se hace pequeña, los radicales libres comienzan a reaccionar entre sí, en distintas combinaciones provocando la formación de productos excitados (P^{*}). El paso de estos productos excitados a su estado estable (P) ocurre con la emisión de cuantos de luz visible. Estas reacciones reciben el nombre de reacciones de terminación y con ellas concluye la reacción en cadena mediada por radicales libres (Southorn & Powis, 1988).