Actividad de las enzimas antioxidantes

en el riñon de la rata con preeclampsia experimental

Rat kidney antioxidant enzyme activities in experimental preeclampsia

Camacho E, Silva JA, Matos MG, Garrido MR, *Israel A.
Laboratorio de Neuropéptidos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas - Venezuela.
*Correspondencia: Apartado Postal 50176, Sabana Grande 1050A, Caracas, Venezuela. E-mail: astern88@gmail.com

Recibido: 20/02/2011 Aceptado: 20/03/2011

Resumen

La preeclampsia (PE) es un trastorno multisistémico del embarazo caracterizado por hipertensión, proteinuria y edema. La PE se asocia con la disfunción endotelial, el estrés oxidativo y con la disminución de la actividad de la sintasa del óxido nítrico (SON) endotelial. Los mecanismos de la vasodilatación asociada al embarazo normal sugieren que el óxido nítrico (NO) es el más importante mediador en la reducción de la resistencia vascular, mientras que en la PE la respuesta dilatadora dependiente de endotelio y mediada por el NO se encuentra reducida. Se ha demostrado que la inhibición de la síntesis del NO mediante la administración crónica de L-NAME en ratas preñadas, resulta en un modelo animal que ocasiona un síndrome similar a la PE, el cual cursa con hipertensión, proteinuria, trombocitopenia y retardo de crecimiento intrauterino. Con el fin de caracterizar las alteraciones renales que ocurren durante la PE, empleamos este modelo animal de preeclampsia inducido por la inhibición de la SON, en ratas de 13 días de gestación. Se cuantifico la posible alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), superoxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), así como la SON renal. El tratamiento crónico con L-NAME en ratas preñadas incrementó la PAM (+20 mmHg), produjo proteinuria, sin embargo no altero significativamente el número y el peso de los fetos. El estudio histológico de los riñones de animales pre-eclámpticos mostró que los mismos presentan tumefacción turbia de epitelios tubulares, focos hemorrágicos y congestión de capilares glomerulares. El tratamiento crónico con L-NAME en las ratas preñadas redujo la actividad de las tres enzimas antioxidantes evaluadas y de la SON renal. Estos hallazgos sugieren que la PE experimental cursa con alteración renal asociada con la reducción de la actividad antioxidante y la inhibición de la SON.

Palabras claves: preeclampsia, oxido nítrico, estrés oxidativo

Abstract

Preeclampsia (PE) is a multisystem disorder of pregnancy characterized by hypertension, proteinuria and edema. PE is associated with endothelial dysfunction, oxidative stress and decreased endothelial nitric oxide synthase activity. The mechanisms of normal pregnancy-associated vasodilation suggest that nitric oxide (NO) is the most important mediator for the reduction of vascular resistance. Many studies demonstrate reduction of endothelium-dependent dilator response mediated by NO in PE. Inhibition of NO synthesis is an animal model which results in a PE-like syndrome, hypertension, proteinuria, thrombocytopenia and intrauterine growth retardation. In order to assess the possible renal alteration in this animal model of preeclampsia induced by chronic administration of L-NAME, we determined the antioxidant enzymes activities (catalase, superoxide dismutase and gluthation peroxidase) and nitric oxide sinthase in the rat kidney. Chronic L-NAME treatment in pregnant rats increased MAP (+20 mmHg), produced proteinuria and did not change the number and weight of fetuses. Histological examination of the kidneys showed cloudy swelling PE tubular epithelia, hemorrhagic foci and congestion of glomerular capillaries. In addition, L-NAME treatment reduced CAT, SOD, GPx and NOS activity in the kidney. These findings suggest that in experimental preeclampsia, renal alterations are associated with a reduction in the antioxidant enzyme and NOS activities.

Key words: preeclampsia, nitric oxide, oxidative stress

Introduccion

Si bien la etiología de la preeclampsia no es totalmente conocida, en los últimos años se ha avanzado notablemente en el conocimiento de los posibles mecanismos fisiopatológicos que en ella intervienen. La preeclampsia se considera como un desorden hipertensivo que ocurre principalmente por una mala adaptación placentaria, que involucra disfunción endotelial y que afecta consistentemente al riñón (Shah, 2005). La génesis del proceso reside, probablemente, en una implantación anómala del trofoblasto placentario mediado por mecanismos inmunológicos y quizás genéticos. Esto provoca hipoperfusión útero-placentaria, la cual favorece a la liberación de sustancias citotóxicas que lesionan difusamente al endotelio causando disfunción endotelial y vasoconstricción generalizada (riñón, cerebro, hígado, etc), así como activación de la cascada de la coagulación. Además se produce la activación del sistema nervioso simpático y el desequilibrio entre la síntesis de sustancias vasodilatadoras (prostaciclina y óxido nítrico) y vasoconstrictoras (tromboxano A_2 y endotelina), desviándose el equilibrio hacia estas últimas (Seligman y col., 1994; Lyall y Greer, 1996; Silver y col., 1996; Dekker y Sibai, 1998; Clambers y col., 2001; Roberts y Cooper, 2001; Pacheco, 2003).

Además de la liberación de sustancias vasoactivas y angiogénicas, como la angiotensina II, se liberan sustancias como el anticuerpo anti-receptor AT_1 (AT1-AA) y de un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) el sFlt-1 (placental soluble fms-like tyrosine kinase 1). Este último, al reducir los niveles circulantes del VEGF y del factor de crecimiento placentario (PIGF), contribuyen a la hipertensión, la disfunción endotelial y al daño renal (Bank y col., 1998; Tsataris y col., 2003). Aún más, el predominio de la liberación de sustancias vasoactivas que ocurre en la placenta, a su vez favorece a la activación de vías intrínsecas y extrínsecas de la coagulación, y con ello se genera incremento de tromboxanos, citoquinas, factor de necrosis tumoral que afecta también la integridad endotelial vascular.

Como consecuencia al daño endotelial que ocurre en los vasos sanguíneos, se produce un incremento del estrés oxidativo y por ende de la producción de especies reactivas de oxigeno (ERO), lo cual conlleva a un aumento de la reactividad vascular a la angiotensina II periférica y al daño renal (Shah, 2005). Otro de los factores que influyen en el daño renal en la preeclapmsia, es la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPX placentarias, a los altos niveles de malonil-dialdehido (MDA) (producto final de peroxidación lipídica), al incremento de tromboxanos y lipoperóxidos. Por ello, la desregulación funcional está asociada a una baja protección oxidativa que favorece a la insuficiencia renal (Balal y col., 2003).

La disfunción endotelial en el riñón en la preeclampsia se manifiesta por disminución del flujo plasmático renal (FPR) y de la tasa de filtración glomerular (TFG), presencia de proteinuria que puede estar en rango nefrótico, así como tambiér evidencia morfológica de endoteliosis glomerular (Munkhau gen y Egil, 2009).La evidencia indica que durante el emba razo normal existe una adaptación fisiológica vascular, que comprende un incremento en el volumen sanguíneo, un au mento del gasto cardiaco y una disminución de la resistencia periférica vascular, acompañada de un incremento endógeno en la producción de oxido nítrico (ON), y un aumento en la respuesta vascular dependiente del endotelio intacto (Bu himschi y col., 1998). Actualmente no existen dudas que e incremento de la producción de ON en el endotelio vascular y su bioactividad normal constituyen mecanismos críticos que explican la adaptación hemodinámica en el embarazo norma (Lopez-Jaramillo y col., 2008).

Ahora bien, la característica más importante observada en la preeclampsia es la vasoconstricción generalizada. Debido a ello, se ha propuesto la existencia de una alteración en la síntesis de ON endotelial. En efecto, se ha demostrado que durante la preeclampsia ocurre una disminución de la concentración de nitratos y nitritos, asociada a disminución de los niveles de GMPc, cuando se compara con pacientes controles. Además, existe una disminución de la biodisponibi lidad del ON, posiblemente mediado por la acumulación de la dimetilarginina asimétrica (ADMA), un inhibidor endógeno de la sintasa de oxido nítrico endotelial (Slaghekke y col., 2006) al posible incremento de la actividad arginasa endotelial (De mougeot y col., 2005) y a un incremento del estrés oxidativo responsable de la rápida degradación del ON, especialmente debido a su gran reactividad con el anión superóxido para formar peroxinitrito, lo cual explicaría la vasoconstricción pe riférica, la disfunción endotelial y las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Lopez-Jaramillo y col., 2008).

Debido a la fuerte evidencia que indica el papel primordia del ON y su desregulación en la preclampsia, se genero un modelo experimental que resulta de la inhibición crónica de la síntesis de ON mediante la administración crónica de L-NAME a ratas preñadas. En este modelo los animales desarrollan hi pertensión, y cambios fisiológicos como la potenciación de la respuesta presora a la angiotensina II, vasopresina y noradre nalina, proteinuria e incremento de la agregación plaquetaria similar a los cambios que ocurren en la preeclampsia humana (Molnar y Hertelendy, 1992). El tratamiento de L-NAME en ratas preñadas produce disfunción renal, vasoconstricción en las arterias renales, y una disminución en la tasa de filtración glomerular, alteraciones en la placenta, trombosis en los va sos sanguíneos. De manera que la reduccion de oxido nítrico en ratas preñadas desarrolla un buen modelo de preeclamp sia muy similar a la preeclampsia desarrollada en humanos (Pandhi y col., 2001).

Aun cuando se conoce algo acerca de las generalidades de este modelo experimental, no se ha caracterizado la contri bución relativa del estrés oxidativo y de la actividad de las enzimas antioxidantes en la alteración de la función renal en este modelo de preeclampsia.

Materiales y metodos

Animales y protocolos de experimentación

Como animales de experimentación se utilizaron ratas hembras primigestas, de la cepa Sprague-Dawley, de 12-13 semanas de edad, provenientes del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental (Caracas), mantenidas bajo libre acceso al agua y a la comida (Ratarina®) hasta el momento del experimento. Después del apareamiento, la presencia del espermatozoide en el frotis vaginal marca el día 1 de la gestación. A partir del día 13 de la gestación, los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos. Los animales del grupo I recibieron una dosis de 50 mg/kg/día de N^{ω}-nitro-L-arginina (L-NAME) administrada por vía intraperitoneal, durante 7 días. El grupo II recibió solo vehículo (solución fisiológica). Todos los animales fueron pesados dos veces a la semana y se les determinó la presión arterial sistólica, diastólica y frecuencia cardiaca.

Al día 20 de la gestación, los dos grupos experimentales de animales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales para la recolección de orina de 24 horas. Inmediatamente después de la recolección de las muestras de orina los animales fueron sacrificados por decapitación, se recolectaron muestras del riñón y los fetos los cuales fueron colocadas inmediatamente en hielo. Los fetos fueron cuantificados y pesados y las cortezas renales fueron homogenizadas y congeladas a -20ºC, hasta su utilización en los ensayos respectivos.

Los procedimientos empleados en los experimentos fueron sometidos para su aprobación, al Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996).

Determinación de la presión arterial (PA) y de la frecuencia cardiaca (FC)

Para la determinación de la PA (PAS y PAD) y FC se utilizó el método indirecto no invasivo mediante el empleo de un pletismógrafo digital de cola (Digital Pressure Meter LE 5000, LETICA y el Pressure Cylinder LE 5100, LETICA® Scientific Instruments, Barcelona, España). Para ello, las ratas fueron calentadas en una estufa graduada a 42ºC durante 15 minutos, y luego colocados en un cepo para la determinación no invasiva de los parámetros cardiovasculares. Estos fueron determinados a la misma hora del día durante los períodos de entrenamiento y del experimental. La PAM fue calculada de acuerdo a la formula: PAD+1/3(PAS-PAD).

Determinación de la excrecion urinaria de sodio

El volumen urinario se determinó volumétricamente y se expresó en ml/100g de rata. La cantidad de sodio en las muestras de orina recolectadas de 24 horas, se cuantificó mediante fotometría de llama (Corning® 405 de Corning Medical Instruments, Halsted, Essex, UK). Los resultados fueron expresados en μEq/100g de rata.

Cuantificacion de la excrecion urinaria de proteinas

Se empleó el método colorimétrico basado en el método de Biuret, en el cuál se determina la cantidad de proteínas presentes en la orina mediante la formación de un quelato coloreado, donde ocurre una reacción entre los iones cúpricos y los enlaces peptídicos. El método se fundamenta en la co precipitación de proteínas, en presencia del reactivo de rojo Ponceau y la adición del ácido tricloroacético. La concentración de proteínas urinaria se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 560 nm. La concentración de proteínas en orina se calculó mediante la utilización de una curva estándar de albúmina sérica de bovino y los resultados se expresaron como mg de proteínas/100 g de rata (Pesce y Strande, 1973).

Ensayo de la actividad de la sintasa oxido nitrico (SON)

La actividad de la SON fue determinada mediante la cuantificación de la conversión de L-arginina radiomarcada a [^{3}H citrulina, utilizando una modificación del método descrito po Bredt y Snyder (1990). Los tejidos fueron mantenidos en Buffer hepes 50 mM, pH 7 + EDTA 1 mM. Cada muestra fue preincubada por 30 minutos a 37 ºC en buffer Hepes 50 mM pH 7,1, conteniendo ditiotreitrol 1 mM, β-NADPH 0,5 mM; CaCl 1,25 mM y 10 μg/μl de calmodulina, [^{3}H] arginina 0,12 μM y arginina 0,3 μM y posteriormente, sometidos a un período de incubación de 10 minutos. La reacción fue detenida agregando buffer Hepes 20 mM, pH 5,5, EDTA 4mM, frío y calentado durante 5 minutos a 90 ºC. Los tejidos fueron sonicados, centrifugados a 12.000 rpm durante 4 minutos y el sobrenadante colocado sobre una columna de Dowex 50, forma Na^+ (Bio Rad). La [^{3}H]citrulina será eluída con 2 ml de agua y cuantificada mediante espectroscopia de centelleo líquido.

La identificación de la [^{3}H]citrulina se realizó utilizando cromatografía de papel mediante comparación del tiempo de retención con un patrón de citrulina no radiomarcada. Los resultados se expresaron como picomoles de [^{3}H]citrulina formados/hora/mg de proteína.

Determinacion de la actividad enzimatica de la catalasa (CAT)

La actividad de la catalasa fue determinada empleando una modificación del método de Aebi (1984), que basa en la disminución de la absorbancia del H_2O_2 debido a su degradación enzimática del H_2O_2, y monitoreada a una longitud de onda de 240 nm, a 25ºC. Brevemente, en una celda de cuarzo se colocan 25 μL de homogenizado del tejido diluido 1.33 en amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 7), se adiciona 725 μL de H_2O_2 7,7 mM e inmediatamente se mide el cambio de absorbancia a 240 nm, a los 15 y 30 segundos. De acuerdo a Aebi, se utiliza la constante de reacción de primer orden (k como la unidad de actividad de la CAT, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula: $k = (1/t)\ (2{,}3 \times \log A_1/A_2)$ donde t es el intervalo de tiempo medido (seg), A_1 y A_2 son las absorbacias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2. Los resultados se expresan como k/mg de proteína.

Determinacion de la actividad de la enzima superoxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se determinó mediante una modificación del método de Oberley y col. (1984), el cual mide la capacidad SOD presente en la muestra para inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por el anión superóxido generado a través del sistema de la xantina-xantina oxidasa presente en la mezcla de reacción. Los resultados son expresados como U/mg proteína. Una U de actividad SOD se define como la cantidad de enzima requerida para inhibir en un 50% la formación de los cristales de formazán.

Actividad de la glutation peroxidasa (GPX)

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) fue determinada de forma indirecta de acuerdo al método descrito por Flohé (1984), mediante una reacción acoplada con la glutatión reductasa. El glutatión reducido es empleado por la GPx para reducir el peróxido de hidrógeno, el cual es regenerado por la glutatión reductasa a partir de glutatión oxidado y NAD(P)H. La reacción mide la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NAD(P)H. Los resultados fueron expresados como actividad enzimática en U/mg proteína (ε = 6.22 mM^{-1} cm^{-1}). Una U de GPX representa un mmol de NAD(P)H oxidado/min por mg proteína.

Determinacion las proteinas tisulares

Las proteínas tisulares totales fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951) utilizando albúmina sérica de bovino como patrón. Las muestras fueron ajustadas a una concentración de 10-20 μg de proteínas/10 μl.

Histología renal

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación, se practicó una incisión en la parte media del abdomen, y el riñón izquierdo fue extraído, decapsulado y pesado. El riñón derecho, fue fijado en formalina y embebido en parafina para los estudios histopatológicos, utilizando rebanadas de riñón de unas 4-6 micras. Los estudios morfológicos fueron realizados por un observador ciego con respecto al grupo de tratamiento al que pertenece el animal.

La glomerulosclerosis o el daño tubulointesticial, fue evaluado mediante el uso de una escala semicuantitativa. Las rebadadas de rinón embebidas en parafina, fueron marcadas con eosina y hematoxilina y observadas bajo un microscopio de luz. Treinta glomérulos en cada riñón fueron clasificados de acuerdo a la severidad del daño glomerular: 0= normal; 1= daño leve, la matriz mesangial o la hialinosis con adhesión focal afecta menos del 25% de los glomérulos; 2= esclerosis del 25 al 50%; 3= esclerosis del 50 al 75%; y 4= esclerosis de más del 75% de los glomérulos. Veinte campos de área tubulointersticial, fueron observados y clasificados según se describe a continuación: 0= normal; 1= el área de inflamación intersticial y fibrosis abarca menos del 25% del campo; 2= área de lesión entre el 25 y el 50% del campo; y 3= la lesión involucra más del 50% del campo. El índice de daño tubulointersticial o glomerular, fue calculado promediando los puntajes asignados a los glomérulos o a los campos tubulares.

Análisis estadístico

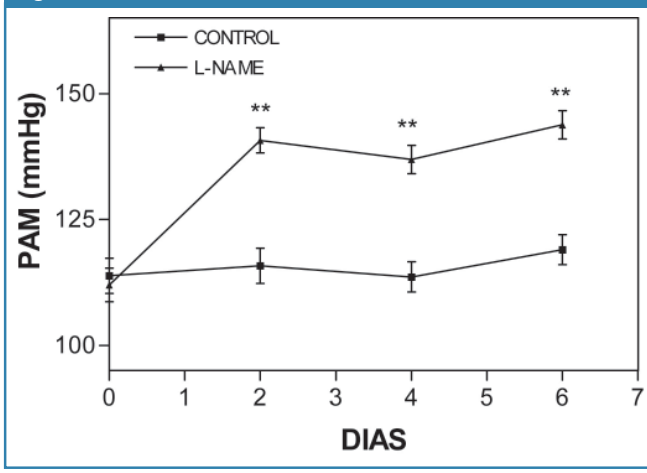
Todos los resultados fueron expresados como la media más o menos el error estándar de la media (X ± EEM). Las diferencias entre los grupos se determinarán mediante el uso de la prueba de "t" de Student y el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Un valor de $p<0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

Presión arterial media y excreción urinaria de proteínas y sodio en ratas con preeclampsia experimental inducida mediante el tratamiento con L-NAME.

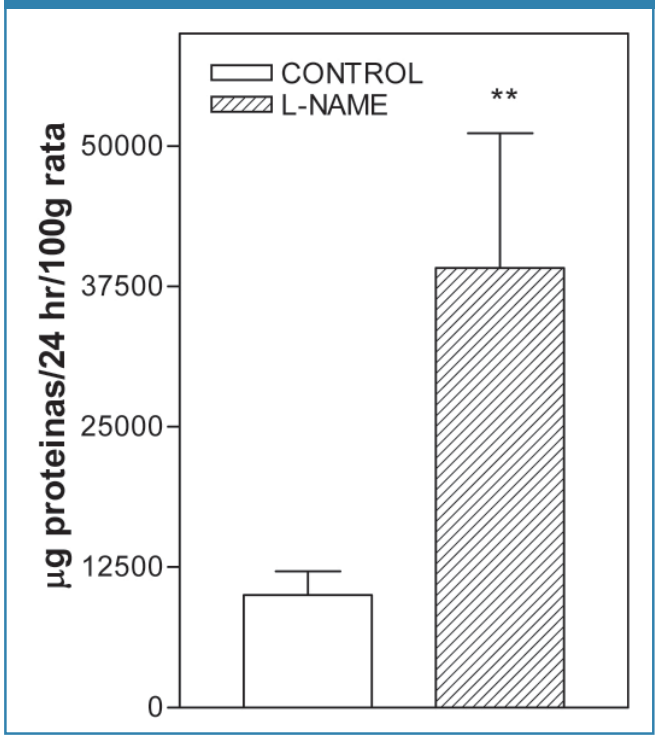
El tratamiento a ratas preñadas con L-NAME durante 7 días consecutivos produjo un incremento significativo de la presión arterial media, cuyos valores alcanzaron a valores de PAM de 143,8 ± 3 mmHg (Figura 1). De igual forma, el tratamiento con L-NAME redujo la excreción urinaria de sodio sin alterar significativamente el volumen urinario, mientras que elevó significativamente la excreción urinaria de proteínas (Tabla I y Figura 2). Aun cuando no se observaron reducciones en el numero de fetos después del tratamiento con L-NAME, si se produjo una reducción significativa en el peso promedio de los fetos asociada con incremento de la necrosis (Tabla I). La observación al microscopio de luz (Figura 3) muestra que el riñón de la rata preñada sin tratamiento se observa tumefacción turbia y edema glomerular (A y B) mientras que en el riñón proveniente de las ratas preñadas y tratadas con L-NAME se observa tumefacción turbia de epitelios tubulares, focos hemorrágicos y congestión de capilares glomerulares (C y D).

Figura 1



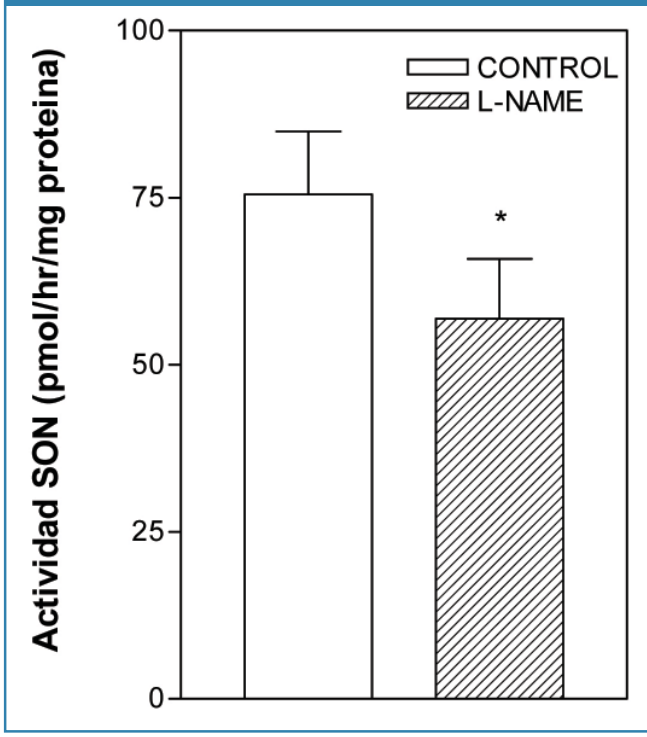
Efecto del L-NAME sobre el curso temporal de la presión arterial media en ratas preñadas. N= 35 por grupo. **$p<0,001$ comparado con ratas tratadas con L-NAME.

Figura 2



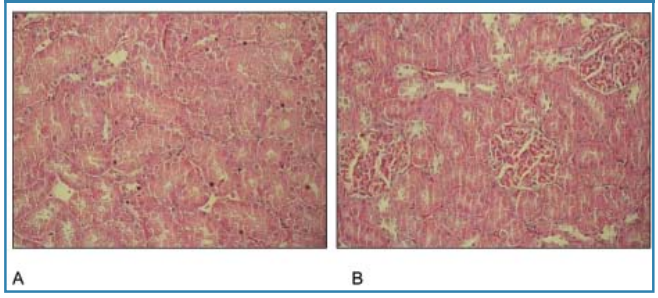
Excreción urinaria de proteínas en ratas con preeclampsia inducida por el tratamiento con L-NAME. N= 29-35 animales por grupo. **p<0,001 comparado con ratas preñadas control.

Figura 4



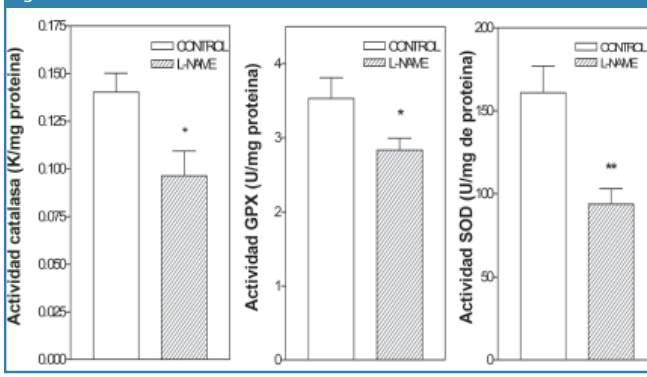
Actividad de la sintasa de oxido nítrico (SON) renal en ratas con pre-eclampsi inducida por el tratamiento con L-NAME. N= 8 por grupo. *p<0,001 comparad con ratas preñadas control.

Figura 3



A. Riñón ratas preñadas tratadas con vehículo: tumefacción turbia. Edema glomerular. B: Riñón de ratas tratadas con L-NAME: tumefacción turbia de epitelios tubulares, congestión de capilares glomerulares y glomérulos de mayor volumen. Tinción con eosina y hematoxilina.

Figura 5



Actividad de las enzimas antioxidantes renales: catalasa (N=31-39 por grupo glutatión peroxidasa (N= 45 por grupo) y superoxido dismutasa (N= 37-45 po grupo), en ratas con pre-eclampsia inducida por el tratamiento con L-NAME *p<0,01; **p<0,001, comparado con ratas preñadas control.

Tabla I

	CONTROL	L-NAME
NUMERO DE FETOS	11,11 ± 0,5	11,95 ± 0,5
PESOS /No. DE FETOS (g)	1,18 ± 0,2	1,11 ± 0,1
NECROSIS	0	1,5±0,1 *
VOLUMEN URINARIO (ml/100g)	4,58 ± 0,9	4,48 ± 1,2
EXCRECION URINARIA DE SODIO (µEq/100g)	149,5 ± 2,2	115,5 ± 9 *

*p<0,05. N= 28-40 por grupo.

Discusion

Los resultados del presente trabajo están en concordancia con las evidencias acerca de un modelo experimental de preeclampsia que resulta de la inhibición crónica de la síntesis de ON mediante la administración de L-NAME a ratas preñadas y ratifican el papel primordial del ON y su desregulación en la preclampsia. En efecto, el tratamiento crónico con L-NAME, produjo un incremento significativo de la presión arterial similar a lo que ocurren en la preeclampsia humana (Molnar y Hertelendy, 1992). Efectivamente, la preeclampsia es un desorden hipertensivo que ocurre principalmente por una mala adaptación placentaria, que involucra disfunción endotelial, la cual afecta consistentemente al riñón (Shah, 2005). Nuestros hallazgos apoyan este concepto ya que la PE inducida por la inhibición de la síntesis de oxido nítrico, tal y como lo demuestra nuestros hallazgos de la disminución significativa de la actividad de la SON renal en ratas preñadas, estuvo asociada a disfunción endotelial en el riñón que se manifestó por proteinuria, así como evidencias morfológicas de endoteliosis glomerular (Munkhaugen y Egil, 2009). Así, se observó una lesión renal precisa, identificable mediante microscopía de luz, caracterizada por tumefacción turbia de las células endoteliales tubulares, focos hemorrágicos y congestión de capilares glomerulares, posibles responsables de las alteraciones de la función renal. Al respecto, se ha demostrado que mientras que en el embarazo normal, aumenta la tasa de filtración glomerular (TFG), por un aumento del flujo plasmático renal FPR, las alteraciones funcionales a nivel renal en la mujer preeclámptica incluyen disminución del flujo plasmático renal (FPR) y la tasa de filtración glomerular (TFG), como también proteinuria que puede estar en rango nefrótico (Moran y col., 2003).

Otro hallazgo significativo en este estudio fue la observación de los signos clásicos de la preeclampsia signos clásicos de la preeclampsia en ratas, como lo es el retardo en el crecimiento intrauterino e incremento necrosis fetal, signos que probablemente son debidos a la vasoconstricción y a la isquemia de la unidad fetoplacentaria descrita en la preeclampsia.

Ahora bien, el estrés oxidativo es un desbalance entre las fuerzas pro-oxidantes y anti-oxidantes y se ha demostrado que en los embarazos con preeclampsia ocurre una significativa disminución de la protección anti-oxidante. Muchas son las causas que parecen están involucradas en el incremento del estrés oxidativo en la preeclampsia. Se ha postulado que el incremento del estrés oxidativo y la producción de anión superóxido en la preeclampsia (Biri y col., 2007) se asocia a una temprana placentación anormal con isquemia placentaria e hipoxia (Gilbert y col., 2007); a la presencia de anticuerpos anti-receptores AT_1 de angiotensina II (Xia y col., 2003), a alteraciones en el metabolismo de carbohidratos asociado a la resistencia a la insulina con sobrepeso y obesidad (Joffe y col., 1998) y a la presencia de infecciones subclínicas en la vagina, sistema urinario y enfermedad periodontal (Herrera y col., 2007). Todas estas alteraciones conducen a una reacción inflamatoria intravascular generalizada y un estado de estrés oxidativo que produce disfunción endotelial que pre dispone a la mujer embarazada a desarrollar preeclampsia (Herrera y col., 2001). En estudios de placentas de mujeres con preeclampsia comparadas con placentas normales, se ha demostrado en las primeras un aumento de la peroxidación de lípidos mitocondriales y de la generación de superóxidos lo que podría contribuir y ser una fuente importante de estrés oxidativo en la placenta (Wang y Walsh, 1998). Debido a este desbalance oxidativo de origen placentario, se ha postulado que la hipoperfusión sanguínea mediada por la angiotensina II, la vasoconstricción sistémica y el estrés oxidativo placentario, son factores responsables de la disfunción endotelia vascular renal, y que contribuye con el desarrollo de la preeclampsia (Shah, 2005).

Uno de los factores que podrían influir en daño renal en la preeclapmsia, es el estrés oxidativo local que resultaría, entre otras causas, por la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes renales. Nuestros resultados apuntan a esa posibilidad ya que la inhibición de la síntesis de ON que genera un modelo de PE experimental con endoteliosis glomerular, estuvo asociada a la disminución significativa de tres de las enzimas antioxidantes renales: la catalasa, la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. La disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, las cuales son mecanismos enzimáticos que defienden en situaciones de estrés oxidativo, sugiere que la desregulación de la funcionalidad renal están asociados a una baja protección oxidativa que favorece a la insuficiencia renal (Balal y col., 2003). El organismo normalmente contiene mecanismos enzimáticos antioxidantes que limita este proceso. Sin embargo, en ciertas circunstancias estos mecanismos regulatorios no pueden controlar el balance redox intracelular, generando elevadas concentraciones de peróxidos lipídicos (Buhimschi y col. 1998) y anión superóxido, el cual es capaz de unirse al ON y formar peroxinitrito, este ultimo al unirse a proteínas es altamente citotóxico; además, los niveles elevados de peroxinitrito reducen la biodisponibilidad de ON con todos los efectos perjudiciales que a nivel vascular y renal esto implica.

En conclusión, en la preeclamsia experimental inducida por la inhibición crónica de la SON, la disfunción renal se asocia a una disminución de los mecanismos antioxidantes renales lo que conduce a un incremento del estrés oxidativo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Banny Caraballo por su ayuda técnica en los experimentos. Este trabajo fue subvencionado por el Ministerio Popular de Ciencia Tecnología e Industrias, Proyecto Misión Ciencia, Sub-proyecto 7, ECCV No 2007001585.

Referencias

Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984; 105:121-126.

Balal M, Karayaylah I, Payda S, Seyrek N, Canacankatan N, Kayrin L. 2003. Oxidative Anti-Oxidative System In Peripartum Acute Renal Failure And Preeclampsia –Eclampsia. Journal of the Turkish Society of Sephrology 12 (3) 141-147.

Banks RE, Forbes MA, Searles J, Pappin D, Canas B, Rahman D, Kaufmann S, Walters CE, Jackson A, Eves P, Linton G, Keen J, Walker JJ, Selby PJ. 1998. Evidence for the existence of a novel pregnancy-associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1 Mol Hum Reprod 4(4):377-86.

Biri A, Bozkurt N, Gunaydina G, Korucuoglu U, Durakb IM, Kavutcu C. 2007. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in preeclampsia. Intern J Gynecol Obst 96: 196–207.

Bredt DS, Snyder SH. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc Natl Acad Sci USA. 87(2):682-685.

Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. 1998. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications Human Reproduction Update. European Society for Human Reproduction and Embryology 4(1):25-42.

Clambers JC, Fusi L, Malik IS, Haskard DO, De Swiet M, Kooner JS. 2001. Association of Maternal Endothelial Dysfunction with Preeclampsia. JAMA. 285(12): 1607-1612.

Dekker GA, Sibai BM. 1998. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. Am J Obstet Gynecol 179: 1359-75.

Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A. 2005. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens 23:971-978.

Flohé L, Günzler WA. 1984. Methods Enzymol. Assays of glutathione peroxidase. Display Settings. 105:114-21.

Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M., Sydney R. Murphy, Joey P Granger. 2008. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 294: H541–H550.

Herrera JAG, Chaudhuri G, López-Jaramillo P. 2001. Is infection a major risk for preeclampsia? Med. Hipotheses. 57:393-397.

Herrera J.A. Parra B, Herrera E, Botero JE, Arce RM, Contreras A, López-Jaramillo P. 2007. Periondontal disease severity related to high levels C-reactive protein in preeclampsia. J Hypertens. 25:1459-1464.

Joffe GM, Esterlitz J, Levine R, Clemens J, Ewell M, Sibai B, Catalano P. 1998. The Relationship Between Abnormal Glucose Tolerance And Hypertensive Disorders Of Pregnancy In Healthy Nilliparous Women. Calcium for Preeclampsia Prevention. (CPEP) Study Group. Am J Obstet Gynecol 179: 1032-1037.

López-Jaramillo P, Arenas WD, García R, Rincon MY, López M. 2008. The Role of the L-Arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia. Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease 2(3) 1-10.

Lowry, OH, NJ Rosbrough, AL Farr, RJ Randall. J. 1951. Biol Chem 193:265.

Lyall F, Greer A. 1996. The vascular endothelium in normal pregnancy and pre-eclampsia. Reviews of Reproduction. 1:107-116.

Maser RL, Magenheimer BS, Calvet JP. 1994. Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. J BiolChem 269:27066-27073.

Molnar M, Hertelendy F. 1992. Nω-Nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, increases blood pressure in rats and reverses the pregnancy-induced refractoriness to vasopressor agents. Am J Obstet Gynecol 166:1560-1567.

Moran P, Baylis PH, Lindheimer MD, Davison JM. 2003. Glomerular ultrafiltration in normal and preeclamptic pregnancy. J Am Soc Nephrol 14(3):648-52.

Munkhaugen J, Egil BV. 2009. News aspects of preeclampsia: lessons for the nephrologist. Nephrol Dial Transplant 1-3

NIH Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Guide 1996 25 (28): 1-111.

Oberley L, Spitz D. 1984. Assay of Superoxide Dismutase Activity in Tumor Tissue. Meth Enzymol. 105:457-464.

Pacheco Romero J. 2003. Disfunción endotelial en la preeclampsia. Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. ISSN 1025-5583. 64 (1): 43-54.

Pandhi P, Saha L, Malhotra S. 2001. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in pregnant rats as a model of pre-eclampsia. Indian J Pharmacol 33: 92-95.

Pesce M, Strande D. 1973. A New micromethod for determination of protein in cerebroespinal fluid and urine. Clin Chem 19(11):1265-1267.

Roberts JM, Cooper DW. 2001.Pathogenesis and genetics of preeclampsia. Lancet 357: 53-56.

Seligman SP, Buyon, JP, Clancy RM, Young BK, Abramson S B. 1994 The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 171:944-948.

Shah DM. 2005. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. Am J Physiol Renal Physiol 288: F614–F625.

Slaghekkee F, Dekker G, Jeffries B. 2006. Endogenous inhibitors of nitric oxide and preeclampsia: a review. J Matern Fetal Neonatal Med 19: 447-452.

Silver RK, Kupferminc MJ, Russell T L, Adler L, Mullen TA, Caplan MS 1996. Evaluation of nitric oxide as a mediator of severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 175: 1013-1017.

Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, Schaaps JP, Cabrol D, Frankenne F, Foidart JM. 2003. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients pathophysiological consequences. J Clin Endocrinol Metab 88(11):5555-5563.

Wang Y, Walsh SW. 1998. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia. Placenta 19: 581-586.

Xia Y, Hong H, Sol B, Day M-C, Rodney KE. 2003. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. J Soc Gynecol Inv 10: 82-93.