



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**POSTGRADO DE FARMACOLOGIA**



**EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA Y EL ESTRÉS  
OXIDATIVO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE  
PREECLAMPSIA EN RATAS**

Trabajo presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela para optar  
al Título de Doctor en Ciencias, Mención Farmacología.

FTCA. ELSA A. CAMACHO G.  
TUTORA: DRA. ANITA STERN DE ISRAEL

Caracas, Noviembre 2012

***A mi Familia***

***Olayda Gruber y Rafael Camacho,  
A mis hermanos Carlos, David y  
A Rusvelt que está en el cielo***

## AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso y nuestro creador por darme ánimo y brindarme el amor a través de todas las personas que me rodean y me ayudan a seguir adelante siempre.

A la Universidad Central de Venezuela por permitirme formarme académicamente.

A mi tutora, la Dra. Anita Stern, por ser ejemplo y guía de la excelencia académica a lo largo de mi investigación, y por el gran apoyo que me ha concedido para el desarrollo de ésta tesis, mis eternas gracias y gran reconocimiento.

A la Dra. Margarita Salazar-Bookaman por su labor incansable como Coordinadora del Postgrado de Farmacología.

A la Dra. María del Rosario Garrido por su gran calidad humana y su gran entusiasmo en aquellos momentos de desánimo.

A la Unidad de Neuropeptidos, por ser todos un gran equipo de trabajo; sin ustedes, no lo hubiésemos logrado.

A mis amigos María Gabriela, Mariella, Carlos, José Antonio, Adriana y Leticia por todos los momentos compartidos y por ser mi familia.

A mi familia, por ser fuente de inspiración para la constancia, y darme la fortaleza para luchar por nuestros sueños.

A Wilmer por todas las palabras de amor y optimismo, y ser incondicional conmigo para lograr esta meta.

*A todos mil gracias...*

## **RECONOCIMIENTO ESPECIAL**

Los autores agradecen al Sr. Banny Caraballo por su ayuda técnica en todos los experimentos. Al Farmacéutico Juan Manuel González Guzmán, por su valioso apoyo y gran participación en los experimentos de reactividad vascular ejecutados en el Laboratorio del Postgrado de Farmacología de la Universidad Central de Venezuela. Al Dr. Julio González por trabajar en colaboración con el Laboratorio de Investigaciones del Postgrado de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo, para la determinación y cuantificación de algunos de los parámetros reportados en nuestro trabajo, así como a la Dra. Karina Acosta y al Dr. Stefan Selgrad, pertenecientes al Departamento Patología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, quienes colaboraron muy generosamente con los estudios histológicos reportados en nuestra investigación. Este trabajo fue subvencionado por el Ministerio Popular de Ciencia Tecnología e Industrias, Proyecto Misión Ciencia, Sub-proyecto 7, ECCV No. 2007001585.

## RESUMEN

La preeclampsia es un síndrome exclusivo de la gestación humana y responsable de una alta morbimortalidad perinatal, cuyas manifestaciones incluyen: hipertensión arterial, proteinuria y edema. Un mecanismo postulado en la fisiopatología de la preeclampsia, es la reducción de la perfusión placentaria y el desarrollo del síndrome clínico materno ocasionado por la liberación de factores placentarios que afectan la regulación de la presión arterial y la función renal. Uno de los factores que ocasiona el trastorno endotelial son las especies reactivas de oxígeno, el incremento de elementos vasoactivos, así como la disminución de agentes vasorelajantes como el óxido nítrico. Todas estas alteraciones vasculares conducen no sólo a la hipertensión sino también a la disfunción renal.

Debido a la importancia del papel del óxido nítrico y su desregulación en la preeclampsia, en el presente trabajo se caracterizó un modelo experimental de preeclampsia que resulta de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico mediante la administración de L-NAME a ratas preñadas y no preñadas. En el mismo se evaluó el estatus oxidativo y, el papel del sistema renina angiotensina en la contribución de la disfunción renal. Los resultados demuestran el papel primordial del óxido nítrico y su desregulación en este modelo de preeclampsia experimental. En efecto, se demostró que el tratamiento durante siete días con L-NAME incrementó la presión arterial media, aumentó la sensibilidad vascular, inhibió la actividad de la sintasa del óxido nítrico renal y redujo el guanilil monofosfato cíclico urinario. La

disfunción endotelial renal en este modelo experimental se manifestó por proteinuria, incremento de la creatinina plasmática, disminución de la excreción urinaria de sodio, potasio y creatinina, así como, evidencia morfológica de endoteliosis glomerular. Al caracterizar el papel de las enzimas antioxidantes renales se encontró una reducción significativa de la actividad de las mismas, y un incremento de la peroxidación lipídica asociada a una elevada concentración de agentes pro-oxidantes.

Nuestro modelo experimental constituye una buena aproximación a la preeclampsia humana y no un efecto inespecífico del L-NAME, ya que aún cuando la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico en ratas no preñadas induce un incremento de la presión arterial media, proteinuria, reducción de la actividad de la sintasa del óxido nítrico renal y de la excreción urinaria de guanilil monofosfato cíclico similar a las ratas preñadas, los efectos sobre la proteinuria, las acciones morfológicas renales, la excreción urinaria de sodio, potasio y creatinina, y sobre el sistema renina angiotensina son específicos de la preeclampsia experimental en ratas. Así, se demostró que en las ratas preñadas tratadas con L-NAME la actividad de la enzima convertidora de angiotensina plasmática, los niveles de renina plasmática, y la aldosterona amniótica se encuentran marcadamente disminuídos, cuando se comparan con las ratas preñadas normotensas. Estos hallazgos sugieren que la preeclampsia experimental se caracteriza por la supresión de los componentes circulantes del sistema renina angiotensina, que podrían ser responsables del desbalance entre los sistemas vasoconstrictores y

vasodilatadores observados en la preeclampsia, así como de algunos de los signos de la preeclampsia, similar a lo que ocurre en la mujer embarazada hipertensa.

Por otra parte, al evaluar la contribución del estrés oxidativo en el daño renal en la preeclampsia experimental, se demostró una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes renales. Asimismo, la disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa plasmática y la tendencia a la reducción en la glutatión peroxidasa en el líquido amniótico, con el simultáneo incremento de los valores de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmático, sugiriéndose que la desregulación generalizada y renal está asociada a una baja protección oxidativa durante la preeclampsia, que favorece a la insuficiencia renal.

El incremento temprano del estrés oxidativo placentario juega un papel fundamental en la disfunción endotelial generalizada y el daño renal en la preeclampsia. Debido a ello, nos planteamos que el tratamiento temprano con antioxidantes o con desacoplantes de la NAD(P)H oxidasa podría interrumpir el proceso de este síndrome. Efectivamente, el tratamiento crónico con un compuesto que mimetiza a la superóxido dismutasa, el tempol, o el desacoplante del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa (apocinina), fueron capaces de reducir significativamente la hipertensión inducida por el L-NAME. Igualmente, ambos compuestos fueron capaces de prevenir la proteinuria y la reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes renales estudiadas.

En conclusión, la preeclampsia experimental inducida por la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico en ratas preñadas, reproduce los signos clásicos de la preeclampsia humana, y se acompaña de la desregulación del sistema renina angiotensina y de disfunción renal. Esto nos permite aseverar que este modelo experimental de preeclampsia constituye una buena aproximación a la preeclampsia humana. Se demuestra que el daño renal encontrado en este modelo experimental se asocia a una disminución de los mecanismos antioxidantes renales, que lleva a un incremento del estrés oxidativo, y a una reducción de la protección de la función renal. Estos resultados indican que la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno tanto placentaria como renal, son causa fundamental de la disfunción endotelial generalizada y del daño renal. Finalmente, la inhibición del estrés oxidativo mediante el uso de agentes antioxidantes como el tempol o la apocinina, pudiese ser una de las posibles estrategias terapéuticas en el tratamiento de la hipertensión inducida por el embarazo humano y abre nuevos horizontes en el tratamiento de este síndrome.



## TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	Pág. ii
Agradecimientos.....	iii
Reconocimiento especial.....	iv
Resumen.....	v
Tabla de Contenido.....	ix
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tablas.....	xvii
Lista de Abreviaturas.....	xviii
Introducción.....	1
La Hipertensión inducida por el embarazo.....	1
Clasificación de la Hipertensión Inducida por el Embarazo.....	5
La Preeclampsia.....	6
Etiología de la preeclampsia.....	8
Disfunción endotelial y preeclampsia.....	12
El óxido nítrico.....	14
El óxido nítrico y el embarazo normal.....	17
El óxido nítrico y la preeclampsia.....	18
El estrés oxidativo y la preeclampsia.....	20
Enzimas antioxidantes.....	28
El Sistema Renina-Angiotensina (SRA).....	35
Regulación del Sistema Renina-Angiotensina en el embarazo normal.....	41

Sistema Renina Angiotensina en la preeclampsia.....	43
Cambios del Sistema Renina Angiotensina uteroplacentario en la preeclampsia.....	46
La angiotensina II y los anticuerpos agonista anti receptor AT <sub>1</sub> .....	48
Interacción AT1-AA y sFl-1.....	49
Disfunción renal y preeclampsia.....	51
Modelos animales de preeclampsia.....	55
Objetivos.....	60
Objetivo General.....	60
Objetivos Específicos.....	60
Materiales y Métodos.....	63
Animales y protocolos experimentales de inducción de PE.....	63
Determinación de la presión arterial (PA) y de la frecuencia cardíaca (Fc)....	66
Cuantificación de la excreción urinaria de proteínas totales.....	67
Cuantificación del daño tubular y renal por microscopía de luz.....	68
Determinación de la creatinina sérica y urinaria.....	68
Determinación de la excreción urinaria de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> .....	69
Actividad de la glutatión peroxidasa sérica.....	69
Determinación del conteo de plaquetas.....	70
Determinación de la reactividad vascular en anillos de aorta.....	70
Ensayo de la actividad sintasa óxido nítrico (SON).....	72
Determinación de la actividad del GMP cíclico urinario.....	73
Determinación de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina II	

(ECA).....	74
Determinación de la concentración de la renina plasmática.....	75
Determinación de la concentración de aldosterona plasmática.....	76
Determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT).....	77
Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)....	78
Determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx).....	79
Determinación de la concentración de los productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	80
Determinación de las proteínas tisulares.....	81
Análisis estadístico.....	81
Resultados.....	82
Discusión.....	140
Referencias Bibliográficas.....	177

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Regulación de la producción del óxido nítrico.....	16
Figura 2. Vías de formación y metabolismo del óxido nítrico.....	23
Figura 3. Esquema clásico del sistema renina angiotensina circulante.....	37
Figura 4. Mecanismo de señalización y funciones fisiológicas mediados por el receptor AT <sub>1</sub> de la angiotensina II.....	40
Figura 5. Mecanismo de señalización y efectos fisiológicos mediados por el receptor AT <sub>2</sub> de la angiotensina II .....	41
Figura 6. Actividad de la renina plasmática en mujeres con preeclampsia y en mujeres embarazadas controles.....	45
Figura 7. Expresión del receptor AT <sub>1</sub> en la decidua placentaria en mujeres embarazadas controles y en mujeres con preeclampsia.....	47
Figura 8. Anticuerpo Agonista anti-receptor AT <sub>1</sub> en presencia y en ausencia del bloqueante AT <sub>1</sub> en tejido materno (decidua) y útero-fetal (placenta).....	47
Figura 9 Anticuerpo agonista anti-receptor AT <sub>1</sub> en la placentación normal.....	49
Figura 10. Curso temporal de la presión arterial media en ratas tratadas con L-NAME.....	83
Figura 11. Efecto del L-NAME sobre el volumen urinario y la excreción urinaria de sodio y potasio en ratas preñadas tratadas durante siete días.....	84
Figura 12. Excreción urinaria de proteínas en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	86
Figura 13. Micrografía de un corte de corteza renal de ratas preñadas tratadas con L-NAME.....	86
Figura 14. Actividad de la enzima sintasa del óxido nítrico renal en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.	88

Figura 15. Actividad de la glutatión peroxidasa plasmática (GPx) en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	89
Figura 16. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en el líquido amniótico de ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	90
Figura 17. Actividad de las enzimas antioxidantes renales: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	91
Figura 18. Efecto de la fenilefrina (Fe) en anillos de aorta provenientes de ratas preñadas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	93
Figura 19. Efecto del carbacol (CCh) sobre anillos de aorta abdominal precontraídos con fenilefrina, provenientes de ratas preñadas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	94
Figura 20. Efecto del nitroprusiato de sodio (NPS) sobre anillos de aorta abdominal precontraídos con fenilefrina, provenientes de ratas con preeclampsia experimental inducida por la administración de L-NAME.....	95
Figura 21. Actividad plasmática de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	97
Figura 22. Renina y aldosterona plasmática en ratas con preeclampsia experimental inducida por la administración de L-NAME.....	98
Figura 23. Renina y aldosterona en el líquido amniótico de ratas con preeclampsia experimental inducida por la administración de L-NAME....	99
Figura 24. Efecto del L-NAME sobre el curso temporal de la presión arterial media en ratas preñadas y no preñadas.....	100
Figura 25. Efecto del L-NAME durante siete días sobre la excreción urinaria de proteínas en ratas no preñadas y en ratas preñadas.....	101

Figura 26. Efecto del L-NAME durante siete días sobre el volumen urinario en ratas no preñadas y en ratas preñadas.....	103
Figura 27. Excreción urinaria de sodio en ratas no preñadas y en ratas preñadas previamente tratadas con L-NAME.....	104
Figura 28. Excreción urinaria de potasio en ratas no preñadas y en ratas preñadas tratadas con L-NAME.....	105
Figura 29. Determinación de la creatinina urinaria en ratas no preñadas y en ratas preñadas tratadas con L-NAME.....	106
Figura 30. Determinación de la creatinina plasmática en ratas no preñadas y en ratas preñadas tratadas con L-NAME durante siete días.....	107
Figura 31. Determinación del número de plaquetas en ratas no preñadas y en ratas preñadas tratadas con L-NAME.....	109
Figura 32. Actividad de la sintasa del óxido nítrico renal en ratas no preñadas y en ratas preñadas tratadas con L-NAME.....	110
Figura 33. Excreción urinaria de GMPc en ratas no preñadas y en ratas preñadas tratadas con L-NAME durante siete días.....	111
Figura 34. Renina y aldosterona plasmática en ratas no preñadas y en ratas preñadas tratadas con L-NAME.....	113
Figura 35. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa plasmática (GPx) en ratas no preñadas y en ratas no preñadas tratadas con L-NAME durante siete días.....	116
Figura 36. Concentración de los productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmático en ratas no preñadas y, en ratas preñadas tratadas con L-NAME .....	117
Figura 37. Actividad de las enzimas antioxidantes renales en ratas no preñadas y en ratas preñadas con tratadas con L-NAME.....	118
Figura 38. Curso temporal del efecto del tempol durante siete días, sobre el incremento de la presión arterial inducido por el tratamiento con L-NAME en ratas preñadas.....	120
Figura 39. Efecto del tempol durante siete días, sobre la excreción	

urinaria de proteínas en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	121
Figura 40. Micrografía de un corte de corteza renal de ratas con preeclampsia experimental inducida por la administración de L-NAME pretratadas con tempol.....	123
Figura 41. Efecto del tempol sobre el volumen urinario en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	124
Figura 42. Efecto del tempol sobre la excreción urinaria de sodio en ratas preñadas preñadas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	125
Figura 43. Efecto del tempol sobre la excreción urinaria de potasio en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	126
Figura 44. Efecto del tempol sobre la actividad de las enzimas antioxidantes renales: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	128
Figura 45. Curso temporal del efecto de la apocinina sobre el incremento de la presión arterial inducido por el tratamiento con L-NAME en ratas preñadas.....	131
Figura 46. Efecto de la apocinina sobre la excreción urinaria de proteínas en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	132
Figura 47. Micrografía de un corte de corteza renal de ratas con preeclampsia experimental inducida por la administración de L-NAME pretratadas con apocinina .....	134
Figura 48. Efecto de la apocinina sobre el volumen urinario en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME.....	135
Figura 49. Efecto de la apocinina sobre la excreción urinaria de sodio en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-	

NAME..... 136

Figura 50. Efecto de la apocinina sobre la excreción urinaria de potasio en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME..... 137

Figura 51. Efecto de la apocinina sobre la actividad de las enzimas antioxidantes renales superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y glutatión peroxidasa (GPx) en ratas con preeclampsia experimental inducida por la administración de L-NAME..... 139



## LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla I. Clasificación de la preeclampsia.....	7
Tabla II. Niveles séricos del SRA en mujeres normotensas y en mujeres con preeclampsia.....	45
Tabla III. Efecto del L-NAME sobre el número de los fetos, el peso y la reabsorción fetal.....	82
Tabla IV. Morfometría fetal durante el tratamiento con tempol.....	119
Tabla V. Morfometría fetal durante el tratamiento con apocinina.....	129

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANG II	Angiotensina II
AP-1	Factor de Transcripción activador de la proteína 1
CAT	Catalasa
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FC	Frecuencia cardíaca
FPR	Flujo plasmático renal
GMPc	Guanilil monofosfato cíclico
GPx	Glutación peroxidasa
GRx	Glutación reductasa
HTA	Hipertension arterial
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-6	Interleuquina 6
L-NAME	Nitro-L-arginina metil éster
MDA	Malondialdehído
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NF-kB	Factor nuclear kappa beta
NO	Óxido nítrico
PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica

PE	Preeclampsia
PGI2	Prostaciclina PGI2
PLGF	Factor de crecimiento placentario
sFlt-1	Receptor de la tirosina quinasa soluble
SOD	Superóxido dismutasa
SON	Sintasa del óxido nítrico
SONe	Sintasa del óxido nítrico endotelial
SONi	Sintasa del óxido nítrico inducible
SONn	Sintasa del óxido nítrico neuronal
SRA	Sistema renina angiotensina
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TBARS	Productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico
TFG	Tasa de filtración glomerular
TGF-B1	Factor de crecimiento beta 1
VCAM	Moléculas de adhesión vascular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

## INTRODUCCIÓN

Los programas de control prenatal o de atención a la mujer embarazada, son una excelente forma de disminuir las complicaciones que pueden ocurrir durante la gestación, ya que con ellos se puede asegurar el bienestar tanto del niño como de la madre.

Una de las medidas preventivas que se lleva a cabo en dichos programas es el control de la presión arterial (PA), ya que permite detectar a tiempo uno de los síndromes clínicos más graves que pueden presentarse en la mujer embarazada, la hipertensión inducida por el embarazo, la preeclampsia (PE) y la eclampsia (Rochart y col., 1988; Dekker y Sibai, 1991, Myatt y col., 2009).

### **La hipertensión inducida por el embarazo**

La hipertensión arterial (HTA) es una de las complicaciones médicas más frecuentes y graves que pueden ocurrir en el transcurso de la gestación. Su incidencia fluctúa entre 7 y 10% a excepción del aborto séptico y constituye la primera causa de mortalidad materna en nuestro medio. Es además una importante causa del retardo de crecimiento fetal y bajo peso al nacer, de prematuridad y de morbilidad perinatal (Davey y MacGilliray, 1988; Yallampalli y Garfield, 1993).

La hipertensión inducida por el embarazo, ha sido definida por el Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia (2002), por dos criterios: 1. Si los

incrementos son mayores o iguales a 30 mmHg para la presión arterial sistólica (PAS) e incrementos superiores a 15 mmHg para la presión arterial diastólica (PAD), sobre las cifras registradas en la primera mitad del embarazo (Cavanagh y Knuppel, 1992) sin que necesariamente llegue a valores totales de PA iguales o superiores a 140/90 mmHg, en dos registros consecutivos en 4 horas como mínimo y, 2. Como un valor de una presión arterial sistólica de 140 mmHg o mayor, o una presión arterial diastólica de 90 mmHg o mayor en cualquier estadio del embarazo. Sin embargo, valores inferiores de PA sugieren preeclampsia (PE) (Gallery, 1995).

Durante el embarazo se producen modificaciones significativas de la función renal, del equilibrio hidroelectrolítico y la hemodinamia (Valdés, 1995). Así, el volumen plasmático aumenta durante todo el embarazo hasta en un 50%, mientras que la masa eritrocitaria aumenta sólo levemente en las últimas semanas, lo que explica el estado de hemodilución existente. La disminución del umbral de la sed y para la liberación de la hormona antidiurética, condiciona un aumento del agua corporal; ello se traduce en una disminución de la concentración de sodio plasmático en aproximadamente 5 meq/L y de la osmolaridad en 10 mosm/Kg. El aumento del agua intersticial puede reflejarse por la presencia de edema (Valdés, 1995).

La disminución de la resistencia vascular se origina en una relativa refractariedad a sustancias presoras (angiotensina II), por un incremento en la

síntesis de compuestos vasodilatadores (prostaglandinas, óxido nítrico) lo que al final se traduce en un descenso de la PA. Como fenómeno compensatorio, la actividad de la renina plasmática aumenta especialmente durante las primeras seis semanas, subiendo luego levemente. Los niveles de aldosterona aumentan durante todo el embarazo, especialmente en las últimas 8 semanas. Los niveles de noradrenalina se mantienen constantes mientras los del péptido natriurético auricular suben levemente durante toda la gestación (Tapia y col., 1972; Wilson, y col., 1980; Valdés, 1995).

La presión arterial controlada en óptimas condiciones desciende a valores por debajo de 125/75 mmHg, en los primeros dos trimestres del embarazo, alcanzando su valor más bajo durante la 8<sup>va</sup> semana de la gestación; durante el tercer trimestre puede subir hasta 135/85 mmHg, por lo cual deben considerarse como límites los valores 120/75 mmHg en el segundo trimestre y 130/85 mmHg en el tercer trimestre (Valdés, 1995).

El descenso fisiológico de la PA durante los primeros meses puede enmascarar una hipertensión arterial previa y, la elevación posterior dificulta el diagnóstico diferencial entre preeclampsia e hipertensión arterial crónica (Valdés, 1995). El monitoreo de la PA ambulatoria realizado a las 28 semanas de gestación ha mostrado una estrecha relación inversa con el peso al nacer. Un promedio de presión arterial diastólica de 24 h sobre 73 mmHg, se correlaciona con una disminución significativa de este peso (Valdés, 1995).

El gasto cardíaco aumenta desde el primer trimestre alcanzando un máximo entre el 30 y 40% de los valores previos al embarazo a las 24 semanas de gestación (Valdés, 1995).

La tasa de filtración glomerular y el flujo plasmático renal aumentan entre el 40 y el 65%, y luego de un 50 a un 80% respectivamente, durante la primera mitad de la gestación en el embarazo normal (Jeyabalan y Conrad, 2007). La depuración de creatinina aumenta hasta la 8<sup>va</sup> semana de gestación permaneciendo luego constante. Ello se refleja en un nivel de creatinina sérica, con un valor aproximado de 0,9 mg/dL, con una tasa de filtración glomerular incrementada en un 50%, con cifras de nitrógeno ureico bajo 14 mg/dL e inclusive cifras inferiores a 5 mg/dL (Valdés, 1995).

El aumento de solutos filtrados explica la aparición fisiológica de glucosuria, aminoaciduria y aparición de vitaminas hidrosolubles en la orina. La proteinuria puede llegar hasta 300 mg/24 h, sin embargo, la excreción de albúmina aumenta solo levemente (Valdés, 1995).

Un aspecto primordial en la toma de decisiones sobre el control prenatal, depende de la condición fetal. Todas las formas de hipertensión arterial que afectan a la mujer embarazada repercuten en mayor o menor grado en el crecimiento del feto. La importancia que tiene la evaluación de la condición fetal en la paciente hipertensa es lo que permite en último término decidir el momento y la forma más adecuada para la ocurrencia del parto (Gallery, 1995).

Además de la evaluación clínica de la altura uterina, el volumen estimado del líquido amniótico, la estimación del peso fetal y la percepción de la actividad fetal, existen otros exámenes más comúnmente empleados para evaluar la unidad feto-placentaria y que son válidos para todos los tipos de hipertensión, lo constituyen el registro electrónico de la frecuencia cardíaca fetal, la ecografía que permite evaluar la curva de crecimiento fetal y el estado de bienestar fetal, y la amniocentesis que permite estudiar el estado de madurez pulmonar fetal, elemento clave en la decisión para interrumpir un embarazo.

### **Clasificación de la Hipertensión Inducida por el Embarazo**

La clasificación comúnmente aceptada de hipertensión durante el embarazo es la del grupo nacional de trabajo de educación sobre la hipertensión de 1990 (*National High Blood Pressure Education Working Group 1990*), que la divide en cuatro categorías:

1) Hipertensión arterial inducida por el embarazo: Hipertensión arterial que se desarrolla como consecuencia del embarazo y que se revierte después del parto.

- Preeclampsia (moderada o severa): Hipertensión, proteinuria y edema.
- Eclampsia: Hipertensión, proteinuria y edema acompañado por convulsiones y/o coma.

El síndrome HELLP es una complicación seria de la hipertensión inducida por el embarazo. Se presenta aproximadamente en un 2 a 12 por ciento de las mujeres con hipertensión del embarazo. Generalmente se desarrolla antes del parto, pero puede presentarse también después del mismo. El síndrome



HELLP consiste en hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y trombocitopenia.

2) HTA crónica: Hipertensión arterial esencial (90%) o secundaria (10%) que antecede al embarazo y que se mantiene después del parto.

3) HTA crónica más preeclampsia/eclampsia sobre-agregada. Es la aparición de proteinuria patológica en una paciente hipertensa crónica. Puede asociarse también a un edema patológico (preeclampsia). Cuando existe la aparición de convulsiones o coma, se habla de eclampsia. Es la de peor pronóstico materno-fetal.

4) HTA transitoria: HTA leve o moderada sin proteinuria que aparece tardíamente en el embarazo y que desaparece después del parto.

### **La preeclampsia**

La preeclampsia (PE) es un síndrome complejo, exclusivo de la gestación humana y responsable de una alta morbimortalidad perinatal. Por ello ha sido denominada como una patología de múltiples teorías, a la cual se ha asociado tanto factores medioambientales como genéticos para el desarrollo de la misma.

Se caracteriza por HTA, proteinuria y edema (Ito y col., 2002) y aparece habitualmente después de las 20 semanas de gestación, presentándose con mayor frecuencia en el tercer trimestre y revirtiéndose en el posparto. La PE afecta principalmente a primigestas (75%) y, por lo general, no recurre en los embarazos siguientes. Otros factores de riesgo que predisponen a las

pacientes a la PE son: el embarazo gemelar, la edad < 21 ó > 35 años, los antecedentes personales o familiares de PE o eclampsia y los antecedentes de hipertensión crónica (Valdés y Oyarzun, 1999).

La severidad de la enfermedad depende de los niveles de presión arterial y de la magnitud del daño de otros órganos entre los que destacan el riñón, el hígado y el cerebro (Tabla I).

<b>TABLA I</b>		
<b>CLASIFICACIÓN DE PREECLAMPSIA</b>		
	Moderada	Severa
Presión arterial (mm Hg)	< 160/110	> / = 160/110
Proteinuria (g/24 h)	< 3	> / = 3
Oliguria (< 500 ml/24 h)	-	+
Edema	leve/mod	Generalizado
Cefalea	leve/mod	Intensa
Trombocitopenia	-	+
Compromiso hepático	-	+
Compromiso neurológico	-	fotopsias, tinitus, hiperreflexia

**TABLA I. CLASIFICACIÓN DE LA PREECLAMPSIA** (Modificado de Valdés y Oyarzun, 1999).

## **Etiología de la preeclampsia**

Si bien la etiología de la PE sigue siendo desconocida, en los últimos años se ha avanzado notablemente en el conocimiento de los distintos mecanismos fisiopatológicos que en ella intervienen. La génesis del proceso reside, probablemente, en una implantación anómala del trofoblasto placentario mediado por mecanismos inmunológicos y quizás genéticos. Esto provoca una hipoperfusión útero-placentaria que favorece 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 una activación del sistema nervioso simpático y un desequilibrio entre la síntesis de sustancias vasodilatadoras (prostaciclina y óxido nítrico) y vasoconstrictoras (tromboxano A<sub>2</sub> 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; Ariza y col., 2006).

En el embarazo normal la implantación es el primer estadio en el desarrollo de la placenta. En la mayoría de los casos ocurre una relación muy cercana entre el trofoblasto embrionario y las células del endometrio. El cigoto, en estado de blastocito, se adosa a la capa funcional del útero, el endometrio, que para entonces ha sufrido modificaciones histológicas a causa de los cambios hormonales del embarazo. Así, por ejemplo, la progesterona favorece que las

glándulas del endometrio se vuelvan voluminosas y se llenen de secreciones ricas en glucógeno, que las células del estroma uterino se vuelvan más grandes y las arterias más tortuosas y amplias en su extensión.

La implantación del embrión humano se lleva a cabo por la acción erosiva del sinciotrofoblasto, (un grupo de células que rodean parte del blastocito. La actividad de ciertas proteinasas, factores de crecimiento, citoquinas, los leucocitos, y la tensión de oxígeno han sido implicados como reguladores importantes de la invasión del trofoblasto al endotelio materno). Esta destrucción del endometrio hace que el embrión entre en contacto con arteriolas y vénulas que vierte la sangre materna a la cavidad de la implantación, llamado espacio intervelloso endovascular y el desplazamiento del endotelio materno es seguida por un remodelaje y dilatación vascular que favorece la perfusión materna a los espacios intervelloso. El mesodermo del blastocito es el que dará origen a las células del estroma y de los vasos de la placenta. La consecuencia de estos cambios es la transformación de dichas arterias en vasos de baja resistencia y alta capacitancia, adaptados a un feto en constante crecimiento (Merviel y col., 2004). Para ello, se produce una serie de cambios durante los estadios tempranos del embarazo, en los que se presentan alteraciones histológicas en las arterias terminales espirales situadas en la decidua materna, las cuales se caracterizan por la desintegración de la lámina elástica interna por lo que permanece una delgada capa de membrana basal entre el endotelio y la capa muscular. El siguiente cambio ocurre entre las semanas 6 y 12 de la gestación, donde las

arterias espirales son invadidas por células citotrofoblásticas (arterias más profundas del útero) que sustituyen a las células endoteliales de los vasos maternos y permiten su dilatación. Posteriormente, la invasión alcanza las arterias radiales del miometrio durante las semanas 14 a 20 de la gestación, convirtiendo de esta manera a los vasos maternos en el conducto útero-placentario que permite la dilatación de estas arterias, resultando en una disminución de la resistencia uteroplacentaria, y con ello, se favorece a un aumento del flujo sanguíneo a través de las mismas, lo cual permite el transporte de nutrientes necesarios para el desarrollo fetal (Gerretsen y col., 1981). Estos cambios morfológicos normales en el lecho placentario impiden que los vasos maternos espirales respondan o sean sensibles a los agentes vasopresores dado que quedan muy pocas células musculares lisas susceptibles para responder a estas sustancias (Gerretsen y col., 1981).

Se considera que la patogénesis de la PE sucede en varios estadios: en primer lugar las células trofoblásticas no logran invadir la decidua y la porción miometral de las arterias espirales y radiales, conservando a ese nivel la capa músculo/elástica. Esto implica una reducción del diámetro de las arterias espirales en la PE así como, la expresión anormal de receptores endoteliales en la invasión citotrofoblástica, reducción de factores como las VCAM, ICAM, interacción del VEGF-Flt-1, cadherinas integrinas  $\alpha,\beta$ ; por tanto las arterias se hacen más sensibles frente a los estímulos vasopresores (Myatt y Webster, 2009), perdiendo así la prevención de la coagulación y la modulación del tono vascular. En segundo lugar, hay una pobre perfusión placentaria a través de

las arterias transformadas inadecuadamente lo que trae como consecuencia un aporte sanguíneo restringido e insuficiente para un feto en crecimiento, produciendo isquemia placentaria, y a su vez retardo del crecimiento intrauterino. Finalmente, en muchas arterias se produce una aterosclerosis aguda, caracterizada por un síndrome de obstrucción parcial o total de la luz de dichas arterias por la formación de agregados plaquetarios y depósitos de fibrina e invasión de macrófagos cargados de lípidos en la pared de los vasos. La morfología de esos vasos sugiere un proceso aterogénico paralelo de las arterias carótidas, con lipoproteínas de baja densidad que promueven eventos de peroxidación lipídica los cuales indican, que son una manifestación de la lesión endotelial materna generalizada (Dekker y Sibai, 1998; Roberts y Cooper, 2001; Hubel, 1999; Pacheco, 2003).

Efectivamente, la placenta isquémica produce sustancias citotóxicas y desprendimiento del tejido placentario, especialmente micropartículas de la membrana sincitiotrofoblástica, que pueden provocar daño endotelial con la consecuente vasoconstricción y aumento de la PA materna. Además, muchos vasos pueden ser ocluidos por aterosclerosis aguda (necrosis fibrinoide, presencia de lípidos y macrófagos e infiltración mononuclear perivascular), que asociada a la trombosis puede causar infartos placentarios (Dekker y Sibai, 1998; Roberts y Cooper, 2001; Pacheco, 2003).

## **Disfunción Endotelial y Preeclampsia**

El término de disfunción endotelial es definido como un estado de alteración y diferenciación endotelial típicamente inducido como resultado de la estimulación por citoquinas. Adicionalmente, la evidencia indica que la disfunción endotelial incluye vasoespasmo y reactividad vascular (Hung y Burton, 2006).

El endotelio arterial es una estructura activa con múltiples funciones ya que mantiene su propia integridad, principalmente a través de las integrinas, proteínas que forman parte de su estructura y que comunican a la célula endotelial con la matriz sub-endotelial y con las células endoteliales adyacentes. Igualmente, el endotelio ofrece una superficie que se opone a la trombosis y previene la activación de la coagulación. Además, estimula la actividad fibrinolítica e inhibe la adhesión y la agregación plaquetaria. El endotelio produce sustancias tanto vasodilatadoras (óxido nítrico, prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio) como vasoconstrictoras (endotelina-1 y el factor de contracción derivado del endotelio) así como sustancias que participan en los mecanismos inflamatorios e inmunológicos vasculares. De esta manera, el endotelio ejerce una función de control sobre la circulación mediante la producción de sustancias vasoactivas, hemostáticas, permeabilidad selectiva e inmunológica, para mantener la homeostasis cardiovascular que se encuentra en constante equilibrio. De tal manera que, la pérdida de la función endotelial se traducirá en una alteración del equilibrio

homeostático vascular, reflejado en la vasoconstricción, que éste fuese suficientemente prolongado, produciendo HTA (Contreras y col., 2002).

Ahora bien, el endotelio juega un papel muy importante en el embarazo normal, ya que participa en la regulación de la resistencia vascular y la presión sanguínea (LaMarca y col., 2008). Dicha regulación comprende una profunda reducción en la reactividad vascular frente a sustancias vasoconstrictoras, disminución de la resistencia vascular periférica y, en consecuencia, un aumento en la producción de óxido nítrico por el endotelio (Contreras y col., 2002).

Cuando ocurre una anomalía en la producción o acción de esos factores, el endotelio vascular se predispone a la vasoconstricción, adhesión de leucocitos, mitogénesis, pro-oxidación e inflamación vascular. Debido a ello, se han encontrado diversos marcadores de disfunción endotelial que pueden predecir el desarrollo del síndrome de preeclampsia en la mujer, previo a la manifestación de la enfermedad (LaMarca y col., 2008). Entre los mediadores potenciales relacionados con la disfunción endotelial se encuentra el óxido nítrico (NO).



## **El Óxido nítrico**

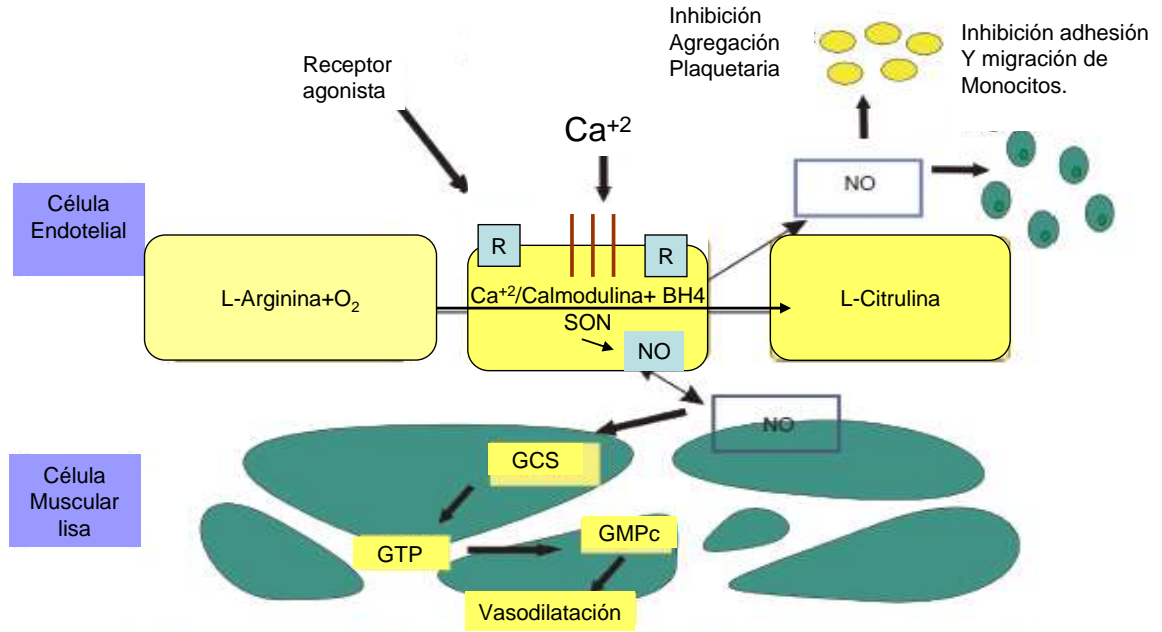
El NO es un mensajero intracelular que se encuentra presente en muchos vertebrados donde ejerce funciones moduladoras en el flujo sanguíneo, la trombosis y la actividad neural. El NO es un compuesto altamente reactivo ya que es un intermediario entre el O<sub>2</sub> y el N<sub>2</sub>, presenta una muy baja solubilidad, pero puede difundir en la membrana muy fácilmente a través del citoplasma (Moncada y col., 1991; Moncada y Higgs, 1993). Es sumamente importante para la activación biológica de la guanilil ciclasa, la cual le permite ejercer sus múltiples funciones (Pacher y col., 2007).

El NO desempeña un papel importante en los procesos biológicos así como la regulación del tono vascular, la comunicación neuronal, la actividad antimicrobiana, la ventilación, la secreción hormonal, y en la inmunidad, además de participar en la homeostasis del sodio y, por tanto, en la regulación de la PA al controlar el tono de las arteriolas glomerulares y en el mesangio (Rojo y col., 2003).

La enzima sintasa del NO (SON) endotelial es la encargada de la conversión de la L-arginina en citrulina y NO continuamente, en presencia de NAD(P)H y, de cofactores tales como calcio/calmodulina, y tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Se han aislado tres isoformas de la SON: la neuronal (SON<sub>n</sub>), la inducible (SON<sub>i</sub>) (la cual es inducida por acción de las citoquinas, el factor de necrosis tumoral, la interleuquina-1 y algunos lipopolisacáridos entre otros), y la endotelial

(SONe) (Alemán y col., 2008). Las porciones terminales de las SON, demuestran homología con la NAD(P)H oxidasa y con la citocromo P450 reductasa. La mayor diferencia en la regulación, es la localización subcelular que describe las tres isoformas. Las isoformas SONE y SONn son formas constitutivas dependientes de calcio-calmodulina. Y la SONi ha sido identificada por su respuesta ante la exposición a citoquinas inflamatorias y lipopolisacáridos. La SONE ha sido identificada en células endoteliales. La SONi es regulada por factores transcripcionales. En las células no estimuladas la expresión de SONi es muy baja o está casi ausente. Adicionalmente, en condiciones experimentales, la inhibición crónica competitiva de la SON por el uso de L-NAME (un análogo de la L-arginina), demuestra un aumento en la expresión genética de la SONi (Buhimschi y col., 1998).

El NO ejerce un efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria e inhibición de la adhesión y la migración de los monocitos. Por otra parte, el NO difunde a la célula muscular lisa adyacente, para activar a la proteína guanilil ciclasa soluble, para la conversión de GTP a GMPc, el cual es un segundo mensajero del NO, donde participa en múltiples mecanismos de señalización, favoreciendo a la vasodilatación. En la figura 1 se ilustra la regulación y producción del NO (López-Jaramillo y col., 2008).



**FIGURA 1. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NITRICO (NO) EN EL ENDOTELIO VASCULAR.** Se muestran acciones antitrombóticas, antiaterogénicas y acciones vasodilatadoras. GCS: GUANILIL CICLASA SOLUBLE, GTP: GUANOSINA TRIFOSFATO 5', Y GMPC: GUANOSINA MONOFOSFATO (Modificado de López-Jaramillo y col., 2008).

El NO es inactivado por la reacción con el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el cuál es uno de los agente responsables de la peroxidación lipídica y de la nitración de las proteínas. Actualmente, se sabe que la producción del radical superóxido  $O_2^{\cdot-}$  se incrementa en diferentes situaciones durante el embarazo como en estados de infección e inflamación (López-Jaramillo y col., 2008).

## **El Óxido Nítrico y el Embarazo Normal**

El sistema del NO se encuentra altamente regulado durante la gestación. Se ha demostrado que durante todo el embarazo el NO inhibe las contracciones uterinas, pero no así durante el parto, lo que sugiere que existe un mecanismo fisiológico que participa de forma intrínseca, autocrina, que activa la generación de NO en el útero, y con ello contribuye al mantenimiento uterino hasta llegar a término de la gestación. La isoforma que más se expresa ante los cambios uterinos y gestacionales es la SONi, la cual se encuentra aumentada durante la gestación, pero se disminuye durante el trabajo de parto. Esto indica que el NO presenta un efecto relajante importante durante el desarrollo de la gestación. En el tejido placentario también se ha reportado la presencia de la actividad de la SON dependiente de calcio/calmodulina, lo cual indica que la SON involucrada es la endotelial con principios funcionales para generar vasodilatación (Buhimschi y col., 1998).

Como se mencionó previamente, la evidencia indica que en el embarazo normal existe una adaptación fisiológica vascular, que comprende un incremento en el volumen sanguíneo, un aumento del gasto cardíaco y una disminución de la resistencia vascular periférica, acompañada por un incremento endógeno de la producción de NO, y de una respuesta vascular dependiente del endotelio intacto (Buhimschi y col., 1998). Este incremento del gasto cardíaco observado en mujeres embarazadas, es de un 30 - 40% con respecto a las mujeres no embarazadas, que se produce como consecuencia

de una sobrecarga de volumen y/o por el descenso de la vasodilatación periférica, y asociada a una disminución de la producción de prostaciclina y NO. Recientemente, se encontró que la producción de NO endotelial detectada en el suero, estaba involucrada con la vasodilatación observada en mujeres embarazadas y múltiples estudios demostraron que el incremento de la producción de NO en la viabilidad vascular y endotelial, son mecanismos críticos para explicar las adaptaciones hemodinámicas en el embarazo. Se ha empleado la cuantificación de los niveles séricos de NO<sub>2</sub> (nitritos) y NO<sub>3</sub> (nitratos), como índice de producción de NO, mientras que la bioactividad del NO, ha sido evaluada por los niveles en fluidos biológicos de GMPc (López-Jaramillo y col., 2008).

### **El Óxido nítrico y la preeclampsia**

Actualmente, no existen dudas que el incremento de la producción de NO en el endotelio vascular y su bioactividad normal constituyen mecanismos críticos que explican la adaptación hemodinámica en el embarazo normal (López-Jaramillo y col., 2008).

Por otra parte, la característica más importante observada en la PE es la vasoconstricción generalizada. Debido a ello, se ha propuesto la existencia de una alteración endotelial en la síntesis de NO en la patogenia de éste síndrome. Por otra parte, debido a la alta reactividad del NO en transformarse en nitratos y nitritos, se postula la probabilidad de la existencia de una baja bioactividad del mismo en la PE. En este sentido, muchos investigadores han

realizado estudios clínicos en mujeres embarazadas con PE *versus* mujeres embarazadas controles, para evaluar la concentración plasmática y sérica de nitratos y nitritos y los hallazgos, aún cuando son controversiales, demuestran definitivamente que durante la PE ocurre una reducción de la concentración de nitratos y nitritos, asociada a una disminución de los niveles de GMPC, cuando se compara con pacientes controles. Esto sugiere una disminución de la biodisponibilidad del NO, posiblemente mediado por un incremento del estrés oxidativo y que explicaría la vasoconstricción periférica, la disfunción endotelial y las manifestaciones clínicas de esta patología (López-Jaramillo y col., 2008).

La baja producción de nitratos y nitritos en la PE ha sido adjudicada a la alteración en la vía de L-arginina-NO a diferentes niveles de la misma. Entre dichas alteraciones que comprometen al NO se han sugerido deficiencias en el sustrato de L-arginina o en su transporte (McCord y col., 2006; Neri y col., 2006); o depleción de L-arginina producida por la sobre expresión de arginasa II, (la enzima que metaboliza a la L-arginina, y que puede orientar a la SON, a generar especies reactivas de oxígeno) (López-Jaramillo y col., 2008; Buhimschi y col., 1998), reducción de la producción de NO por deficiencia en los cofactores requeridos para el buen funcionamiento de la SONE, como son el ión calcio (López-Jaramillo, 2008) y la BH4 (Toth, 2002). La acumulación de un inhibidor endógeno de la SON, como es la dimetilarginina asimétrica (ADMA), que se encuentra en concentraciones elevadas en PE (LaMarca y col., 2008) y finalmente, la alteración polimórfica de la SONE que resulta en la disminución de su actividad enzimática (Serrano y col., 2004).

Ahora bien, en aquellos casos de mujeres embarazadas con PE que muestran más bien un aumento de la producción de NO y niveles de nitritos y nitratos incrementados o normales, se ha postulado que a pesar del incremento en la producción de NO también se incrementa su degradación, por lo que la bioactividad del NO estaría reducida. Se ha sugerido que el incremento del estrés oxidativo que ocurre en la PE es el responsable de la rápida degradación del NO, especialmente debido a la gran reactividad del NO y el anión superóxido para formar peroxinitrito.

### **Estrés Oxidativo y la preeclampsia**

El estrés oxidativo es una condición que describe la producción de radicales libres más allá del umbral de su neutralización por un agente antioxidante (Flora, 2009). Aunque la definición más común, lo señala como un desbalance entre la producción y la eliminación de moléculas oxidantes y antioxidantes, a favor de los oxidantes, en donde se ha generado un incremento de la tasa de la síntesis de radicales libres. En la actualidad, existe una gran variedad de radicales libres dentro de la biología, sin embargo, entre la categoría más amplia se encuentran las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Hubel, 1999). Las EROs constituyen los mediadores más importantes en la producción de daño celular que incluyen a los lípidos y membranas, proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, éstos efectos nocivos de las EROs pueden ser neutralizados o equilibrados por la acción de moléculas antioxidantes no enzimáticas además de las enzimas antioxidantes endógenas (Flora, 2009).

Se considera un radical libre a una molécula que contenga uno o más electrones desapareados que ocupan la última capa de sus orbitales, siendo los más comunes, aquellos agentes derivados de las EROs, y dicha formación requiere de la catálisis de algunas enzimas para su producción. Estos radicales libres, derivados de las EROs, pueden provenir de diferentes vías, como los resultantes de la irradiación por la luz ultravioleta y los rayos gamma, los productos catalizados por metales en otras reacciones, los presentes en la atmósfera, los producidos por neutrófilos y macrófagos durante la inflamación, y los productos de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria.

Entre los radicales libres derivados de oxígeno se encuentran el anión hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), el anión superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), y el óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ), pero también existen moléculas que no contienen electrones desapareados y que forman parte de la familia de moléculas altamente reactivas, tales como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), y el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), los cuales son altamente reactivos para la formación de los productos primarios de la peroxidación lipídica, hidroperóxidos lipídicos, formados cuando el radical libre ataca a los ácidos grasos poliinsaturados o al colesterol en la membrana o lipoproteínas. Alternativamente, también pueden ser formados por cicloxigenasas o lipoxigenasas, donde estos hidroperóxidos podrían participar en la regulación de los genes sensibles al estado redox y finalmente, los radicales que atacan a biomoléculas incluyendo, ADN, tioles, aminoácidos, y metales que permiten reacciones de oxidación y de nitración. Los elevados niveles de aniones NO darán como resultado especies nitradas, que interferirán

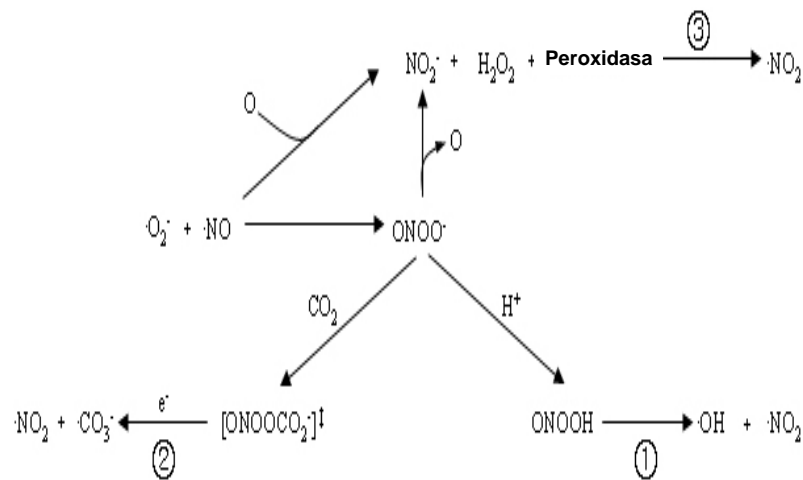


en las funciones de las proteínas alteradas, alteraciones de la integridad de la membrana, mutaciones del ADN, y muerte celular por apoptosis o por necrosis.

Una de las reacciones involucradas es la del NO con el radical superóxido para formar el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (figura 2), el cual es fuertemente oxidante y es la molécula responsable de la nitración de proteínas que contiene residuos de tirosina, de la oxidación de tioles, ya que dichas reacciones contribuyen al daño oxidativo, de procesos inflamatorios y del incremento de la síntesis de prostaglandinas como producto de la oxidación del ácido araquidónico en las membranas lipídicas, con el subsecuente bloqueo de la relajación vascular e incremento de la vasoconstricción, lo que genera hipertensión (Gilbert, 2008; Hubel 1999; Eiserich y col., 1998; Patel y col., 1998).

Una sustancia antioxidante, es aquella que es capaz de prevenir que otra sustancia se oxide. Generalmente, un antioxidante puede proteger de la toxicidad de metales al atrapar a los radicales libres por iones metálicos quelantes, e impidiendo la propagación de la reacción en cadena que ellos inician; así como también agentes que permitan mantener el estado redox, lo que se traduce en la reducción del compromiso del oxígeno molecular (Flora, 2009). Los sistemas antioxidantes que actúan en la célula pueden ser endógenos y exógenos, los cuales limitan la actividad y la producción de las EROs, manteniendo el sistema controlado (Biri y col., 2007). Actualmente, los antioxidantes han sido caracterizados como todas aquellas sustancias que pueden prevenir o desacelerar la oxidación de otras moléculas. Estas

sustancias que protegen a biomoléculas de los radicales libres han demostrado su fiel funcionamiento tanto *in vivo* como *in vitro*. Los antioxidantes endógenos y enzimáticos más importantes son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión reductasa (GRx) y la glutatión peroxidasa (GPx). Entre los sistemas antioxidantes exógenos, y clasificados como no enzimáticos más significativos se encuentran: los carotenoides (licopenos,  $\beta$ -carotenos, luteínas) las vitaminas A, C, E, ácido ascórbico, tocoferoles; químicos asociados a lípidos (ubiquinol-10, n-acetilcisteína, ácido lipóico) antioxidantes fenólicos (quercetinas, catequinas; flavonoides) hormonas (melatonina y oestrógenos) esteroides y saponinas (cortisol, estradiol, estriol) y algunos minerales como el selenio, zinc y cobre que actúan como cofactores de la enzima glutatión peroxidasa (Tanira y col., 2005; Sharma y col., 2006).



**FIGURA 2. VÍAS DE FORMACIÓN Y METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO.**  $\text{O}_2^{\cdot -}$ , anión superóxido; NO, óxido nítrico;  $\text{ONOOCO}_2^{\cdot}$ , nitroso peroxocarboxilato;  $\text{ONOOH}$ , ácido peroxinitroso;  $\text{OH}^{\cdot}$ , radicales hidroxilo;  $\text{CO}_2$ , dióxido de carbono;  $\text{CO}_3^{\cdot -}$ , carbonato;  $\text{NO}_2^{\cdot}$ , nitrito;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peróxido de hidrogeno (Woon-Seok Yeo y col., 2008).

En un estado de enfermedad, un desbalance de sustancias prooxidantes y de sustancias antioxidantes, puede resultar entre otras alteraciones en disfunción endotelial, donde ejerce acciones directamente sobre el músculo liso vascular, o en la liberación de sustancias vasoactivas (Hung, 2007). En la PE el estrés oxidativo puede resultar por interacciones de componentes maternos preexistentes, tales como la obesidad, la diabetes, la hiperlipidemia y componentes placentarios que involucran la secreción de peróxidos lipídicos. Más aún, el estrés oxidativo puede mediar la disfunción endotelial especialmente los que contribuyen a la fisiopatología de la PE, ya que existe evidencia de un incremento de sustancias prooxidantes y disminución de sustancias antioxidantes (LaMarca y col., 2008).

Normalmente, en el embarazo se establece un desarrollo placentario que permite que las arterias espirales placentarias presenten una baja resistencia. Cuando ocurre la PE, se postula que se produce una adaptación anómala de la invasión trofoblástica que genera un desbalance en el microambiente placentario dando como origen la teoría del inicio del desarrollo de la PE. Recientemente, se demostró que en el embarazo normal a las doce semanas ocurre un incremento en la tensión de oxígeno, paralelo a la elevación de la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes (Gerretsen y col., 1981). La disminución de la respuesta antioxidante puede estar influenciada por un estímulo que podría resultar en estrés oxidativo permitiendo aún más, la degeneración trofoblástica y una disminución en el remodelaje de las arterias espirales, efecto típico de la PE.

Muchas son las causas que parecen están involucradas en el incremento del estrés oxidativo en la PE. Se ha postulado que el incremento del estrés oxidativo por una sobreproducción del anión superóxido (Biri y col., 2007), se asocia a la presencia de un anticuerpo agonista anti-receptor AT<sub>1</sub> de la angiotensina II (Xia y col., 2003), a una placentación temprana anormal con isquemia e hipoxia placentaria que favorece a la liberación de factores que conducen a la disfunción endotelial, entre ellos los radicales libres (Gilbert y col., 2008); 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, en el sistema urinario, así como enfermedad periodontal (Herrera y col., 2007). Todas estas alteraciones conducen a una reacción inflamatoria intravascular generalizada y a un estado de estrés oxidativo que produce disfunción endotelial, y que predispone a la mujer embarazada a desarrollar PE (Herrera y col., 2001).

Se sabe que uno de los procesos asociados a la generación de los radicales libres es la peroxidación lipídica la cual ocurre en los tejidos y en las células continuamente en condiciones normales. Esto incluye la conversión de ácidos grasos no insaturados a hidroperóxidos lipídicos. Dicho proceso es iniciado por la interacción entre un radical libre y una molécula lipídica. Esta peroxidación perpetúa a la misma molécula, con hidroperóxidos lipídicos a la formación de mayor cantidad de hidroperóxidos. La evidencia indica que en las mujeres con hipertensión inducida por el embarazo ocurren incrementos de estrés oxidativo, ya que se ha reportado aumento de los niveles de

productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), el cual es un marcador de peroxidación lipídica, debido a la reacción del malondialdehído (MDA) un producto de la peroxidación lipídica, con el ácido tiobarbitúrico (TBA).

Aunado a lo anterior se ha reportado un incremento de lipoproteínas de baja densidad así como un aumento de la formación de radicales libres, lo que favorece a la agregación plaquetaria, y al daño endotelial, todos éstos factores involucrados en la PE (Adiga y col., 2007).

El organismo normalmente contiene mecanismos enzimáticos antioxidantes que limitan este proceso. Más aún, en el organismo se requieren bajas concentraciones de estos hidroperóxidos puesto que participan en señales como mensajeros intracelulares endógenos (Slater, 1987). 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).

Otra fuente generadora de anión superóxido y, por ende de las EROs que podría estar relacionada con la PE es la NAD(P)H oxidasa. En efecto, se ha demostrado que la NAD(P)H se encuentra en neutrófilos y en células endoteliales, así como también se ha encontrado la presencia de esta enzima en trofoblasto humano (Barbieri y col., 2004).

La NAD(P)H oxidasa es un complejo multimérico consistente de varias subunidades, dos subunidades unidas a la membrana plasmática (gp91<sup>phox</sup>+p22<sup>phox</sup>) y tres subunidades citoplasmáticas (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y las proteínas Rac, que unen GTP). En en el momento de la activación, estas últimas se translocan a la membrana, tras ser fosforilados ciertos dominios dentro de estas unidades (Vignais, 2002). El núcleo catalítico de la NAD(P)H oxidasa es un flavocitocromo b<sub>558</sub> que es una proteína con un potencial redox bajo que se encuentra anclado a la membrana por una serie de segmentos transmembranales hidrofóbicos y forma un enlace no covalente con las subunidades p22<sup>phox</sup> y gp91<sup>phox</sup> en una relación molar de uno a uno (Biberstine-Kinkade y col., 2001). Se sabe que la subunidad gp91<sup>phox</sup> es el real componente catalítico del núcleo.

La hipótesis planteada hasta este momento es que la p47<sup>phox</sup> es la subunidad responsable de la activación y translocación de los diferentes componentes que se encuentran del citosol hacia la membrana. Estudios realizados en neutrófilos deficientes de p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>, demostraron la importancia de la subunidad p47<sup>phox</sup> en el proceso de translocación de todas las subunidades del citoplasma a la membrana después de una estimulación. Esto fue evidenciado al estimular los neutrófilos deficientes de p67<sup>phox</sup>, que lograban realizar translocaciones normales a diferencia de los deficientes de p47<sup>phox</sup> que eran incapaces de realizar la translocación (Vignais, 2002).

Ahora bien, se ha encontrado un incremento de la actividad de la NAD(P)H oxidasa en el tejido trofoblástico, en los neutrófilos y en los vasos placentarios en mujeres con PE. Más aún, se ha reportado que la NAD(P)H oxidasa está expresada en la placenta y en el trofoblasto de mujeres con PE. Igualmente, se ha reportado la presencia de alta expresión de subunidades (p22phox, p47phox, p67phox) de la NAD(P)H oxidasa en placentas de mujeres con PE temprana con respecto a las mujeres que desarrollaron PE tardía, sugiriendo que la NAD(P)H oxidasa juega un papel importante en la disfunción endotelial asociada con el estrés oxidativo en la PE (LaMarca y col., 2008). Sin embargo, se ha planteado que el estímulo potencial para la activación de la NAD(P)H oxidasa en la PE incluye el estrés forzado en la unidad vascular feto-placentaria, una elevada concentración de citoquinas plasmáticas y un incremento en la sensibilidad a la angiotensina II (Raijmakers y col., 2004). Esto trae como consecuencia que en la PE se produzca una mayor cantidad de EROs, agravando aún más la disfunción endotelial, generando una mayor disminución del NO y un aumento de los factores contráctiles que afectan a la patogenia de la PE (Pacheco, 2003).

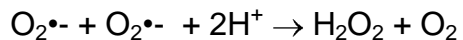
### **Enzimas Antioxidantes**

Las enzimas antioxidantes son muy importantes para mantener el balance crítico redox a nivel intra y extracelular. El desbalance entre las EROs y la defensa antioxidante ha sido implicada en la patogénesis de la PE, la cual se asocia a la disfunción endotelial generalizada debido a la acción de los radicales libres sobre las células endoteliales (Llurba y col., 2004).

Efectivamente, en la PE se ha demostrado un incremento en los hidroperóxidos lipídicos, como el principal marcador de las reacciones iniciales de la peroxidación lipídica, el cual resulta del ataque de los radicales libres a las membranas lipídicas en conjunto con una débil participación de la defensa antioxidante.

Las EROs son generadas bajo una compartimentalización intracelular específica y las enzimas antioxidantes se encuentran selectivamente distribuidas dentro de las células en regiones subcelulares acorde con su función, un ejemplo de esto son las tres isoformas de la SOD que se localizan en diferentes lugares de la célula (Beyer y col., 1991). Cada una de ellas media la rápida conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno, la CAT y la GPx que se encuentran en los peroxisomas y el citoplasma y, se encargan de la eliminación del peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua y oxígeno (Rees y col., 2008).

Las SOD son metaloenzimas que catalizan la conversión del anión superóxido para dar oxígeno molecular y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Biri y col., 2007).



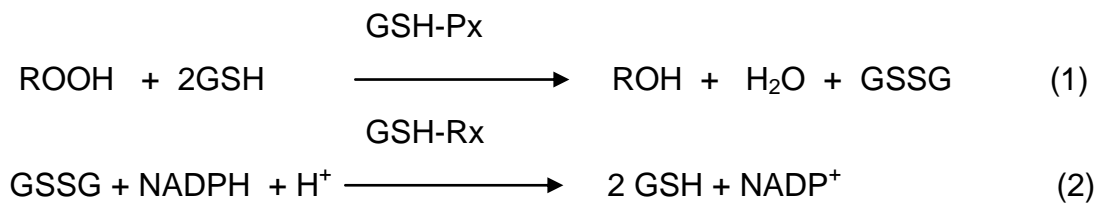
Esta enzima fue descubierta por McCord y Fridovich (1969). En las células eucariotas existen tres isoenzimas de las SOD, todas productos de genes



nucleares diferentes y son sintetizadas en los ribosomas citoplásmáticos (Ho y col., 1991). Dos de estas isoformas contienen cobre y zinc (Cu,Zn-SOD en su sitio activo), y la tercera contiene manganeso (Mn-SOD). Una de las isoformas de CuZn-SOD se localiza principalmente en el citosol aunque también se encuentran en los lisosomas, en el núcleo y en menor cantidad en los peroxisomas y en el espacio intermembranoso mitocondrial (Weisiger y col., 1973), su estructura es un dímero, con un peso de 17 kDa por subunidad (Hsu y col., 1992; Crapo y col., 1992). La otra isoforma de Cu,Zn-SOD es extracelular (EC-SOD), en el humano su peso molecular es de 104 kDa y tiene estructura tetramérica (Oury y col., 1996), se localiza en fluidos como en el plasma, el líquido sinovial y la linfa. Se ha sugerido que su sitio de síntesis son las células endoteliales y cuando está unida a ellas funciona como una cubierta protectora; posee afinidad por la heparina y por los proteoglicanos de heparán sulfato (Carlsson y col., 1996), y contribuye de un 0,5 a un 20% de la actividad de la SOD total (Oury y col., 1996). En la rata, esta isoforma está constituida por dos subunidades; su peso molecular es de 85 kDa y, a diferencia de la forma tetramérica, no posee afinidad por la heparina (Carlsson y col., 1996). La Mn-SOD también es un tetrámero con un peso de 80 kDa, contiene 2 átomos de manganeso por dímero y se localiza en la matriz mitocondrial (Weisiger y col., 1973).

Otra de las enzimas antioxidantes encargada de la degradación de EROs es la glutatión peroxidasa (GPx), descubierta por Mills (1957). Esta enzima

cataliza la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o de otros peróxidos orgánicos a H<sub>2</sub>O con la concomitante oxidación del glutatión reducido (GSH), el que se transforma en glutatión oxidado (GSSG) (1) (Chu y col.,1993). El GSSG es, a su vez, reducido a GSH por la glutatión reductasa (GSH-Rx) en presencia de NAD(P)H formando un ciclo redox, impidiendo que se agoten las reservas de GSH (Harris 1992; Ichikawa y col., 1994) (2). Los niveles de NAD(P)H son regenerados por la acción de las enzimas málica y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

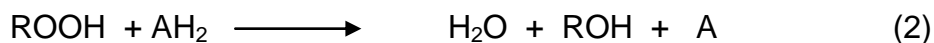
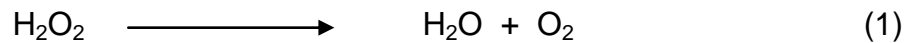


Se conoce una isoforma de esta enzima GSH-Px citosólica (cGPx) que contiene en su sitio activo un átomo de selenio. Esta enzima es tetramérica (Arthur y col., 1994), y sólo tiene actividad antioxidante en casos de un incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de hidroperóxidos de lípidos, pero muestra una baja actividad sobre los hidroperóxidos de fosfolípidos y de colesterol. La GSH-Px extracelular (pGPx) es una enzima glicosilada, que se sintetiza en el riñón y en el pulmón, su ARNm se ha encontrado en células del epitelio tubular proximal y en células parietales de la cápsula de Bowman. Se piensa que tiene un papel importante en la protección del riñón durante el daño oxidativo (Maser y col., 1994); sin embargo, su función no ha sido bien establecida, ya

que su sustrato (GSH), está en muy bajas concentraciones 0,3  $\mu\text{M}$  en el plasma (Avisar y col., 1994; Arthur y col., 1994). Esta enzima puede estar presente en la circulación como un homotetrámero (Yoshimura y col., 1991).

Por otra parte, el peróxido de hidrógeno es uno de los residuos del metabolismo celular de muchos organismos vivos, además de ser un importante segundo mensajero implicado en procesos de fagocitosis de microorganismos patógenos, principalmente anaerobios, pero dada su toxicidad debe transformarse rápidamente en compuestos menos peligrosos.

Esta función la efectúa la catalasa, enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en oxígeno y agua (Prego y col., 1997).



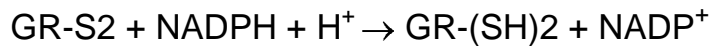
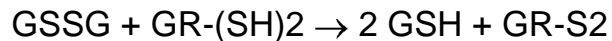
La catalasa es una enzima perteneciente a la familia de las Fe-protoporfirinas IX, y se encuentra presente en muchos tipos de células. Su función es proteger a las células del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno producido en distintas reacciones redox del metabolismo celular. La catalasa fue una de las primeras enzimas purificadas y ha sido muy estudiada (Deisseroth y Dounce, 1970). Es una de las enzimas más eficientes con una velocidad de aproximadamente 200.000 transformaciones/segundo. Esta enzima está

formada por un tetrámero con cuatro subunidades idénticas (350,000 kD). Cada monómero contiene un grupo prostético hem en el núcleo catalítico de la enzima. En algunas especies animales también contiene una molécula de NAD(P) por subunidad cuya función es proteger a la enzima de la oxidación por su sustrato  $H_2O_2$  (Ivancich y col., 1997).

Más comúnmente se puede encontrar en los peroxisomas, que contienen oxidasas y catalasas. En los peroxisomas se degradan las purinas y otros compuestos. En los peroxisomas se produce  $H_2O_2$ , compuesto que es degradado rápidamente por la catalasa (Chance y Oshino, 1971).

El mecanismo completo mediante el cual actúa la catalasa no se conoce del todo; sin embargo, en la actualidad se sabe que la reacción química se produce en dos etapas, en donde Fe-E representa el núcleo de hierro del grupo hemo unido a la enzima que actúan como cofactores (Vetrano y col., 2005). Esta enzima puede actuar como una peroxidasa (con el consumo de 1 mol de peróxido de hidrógeno), para muchas sustancias orgánicas especialmente para el etanol, que actúa como donante de hidrógeno. Las enzimas de muchos microorganismos, como el *Penicilium simplissimum* que exhiben actividad de catalasa y peroxidasa, son frecuentemente llamadas catalasas-peroxidasas (Kehrer, 1993, Tanira y col., 2005).

Por último, la glutatión reductasa (GRx), que es una enzima que requiere el cofactor NAD(P)H y que cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) por medio de las siguientes reacciones:



En donde GR-(SH)<sub>2</sub> y GR-S<sub>2</sub> corresponden a las formas reducidas (ditiol) y oxidadas (disulfuro) de la glutatión reductasa. Las peroxidasas y las glutatión transferasas son enzimas que catalizan el ataque nucleofílico del glutatión reducido ó GSH (g-Glu-Cys-Gly) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas) durante la detoxificación de peróxidos orgánicos y en el metabolismo de xenobióticos o sustancias nocivas para las células (Tanira y col., 2005).

Por otra parte, se ha postulado que muchos sistemas antioxidantes están involucrados en el desarrollo de enfermedades, donde el grupo tiol y el glutatión son reducidos (Tanira y col., 2005). Tal y como se ha indicado anteriormente, se ha demostrado que el incremento del estrés oxidativo ejerce un papel importante en la PE, el cual se asocia a un aumento de la peroxidación lipídica, así como a una disminución significativa de la actividad de las enzimas antioxidantes como la SOD, la CAT, la GPx y la GSR, y de los antioxidantes no enzimáticos (vitamina C, vitamina E, betacarotenos) (Tanira y col., 2005).

Efectivamente, se ha demostrado una disminución tanto de la actividad como de la expresión de la SOD a nivel placentario en la mujer embarazada con PE, lo cual conduce a la activación de la liberación de neutrófilos a partir de la placenta de la mujer preecláptica, favoreciendo a la generación de EROs. Así, se ha demostrado una disminución de la actividad SOD total en homogenizado de placenta, especialmente en la fracción mitocondrial y citosólica proveniente de mujeres con PE (Poranen y col., 1996). Igualmente, se ha evidenciado una disminución de la actividad y de la expresión de la enzima Cu,Zn-SOD en tejido placentario (Wang y Walsh, 1998). Aún más, se ha demostrado una reducción de la actividad de la SOD en los glóbulos rojos y en los glóbulos blancos proveniente de mujeres con PE comparado con las embarazadas normales (Chen y col., 1994).

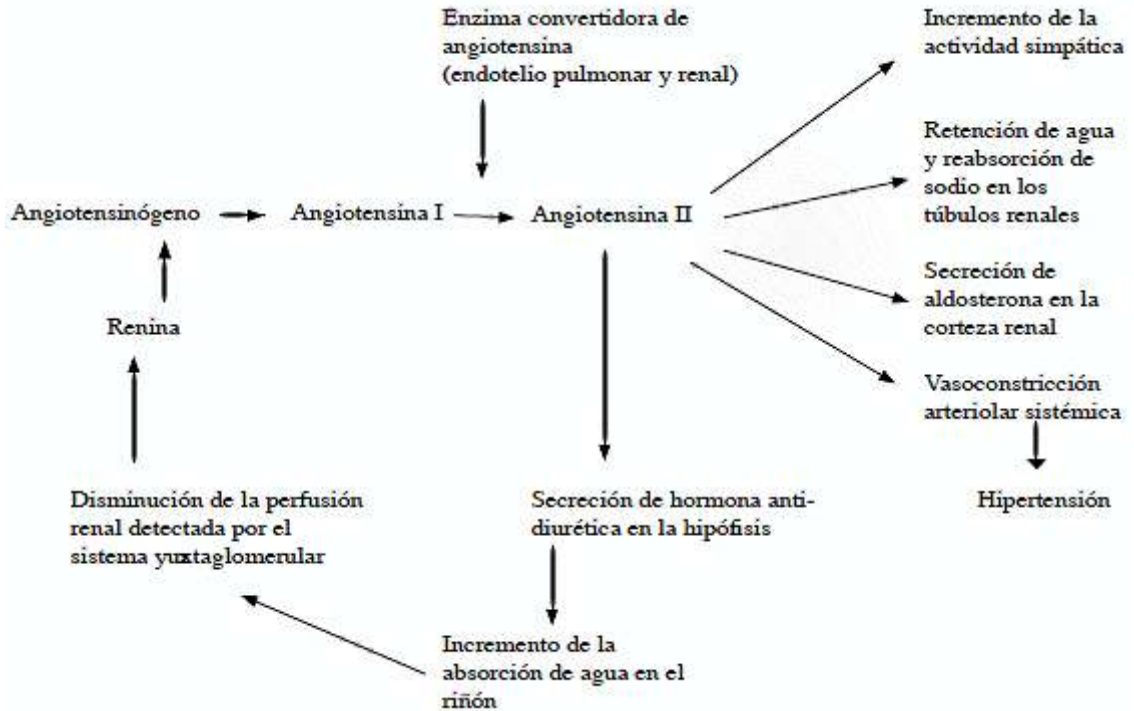
### **El Sistema Renina-Angiotensina (SRA)**

El sistema renina-angiotensina-aldosterona juega un papel funcional muy importante en el mantenimiento de la homeostasis del medio interno y de la PA. Este sistema hormonal, cuyo péptido activo es la angiotensina II, está constituido por dos componentes según el sitio de origen: el sistema renina angiotensina endocrino renal o sistémico y, el sistema renina angiotensina paracrino o autocrino, el cual cumple funciones locales o tisulares (Dinh y col., 2001).

El SRA está constituido por una cascada enzimática necesaria para la generación de angiotensina II (ANG II), dichos constituyentes son el angiotensinógeno, la renina y la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

Los órganos y tejidos que disponen de estos elementos, pueden producir ANG II. Esta hormona desarrolla sus funciones a través de su interacción con receptores específicos (AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>) (Dinh y col., 2001).

La renina, es sintetizada y liberada por las células yuxtaglomerulares del riñón, localizadas en las arteriolas aferentes renales y es liberada a la circulación ante estímulos tales como la hiponatremia, la hipovolemia, la hiperkalemia y por, niveles elevados de ANG II. El sustrato de la renina es una alfa 2-globulina plasmática, sintetizada en el hígado, el angiotensinógeno. La renina escinde enzimáticamente al angiotensinógeno liberado desde las células hepáticas para formar un decapeptido la angiotensina I, el cual es convertido bajo su forma activa en el lecho vascular pulmonar, por la acción de la ECA, a ANG II un octapéptido (un potente vasoconstrictor). Adicionalmente, en la circulación sistémica, el SRA se encuentra presente es muchos tejidos incluyendo el vascular, el corazón, el riñón y el cerebro, donde es capaz de producir ANG II para ejercer efectos autocrinos, intracrinos y paracrinos. La ANG II puede formarse además por una vía no mediada por la ECA, donde incluye proteínas como la quimasa, la catepsina G, y la enzima generadora de ANG II sensible a la quimiostatina (Dinh y col., 2001) (figura 3).



**FIGURA 3. ESQUEMA CLÁSICO DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA) CIRCULANTE.** La molécula clave del SRA es la ANG II, como un potente vasoconstrictor, los receptores  $AT_1$  incrementan la presión arterial. Abreviaturas: ADH: hormona antidiurética. ANG II: angiotensina II,  $AT_1$  RECEPTOR: receptor  $AT_1$  (Reyna-Villasmil y Briceño-Pérez, 2011).

El SRA juega un papel fundamental en la homeostasis cardiovascular. La sobreactividad del SRA ha sido implicada en múltiples enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, la insuficiencia cardíaca congestiva, la insuficiencia renal y la PE (Dinh y col., 2001).

Los efectos fisiológicos conocidos de la ANG II están mediados por la activación del receptor  $AT_1$ , el cual se expresa en las células musculares lisas, el riñón y en la glándula suprarrenal, entre otros. Los receptores  $AT_1$  están acoplados a la proteína Gq, donde funcionalmente las vías de señalización

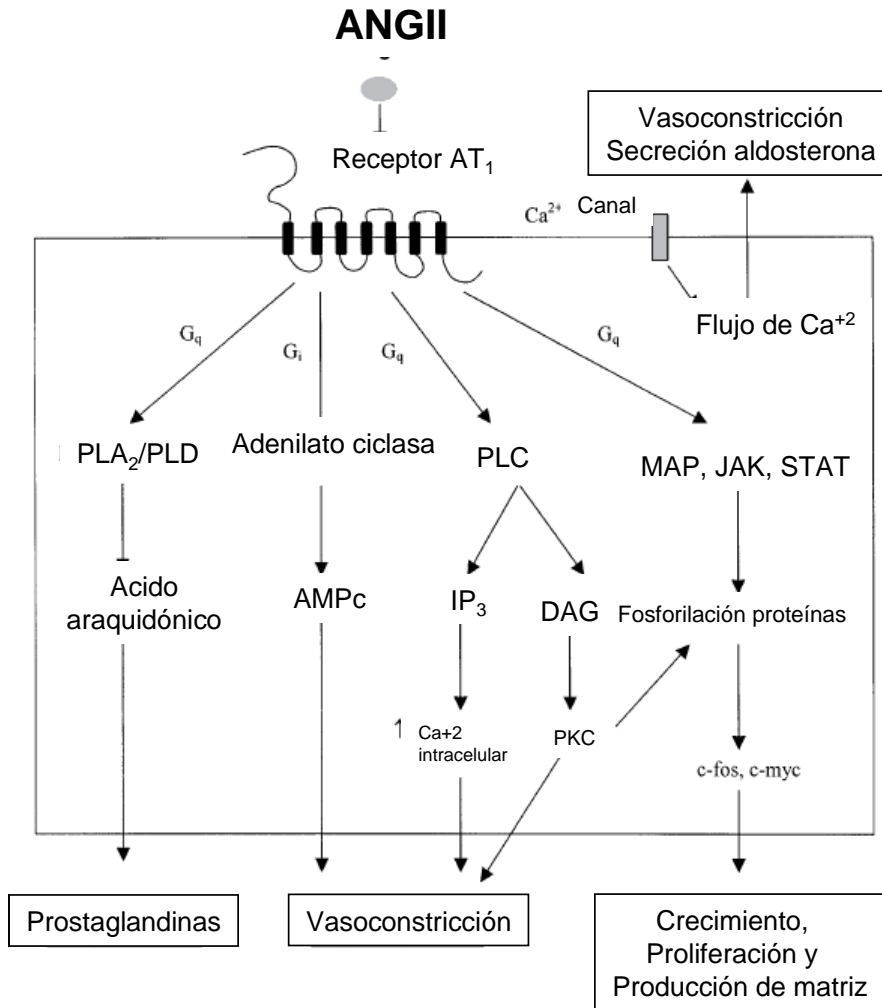


incrementan la concentración de calcio intracelular. Esta activación promueve a la vasoconstricción, el incremento de la actividad simpática y la liberación de aldosterona. El receptor  $AT_2$  está altamente expresado en el riñón fetal y su expresión es disminuida durante su periodo neonatal. En el adulto la expresión del receptor  $AT_1$  renal es mucho mayor que la expresión del receptor  $AT_2$ . La estimulación del receptor  $AT_2$  inhibe el crecimiento celular, incrementa la apoptosis, causa vasodilatación y está involucrado en el desarrollo fetal (Dinh y col., 2001; Irani y Xia, 2008).

El mecanismo de señalización del receptor  $AT_1$  está constituido por cinco vías clásicas: Activación de las fosfolipasa  $A_2$ , la fosfolipasa C y la fosfolipasa D, apertura de canales de calcio tipo L, e inhibición de la adenilil ciclasa. La estimulación de la fosfolipasa C- $\beta$ , la cual está acoplada a la proteína Gq/11, es el mecanismo de señalización intracelular más descrito, en el cual los segundos mensajeros inositol trisfosfato y diacilglicerol, se forman por la hidrólisis del fosfatidilinositol-bifosfato. La activación de la fosfolipasa  $A_2$  y D estimula la liberación del ácido araquidónico, el cual es el precursor de las prostaglandinas. La ANG II mediante la estimulación del receptor  $AT_1$  acoplado a la proteína Gi/o que inhibe a la adenilil ciclasa en múltiples tejidos, incluyendo el hígado, el riñón, el tejido glomerular, atenuando la producción del segundo mensajero AMPc. El AMPc es un vasodilatador y su producción es disminuida por acción del receptor  $AT_1$ , produciendo vasoconstricción (Dinh y col., 2001) (figura 4).

Por su parte, el receptor AT<sub>2</sub> presenta una alta afinidad por compuestos inhibidores AT<sub>2</sub> como el PD123319, PD123177, y CGP42112, y una muy baja afinidad para el losartán y el candesartan. La señalización del receptor AT<sub>2</sub> parece ser una vía indirecta negativa acoplada a la guanilil ciclasa (por inhibición de la producción de la GMPC), y a la inhibición de canales de potasio (figura 5). Se ha demostrado recientemente que el receptor AT<sub>2</sub> está asociado a la activación de proteínas fosfatasa, como la tirosina fosfatasa, la MAP quinasa 1 (MKP1), dominios que contienen fosfatasa 1-SH2, y serina/treonina fosfatasa 2A. Estas vías resultan en la inactivación las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK, la apertura de los canales de potasio y la inhibición de canales de calcio tipo T. Las MKP-1 juegan un papel importante en la proliferación celular (figura 5) (Dinh y col., 2001).

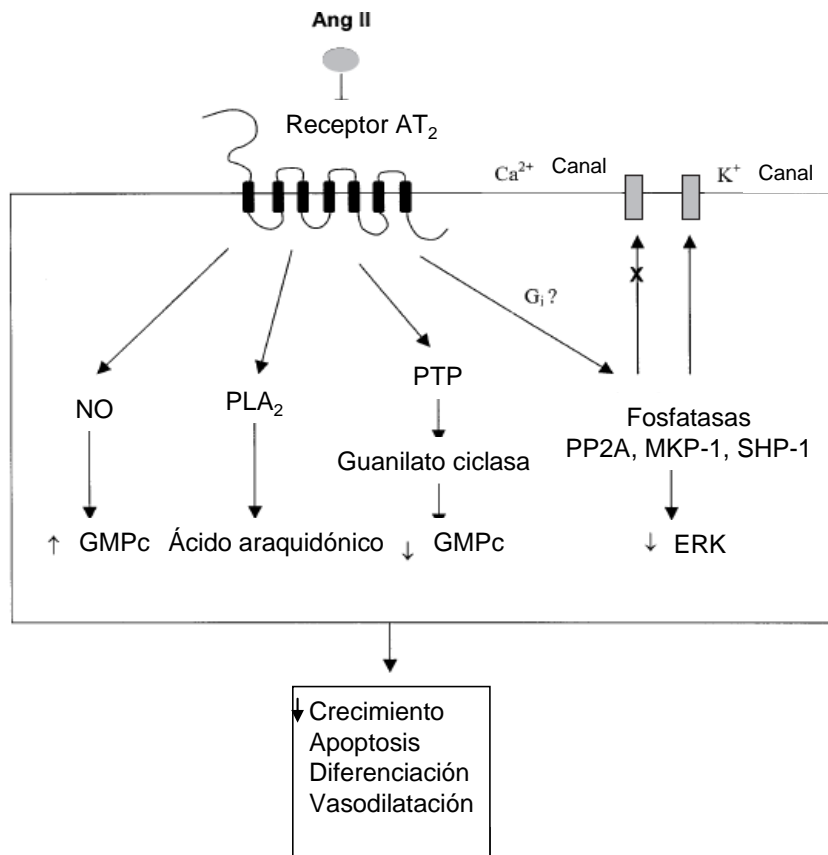
Se ha reportado que el receptor AT<sub>2</sub> se encuentra altamente expresado durante el desarrollo fetal, pero declina rápidamente posterior al nacimiento. En el adulto se ha encontrado la presencia del receptor AT<sub>2</sub> en el cerebro, específicamente en áreas relacionadas a las funciones sensoriales, incluyendo el núcleo talámico, el núcleo geniculado medial, el locus ceruleus y la oliva inferior.



**FIGURA 4. MECANISMO DE SEÑALIZACIÓN Y FUNCIONES FISIOLÓGICAS MEDIADOS POR EL RECEPTOR AT<sub>1</sub> DE LA ANGIOTENSINA II.** PLA: fosfolipasa A, PLC: fosfolipasa C, JAK: janus quinasa, STAT: señal de transducción y activación de transcripción, IP<sub>3</sub>: fosfatidil tri-inositol, DAG: diacilglicerol (Dinh y col., 2001).

Utilizando técnicas de inmunohistoquímica se ha reportado una muy baja densidad de receptores en el miocardio, en los vasos coronarios, en los ventrículos y en la aurícula. Por otra parte, se ha encontrado, que el receptor AT<sub>2</sub> es altamente expresado en médula suprarrenal, en los túbulos renales y el glomérulo, tanto en ratas como en humanos. En el humano se ha descubierto una alta densidad de receptores AT<sub>2</sub> en el miometrio uterino,

posiblemente por la acción de las hormonas sexuales, en el ovario, en las células granulosas foliculares y en el tejido fetal (Dinh y col., 2001; Irani y Xia, 2008; Chen y col., 2007).



**FIGURA 5. MECANISMO DE SEÑALIZACIÓN Y EFECTOS FISIOLÓGICOS MEDIADOS POR EL RECEPTOR AT<sub>2</sub> DE LA ANGIOTENSINA II** (Dinh y col., 2001).

### Regulación del Sistema Renina Angiotensina en el embarazo normal

En el humano, junto con los cambios hemodinámicos que ocurren en el embarazo se observan mecanismos adaptativos del SRA. El embarazo normal se caracteriza por un incremento temprano de la renina, la cual parece ser liberada desde los ovarios y la decidua materna. Igualmente, se ha reportado un incremento en la síntesis de angiotensinógeno en el hígado, como

consecuencia de un aumento de la concentración de estrógenos producidos por la placenta. Más aún, se observa un incremento de la actividad de la renina plasmática, los niveles séricos de ANG II y de la aldosterona, lo cual puede contribuir a una mayor retención de sodio y agua. Esto último explicaría el mecanismo de expansión del volumen en el embarazo, sin un aumento concomitante de la presión PA. El incremento de los niveles circulantes de ANG II sugeriría una acción sobre el sistema vascular para incrementar el tono vasomotor, pero en el embarazo no se observa esta respuesta. En efecto, el sistema vascular en el embarazo normal es refractario a la ANG II, probablemente debido a la acción de la progesterona y de la prostaciclina (Shah, 2005; Irani y Xia, 2008).

En relación a la porción placentaria, se ha demostrado que las células trofoblásticas son ricas en receptores  $AT_1$ , los cuales responden a los cambios frente a las concentraciones de ANG II en el embarazo. Estudios recientes han demostrado que el receptor  $AT_1$  es capaz de regular múltiples genes, incluyendo a las proteínas asociadas a la invasión trofoblástica (factor inhibidor del plasminógeno-1, (PAI-I-) y la angiogénesis (receptor soluble similar a la fms tirosina kinasa, sFlt-1). La ANG II también activa la señalización y la síntesis del factor nuclear kappa B (NFkB) y la estimulación de la NAD(P)H oxidasa en las células trofoblásticas. La ANG II, a través del receptor  $AT_1$ , es capaz de disminuir el sistema transportador de aminoácidos A2 en fragmentos de vellosidades de placenta humana. En adición, se cree que la regulación de genes específicos involucrados en la unidad feto-placentaria es mediada por el

SRA; esto facilita el flujo de oxigenación adecuado en la circulación fetal y placentaria requerido para en el embarazo normal. Asimismo, Takimoto y col. (1996) demostraron la activación del gen de expresión de la renina en células trofoblásticas en el embarazo tardío, así como la liberación de la renina desde la placenta a la circulación materna, hallazgos que indican que el SRA ejerce un papel importante durante la gestación (Irani y Xia, 2008).

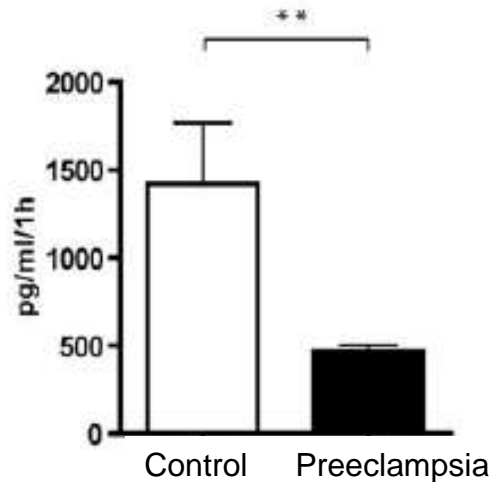
### **Sistema Renina Angiotensina en la Preeclampsia**

El SRA ha sido uno de los sistemas involucrados en la patogénesis de la PE. Aunque las alteraciones del sistema renina-angiotensina contribuyen con la hipertensión asociada con el embarazo, la patogénesis de esta hipertensión no está clara; sin embargo numerosos hallazgos relacionan a la PE con el SRA (Nasir y col., 2010).

Existe evidencia que documenta acerca de una disminución significativa de la actividad de la renina plasmática, de la concentración de ANG II y de la aldosterona plasmática en la mujer que desarrolla PE comparada con la normotensa, lo cual conduce a una hemoconcentración y a la vasoconstricción (Shah, 2005). Herse y col. (2007), encontraron que la actividad de la renina plasmática era tres veces menor en pacientes con PE con respecto a las pacientes controles, lo que sugiere que en el embarazo normal existe un incremento en la actividad de la aldosterona puesto que incrementa la renina como sustrato, mientras que en la PE dicho sustrato está suprimido (Herse y col., 2007) (figura 6). Israel y Peceño (2000), cuantificaron la actividad de la

ECA y la concentración de aldosterona en plasma de mujeres embarazadas con PA normal o con PE, encontrando una reducción significativa tanto de la actividad de la ECA como de la concentración de aldosterona plasmática en las pacientes con PE al ser comparadas con las pacientes normotensas. Adicionalmente, se demostró una correlación negativa y significativa entre los niveles de ECA/aldosterona y la PA en todas las mujeres embarazadas, sugiriendo que la alteración en estos parámetros se correlaciona con la alteración de la PA. En otros estudios se reportó una disminución de la angiotensina 1-7, en pacientes con PE siendo éste último un potente vasodilatador perteneciente al SRA involucrando otras vías (Merrill y col., 2002) (Tabla II). Mientras que las mujeres embarazadas normales muestran una disminución en la sensibilidad vascular a la ANG II en la PE, las mujeres exhiben un aumento en la reactividad del sistema vascular a la ANG II. Se ha sugerido que esto se debe a la regulación hacia arriba de la población de receptores vasculares en la PE. En apoyo a esto, se ha evidenciado una regulación hacia arriba del receptor  $AT_1$  en las plaquetas de mujeres con PE (Baker y col., 1992). Este fenómeno, se ha tratado de explicar por el hecho que el receptor  $AT_1$  es capaz de dimerizar o alternativamente sufrir una heterodimerización con el receptor de bradikinina ( $AT_1$ - $B_2$ ) que contribuiría a la hipersensibilización durante la PE (Xia y col., 2003).

### Actividad Plasmática de la Renina



**FIGURA 6. ACTIVIDAD DE LA RENINA PLASMÁTICA EN MUJERES CON PREECLAMPSIA Y EN MUJERES EMBARAZADAS CONTROLES.** Valores expresados en pg/mL/h (Herse y col., 2007).

Componentes Séricos del SRA	Embarazo Normotenso	Embarazo con Preeclampsia
Renina	++	+
Angiotensina I	++	+
ECA	-	=/-
Aldosterona	++	+
ANG (1-7)	++	-
Angiotensina II	++	+
Sensibilidad a la ANG II	- (Sistema Refractario)	Elevada sensibilidad ++
AT <sub>1</sub> -AA	Ausente	Presente
Receptor AT <sub>1</sub>	Producción basal en decidua materna	Sobre-regulado en decidua materna

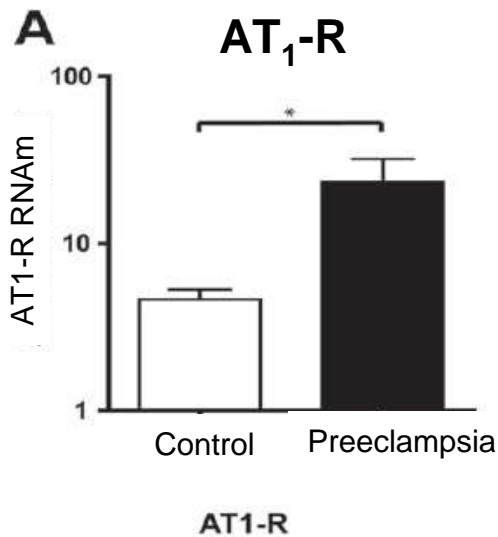
**TABLA II. NIVELES SÉRICOS DE LOS COMPONENTES DEL SRA EN MUJERES EMBARAZADAS NORMOTENSAS, VERSUS MUJERES CON PREECLAMPSIA.** Los niveles circulantes del sistema SRA están más incrementados en mujeres embarazadas normales, versus mujeres con preeclampsia. Leyenda: ++ gran incremento, sobre mujeres no embarazadas, + ligeramente incrementado sobre mujeres no embarazadas., = igual que las mujeres no embarazadas, y – disminuidas comparadas con mujeres no embarazadas (Modificado de Irani y Xia y col., 2008).



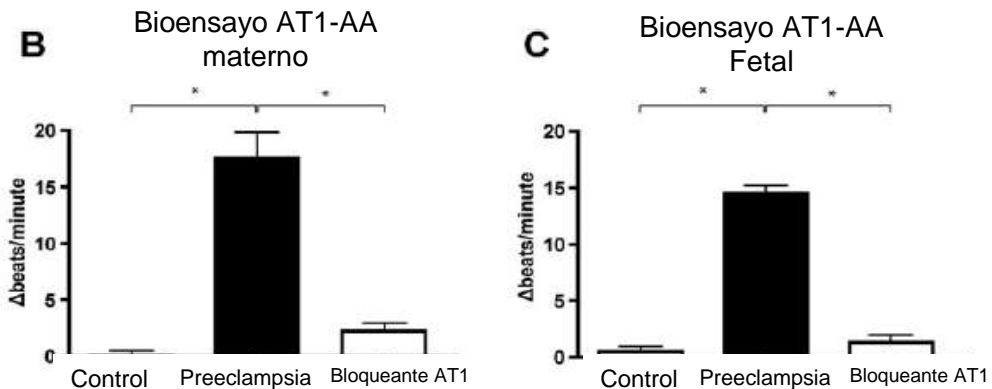
## **Cambios del SRA uteroplacentario en la preeclampsia**

Los cambios uteroplacentarios observados en el SRA son distintos, y probablemente opuestos, a los observados en la circulación en pacientes con PE. En efecto, se ha demostrado la existencia de cambios placentarios o deciduales en la expresión de los componentes del SRA. Herse y col. (2007), evaluaron la variación uteroplacentaria de algunos de los componentes del SRA en muestras de placenta humana control y muestras de placenta humana con PE, considerando las unidades: feto-placentaria (denominada placenta) y materno-placentaria (denominada decidua). En dicho estudio encontraron sobre-expresión del receptor  $AT_1$  en la decidua en mujeres con PE, lo cual no sucedía con el grupo control, ni en la placenta de mujeres con preeclampsia (figura 7). Esto estuvo acompañado de una mayor expresión de los genes de renina, ECA y angiotensinógeno en el lado decidual comparado con el placentario, tanto en la mujer embarazada normal como la preecláptica. Además, determinaron mediante un bioensayo en cardiomiocitos neonatales la presencia del anticuerpo agonista anti-receptor  $AT_1$ , demostrando que el anti-anticuerpo del receptor  $AT_1$  se manifiesta tanto en la madre como en el feto preecláptico y que su efecto taquicardizante es abolido en presencia de losartán, un bloqueante del receptor  $AT_1$  (figura 8), sugiriendo la importancia de la regulación del receptor  $AT_1$  en la decidua en mujeres con PE que combinado con una alteración del SRA placentario, y la producción de un anticuerpo agonista anti-receptor  $AT_1$  en la decidua, posiblemente podría estar involucrado en la patogénesis de la PE. Esto podría deberse a que la decidua actuaría

activamente como un SRA local participando así en la regulación de la presión sanguínea materna, del flujo sanguíneo y de la resistencia vascular uteroplacentaria (Takimoto y col., 1996). La ANG II producida localmente entraría a la circulación materna donde al ser secuestrada por ese sistema incrementa la reactividad vascular observada en la PE (Irani y Xia, 2011).



**FIGURA 7. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR AT<sub>1</sub> EN LA DECIDUA PLACENTARIA EN MUJERES EMBARAZADAS CONTROLES Y EN MUJERES CON PREECLAMPSIA (Tomado de Herse y col., 2007).**



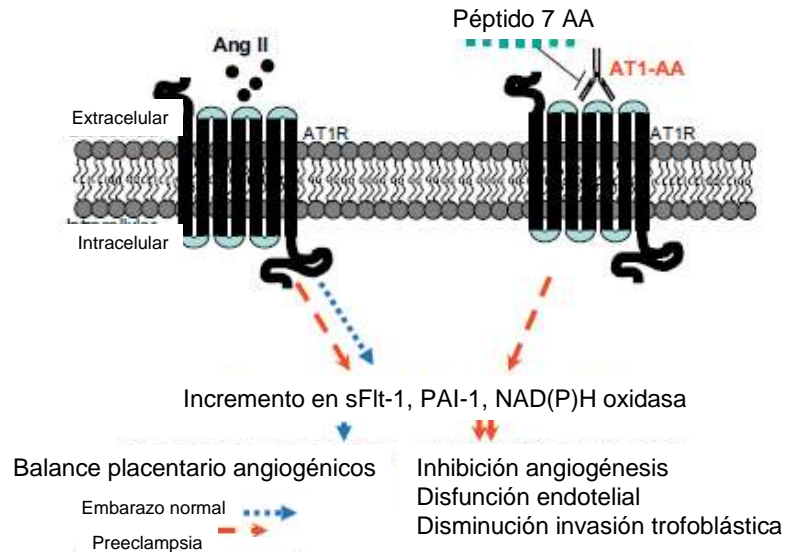
**FIGURA 8. ANTICUERPO AGONISTA ANTI-RECEPTOR AT<sub>1</sub>, EN PRESENCIA Y AUSENCIA DEL BLOQUEANTE AT<sub>1</sub>, EN TEJIDO MATERNO (DECIDUA) Y EN TEJIDO UTERO-FETAL (PLACENTA) (Tomado de Herse y col., 2007).**

## **La Angiotensina II y los Anticuerpos agonista anti- receptor AT<sub>1</sub> (AT<sub>1</sub>-AA)**

El mayor avance en el conocimiento de la PE fue cuando Wallukat y col, (1999) reportaron la presencia de anticuerpos contra el receptor AT<sub>1</sub> (AT<sub>1</sub>-AA) en la circulación de la mujer preecláptica. El AT<sub>1</sub>-AA es agonista del receptor AT<sub>1</sub> y se une a una región que presenta una secuencia de siete aminoácidos (AFHYESQ) en la segunda asa extracelular del receptor AT<sub>1</sub>. Esto ha llevado a una extensa investigación de la participación de el AT<sub>1</sub>-AA en la patogénesis de la PE (Irani y Xia Y, 2008).

Algunos investigadores demostraron los eventos de señalización de AT<sub>1</sub>-AA *in vitro* que permitieron explicar la capacidad del AT<sub>1</sub>-AA de activar las células vasculares y trofoblásticas (Herse y col., 2007). Así, se demostró que los AT<sub>1</sub>-AA son capaces de estimular a la NAD(P)H oxidasa e incrementar la producción de EROs intracelular. Consecuentemente, los AT<sub>1</sub>-AA son capaces de actuar sobre blancos “corriente abajo” como la PKC, las ERK 1/2 y los factores de transcripción NF-kB y AP-1, por lo que contribuye al estado de estrés oxidativo e inflamatorio de la preeclampsia. La presencia de AT<sub>1</sub>-AA en pacientes con preeclampsia, activa factores nucleares que inician la vía extrínseca de coagulación por formación del complejo enzimático VII/factor VII activado. También el AT<sub>1</sub>-AA promueve un incremento y la secreción del PAI, (factor inhibitorio del activador del plasminógeno), el cual es sobre-expresado en placentas de mujeres con PE, resultando en la disminución de la conversión de plasminógeno a plasmina lo que induce a su vez a la inhibición de la digestión de la matriz extracelular, afectando negativamente la invasión

trofoblástica en la decidua. La activación del receptor AT<sub>1</sub> por el AT1-AA resulta en una disminución de la invasión trofoblástica demostrado en un sistema *in vitro* (Irani y Xia, 2008) (figura 9).



**FIGURA 9. ANTICUERPO AGONISTA ANTI-RECEPTOR AT<sub>1</sub> EN LA PLACENTACIÓN NORMAL.** El AT1-AA interactúa con los receptores AT<sub>1</sub> en células trofoblásticas con actividad sinérgica a la angiotensina II para deteriorar la placentación. El SRA normal funciona con el receptor AT<sub>1</sub> el cual es imperativo para la placentación normal. El AT1-AA se encuentra en el suero de las mujeres con preeclampsia, y funciona como la angiotensina II, interactuando con el receptor AT<sub>1</sub> para producir factores como sFlt-1, PAI, y NAD(P)H oxidasa (Tomado de Irani y Xia, 2008).

### Interacción de del AT<sub>1</sub>- AA y sFlt-1

La sFlt-1 es una forma trunca del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1 (VEGF-R1), el cual contiene un dominio extracelular de unión a un ligando. La sFlt-1 es capaz de unirse a ese dominio, evitando la unión del receptor a su ligando (PLGF) el factor de crecimiento placentario y el (VEGF) factor de crecimiento endotelial vascular. Es bien sabido que en la placenta se producen un número de factores angiogénicos VEGF, PLGF. En

pacientes preeclámpticas el incremento de sFlt-1 está asociado con una disminución de VEGF y PLGF (Shah, 2005).

Se ha reportado que la sFlt-1 induce genes que generan hipoxia en la placenta de mujeres embarazadas normotensas, y esta inducción de la sFlt-1 sucede en células del sincitiotrofoblasto, y altera genéticamente la expresión de las proteínas involucradas en el retardo de la invasión trofoblástica. Esto indica que el factor inducible de hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) está sobre-regulado en la PE permitiendo el incremento de otros factores, como el factor transformante  $\beta$ , el cual limita la invasión trofoblástica a las arterias espirales y la decidua generando condiciones de hipoxia (Hung y col., 2006).

Se ha encontrado la presencia de los AT<sub>1</sub>-AA en mujeres con PE, aún un año después del parto. Estas mujeres presentan concomitadamente, niveles circulantes elevados de sFlt-1 y niveles circulantes reducidos de VEGF, así como valores altos de la resistencia a la insulina. Esta correlación e interacción de factores puede ser importante en el riesgo cardiovascular.

Se ha postulado que la presencia AT<sub>1</sub>-AA y a su vez la hipoxia generada puede contribuir con un exceso de la secreción de sFlt-1 que, a su vez, puede potenciar la hipoxia placentaria, reportada en las pacientes con PE. Todo ello además, plantea la hipótesis que la enorme expresión de sFlt-1 en la placenta en la PE es debida a la activación combinada del receptor AT<sub>1</sub> por la ANG II y el AT<sub>1</sub>-AA (Irani y Xia, 2008; Herse y col., 2007)

## **Disfunción Renal y Preeclampsia**

La PE es un trastorno hipertensivo que ocurre principalmente por una mala adaptación placentaria, que involucra disfunción endotelial, la cual afecta consistentemente al riñón (Shah, 2005). La disfunción endotelial en el riñón en la preeclampsia se manifiesta por la proteinuria, así como evidencia morfológica de endoteliosis glomerular (Munkhaugen y Egil, 2009). Las alteraciones a nivel renal incluyen disminución del flujo plasmático renal (FPR) y de la tasa de filtración glomerular (TFG), como también proteinuria que puede estar en rango nefrótico.

Se ha planteado la hipótesis que la PE es como una variación del modelo Goldblatt de hipertensión inducida “1clip-2 riñones” (Shah, 2005). En este modelo se propone que la reducción de la perfusión de la unidad uteroplacentaria en la preeclampsia se comporta como si fuera el “riñón clipeado” y los riñones de la madre preecláptica representarían los dos riñones “sin-clip”; de manera que, la reducción del flujo sanguíneo intervilloso en la placenta preecláptica regularía al SRA uteroplacentario e induciría la liberación de factores y sustancias derivadas de la placenta (Karumanchi y col., 2005). Así, como consecuencia de una mala adaptación placentaria, ocurre la liberación de sustancias vasoactivas y angiogénicas, como la angiotensina II, el AT1-AA y el sFlt-1, un antagonista del VEGF, el cual al reducir los niveles circulantes de VEGF y PLGF, contribuye a la hipertensión, a la disfunción endotelial y al daño renal. El efecto del sFlt-1 fue evidenciado experimentalmente en ratas preñadas a las que se les administró sFlt-1

mediante la transferencia de un gen vía adenovirus y se observó un cuadro similar a la PE, con un incremento en la presión arterial y proteinuria en las ratas y consecuentemente, una disminución del factor angiogénico VEGF en el plasma y del factor PLGF (LaMarca y col., 2008; Maynard y col., 2003). Se sabe que el VEGF se sintetiza constitutivamente en los podocitos glomerulares y es un factor crítico para el mantenimiento adecuado del endotelio y especialmente, de las fenestraciones. Así que el incremento exagerado de sFlt-1 reduce el VEGF causando lesiones glomerulares que inducen proteinuria. En estudios de control en una muestra de mujeres embarazadas y seleccionadas en forma aleatoria se ha medido la fracción libre de sFlt1, el PLGF y el VEGF, y se ha demostrado la mayor elevación progresiva y más temprana en pacientes que desarrollaron preeclampsia que en el grupo control, lo que indica que el sFlt1 actúa en forma inhibitoria sobre PLGF (Levine y col., 2004).

Paradójicamente, en la PE se observa una disminución de la actividad del SRA renal, con concentraciones disminuidas de renina, ANG II y aldosterona, asociados a una hipersensibilidad a la aldosterona renal y un aumento en la reactividad a la ANG II, lo que trae como consecuencia un aumento exagerado de la reabsorción de sodio y agua, factores que favorecen la patogenia de la PE (Shah, 2005).

En estudios de placentas de mujeres con PE en una comparación de placentas normales, se ha demostrado 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 ANG II, la vasoconstricción sistémica y el estrés oxidativo placentario, son factores responsables de la disfunción endotelial vascular renal, y que contribuyen con el desarrollo de la preeclampsia (Shah, 2005).

En la placenta ocurre también un desbalance entre las sustancias vasodilatadoras (NO, prostaciclina) y las sustancias vasoconstrictoras (endotelina-1, tromboxanos), predominando la liberación de sustancias vasoactivas. Este desbalance, a su vez, favorece a la activación de vías intrínsecas y extrínsecas de la coagulación, y con ello se genera un incremento de los tromboxanos, las citoquinas, el factor de necrosis tumoral que afecta también la integridad endotelial vascular, como consecuencia al daño endotelial ocurrido en los vasos sanguíneos; las EROs se incrementan, lo cual lleva a un aumento de la reactividad vascular a la ANG II periférica y al daño renal (Shah, 2005).

Otro de los factores que influyen en daño renal en la PE, es la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx placentarias y altos niveles de TBARS, al incremento de los tromboxanos y los lipoperóxidos, los cuales son mecanismos enzimáticos que defienden en situaciones de estrés oxidativo, lo que sugiere que la desregulación de su funcionalidad está



asociada a una baja protección oxidativa que favorece al desarrollo de la insuficiencia renal que acompaña a la PE (Balal y col., 2003).

Se describe en la PE un marcado aumento en la resistencia vascular, que induce un aumento de la PA. Como ya se ha mencionado, los mecanismos no están plenamente definidos, pero entre ellos se encuentra la sobreactividad simpática y niveles elevados de sustancias vasoactivas como las monoaminas, en algunas pacientes que desarrollan preeclampsia (Schobel y col., 1996). Al menos tres mecanismos potenciales pueden desencadenar esta activación simpática, que podría deberse a una disminución en los barorreceptores mediada por sustancias inhibitoras centrales o bien, por mecanismos neuronales centrales. También es posible que sustancias humorales o paracrinas pudieran actuar a nivel central aumentando la actividad simpática y por último, se plantea que pudiera deberse a cambios en los barorreflejos mediados por sustancias circulantes en mujeres con PE (Schobel y col., 1996). La vasoconstricción periférica, mediada por la actividad simpática o por sustancias vasoactivas, desencadena un mayor daño en el endotelio glomerular, debido a que la restricción del flujo renal, genera gran liberación de sustancias vasoactivas que incrementan el daño en tejidos inflamados. De esta manera, la permeabilidad endotelial alterada, induce una mayor filtración de proteínas.

## **Modelos animales de preeclampsia**

Aún cuando existe evidencia acerca de la fisiopatología de la PE, en la actualidad no están completamente elucidadas las causas o los factores que inducen a esta alteración que ocurre en humanos y en dos especies de primates. Por esta razón, es imperativo el desarrollo de un modelo experimental que pueda mimetizar los signos clínicos que en ella ocurren. Se han hecho numerosos intentos para mimetizar o inducir PE en diferentes animales incluyendo primates no-humanos. No obstante, un modelo animal ideal de PE debe tomarse con cautela en relación a aspectos como la accesibilidad al uso de animales pequeños, la confiabilidad y la reproducibilidad, y la capacidad de predecir las propiedades potenciales de un agente antihipertensivo lo cual podría ser útil en la PE (Badyal y col., 2003).

Así, se han descrito varios modelos experimentales con aproximaciones diferentes, los cuales mimetizan parcialmente los signos de la preeclampsia. Fundamentado en el concepto que la ingestión crónica excesiva de sal produce hipertensión en las ratas, la cual mimetiza la hipertensión morfológica humana, Beauséjour y col, (2003) establecen un modelo de hipertensión inducida por el embarazo, producido por la ingestión de NaCl al 1,8% durante el período de embarazo, (Badyal y col., 2003). Un modelo similar es el que se produce por la administración conjunta de NaCl al 2% en el agua y la inyección de un mineralocorticoide (DOCA-SAL). En este modelo, el incremento de la PA se asocia con un aumento en la secreción de vasopresina, hiperactividad simpática y del SRA, retención de agua y vasoconstricción generalizada (Badyal y col., 2003). Por otro lado, con base en el concepto que la

preeclampsia se debe a un defecto primario en la isquemia uteroplacentaria, Ogden y col, (1940) desarrollaron un modelo de preeclampsia mediante la inducción de isquemia uteroplacentaria, lo cual se produce por la reducción aguda del 50% de la presión de perfusión placentaria en perros anestesiados (Woods y Brooks 1989), ratas (Clark y col., 1982), conejos (Losonczy, 1992), y monos Rhesus (Combs y col., 1993) que incluye isquemia placentaria y necrosis, así como retardo en el crecimiento fetal (Alexander y col., 2001), cambios histológicos uteroplacentarios muy similares a la PE humana, e inclusive muerte intrauterina en algunas especies, e hipertensión (Woods y Brooks, 1989; Alexander, 2001). Por otra parte, Carlström y col, (2009), mediante el uso de un inhibidor de la angiogénesis, la suramina, desarrollaron un modelo experimental de PE en donde se genera un defecto en la placentación y disfunción endotelial, aparentemente relacionado con la liberación de mediadores inflamatorios en ratas preñadas. En este modelo se demostró que la inhibición de la angiogénesis uterina incrementa la PA materna y compromete el desarrollo fetal y placentario, e incrementa los niveles de renina y reduce de los niveles de sFlt-1, lo que indica que la hipoxia placentaria y la subsiguiente activación del SRA juegan un papel primordial en la hipertensión.

Por otro lado, se han desarrollado numerosos modelos de PE basados en la estimulación simpática inducido por condiciones del estrés ambiental, físico y mental (Seely y Salomon, 2003). Así, animales preñados que son sometidos a estrés crónico inducido por ruido intermitente, la superpoblación en la jaula,

prueba al frío, que causan aumento en los niveles de las catecolaminas circulantes, de la presión sanguínea, algunas veces está asociada con una alteración en la invasión trofoblástica (Schobel y col., 1996).

Por otra parte, el embarazo normal se caracteriza por un estado inflamatorio activado por los desechos placentarios y en donde la PE constituye la situación extrema. Así, las citoquinas inflamatorias y los marcadores del estrés oxidativo (peroxinitrito y nitrotirosina) están aumentados en la PE. Basados en este concepto y mediante la administración de una dosis ultra-baja lipopolisacáridos en ratones preñados, se induce hipertensión, proteinuria, y trombosis glomerular, así como una disminución del conteo plaquetario y una reducción de la invasión trofoblástica. Aún más, en ratas, la administración crónica del factor de necrosis tumoral alfa, se traduce en una reducción de la enzima óxido nítrico sintasa amplificando la reactividad vascular. También, el factor de necrosis tumoral alfa se correlaciona con incrementos en la resistencia a la insulina, sugiriendo que la inflamación y la resistencia a la insulina, podrían actuar sinérgicamente en los daños observados en la PE humana (Podjarny y col., 2004).

Finalmente, debido a la fuerte evidencia que indica el papel primordial del NO y su desregulación en la PE, en el presente trabajo se propuso caracterizar un modelo experimental que resulte de la inhibición crónica de la síntesis de NO mediante la administración de L-NAME a ratas preñadas. Efectivamente, el NO, un potente vasodilatador liberado por las células endoteliales, inhibe la

agregación plaquetaria y la adhesión al endotelio y, está involucrado en el control de la PA (Lyall y col., 1996). El NO es producido en la circulación fetoplacentaria, contribuyendo al control del tono vascular y atenuando las acciones de los vasoconstrictores (Myatt y col., 1992, Lyall y col., 1996). La NO sintasa de la vasculatura vellosa placentaria corresponde a la isoforma endotelial tipo III dependiente calcio-calmodulina (Myatt y col., 1992), y está presente en las venas y arterias umbilicales, arterias y venas coriónicas, y en el sinciciotrofoblasto.

Desde el punto de vista fisiopatológico la PE se asocia con hipertensión, proteinuria y edema, factores que son reflejo de una vasoconstricción generalizada, como resultado de una función endotelial anormal. Existe evidencia que en el endotelio vascular se produce un gran número de agentes vasoactivos que actúan de forma paracrina o adjunta a la célula muscular lisa, los cuales regulan el tono vascular. Entre estos factores se encuentran el NO y las prostaciclínas. De manera que, un desbalance entre factores vasorelajantes y vasoconstrictores, a favor de los últimos, afecta de manera prominente la PA sanguínea.

En este modelo las ratas preñadas tratadas con L-NAME desarrollan características de la hipertensión de manera dependiente de la dosis, y se asocia a cambios fisiológicos como la potenciación de las respuestas presoras a la ANG II, la vasopresina y la noradrenalina (Molnar y Hertelendy, 1992), proteinuria y un incremento de la agregación plaquetaria, similar a los cambios

que ocurren en la PE humana. El tratamiento con L-NAME en ratas preñadas también disminuye el peso y el crecimiento fetal. También ocurre disfunción renal, vasoconstricción de las arterias renales, y una disminución en la TFG, alteraciones en la placenta, y trombosis intravascular, de manera que la deprivación de óxido nítrico en ratas preñadas genera un buen modelo de PE muy similar a la PE desarrollada en humanos (Pandhi y col., 2001). Aún cuando se conoce sobre las generalidades acerca de este modelo experimental, se desconoce el papel y la relevancia del sistema renina angiotensina, circulante y tisular, ni tampoco se ha caracterizado la contribución relativa del estrés oxidativo y de la actividad de las enzimas antioxidantes en este modelo de PE por inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico en ratas preñadas.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar un modelo de preeclampsia experimental inducido mediante el tratamiento crónico con la L-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME), un inhibidor de la síntasa del óxido nítrico. Establecer el papel del estrés oxidativo en la disfunción renal observado durante la preeclampsia.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Estandarizar un modelo reproducible de preeclampsia en ratas preñadas mediante la administración crónica de L-NAME.
- 2) Establecer el curso temporal de las alteraciones en la presión arterial sistólica, diastólica y media en ratas preñadas controles y en ratas preñadas tratadas previamente L-NAME.
- 3) Establecer las posibles variaciones en el número y peso de los fetos provenientes de ratas preñadas controles y tratadas con L-NAME.
- 4) Determinar la excreción urinaria de proteínas totales, de los electrolitos sodio y potasio, GMPc urinario, así como la creatinina sérica y urinaria, en ratas preñadas controles y en ratas preñadas tratadas previamente con el L-NAME.

- 5) Evaluar la reactividad vascular en la aorta abdominal proveniente de ratas preñadas normales y en ratas preñadas tratadas previamente con el L-NAME.
- 6) Evaluar la actividad de la enzima convertidora de angiotensina II (ECA) plasmática en ratas preñadas normales y en ratas preñadas tratadas previamente con el L-NAME.
- 7) Determinar la concentración de aldosterona y de renina plasmática de las ratas preñadas controles y en las ratas preñadas tratadas previamente con el L-NAME.
- 8) Determinar la actividad de la glutatión peroxidasa y la concentración de TBARS plasmático en ratas preñadas controles y en ratas preñadas tratadas previamente con el L-NAME.
- 9) Evaluar la concentración de aldosterona, actividad de la renina y glutatión peroxidasa en el líquido amniótico en ratas preñadas controles y en ratas preñadas previamente tratadas con el L-NAME.
- 10) Cuantificar la actividad de la sintasa óxido nítrico en el riñón de ratas preñadas controles y en ratas preñadas previamente tratadas con L-NAME.



- 11) Evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes renales superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa en las ratas preñadas controles y en las ratas preñadas tratadas con L-NAME.
  
- 12) Realizar el estudio comparativo de los parámetros antes mencionados con el de las ratas no preñadas controles y en ratas no preñadas tratadas previamente con el L-NAME.
  
- 13) Evaluar el efecto de la administración del tempol sobre los parámetros previamente descritos en ratas preñadas controles y en ratas preñadas tratadas previamente con L-NAME.
  
- 14) Evaluar el efecto de la administración de apocinina sobre los parámetros previamente descritos en ratas embarazadas controles y en ratas embarazadas tratadas previamente con el L-NAME.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales y protocolos experimentales de inducción de PE**

Se utilizaron ratas hembras primigestas, de la cepa Sprague-Dawley, de 12 a 15 semanas de edad, provenientes del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental (Caracas), mantenidos bajo libre acceso al agua y a la comida (Ratarina®) hasta el momento del experimento, con ciclos controlados de luz-oscuridad de 12 horas. Una vez verificada la etapa del ciclo estral de la rata virgen mediante frotis vaginal, se aparearon las ratas hembras con machos fértiles y al día siguiente del apareamiento, la presencia de un tapón vaginal en el frotis vaginal marcó 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<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NAME) administrada por vía intraperitoneal durante 7 días. Al grupo II sólo se le administró vehículo (Solución Fisiológica NaCl 0,9% a un volumen requisito de 0,1 mL por cada 100g de p.c.).

Todos los animales se pesaron dos veces a la semana hasta el final del protocolo, y se les determinó la PAS, PAD, y la frecuencia cardíaca (FC) mediante el uso de un pletismógrafo digital de cola (LETICA® Scientific Instruments, Barcelona, España).

Al día 20 de la gestación, los grupos experimentales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales con acceso a agua en igual cantidad para todos los grupos. Se recolectaron muestras de orina por un período de 24 horas, para la determinación de las proteínas totales en orina, la cuantificación de creatinina y la excreción de sodio y potasio.

Inmediatamente después de la recolección de las muestras de orina, los animales fueron sacrificados por decapitación, se recolectaron muestras de sangre de dos vías: (1 mL proveniente de la vena de la cola de la rata, y 1 mL proveniente del tronco, posterior a su decapitación), y de líquido amniótico, así como la extracción de los riñones y los fetos los cuales fueron colocados inmediatamente en hielo, homogenizados y congelados a -20 °C, hasta su posterior utilización en los ensayos respectivos.

La muestra de sangre proveniente de la cola se uso para determinar el conteo de plaquetas; igualmente se recolectó sangre proveniente del tronco del animal, en tubos Eppendorff® heparinizados (20 µl/mL de sangre), para las determinaciones de la actividad de la ECA, de la concentración de la renina, y de la aldosterona plasmática, actividad de la glutatión peroxidasa plasmática y TBARS. Las muestras se centrifugaron a 10.000 r.p.m. por 10 min; se separó el plasma y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

En el momento del sacrificio de los animales de experimentación, se recolectó

el líquido amniótico en frío mediante el uso de una jeringa estéril, con precaución de no contaminar la misma con residuos de sangre, dichas muestras se congelaron a -20 °C hasta su posterior uso. Las muestras de líquido amniótico de cada animal se utilizaron para la determinación de la concentración de renina, aldosterona y la actividad de la glutatión peroxidasa.

Se extrajeron los riñones y se disecó la corteza renal en frío. Se pesó y lavó el tejido con Buffer fosfatos 10mM (PBS) y se diluyó (1:10 p/v) en solución PBS 10mM. Posteriormente los tejidos fueron sonicados y centrifugados a 10.000 r.p.m. a una temperatura de -4°C, por 30 minutos. El sobrenadante de los tejidos fueron inmediatamente congelado a -20 °C, hasta su posterior utilización. Estas muestras fueron utilizadas, para la determinación de la actividad de la sintasa del óxido nítrico (SON) y la actividad de las enzimas antioxidantes.

Los fetos fueron extraídos de los sacos vitelinos maternos y, colocados inmediatamente en frío para ser pesados individualmente.

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

### **Determinación de la presión arterial (PA) y de la frecuencia cardíaca (FC)**

Para la determinación de la PA 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). Este equipo emplea la señal de pulso transmitida a lo largo de la arteria caudal, la cual tiene su máxima intensidad cuando la presión del manguito ubicado en la cola es cero. La señal de pulso desaparece cuando el manguito insuflado alcanza la presión sistólica y comienza a aparecer cuando esta disminuye, obteniéndose de esta forma el registro de una presión equivalente a la diastólica. La onda de pulso es registrado por un traductor mecano eléctrico que utiliza un puente de Wheaston montado sobre un anillo de cobre-berilio.

Para la determinación de la PA y de la FC en el pletismógrafo digital de cola, las ratas fueron sometidas a un período de acostumbamiento durante tres días previos al experimento. Las ratas fueron calentadas en una estufa graduada a 42 °C durante 15 minutos, para producir una dilatación de los vasos sanguíneos periféricos. Inmediatamente después, el animal se colocó en un cepo (pequeña cámara de material acrílico) para inmovilizarlas, se colocó el manguito en la cola del animal y, mediante el uso de un transductor de presión arterial y frecuencia cardíaca se procedió a la determinación de la PAS, la PAD y la FC. Los parámetros cardiovasculares se determinaron a la misma hora del día durante los períodos de entrenamiento y experimental.

Los valores fueron expresados como presión arterial media (PAM) en milímetros de mercurio (mmHg), valor obtenido aplicando la fórmula:  $PAM = PAD + 1/3(PAS - PAD)$  (Ganong, 1988).

### **Cuantificación de la excreción urinaria de proteínas totales**

Consiste en un método colorimétrico basado en el método de Biuret, en el cual 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 totales de la muestra, en presencia del reactivo de rojo Ponceau y la adición del ácido tricloroacético. Previamente, las muestras fueron centrifugadas para eliminar células tubulares y los oxalatos presentes que interfieren con el análisis. Brevemente, a una muestra de 50  $\mu$ l orina, se le adicionaron 500  $\mu$ l del reactivo de rojo Ponceau 40 g/L y ácido tricloroacético 300 g/L, a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó con el uso de una centrífuga Sorval® (RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) a 12.000 r.p.m., durante 10 minutos. El precipitado formado se resuspendió mediante la adición de 1,0 mL de hidróxido de sodio (8 g/L) y la concentración de proteínas urinarias se cuantificó espectrofotométricamente con el uso de un equipo BIO-RAD® (microplate Reader Benchmark) a una longitud de onda de 560 nm (Pesce y Strande, 1973).

La concentración de proteínas en orina se calculó mediante la utilización de una curva estándar de albúmina sérica de bovino en valores de concentraciones decrecientes que van desde 8 a 0,125 mg/mL. Los resultados se expresaron como mg de proteína/100 gramos de peso corporal (Pesce y Strande, 1973).

### **Cuantificación del daño tubular y renal por microscopía de luz**

Después de sacrificar las ratas, se extrajeron los riñones inmediatamente y se obtuvo un corte de la corteza, la cual se fijó en 1 mL de formaldehído 10% en PBS. Posteriormente, este corte se deshidrató gradualmente en etanol absoluto seguido de xilol y se embebió en parafina. Con un microtomo se obtuvieron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor y se tiñeron con hematoxilina/eosina para su posterior evaluación histológica.

### **Determinación de la creatinina sérica y urinaria**

La determinación de creatinina se fundamenta en la reacción de Jaffé, en la cual la creatinina forma un complejo coloreado con el picrato en medio alcalino, que absorbe energía electromagnética a 510 nm.

Para ello se utilizó un kit comercial de creatinina directa (Laboratorios Biogamma C.A., Caracas, Venezuela). Se preparó un tubo que contenía: 1,5 mL de solución saturada de ácido pícrico, 1,5 mL de solución de NaOH y 0,2 mL de agua destilada para el blanco, 0,2 mL de creatinina (6 mg%) para el

estándar y 0,2 mL de suero para la muestra. Se mezcló bien y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente se leyó a una longitud de onda de 510 nm en un espectrofotómetro con el uso de un equipo BIO-RAD® (microplate Reader Benchmark). Los resultados se expresaron en mg/dL.

La concentración de creatinina en suero es un marcador de la función renal, ya que es un índice de la tasa de filtración glomerular (Schor y col, 1981). La concentración de creatinina plasmática y urinaria se calculó mediante la interpolación en una curva estándar de creatinina. Los resultados se expresaron en mg/dL.

#### **Determinación de la excreción urinaria de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>**

La cantidad de sodio y potasio en las muestras de orina recolectadas, se determinó mediante fotometría de llama (Corning® 405 de Corning Medical Instruments, Halsted, Essex, RU.) Los resultados se expresaron en  $\mu\text{Eq/mL}$  de orina y corregidos por 100 g de peso corporal.

#### **Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) plasmática**

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) plasmática está relacionada principalmente con la síntesis y secreción de esta enzima en los túbulos renales, especialmente en el túbulo proximal, por lo que la medición de sus niveles en plasma ha sido empleada como un marcador de daño tubular. La determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa sérica es similar a la



determinación de la glutatión peroxidada renal descrita en la metodología (Avisar y col., 1994).

### **Determinación del conteo de plaquetas**

El conteo de plaquetas se realizó mediante el uso de un kit comercial de laboratorios Biogamma C.A. Caracas-Venezuela, el cual se fundamenta en el uso de un diluyente Biogamma suministrado en el recipiente mezclado (por inversión durante varias veces) con la cantidad de sangre, que provee una dilución 1:1000. Posteriormente, se coloca la gota (con mezcla y sangre) en la cámara de Neubauer, y se procede a hacer el conteo de plaquetas presentes en 5 cuadrados de la cámara con el uso de un microscopio Ibermedic 2001 ® binocular Olympus ch20 con un objetivo de 40x. El número de plaquetas contadas se multiplica por 5000 para obtener un resultado final de concentración de plaquetas por  $\text{mm}^3$ .

### **Determinación de la reactividad vascular de anillos de aorta**

La preparación de las tiras de aorta fue realizada siguiendo el método descrito por Furchgott (1955). Tras sacrificar el animal por dislocación cervical, inmediatamente se procedió a realizar una incisión en el medio del tórax, se expuso la aorta torácica exponiendo la misma en toda su extensión mediante la separación de los pulmones, el corazón y las vísceras abdominales. Cuidadosamente, se removió la aorta en toda su extensión y se colocó en solución fisiológica burbujeada con gas carbógeno (95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$ ). Seguidamente, se introdujo una varilla de vidrio (con los ganchos que sujetan

el tejido) en el interior del órgano, y posteriormente se procedió a la remoción del exceso de tejido conectivo que recubre externamente a la aorta y se procedió a cortarla en forma de espiral.

La aorta fue cortada en secciones de 2 mm de largo y montados en soportes horizontales de acero inoxidable. Luego fueron fijados por un extremo a un baño para órgano aislado y por el otro a un transductor de fuerza desplazamiento FT-03 (Grass Instruments, Mass) incubados en una solución de Krebs Henseleit de la siguiente composición (mM): NaCl 118, KCl 4,7, MgSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 1,2, CaCl<sub>2</sub> 2,5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 25 y glucosa 11,1; mantenida a 37°C y burbujeada con la mezcla gaseosa de 95% de oxígeno y 5% CO<sub>2</sub>. La preparación se estabilizó por un período de dos horas antes de iniciar los experimentos, lavando cada 10 minutos y manteniendo una tensión basal de 2 gramos. La respuesta del tejido fue registrada en un polígrafo Grass modelo 7400 (Grass Instruments Mass). Se prepararon 4 baños con 4 secciones diferentes del mismo tejido y cada uno de los mismos fue mantenido a una temperatura de 37,5 °C y a un pH de 7,4.

Se usaron las siguientes drogas: fenilefrina (FE), carbamilcolina (CCh) y una solución de cloruro de potasio (KCl). Después de estabilizar el tejido durante 2 horas, se procedió a construir una curva dosis-respuesta con el agonista (fenilefrina), hasta obtener una respuesta máxima (contracción del anillo de la aorta) seguidamente, se lavó el tejido varias veces con suficiente solución de Krebs-Henseleit. Se dejó estabilizar nuevamente la preparación durante 30

minutos, lavando cada 10 minutos. Después de este período se procedió a construir curvas de dosis–respuesta acumulativa a la fenilefrina usando un factor geométrico de 3 para el incremento de las concentraciones. La relajación dependiente del endotelio se realizó pre-contrayendo la aorta con fenilefrina 10  $\mu\text{M}$  seguido por curva dosis–respuesta acumulativa a acetilcolina (CCh) (0,001 – 10  $\mu\text{M}$ ) y la relajación independiente del endotelio se estudió con nitroprusiato de sodio (NPS). (0,001 – 100  $\mu\text{M}$ ) en anillos de aorta precontraídos con fenilefrina 10  $\mu\text{M}$ .

Para preservar el endotelio se tuvo especial cuidado con la manipulación de la luz del vaso sanguíneo.

Los resultados se expresaron como porcentaje de la respuesta máxima en las arterias pre-contraídas con fenilefrina a tres dosis crecientes del agonista ( $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-6}$  M).

### **Ensayo de la actividad de la sintasa óxido nítrico (SON)**

La actividad de la SON se determinó mediante la cuantificación de la conversión de arginina radiomarcada a [ $^3\text{H}$ ]citrulina, utilizando una modificación del método descrito por Bredt y Snyder (1990). Los tejidos provenientes de la corteza renal de los animales de experimentación fueron mantenidos en Buffer Hepes 50 mM, pH 7 + EDTA 1 mM. Cada muestra fue preincubada por 30 minutos a 37 °C en buffer Hepes 50 mM pH 7,1, que contiene ditioneitol 1 mM,  $\beta$ -NADPH 0,5 mM;  $\text{CaCl}_2$  1,25 mM y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de

calmodulina, [<sup>3</sup>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 luego mediante el calentado durante 5 minutos a 90 °C. Las cortezas renales extraídas fueron sonicadas y centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C, durante 4 minutos, con el uso de una centrífuga Sorval® (RC-5B Refrigerated Superspeed centrifuge), y el sobrenadante obtenido fue colocado sobre una columna de Dowex 50, forma Na<sup>+</sup> (BioRad). La [<sup>3</sup>H]citrulina fue eluída con 2 mL de agua y cuantificada mediante el uso de un contador de centelleo líquido (Packard ®Tricarb 2700TR).

La identificación de la [<sup>3</sup>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 [<sup>3</sup>H]citrulina formados/h/mg de proteína.

### **Determinación del GMP cíclico urinario**

Se recolectaron muestras de orina de 24 horas para la determinación de la excreción urinaria de GMPc. El contenido de GMPc se cuantificó por radioinmunoensayo (RIA) utilizando para ello un kit comercial (Amersham® International plc, UK). El método se fundamenta en la competencia que se establece entre el GMPc no marcado de la muestra y una cantidad fija de GMPc marcado con <sup>3</sup>H, por la unión a un anticuerpo que posee alta

especificidad para este nucleótido. La cantidad de GMPc unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de GMPc presente en la muestra. Brevemente, las muestras a una dilución 1:75 en solución Tris/EDTA (50mM Tris/HCl, 4mM EDTA, pH 7,5), se incubaron en hielo con 50  $\mu$ L de anticuerpo específico para  $^3\text{H}$ -GMPc y 50  $\mu$ L del anticuerpo específico para GMPc durante 90 minutos (volumen final:200  $\mu$ l). Luego, se separó el GMPc unido al anticuerpo por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y posterior centrifugación (12000 rpm/5 min, a 4°C). Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue reconstituído con 200  $\mu$ L de agua destilada a la que se añadió 1 mL de líquido de centelleo. La radioactividad se cuantificó mediante el uso de un contador de centelleo líquido (Packard ®Tricarb 2700TR).

La cantidad de GMPc presente en la muestra se determinó utilizando una curva estándar (rango de 0 a 4 pmol/tubo). Los resultados se expresaron en picomoles por mililitro de orina por 100 gramo de peso corporal (pmol/mL/100 g.p.c.).

### **Determinación de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina II (ECA)**

La determinación de la actividad de la ECA se realizó mediante el método radioenzimático descrito por Rohrbach (1978) y modificado por Israel y col, (1998), el cual consiste en la reacción enzimática de un sustrato, el hipuril-His-Leu[1- $^{14}\text{C}$ ]-glicine (HHL) (1,33 mM, 2,9 Ci/mol, New England Nuclear,

Boston, MA), en presencia de la ECA contenida en la muestra de plasma, la cual pierde el grupo His-Leu transformándose cuantitativamente en un derivado radioactivo, el ácido hipúrico-<sup>14</sup>C. Brevemente, la muestra se incubó con el sustrato HHL durante 60 minutos a 37 °C, una vez finalizado este período se detuvo la reacción con ácido clorhídrico (0,1 N). El ácido hipúrico radiomarcado generado se separó por extracción con 1,5 mL de acetato de etilo (saturado con agua). Se transfirió la fase orgánica a un vial de centelleo y dejó evaporar la muestra en un horno a 80°C durante la noche. Se añadió líquido de centelleo a los viales y se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo líquido (Packard ®Tricarb 2700TR). La actividad de la ECA se expresó como el producto formado, por hora, por mL de plasma (pmol/h/mL).

### **Determinación de la concentración de renina plasmática**

El método se basa en la cuantificación mediante radioinmunoensayo de la angiotensina I producida a partir del angiotensinógeno endógeno por acción de la renina plasmática, bajo condiciones que previenen la degradación de Angiotensina I (presencia de inhibidores de peptidasas como el fluoruro de fenilmetilsulfonil [PMSF]). El radioinmunoensayo se basa en la competencia entre la angiotensina I radiomarcada y la angiotensina I contenida en los estándares o en la muestra problema, por la unión a un anticuerpo específico. La unión de angiotensina I marcada al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de angiotensina I no marcada en la muestra.

El método consiste en tomar 500 µl de cada muestra se colocaron en los tubos refrigerados en hielo, se le adicionaron 10 µl de PMSF y 50 µl de Buffer fosfato pH 6, y se sometió a agitación. Se transfirieron 200 µl de la mezcla a un segundo grupo de tubos, los cuales se incubaron en un baño a 37°C por 90 minutos, tiempo después del cual se introdujeron en hielo como el primer grupo de tubos no incubados. Los reactivos fueron añadidos a temperatura ambiente de acuerdo al siguiente protocolo:

Tubos	Standard	Muestras y Blancos	Angiotensina I
Estándar	50 µl	-----	500 µl
Muestra	-----	50 µl	500 µl
Blanco	-----	50 µl	500 µl

Se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas, después se aspiró el contenido de cada tubo y se determinó la radioactividad mediante el uso de un contador de centelleo líquido (Packard ®Tricarb 2700TR). Los resultados se expresaron en ng/mL de plasma.

### **Determinación de la concentración de aldosterona plasmática**

Para determinar la concentración plasmática se empleó el método de radioinmunoensayo de fase sólida: Aldosterone-Coat-A-Count® (Diagnostic Products, Los Angeles, CA). Se utilizaron tubos recubiertos con anticuerpo y aldosterona marcada con <sup>125</sup>I. El método consiste en que la aldosterona de las muestras compite con la aldosterona radiomarcada, por el sitio de los anticuerpos, durante el período de incubación. Para lo cual se tomaron 200 µl de la muestra de plasma y se transfirieron en los tubos “cubiertos” a los que

se les añadió 1 mL de aldosterona con  $^{125}\text{I}$  para su posterior incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  por tres horas. Luego se decantó el líquido dejando secar por 2 a 3 minutos para luego cuantificar la radioactividad mediante espectrofotometría de centelleo líquido (Wallac 1470 Wizard).

La concentración de aldosterona se calculó mediante la utilización de una curva estándar (de 0 a 120 pg/mL). Los resultados fueron corregidos por mg de proteínas, y los niveles de aldosterona se expresaron en pg/mg de proteínas plasmáticas.

#### **Determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT)**

La actividad de la catalasa fue determinada empleando una modificación del método de Aebi (1984). Se basa en la disminución de la absorbancia del  $\text{H}_2\text{O}_2$  debido a su degradación por la catalasa presente en la muestra.

En una celda de cuarzo se colocan 25  $\mu\text{L}$  de homogenizado de corteza renal diluido 1:10 en Buffer fosfato 10 mM (pH 7), se añadió 725  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM (para un volumen final de 750  $\mu\text{L}$ ) e inmediatamente después se midió el cambio de absorbancia a 240 nm a los 15 y 30 segundos.

Para los cálculos se utilizó 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), A1 y A2 son las absorbancias del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tiempos t1 y t2. Los resultados se expresaron como k/mg de proteína (k= constante de reacción).

### **Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)**

La actividad de SOD se determinó mediante una modificación del método de Oberley y Spitz (1984). El método se fundamenta en la capacidad de esta de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones superóxido generados en el sistema de la xantina-xantina oxidasa presente en la mezcla de reacción (Oberley y Spitz, 1984).

Para ellos se prepara una mezcla de reacción con la siguiente composición: xantina 0,122 mM, EDTA 0,122 mM, NBT 30,6 µM, albúmina 0,006% y bicarbonato de carbonato de sodio 49 mM. Se colocan 2,45 mL de la mezcla en tubos de ensayo y se mantienen a 27 °C. Se adiciona 500 µL de muestra, diluída 1:10 en amortiguador de fosfatos 50 nM (pH 7) e inmediatamente después, la reacción comienza con la adición de 50 µL de xantina oxidasa (8,4 unidades). Se preparó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos, pero sin xantina oxidasa. Asimismo, se preparó un tubo de 100% de reducción, el cual contenía xantina oxidasa sin muestra. Los tubos se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente, seguidamente se adicionó 1 mL de cloruro de cobre (II) 0,8 mM y se midió la absorbancia a 560 nM. Con el uso de un espectrofotómetro BIO-RAD®) (microplate Reader Benchmark). Los resultados fueron expresados como U/mg de proteína.

Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima requerida para inhibir en un 50% la formación de cristales de formazán (McCord y Fridovich, 1969).

### **Actividad de la Glutación Peroxidasa (GPx)**

La actividad de la GPx fue determinada de forma indirecta de acuerdo al método descrito por Flohé (1984). La actividad de la GPx se cuantifica de manera indirecta por una reacción acoplada con la glutación reductasa (Lawrence y Burk, 1976) y se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NAD(P)H. La GPx al reducir los hidroperóxidos consume glutación reducido, el cual es regenerado por la glutación reductasa a partir de glutación oxidado, proceso que consume NAD(P)H. Para ello, la muestra de corteza renal es homogenizado en amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7,0) en una relación de concentración de 1:10. Luego a 100  $\mu$ L de esta dilución se le adiciona 800  $\mu$ L de una mezcla de reacción que contiene: EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NAD(P)H 0,2 mM, GSH 1 mM y 1 U de GR/mL en amortiguador de fosfatos. De la misma manera, se preparó un tubo de actividad inespecífica con 100  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos. Los tubos se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y su contenido se adicionó a una celda de cuarzo que contiene 100  $\mu$ L de  $H_2O_2$  0,25 mM e inmediatamente se determinó la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 3 minutos. La actividad de la GPx se determinó promediando los cambios de la absorbancia por minuto de la muestra menos el promedio de los cambios de la absorbancia por minuto del inespecífico y multiplicando este valor por 0,16 a 340 nm es de  $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y dividiendo el

resultado entre los mg de proteína adicionados en el ensayo. Así se obtuvo la actividad específica expresada en U/mg de proteína, donde 1 U =  $\mu\text{mol}$  de NAD(P)H oxidado/min.

### **Determinación de la concentración de productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

La concentración de los productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) fue evaluada por un método colorimétrico descrito por Ohkawa y col, (1979), el cual consiste en evaluar el efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre los lípidos, que resulta en la producción de varias sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y que pueden ser medidas por espectrofotometría.

Las muestras de plasma (100  $\mu\text{L}$ ) fueron tratadas con 200  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 10% en frío y centrifugadas a 1.600 g durante 15 min a 4°C para precipitar las proteínas. Se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a otro tubo de centrifuga y se le añadió un volumen igual de ácido tiobarbitúrico 0,67%, e inmediatamente después, se incubó la muestra en baño de maría durante 10 minutos a 100°C. Posteriormente, se dejó enfriar la muestra y se procedió a leer a una longitud de onda de 530 nm con el uso del espectrofotómetro BIO-RAD® (microplate Reader Benchmark). Paralelamente se construyó una curva patrón con malondialdehído. Se determinó la densidad óptica a 532 nm y la concentración de los productos de peroxidación lipídica fueron calculados y

expresados como malondialdehído formado. Los resultados de los TBARS fueron expresados como nmol/mL (Yagi, 1976; Satoh, 1978; Ohkawa, 1979).

### **Determinación las proteínas tisulares**

Las proteínas tisulares totales se determinaron por el método de Lowry y col. (1951) utilizando albúmina sérica de bovino como patrón. Con el uso del reactivo A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% en NaOH 0,1N y del reactivo B: solución de Folin Ciocalteau 1:1 en agua destilada. Los resultados fueron expresados en µg/ml.

### **Análisis estadístico**

Todos los resultados se expresaron como la media más o menos el error estándar de la media ( $X \pm EEM$ ). Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante el uso de la prueba de “t” de Student y el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Un valor de  $p < 0,05$  se consideró como estadísticamente significativo (Steel y Torrie, 1960; Turner, 1965).

## RESULTADOS

### CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE PREECLAMPSIA EN RATAS MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS ÓXIDO NÍTRICO CON L-NAME

#### Efecto del L-NAME sobre el número de fetos, peso y reabsorción fetal

Como se observa en la Tabla III, aún cuando no se observaron reducciones en el número 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 reabsorción fetal.

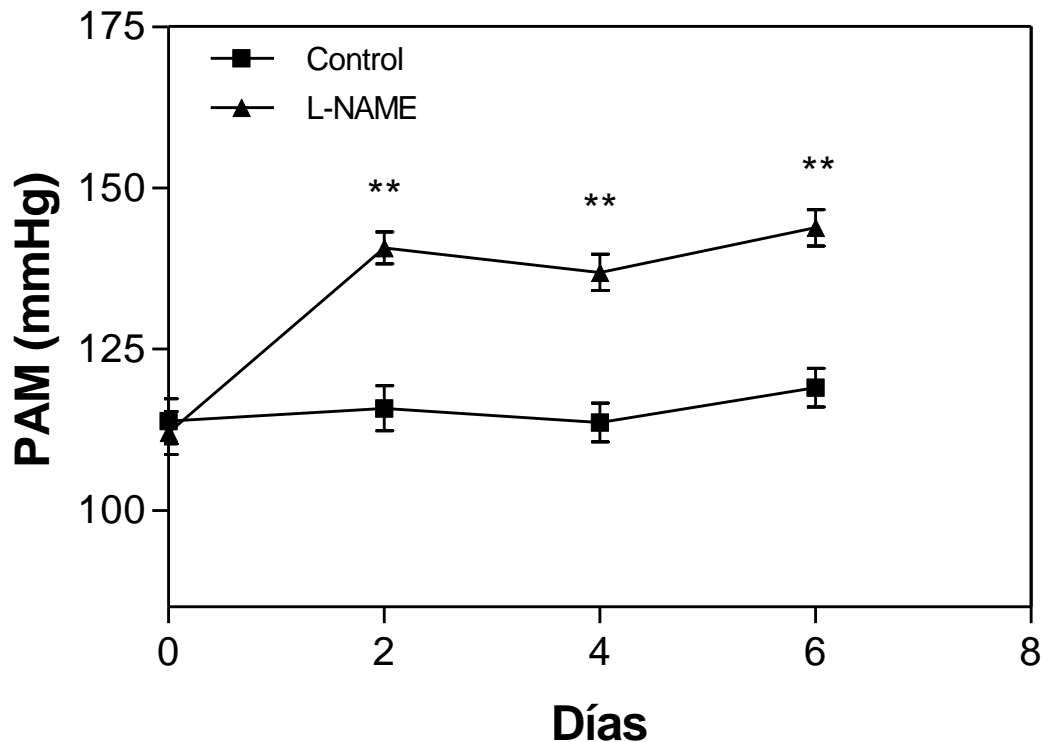
**TABLA III. EFECTO DEL L-NAME SOBRE EL NÚMEROS DE LOS FETOS, EL PESO Y LA REABSORCIÓN FETAL**

	CONTROL (N=21)	L-NAME (N=38)
<b>NUMERO DE FETOS VIVOS</b>	11,11 ± 0,5	11,95 ± 0,5
<b>PESO (g) /No. DE FETOS VIVOS</b>	1,45 ± 0,23	1,027 ± 0,09*
<b>NUMERO DE FETOS REABSORBIDOS</b>	0	1,5±0,1****

Los valores representan la media ± EEM. \*p=0,045 y \*\*\*\*p<0,0001 comparado con el control.

### Efecto del L-NAME sobre el curso temporal de la presión arterial media en ratas preñadas

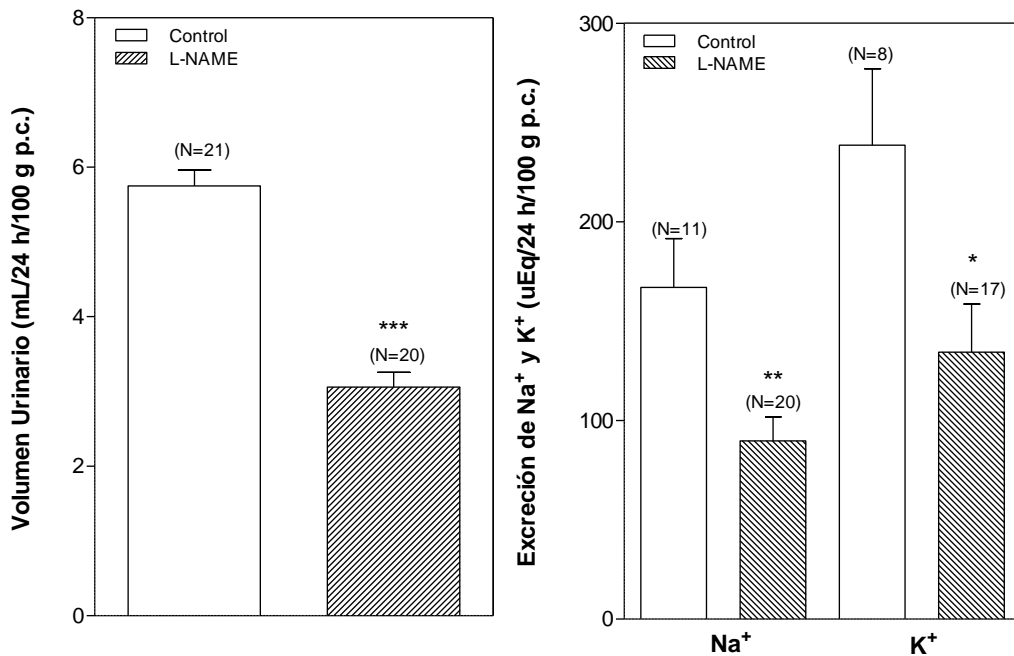
El tratamiento intraperitoneal con L-NAME durante 7 días consecutivos a las ratas preñadas, produjo un incremento significativo de la presión arterial media cuyos valores alcanzaron  $143,8 \pm 3,64$  mmHg comparativamente con el grupo control tratado con vehículo:  $115,5 \pm 1,25$  mmHg, los cuales fueron significativamente mayores que los observados en las ratas controles tratadas con (NaCl 0,9 %) (figura 10).



**FIGURA 10. CURSO TEMPORAL DE LA PRESIÓN ARTERIAL MEDIA EN RATAS PREÑADAS TRATADAS CON L-NAME.** Los grupos experimentales son (■) el grupo Control que recibió NaCl 0,9% i.p., y (▲) el grupo que recibió nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), 50 mg/Kg/día durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. N= 35 por grupo. \*\*p<0,001 comparado con las ratas control.

### Efecto del L-NAME sobre el volumen urinario y la excreción urinaria de sodio y potasio en ratas preñadas tratadas con L-NAME.

En la figura 11 se muestra el efecto del L-NAME sobre el volumen urinario y la excreción urinaria de sodio y potasio en ratas preñadas tratadas durante 7 días con L-NAME. Como se observa en la figura 11, el tratamiento con L-NAME logró disminuir significativamente el volumen urinario (Vehículo:  $5,79 \pm 0,21$  vs L-NAME:  $3,05 \pm 0,19$  mL/100 gr, p.c.,  $p < 0,0001$ ). En relación a la excreción de electrolitos, el tratamiento con L-NAME redujo significativamente la excreción urinaria de sodio ( $p = 0,0035$ ) y de potasio ( $p < 0,02$ ) (Sodio= C:  $166,96 \pm 24,65$  vs L-NAME:  $89,74 \pm 12,01$  en  $\mu\text{Eq}/100$  g p.c.) (potasio= C:  $238,6 \pm 38,5$  vs L-NAME:  $134,37 \pm 24,31$   $\mu\text{Eq}/100$  g p.c.).



**FIGURA 11. EFECTO DEL L-NAME SOBRE EL VOLUMEN URINARIO Y LA EXCRECIÓN URINARIA DE SODIO Y POTASIO EN RATAS PREÑADAS TRATADAS DURANTE SIETE DÍAS.** Control (NaCl 0,9% i.p.) barras vacías y barras con líneas diagonales, tratadas con nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), 50 mg/Kg/día, i.p., durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,02$ ; \*\* $p < 0,003$ , \*\*\* $p < 0,0001$  comparado con ratas tratadas con vehículo.

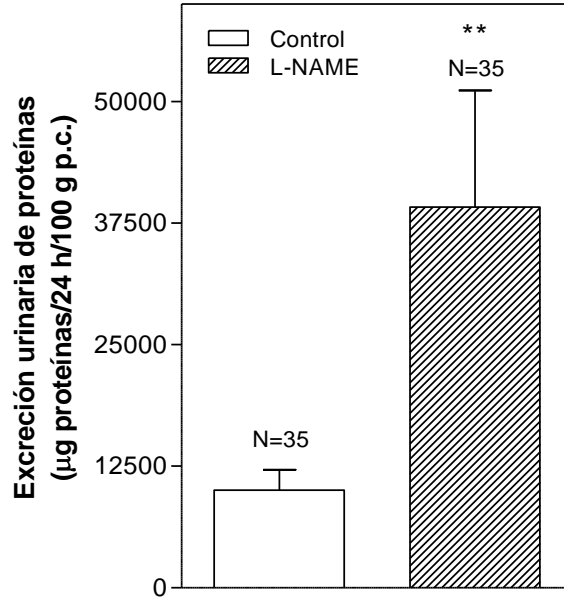
### **Excreción urinaria de proteínas en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME durante siete días.**

En la figura 12, se presentan los valores de la excreción de proteínas urinarias totales excretados en 24 horas corregidos por 100 gramos de rata, provenientes de ratas preñadas controles y tratadas durante 7 días con L-NAME. Como se observa, el tratamiento agudo con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa, el L-NAME durante 7 días, incrementó significativamente la excreción urinaria de proteínas totales, cuando se compara con las ratas preñadas controles (C:  $10040,55 \pm 2100,00$  vs L-NAME:  $39136,42 \pm 12000,00$   $\mu\text{g}$  proteínas/24 h/100 g p.c), lo que representa un 289% de incremento en la excreción urinaria de proteínas en las ratas tratadas.

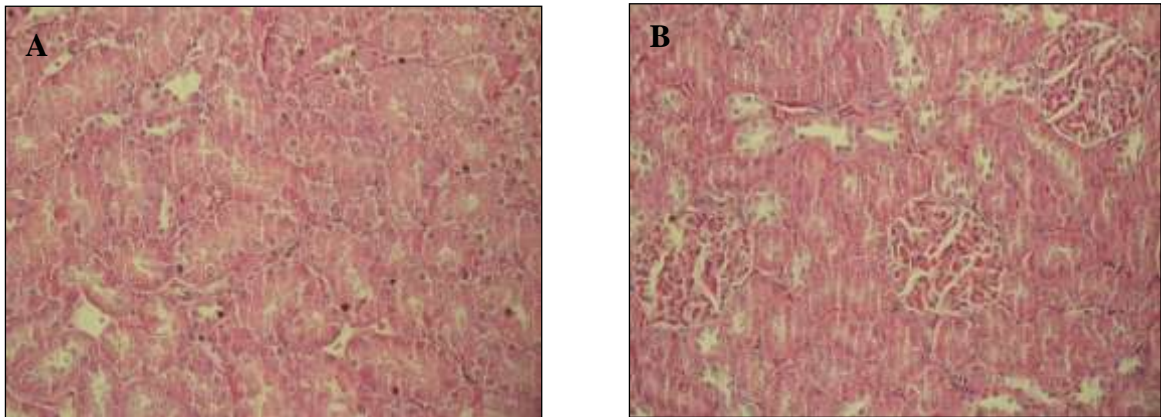
### **Cuantificación del daño tubular mediante el estudio histológico**

En la figura 13, se muestra una foto representativa de un corte de corteza renal de las ratas de un total de 6 cortes. En el panel (A) se muestra que el riñón de la rata control presenta tumefacción turbia y edema glomerular; mientras que en el riñón proveniente de las ratas preñadas y tratadas con L-NAME presenta tumefacción turbia de los epitelios tubulares, los focos hemorrágicos y con congestión de capilares glomerulares (panel B).





**FIGURA 12. EXCRECIÓN URINARIA DE PROTEÍNAS EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \*\* $p < 0,001$  comparado con ratas control.



**FIGURA 13. MICROGRAFÍA DE UN CORTE DE CORTEZA RENAL DE RATAS PREÑADAS TRATADAS CON L-NAME.** A. RIÑÓN DE RATAS PREÑADAS CONTROL: tumefacción turbia. Edema glomerular. B: RIÑÓN DE RATAS TRATADAS CON L-NAME DURANTE 7 DÍAS: tumefacción turbia de los epitelios tubulares, congestión de los capilares glomerulares y glomérulos de mayor volumen. Tinción con hematoxilina y eosina.

## **EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON L-NAME SOBRE MARCADORES CIRCULANTES Y RENALES DEL ESTRÉS OXIDATIVO.**

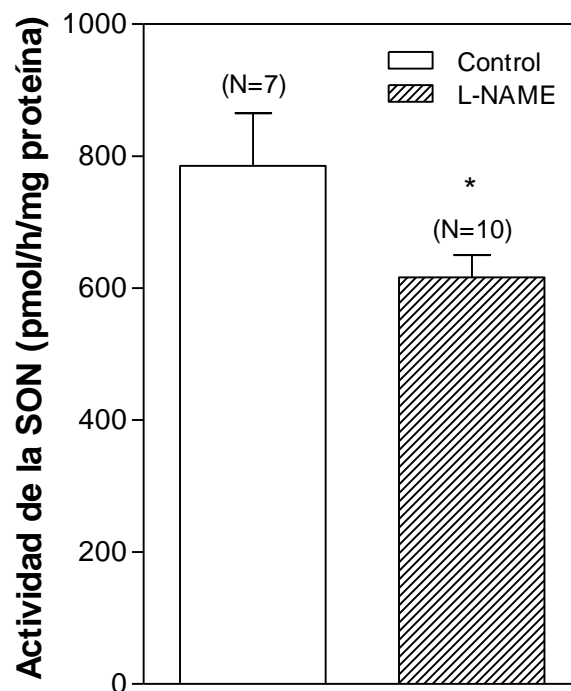
### **Determinación de la actividad de la sintasa de óxido nítrico y de las enzimas antioxidantes renales en ratas con preeclampsia experimental inducida con L-NAME.**

Como se observa en la figura 14, la actividad de la SON renal disminuyó significativamente (21,5 % de reducción) por el tratamiento del inhibidor de la sintasa de óxido nítrico (C:  $785,34 \pm 80$  y L-NAME:  $616,17 \pm 34$ ,  $*p < 0,04$ ) comparado con las ratas controles.

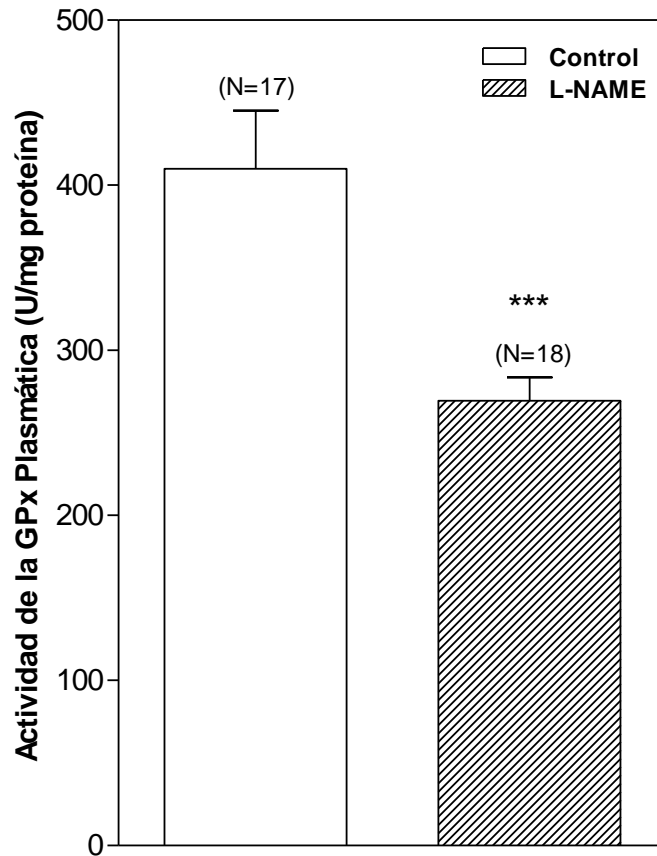
Adicionalmente, se evaluó la actividad de la glutatión peroxidasa plasmática y como se observa en la figura 15, se encontró una reducción significativa de la actividad de la glutatión peroxidasa plasmática de las ratas con preeclampsia experimental con respecto a las ratas preñadas control (C:  $410,077 \pm 35,17$  vs L-NAME:  $269,40 \pm 14,199$ , expresado como U/mg de proteína plasmática ( $p < 0,0006$ ).

En el mismo orden, al evaluar la actividad de la enzima glutatión peroxidasa presente en el líquido amniótico de las ratas se encontró una tendencia a la reducción de la actividad de la enzima en las ratas preñadas tratadas cuando se compara con las controles preñadas (C:  $43,6 \pm 17,1$  vs L-NAME:  $16,3 \pm 4,1$  nmol/ml); más, sin embargo, este cambio no fue estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ) (figura 16).

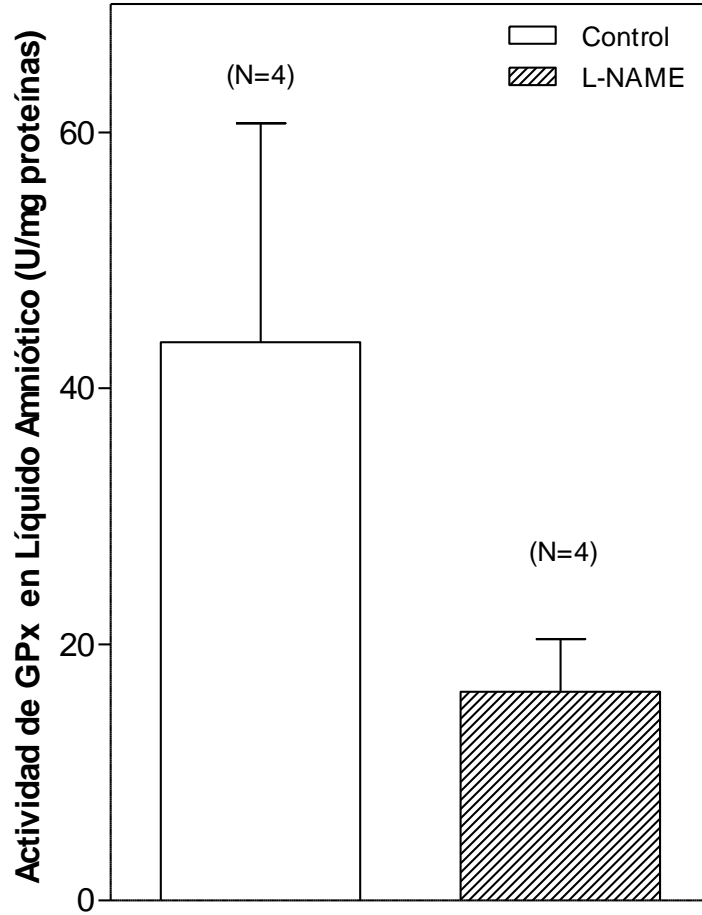
Asimismo, al cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes: catalasa (C:  $0,1459 \pm 0,01$ ; L-NAME:  $0,0963 \pm 0,01$ ) (33,99% de reducción) ( $p < 0,05$ ), glutatión peroxidasa (C:  $3,529 \pm 0,2$ ; L-NAME:  $2,831 \pm 0,1$ ) (19,77% de reducción) ( $p < 0,05$ ), y superóxido dismutasa (C:  $156,13 \pm 16$ ; L-NAME:  $92,60 \pm 10,19$ ) (40,69% de reducción) ( $p < 0,05$ ), se demostró que fueron significativamente disminuídas en la corteza renal de las ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME (figura 17).



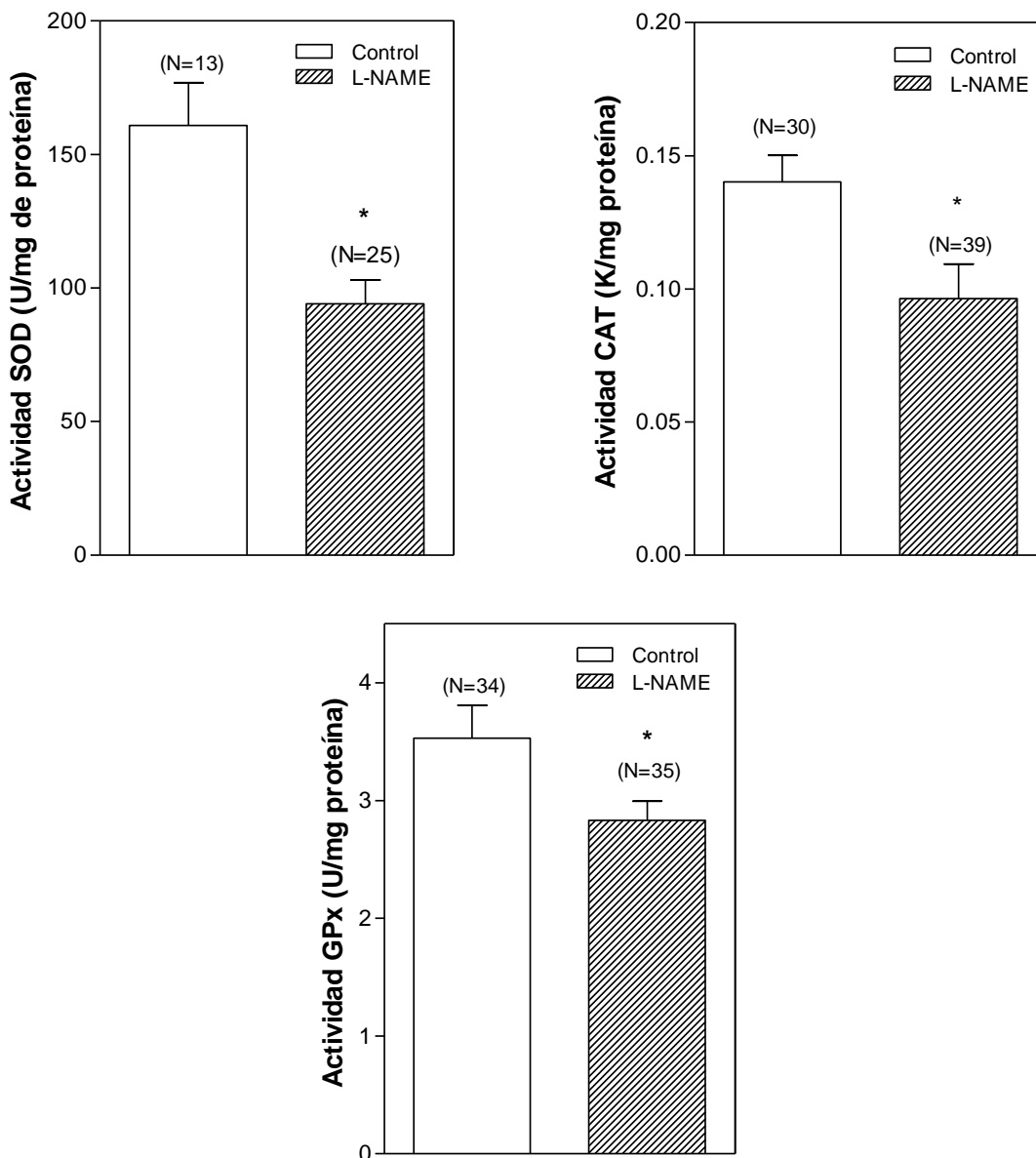
**FIGURA 14. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SINTASA DEL ÓXIDO NITRICO RENAL, EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 díaS. Los valores representan la media  $\pm$  EEM, \* $p < 0,04$  comparado con las ratas control.



**FIGURA 15. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx) PLASMÁTICA EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,0006$  comparado con ratas controles.



**FIGURA 16. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx) EN LÍQUIDO AMNIÓTICO DE RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM.

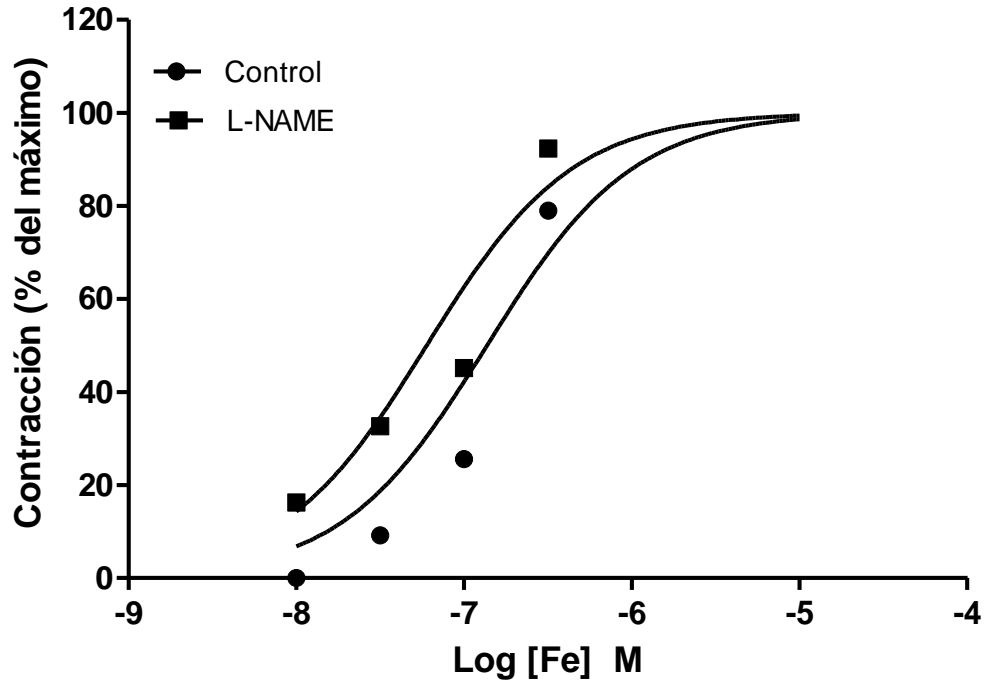


**FIGURA 17. ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES RENALES: SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD), CATALASA (CAT) GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx), EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM, \* $p < 0,05$  comparado con ratas control.

## **EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON L-NAME**

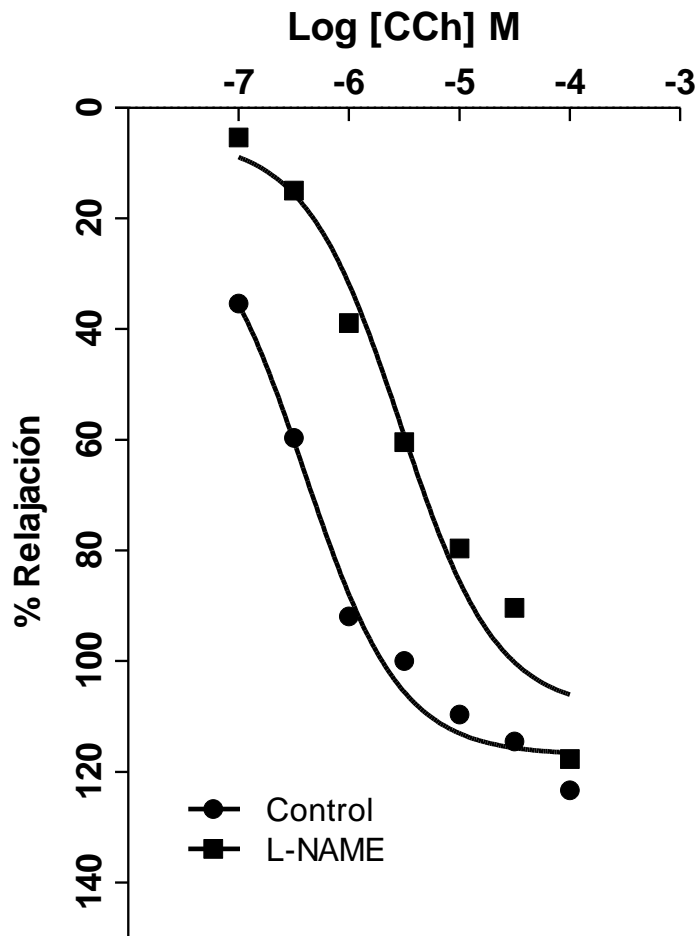
En la figura 18 se muestra la respuesta contráctil frente a concentraciones crecientes de fenilefrina, expresada en porcentaje de la contracción máxima ( $1 \times 10^{-5}$  M), de anillos de la arteria aorta abdominal de las ratas preñadas controles o provenientes de ratas preñadas tratadas con L-NAME. Los resultados muestran que la fenilefrina contrajo las tiras de la aorta abdominal de manera dependiente de la dosis, y el tratamiento con L-NAME mostró una tendencia a desplazar la curva dosis respuesta hacia la izquierda.

Se evaluó la respuesta de la relajación dependiente de endotelio utilizando concentraciones crecientes de carbacol (CCh) y la relajación no dependiente de endotelio usando nitroprusiato de sodio (NPS). Los resultados se expresaron como porcentaje de relajación de la arteria pre-contraídas con fenilefrina (figuras 19 y 20). Como se observa, el carbacol produjo relajación, dependiente de la dosis, de las tiras de aorta abdominal de rata pre-contraídas con fenilefrina. El tratamiento con L-NAME *in vivo* desplazó a la derecha la curva de dosis respuesta al CCh. Por su parte, el nitroprusiato de sodio fue capaz de relajar, de manera dependiente de la dosis, las tiras de aorta pre-contraídas con fenilefrina, y el tratamiento con L-NAME *in vivo* desplazó a la derecha la curva de dosis respuesta frente al NPS.

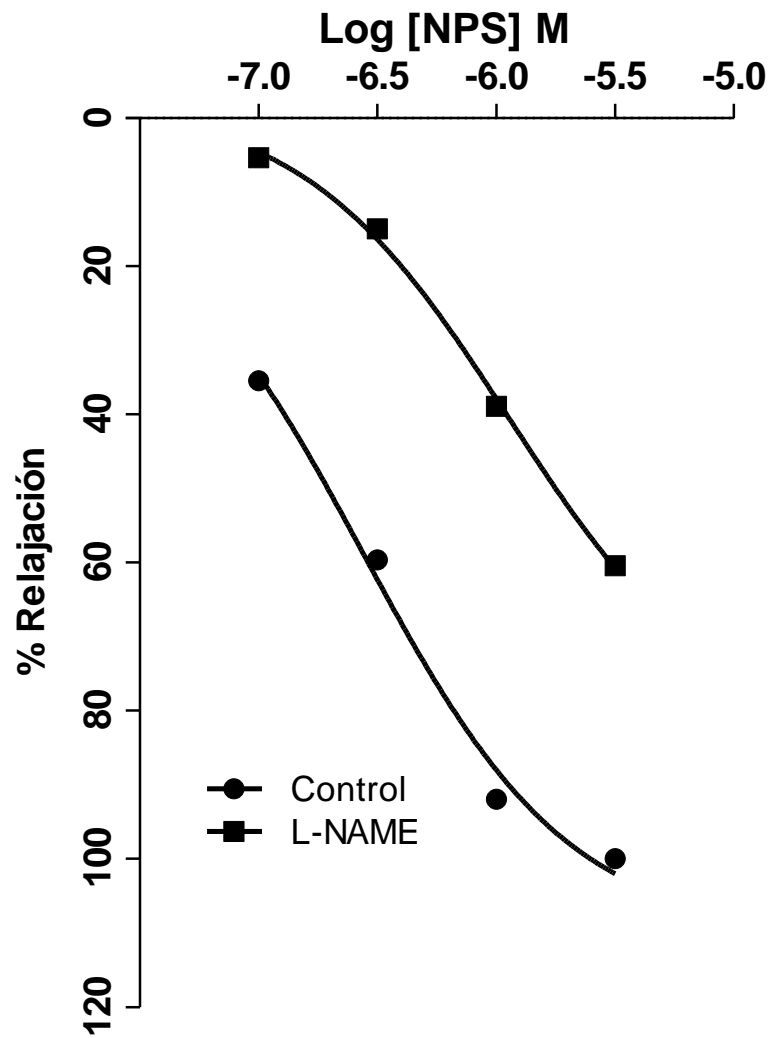


**FIGURA 18. EFECTO DE LA FENILEFRINA (Fe) EN ANILLOS DE AORTA PROVENIENTES DE RATAS PREÑADAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Dosis máxima de fenilefrina ( $1 \times 10^{-5}$  M). (●) el grupo Control (NaCl 0.9% i.p.) y (■) el grupo nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 50 mg/Kg/día i.p, durante 7 días. Este es un gráfico representativo de N= 3.





**FIGURA 19. EFECTO DEL CARBACOL (CCh) SOBRE ANILLOS DE AORTA ABDOMINAL PRECONTRAÍDOS CON FENILEFRINA, PROVENIENTES DE RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME. (●) el grupo Control (NaCl 0,9% i.p.) y (■) el grupo nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 50 mg/Kg/día i.p, durante 7 días. Este es un gráfico representativo de N= 3.**

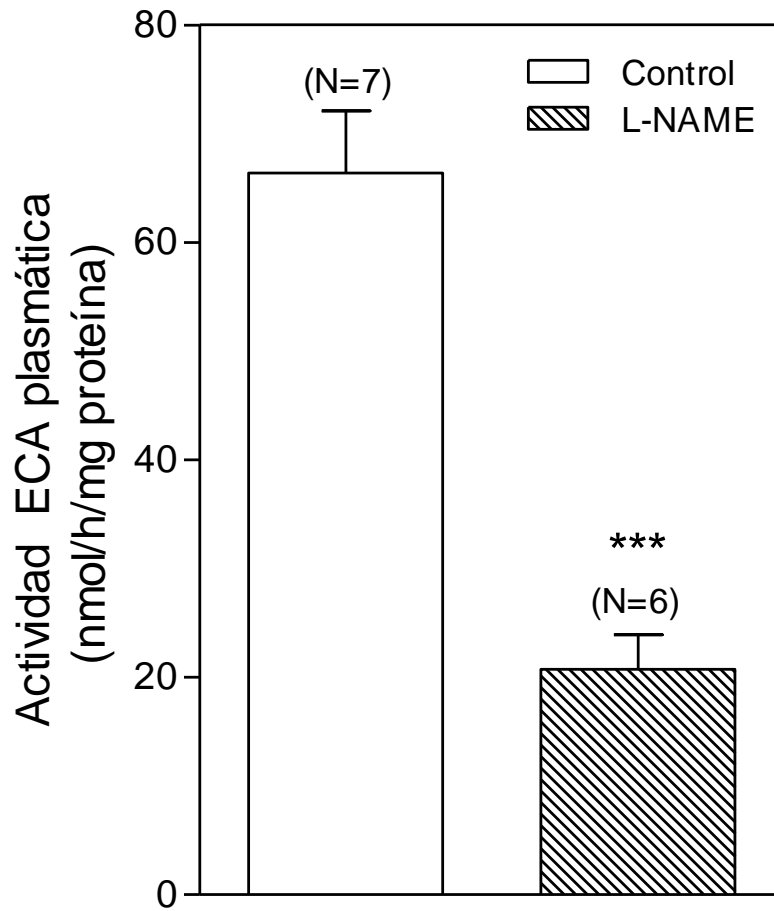


**FIGURA 20. EFECTO DEL NITROPRUSIATO DE SODIO SOBRE ANILLOS DE AORTA ABDOMINAL PRECONTRAÍDOS CON FENILEFRINA, PROVENIENTES DE RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE L-NAME. (●) el grupo Control (NaCl 0,9% i.p.) y (■) el grupo nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 50 mg/Kg/día i.p, durante 7 días. Este es un gráfico representativo de N= 3.**

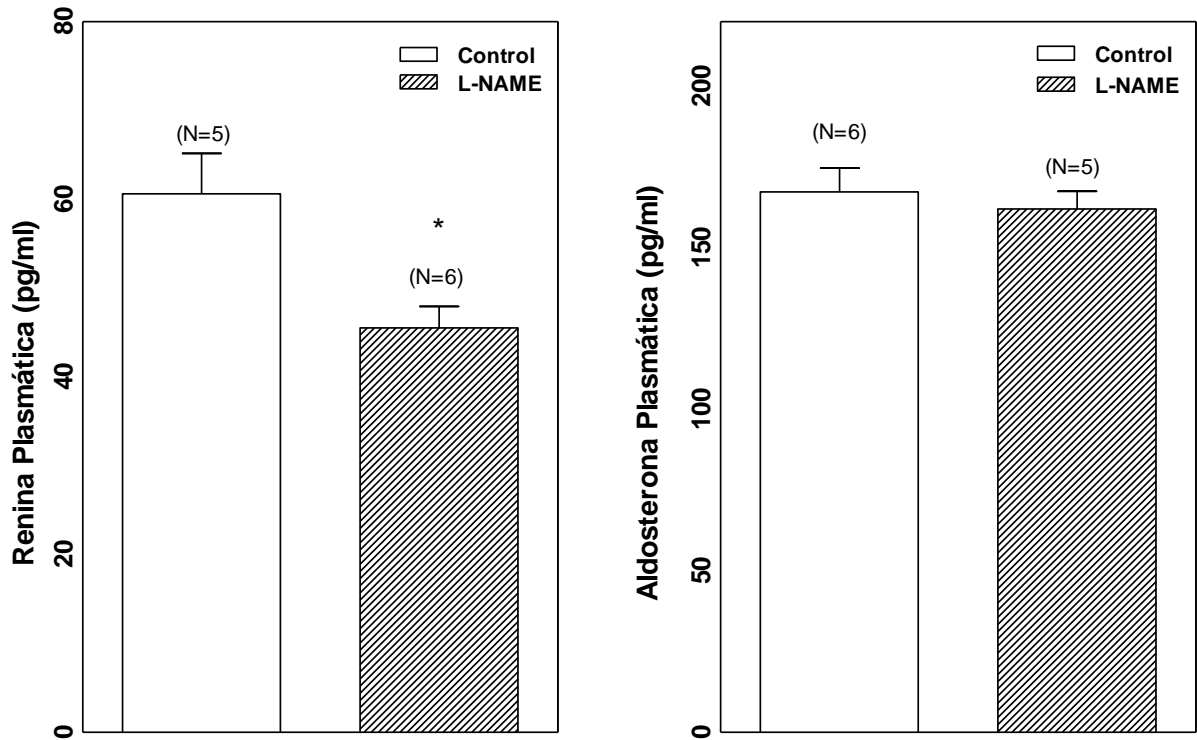
## MARCADORES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA

El tratamiento con L-NAME a la dosis de 50 mg/Kg/día durante 7 días a las ratas preñadas redujo significativamente la actividad de la enzima convertidora de angiotensina plasmática cuando se compara con las ratas preñadas controles (C:  $66,40 \pm 5,7$  vs L-NAME:  $20,75 \pm 3,14$  expresado en nmol/h/mg proteína,  $p < 0,0001$ ) (figura 21). Esta reducción fue de un 65,64%. Aún más, al cuantificar la concentración de renina y aldosterona plasmática, se encontró una disminución significativa en la concentración de renina plasmática en las ratas tratadas con L-NAME comparada con las ratas preñadas controles (-24,84%,  $p < 0,02$ ) (C:  $60,63 \pm 4,55$  vs L-NAME:  $45,54 \pm 2,4$  en pg/mL). En relación a la aldosterona plasmática, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (C:  $167,33 \pm 7,41$  vs L-NAME:  $162,0 \pm 5,5$  pg/mL) (figura 22).

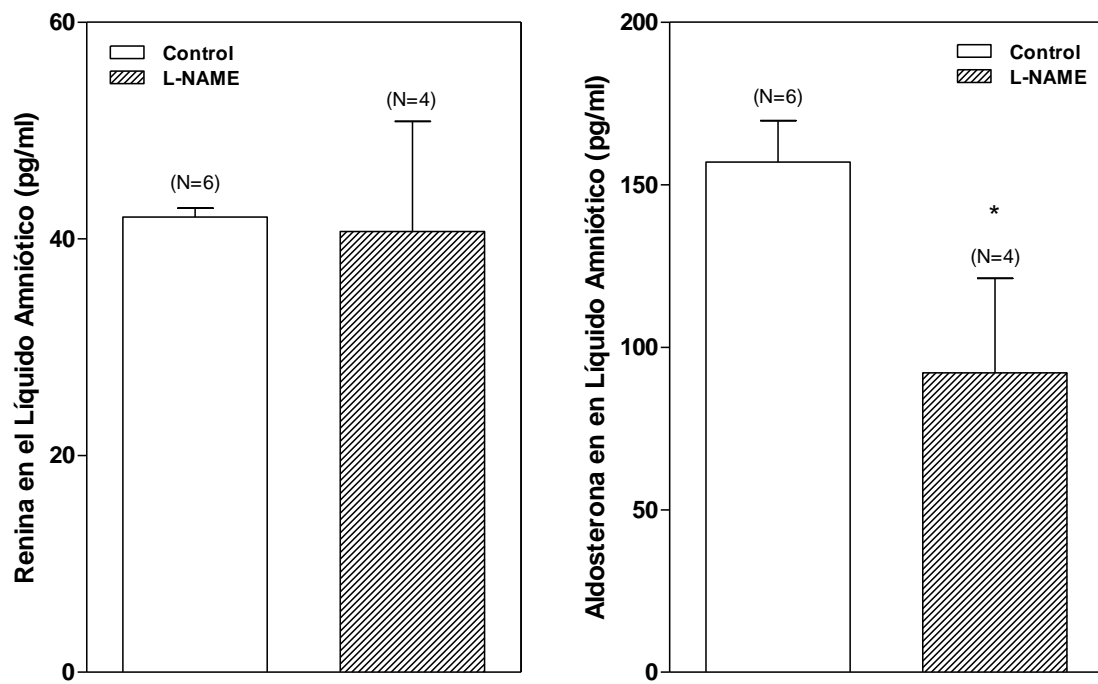
Por otra parte, al cuantificar la concentración de renina en el líquido amniótico en los grupos experimentales, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las ratas preñadas controles y las ratas preñadas tratadas con L-NAME (C:  $42,02 \pm 0,818$  vs L-NAME:  $40,675 \pm 10,175$ , en pg/mL). Sin embargo, al determinar la concentración de aldosterona en el líquido amniótico se evidenció una reducción significativa del 41,44% ( $p < 0,02$ ) en las ratas preñadas que recibieron tratamiento de L-NAME con respecto al grupo control (C:  $157,0 \pm 13,74$  vs L-NAME:  $92,10 \pm 29,07$ , en pg/mL) (figura 23).



**FIGURA 21. ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ECA) EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \*\*\* $p < 0,0001$  comparado con ratas controles.



**FIGURA 22. RENINA Y ALDOSTERONA PLASMÁTICA EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR LA ADMINISTRACION DE L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster, 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 días. Los valores representan la media ± EEM. \* $p < 0,02$  con respecto al grupo control.

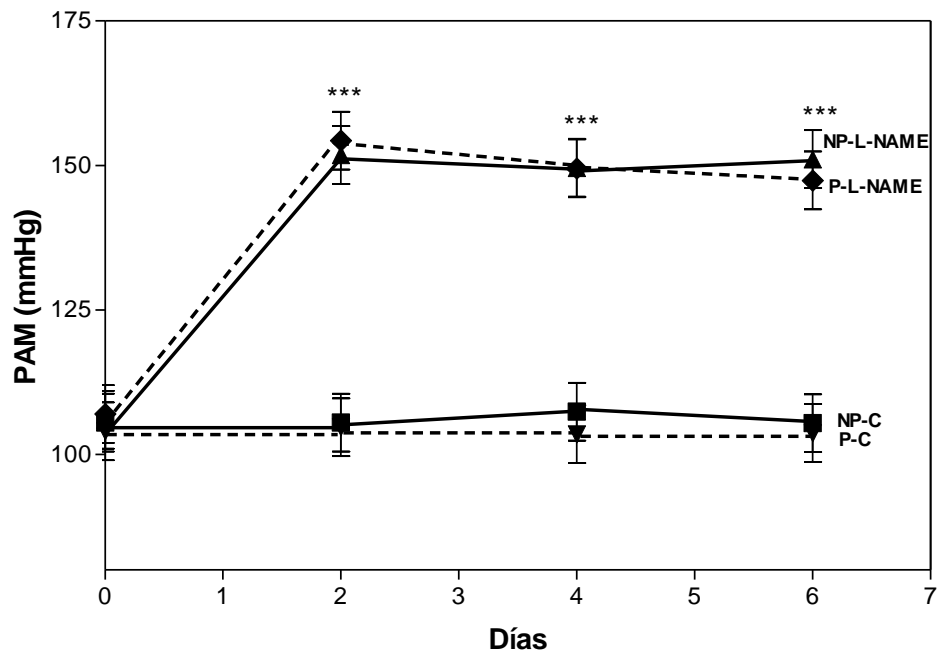


**FIGURA 23. RENINA Y ALDOSTERONA EN EL LÍQUIDO AMNIÓTICO DE RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR LA ADMINISTRACION DE L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster, 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,02$  con respecto al grupo control.

## EFFECTOS COMPARATIVOS DEL TRATAMIENTO CON L- NAME ENTRE RATAS PREÑADAS Y NO PREÑADAS

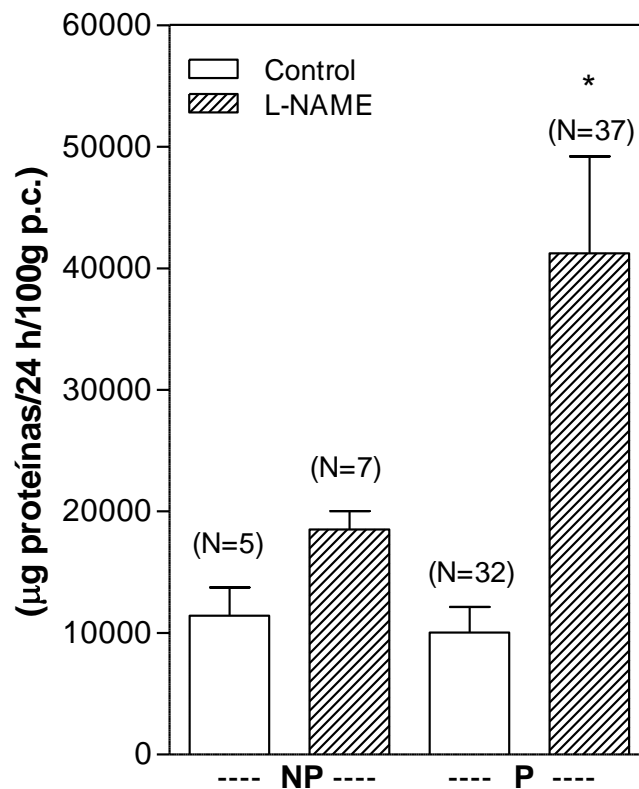
### Cambios en la presión arterial media y excreción urinaria de proteínas en ratas no preñadas (NP) y en ratas preñadas (P) tratadas con L-NAME.

Como se muestra en la figura 24, el tratamiento de ratas preñadas (P) y de ratas no preñadas (NP) con L-NAME durante 7 días consecutivos produjo un incremento significativo de la presión arterial media, cuyos valores alcanzaron  $151,8 \pm 60$  mmHg en las ratas no preñadas y de  $154,3 \pm 50$  mmHg en las ratas preñadas. En ambos casos los incrementos fueron significativamente mayores comparados con los controles no tratados respectivos.



**FIGURA 24. EFECTO DEL L-NAME SOBRE EL CURSO TEMPORAL DE LA PRESIÓN ARTERIAL MEDIA EN RATAS PREÑADAS (P) Y NO PREÑADAS (NP).** (▼): Control preñadas (NaCl 0,9% i.p.), (▲) ratas preñadas que recibieron nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 50 mg/Kg/día i.p., (■) grupo control de ratas no preñadas que recibió (NaCl 0,9% i.p.) y (♦) las ratas no preñadas que recibieron nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 50 mg/Kg/día i.p. N= 8 por grupo. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \*\*\*p<0,001 comparado con ratas controles.

En relación a la excreción urinaria de proteínas totales, se demuestra que el tratamiento con L-NAME incrementó significativamente en las ratas preñadas (310% de incremento). Sin embargo, en las ratas no preñadas (NP) este incremento fue de apenas un 62%, sin llegar a ser significativo. (NP-Control:  $11418,4 \pm 2321,3$  vs NP-L-NAME:  $18514,29 \pm 1500$ ; P-Control:  $10040,57 \pm 2132,6$  vs P-L-NAME:  $41218,83 \pm 8000$ , expresado en  $\mu\text{g}$  proteínas/ 24 h/ 100 g p.c.) (Figura 25).



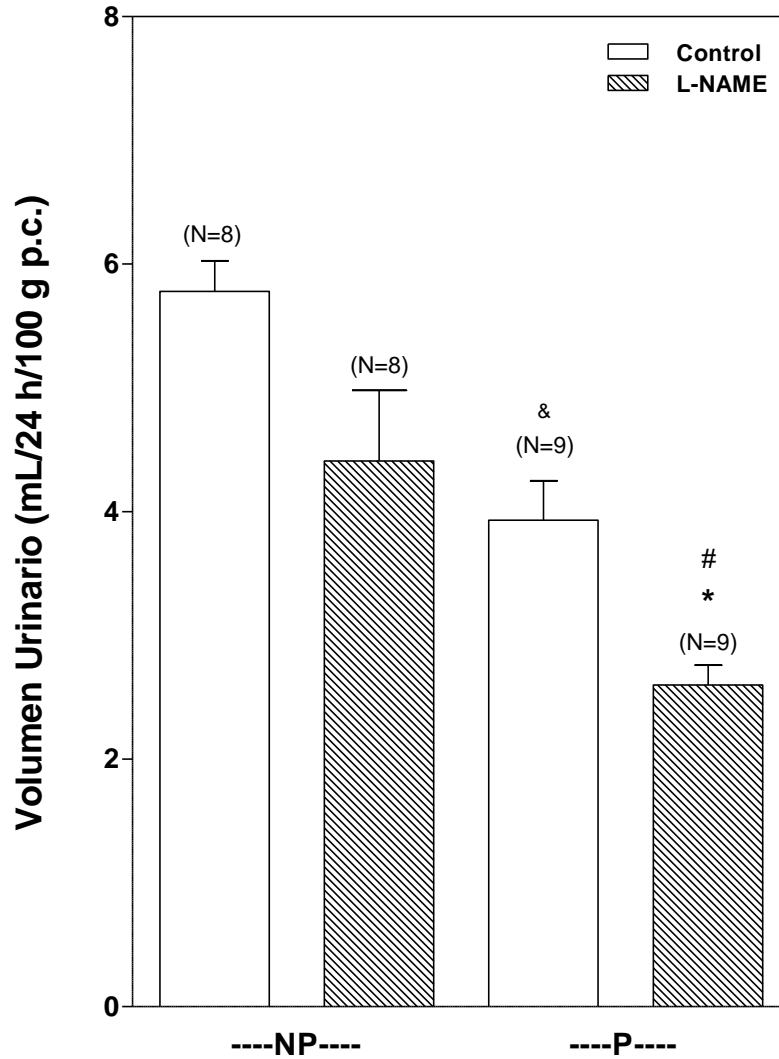
**FIGURA 25. EFECTO DEL L-NAME DURANTE SIETE DÍAS SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA DE PROTEÍNAS EN RATAS NO PREÑADAS Y EN RATAS PREÑADAS.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días, NP: ratas no preñadas, y P: ratas preñadas. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con ratas controles preñadas.



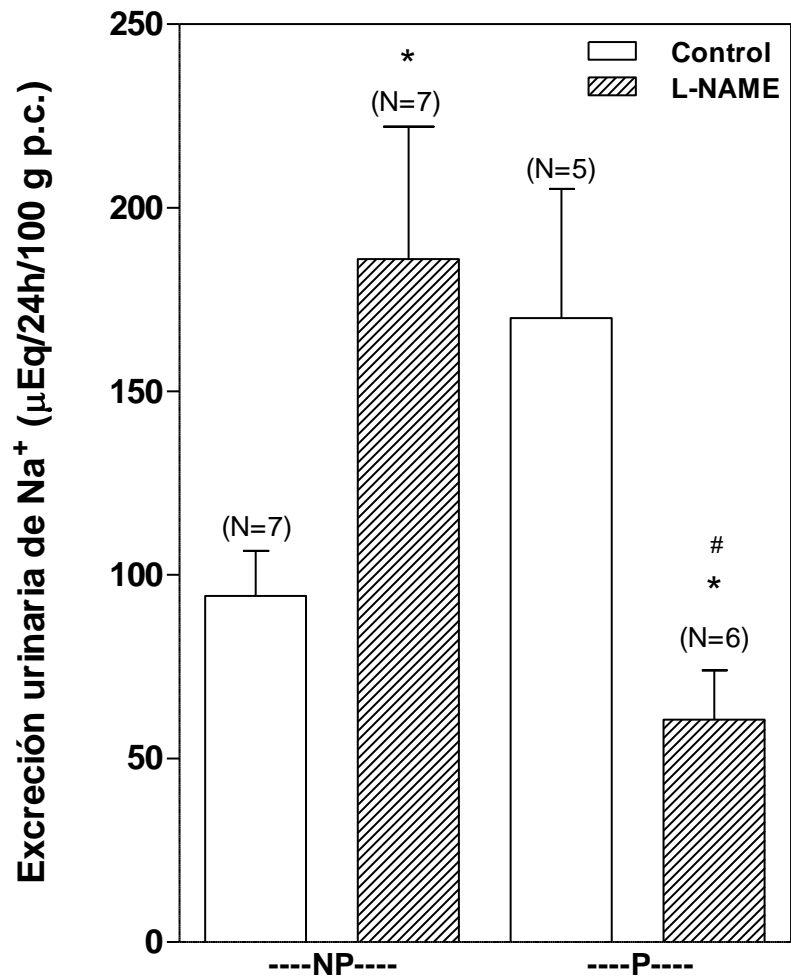
Por otra parte, cuando se cuantificó el volumen urinario en las ratas preñadas y en ratas no preñadas tratadas con L-NAME, se observó que el volumen urinario de las ratas no preñadas control fue ligeramente mayor con respecto al observado en las ratas preñadas control. Ahora bien, el tratamiento con L-NAME redujo significativamente el volumen urinario en las ratas P y produjo una tendencia a la reducción en las ratas NP (Control NP:  $5,78 \pm 0,2550$  vs L-NAME-NP:  $4,41 \pm 0,57$ ; Control P:  $3,93 \pm 0,32$  vs L-NAME-P:  $2,60 \pm 0,16$ , en mL/ 24h/100 g p.c.) (Figura 26).

De igual forma al evaluar la excreción urinaria de sodio en muestras de orina de 24 horas, se encontró que el tratamiento con L-NAME incrementó la excreción de sodio de manera significativa en las ratas no preñadas (Control NP:  $94,27 \pm 12,30$  vs L-NAME NP:  $186,02 \pm 36,07$   $\mu\text{Eq}/24\text{h}/100$  g p.c.;  $p < 0,05$ ) y, contrariamente redujo la excreción urinaria de sodio significativamente en las ratas preñadas (Control P:  $170,06 \pm 35,12$  vs L-NAME P:  $60,66 \pm 13,41$   $\mu\text{Eq}/24$  h/100 g p.c.;  $p < 0,05$ ) (figura 27).

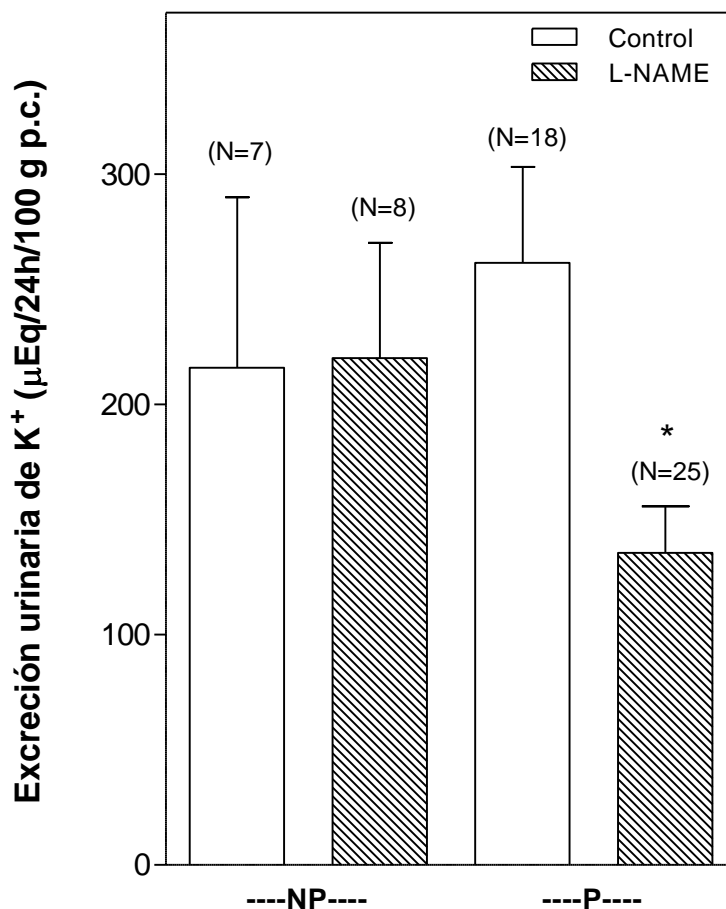
La cuantificación de la excreción de potasio en muestras de orina de 24 horas, logró evidenciar que el tratamiento no produjo cambios significativos en la excreción de potasio en las ratas no preñadas, pero sin embargo se observó una reducción significativa en las ratas preñadas (Control NP:  $215,89 \pm 74$  vs L-NAME NP:  $220,15 \pm 50$   $\mu\text{Eq}/24$  h/100 g p.c.), y (Control-P:  $261,4 \pm 41,7$  vs L-NAME P:  $135,5 \pm 20,2$  en  $\mu\text{Eq}/24$  h/100 g p.c.,  $p < 0,05$ ) (figura 28).



**FIGURA 26. EFECTO DEL L-NAME DURANTE SIETE DIAS SOBRE EL VOLUMEN URINARIO EN RATAS NO PREÑADAS (NP) Y EN RATAS PREÑADAS (P).** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con las ratas P controles. # $p < 0,01$  comparado con las ratas NP tratadas con L-NAME; & $p < 0,01$  comparado con ratas control NP.



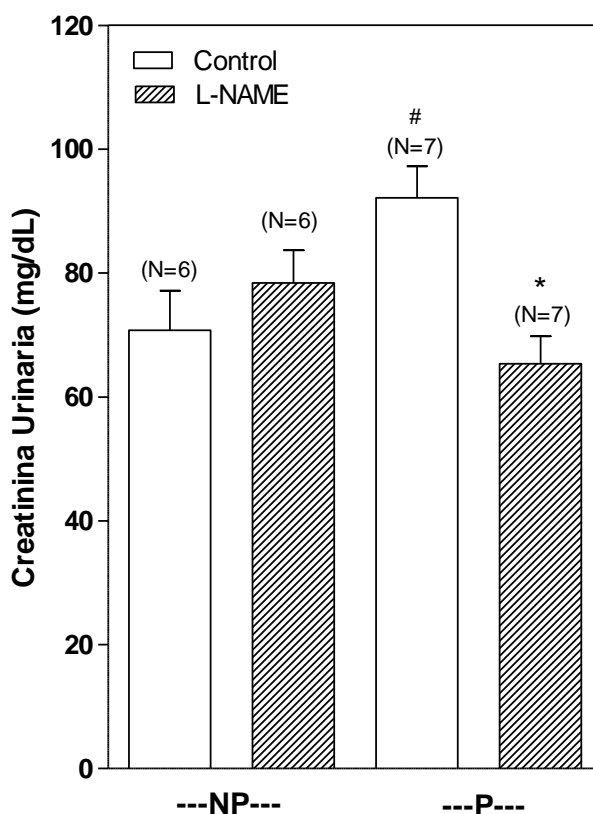
**FIGURA 27. EXCRECIÓN URINARIA DE SODIO EN RATAS NO PREÑADAS (NP) Y EN RATAS PREÑADAS (P) CONTROLES Y PREVIAMENTE TRATADAS CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con las ratas controles; # $p < 0,05$  comparado con ratas L-NAME NP.



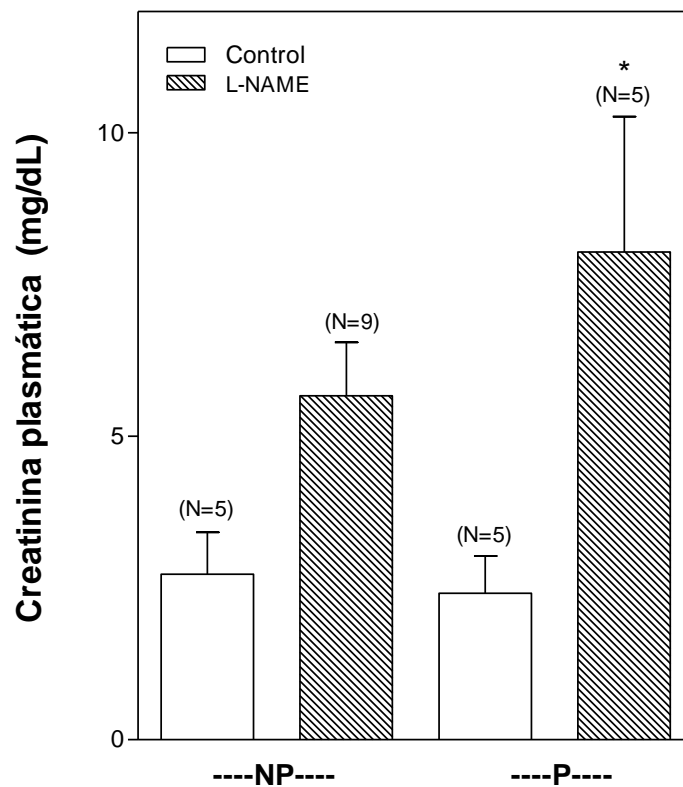
**FIGURA 28. EXCRECIÓN URINARIA DE POTASIO EN RATAS NO PREÑADAS (NP) Y EN RATAS PREÑADAS (P) TRATADAS CON L-NAME.** Control (NaCl 0.9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con ratas controles P.

Al evaluar la función renal utilizando como parámetros la determinación de la creatinina urinaria, y la creatinina sérica se encontró, que el tratamiento con L-NAME no alteró significativamente los valores de creatinina urinaria en las ratas no preñadas (Control NP:  $70,75 \pm 6,4$  vs L-NAME NP:  $78,40 \pm 5,3$  mg/dL); sin embargo, las ratas preñadas tratadas con L-NAME presentaron una reducción significativa en la concentración de la creatinina urinaria,

(Control P:  $92,16 \pm 5,07$  vs L-NAME P:  $65,34 \pm 4,47$  mg/dL,  $p < 0,05$ ) (figura 29). Igualmente, se observó que la concentración de creatinina urinaria en las ratas preñadas fue significativamente mayor que en las NP. El tratamiento con L-NAME produjo cambios significativos en los valores de la creatinina plasmática en las ratas preñadas, y una tendencia no significativa al incremento en las ratas no preñadas (Control NP:  $2,73 \pm 0,69$  vs L-NAME NP:  $5,67 \pm 0,88$  mg/dL), (Control P:  $2,42 \pm 0,61$  vs L-NAME P:  $8,04 \pm 2,23$  mg/dL,  $p < 0,05$  (figura 30).



**FIGURA 29. DETERMINACION DE LA CREATININA URINARIA EN RATAS NO PREÑADAS (NP) Y EN RATAS PREÑADAS (P) TRATADAS CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con las ratas preñadas control. # $p < 0,05$  comparado con las ratas control NP.



**FIGURA 30. DETERMINACION DE LA CREATININA PLASMÁTICA DE RATAS NO PREÑADAS (NP) Y EN RATAS PREÑADAS (P) TRATADAS CON L-NAME DURANTE SIETE DIAS.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  valores comparados con las ratas P control.

Se evaluó el posible efecto del tratamiento con L-NAME, a la dosis de 50 mg/Kg/100 g p.c., durante 7 días sobre el conteo de plaquetas tanto en las ratas no preñadas (NP) como en las ratas preñadas (P). Para ello, se cuantificó el número de plaquetas en ambos grupos experimentales, encontrándose que el tratamiento con L-NAME no produjo cambios

significativos en el número de plaquetas en las ratas no preñadas (Control NP: 1291000 ± 42261 vs L-NAME NP: 1220000 ± 72629, en plaquetas/cc).

Sin embargo, en las ratas preñadas que recibieron el tratamiento con L-NAME se produjo una reducción significativa en el número de plaquetas comparado con su grupo control (Control P: 1378571 ± 59258 vs L-NAME P: 994000 ± 69054,  $p < 0,01$ ) (siendo valores normales reportados para las ratas hembras *Sprague-Dawley* de 1.262,2 ± 278,4 plaquetas/cc).

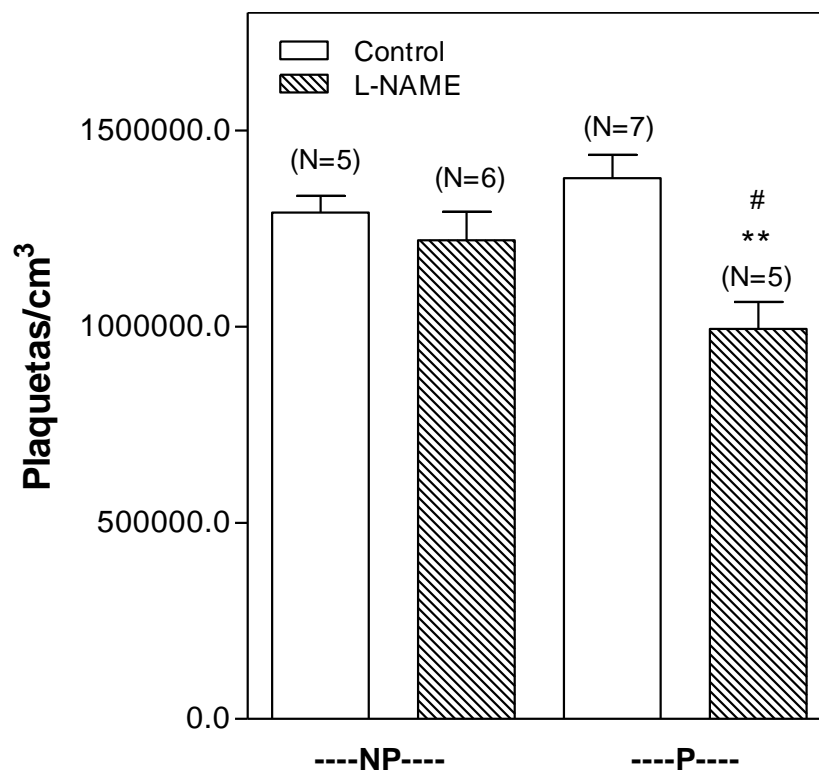
Aún más, se observó que el conteo de plaquetas en las ratas preñadas tratadas con L-NAME fue significativamente menor con respecto a las ratas NP tratadas con L-NAME (figura 31).

### **Efecto del L-NAME sobre la actividad de la sintasa del óxido nítrico y de las enzimas antioxidantes renales, así como la excreción urinaria de GMP cíclico, en ratas preñadas y en ratas no preñadas**

Como se muestra en la figura 32, tanto en la corteza renal de las ratas no preñadas y de las ratas preñadas, el tratamiento con L-NAME logró disminuir significativamente la actividad de la sintasa óxido nítrico (SON) (Control NP: 725,9 ± 90,3 vs L-NAME NP: 443,65 ± 18,7 en pmol/h/mg de proteínas,  $p < 0,05$ ) (CP: 702,5 ± 64,9 vs L-NAME P: 487,4 ± 66,18 en pmol/h/mg de proteína;  $p < 0,05$ ). Igualmente, al realizar la cuantificación de la excreción del GMP cíclico urinario/24h, se observó una tendencia a la disminución del GMPc urinario en las ratas no preñadas tratadas con L-NAME (NP= 49,77 %) (Control

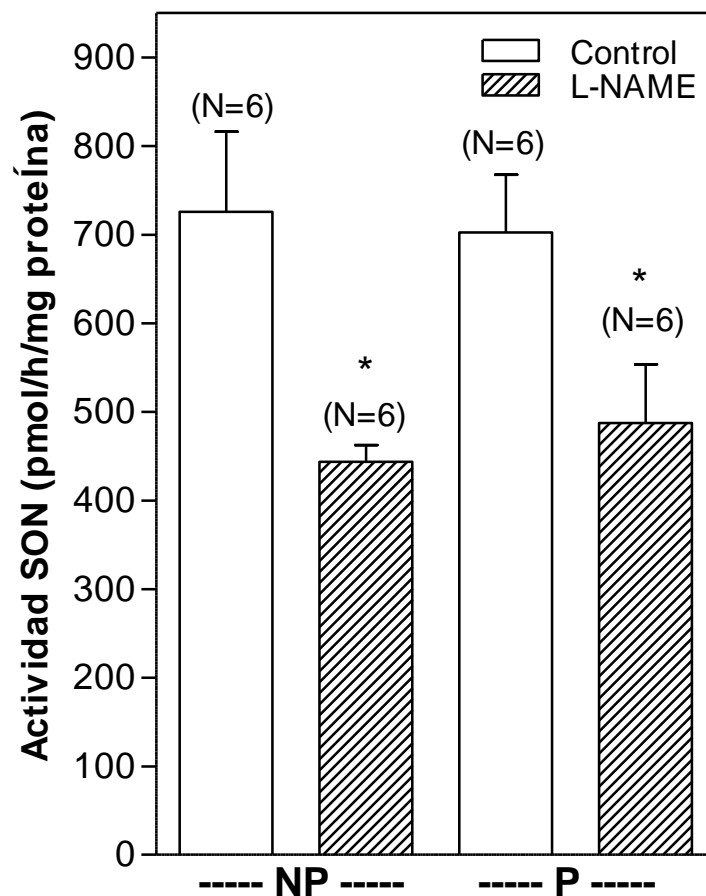
NP:  $444,29 \pm 85,51$  vs L-NAME NP:  $233,23 \pm 28,69$ , en nmol/24h/100 g p.c.), mientras que la disminución en la ratas preñadas fue estadísticamente significativa ( $P= 49,41\%$ ) (Control P:  $1431,29 \pm 156,53$  vs L-NAME P:  $724,08 \pm 133,81$ , en nmol/24h/100g p.c.;  $p<0,001$ ) (figura 33).

Aún cuando, el L-NAME reduce porcentualmente similar la excreción urinaria de GMPc en ambos grupos, se observa que las ratas preñadas presentan una excreción basal significativamente mayor que las ratas NP.

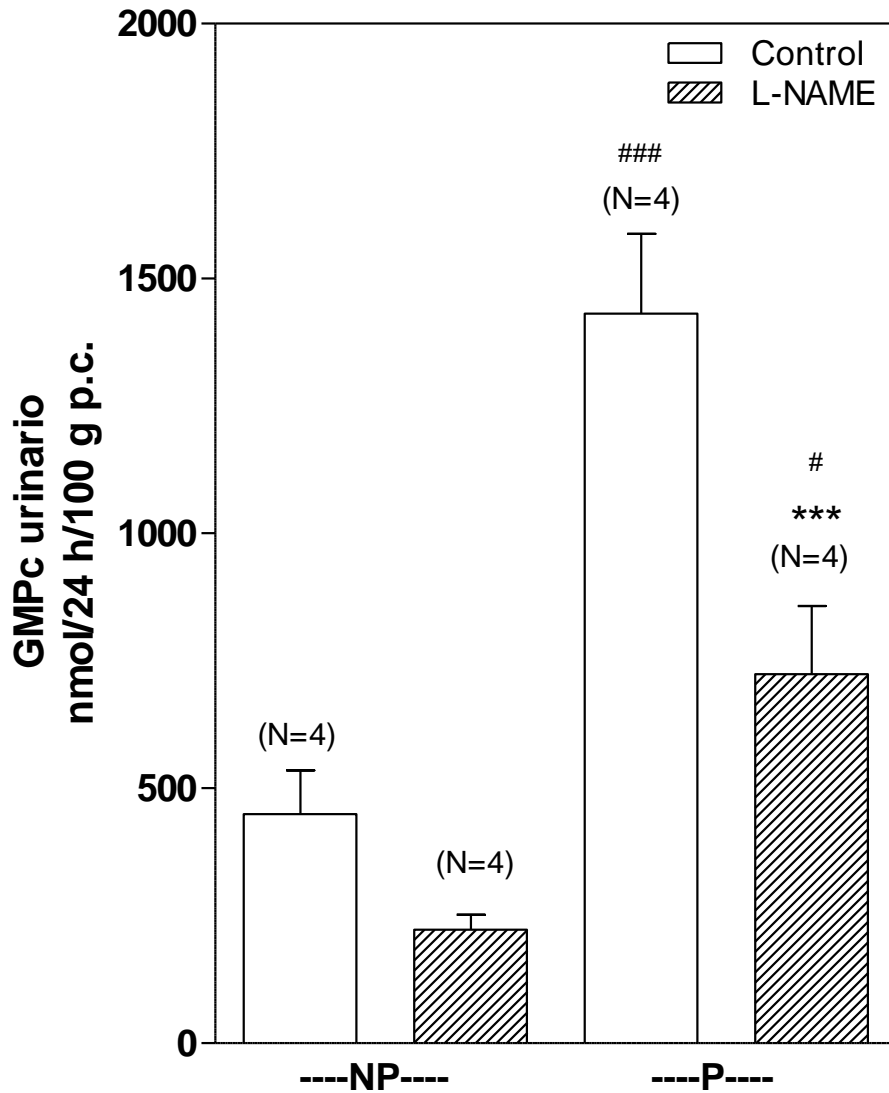


**FIGURA 31. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE PLAQUETAS EN RATAS NO PREÑADAS (NP) Y EN RATAS PREÑADAS (P) TRATADAS CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \*\* $p<0,01$  comparado con las ratas controles preñadas. # $p<0,05$  comparado con las ratas control NP.





**FIGURA 32. ACTIVIDAD DE LA SINTASA DE OXIDO NÍTRICO (SON) RENAL EN RATAS NO PREÑADAS (NP) Y EN RATAS PREÑADAS (P) TRATADAS CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con las ratas control.



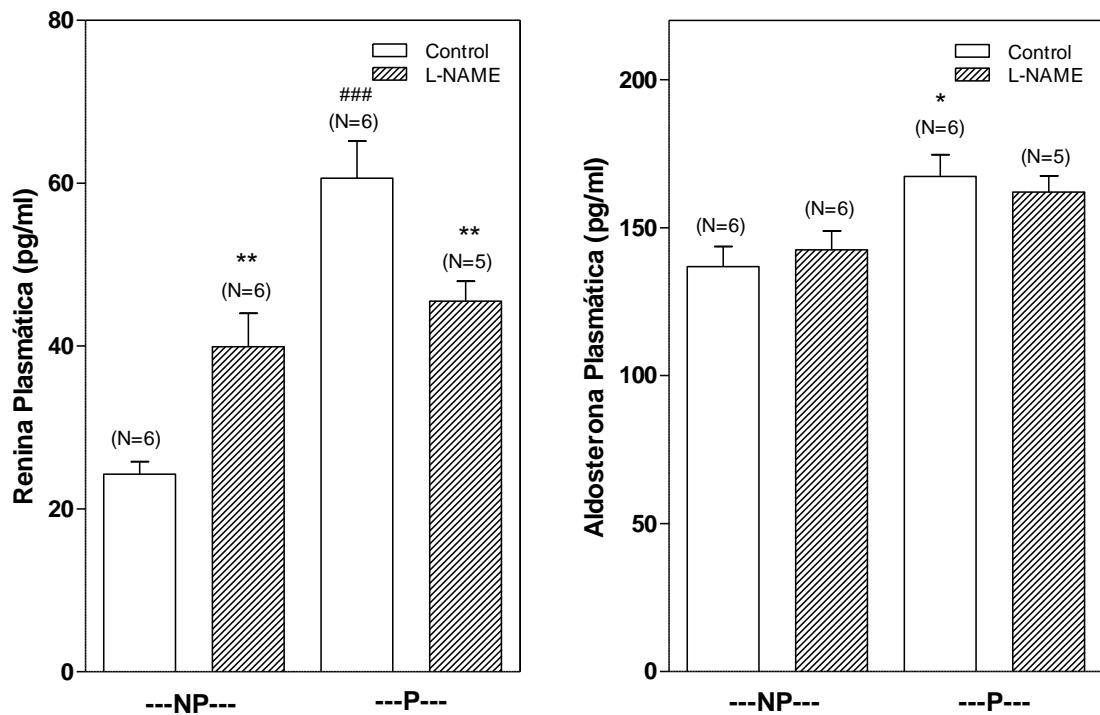
**FIGURA 33. EXCRECION URINARIA DE GMPc EN RATAS NO PREÑADAS (NP) Y PREÑADAS (P) TRATADAS CON L-NAME DURANTE SIETE DIAS.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM.\*\*\*p<0,001 comparado con el grupo control preñadas. #p<0,05 comparado con el grupo NP L-NAME, #p<0,05, comparado con el grupo L-NAME NP, ###p<0,001 comparado con el grupo control NP.

## **EFFECTO DEL L-NAME SOBRE LOS MARCADORES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA PLASMÁTICA EN RATAS PREÑADAS Y NO PREÑADAS.**

Al cuantificar la concentración de algunos de los marcadores del sistema renina angiotensina aldosterona en ratas NP tratadas con L-NAME a la dosis de 50 mg/Kg/día durante 7 días, se encontró que el tratamiento incrementó significativamente la concentración de renina plasmática cuando se compara con el grupo control (Control NP:  $24,27 \pm 1,54$  vs L-NAME NP:  $39,92 \pm 4,11$  pg/mL,  $p < 0,01$ ), con un aumento de la concentración de renina plasmática en un 64,48%. Asimismo, al cuantificar la concentración de renina plasmática en las ratas preñadas tratadas con L-NAME durante 7 días, se encontró una disminución significativa de un 24,84% en la concentración de renina en plasma comparada con las ratas preñadas controles (Control P:  $60,63 \pm 4,55$  vs L-NAME P:  $45,54 \pm 2,4$  en pg/mL,  $p < 0,01$ ). Adicionalmente, se encontró un incremento significativo ( $p < 0,001$ ) en la concentración de la renina plasmática basal en ratas preñadas controles cuando se compara con las ratas no preñadas controles.

Por otra parte, al evaluar el efecto del L-NAME como tratamiento crónico en ratas no preñadas sobre la concentración de aldosterona plasmática, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales tanto en las ratas no preñadas (Control NP:  $136,83 \pm 6,84$  vs L-NAME NP:  $142,50 \pm 6,38$  pg/ml), como en las ratas preñadas (Control P:  $167,33 \pm 7,41$  vs L-NAME P:  $162,0 \pm 5,5$  en pg/ml). Sin embargo, se encontró un

incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en la concentración de la aldosterona plasmática basal en ratas preñadas controles comparadas con las ratas no preñadas controles (figura 34).



**FIGURA 34. RENINA Y ALDOSTERONA PLASMÁTICA EN RATAS NO PREÑADAS (NP) Y EN RATAS PREÑADAS (P) TRATADAS CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con el grupo control, NP; \*\* $p < 0,01$  comparado con su grupo control y ### $p < 0,001$  comparado con las ratas control NP.

## **PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS NO PREÑADAS Y EN LA PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL**

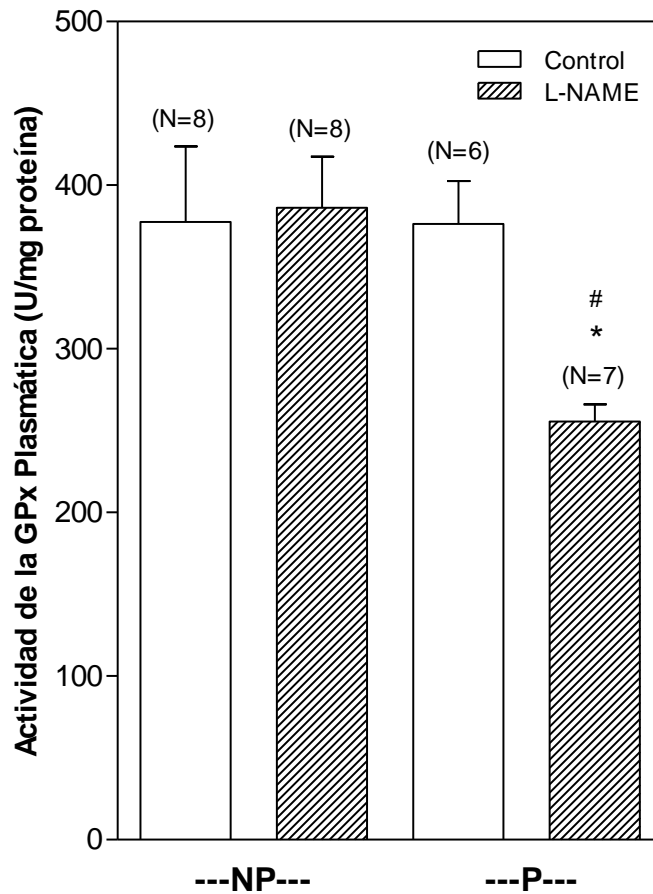
### **Actividad de las enzimas antioxidantes plasmática y renal y determinación de la peroxidación lipídica en ratas no preñadas (NP), y en ratas preñadas (P), con y sin tratamiento con L-NAME**

En la determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) plasmática como índice de daño tubular renal, se encontró que el tratamiento con L-NAME en las ratas no preñadas no alteró la actividad de la GPx plasmática (Control NP:  $377,43 \pm 46,16$  vs L-NAME NP:  $386,11 \pm 31,36$  en U/mg proteína), mientras que en las ratas preñadas tratadas con L-NAME se observó una disminución significativa de la actividad de la GPx plasmática cuando se compara con las ratas preñadas controles (Control P:  $376,39 \pm 26,13$  vs L-NAME P:  $255,52 \pm 10,53$  en U/mg de proteína,  $p < 0,05$ ). Adicionalmente, se observó que la actividad de la GPx plasmática en las ratas P tratadas con L-NAME fue significativamente menor que en las ratas NP tratadas con L-NAME (figura 35).

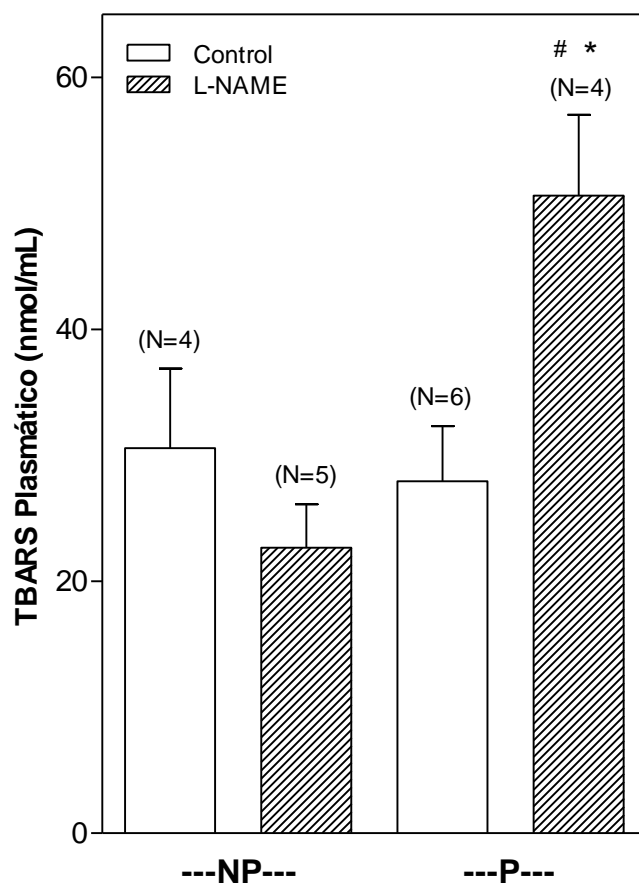
Por otra parte, al cuantificar los productos de peroxidación lipídica plasmático, que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, como medida de peroxidación lipídica expresado como TBARS en nmol/mL, se encontró que el pretratamiento con L-NAME 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días, no alteró significativamente la concentración de TBARS en el plasma de las ratas no preñadas comparadas con las ratas no preñadas controles (NP control:  $30,57 \pm 6,32$  vs NP L-NAME:  $22,68 \pm 3,41$  nmol/ml), mientras que en el modelo

experimental de preeclampsia inducido por la administración crónica de L-NAME 50 mg/Kg/día, se observó un incremento significativo de TBARS cuando se compara con el grupo control de las ratas preñadas (C:  $27,94 \pm 4,38$  vs L-NAME:  $50,63 \pm 6,41$ , valores expresados en nmol/ml,  $p < 0,05$ ). Adicionalmente, se observó que la concentración de TBARS en las ratas P tratadas con L-NAME fue significativamente mayor que en las ratas NP tratadas con L-NAME (figura 36).

Con relación a las actividades de las enzimas antioxidantes renales, el pretratamiento con L-NAME 50 mg/Kg/día durante 7 días a ratas no preñadas no alteró la actividad de las enzimas antioxidantes renales corticales (SOD= Control NP:  $213,67 \pm 25,92$ ; L-NAME NP:  $237,83 \pm 28,24$ ), (CAT= Control NP:  $0,4081 \pm 0,04$ ; L-NAME NP:  $0,4320 \pm 0,05$ ), (GPx= Control NP:  $3,65 \pm 0,18$ ; L-NAME NP:  $3,29 \pm 0,28$ ). En contraste, en ratas preñadas, el tratamiento con L-NAME redujo significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes cuando se compara con las ratas preñadas controles (SOD= Control P:  $196,76 \pm 36,90$ ; L-NAME P:  $76,18 \pm 10,67$ ;  $p < 0,01$ ) (CAT=Control P:  $0,3568 \pm 0,05$ ; L-NAME P:  $0,1987 \pm 0,03$ ;  $p < 0,05$ ), (GPx=Control P:  $3,82 \pm 0,34$ ; L-NAME P:  $2,69 \pm 0,25$ ;  $p < 0,05$ ) (figura 37).

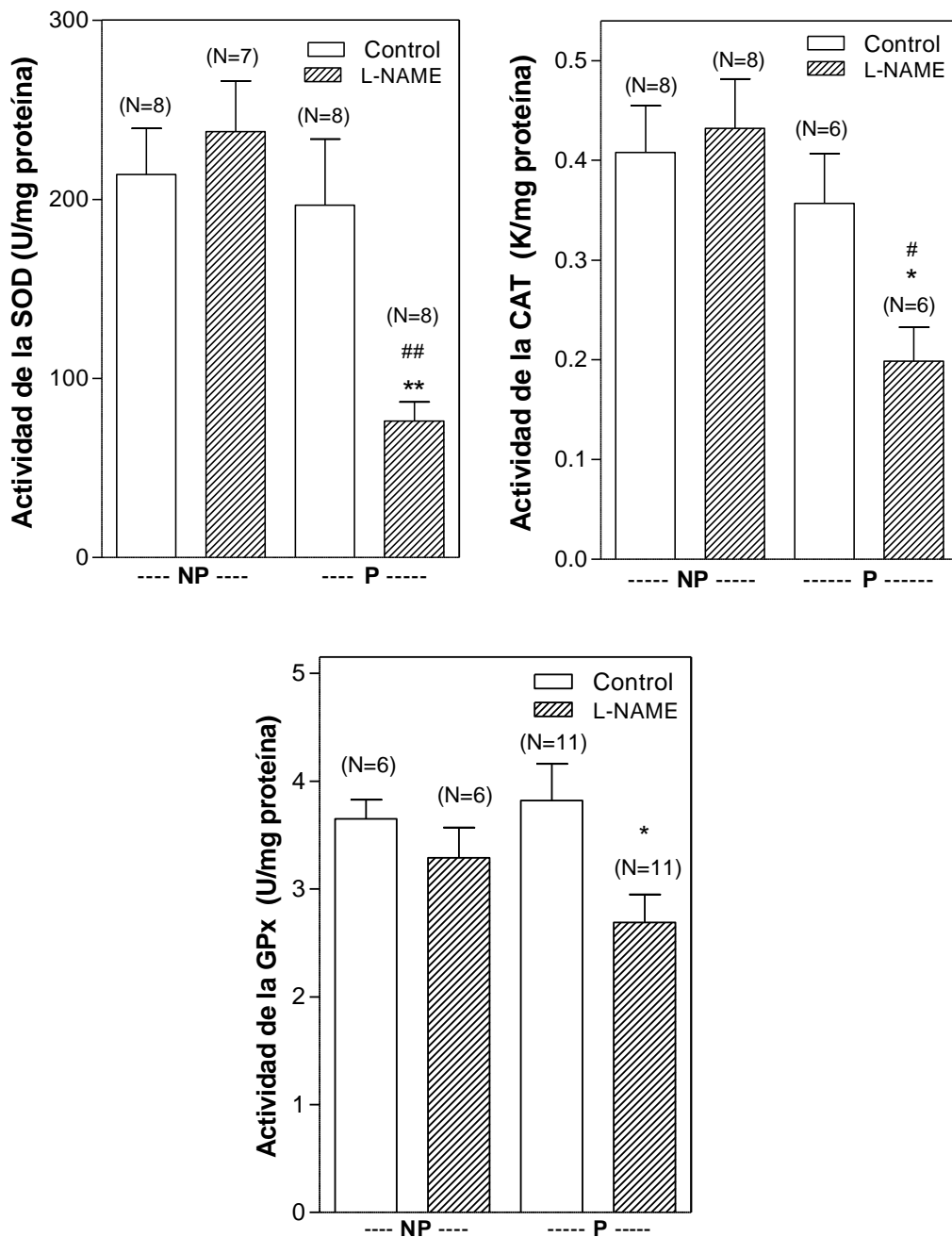


**FIGURA 35. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx) PLASMÁTICA EN RATAS NO PREÑADAS (NP) Y EN RATAS PREÑADAS (P) TRATADAS CON L-NAME DURANTE SIETE DÍAS.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,01$  comparado con ratas controles P; # $p < 0,05$  comparado con las ratas tratadas con L-NAME NP.



**FIGURA 36. CONCENTRACION DE LOS PRODUCTOS DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA QUE REACCIONAN CON EL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) PLASMÁTICO EN RATAS NO PREÑADAS (NP) Y EN RATAS PREÑADAS (P) TRATADAS CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,01$  comparado con ratas controles P. # $p < 0,05$  comparado con las ratas tratadas con L-NAME NP.





**FIGURA 37. ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES RENALES EN RATAS NO PREÑADAS (NP) Y EN RATAS PREÑADAS (P), TRATADAS CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. **SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD):** \*\*p<0,01 comparadas con ratas preñadas controles, ##p<0,01 comparadas con ratas no preñadas tratadas con L-NAME. **CATALASA (CAT):** \*p<0,05 comparado con ratas preñadas controles y #p<0,05 comparado con ratas no preñadas tratadas con L-NAME. **GLUTATION PEROXIDASA (GPx):** \*p<0,05 comparado con ratas preñadas controles.

## EFFECTO DEL TEMPOL Y LA APOCININA SOBRE LA REDUCCIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE RENAL

### Morfometría Fetal durante el tratamiento con TEMPOL

Tal y como se indica en la Tabla IV, aún cuando no se observó reducción en el número de fetos vivos posterior al tratamiento con L-NAME de las ratas preñadas, se encontró una disminución significativa del peso de los fetos que estuvo asociado a alteraciones con varios grados de reabsorción. El tratamiento con tempol no fue capaz de prevenir la reducción en el peso fetal ni la reabsorción fetal inducida por el tratamiento con L-NAME.

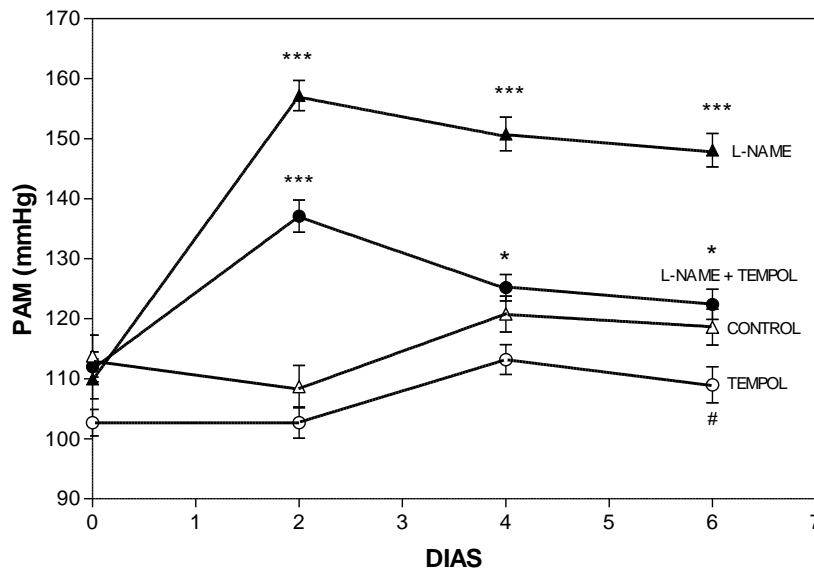
**TABLA IV. MORFOMETRÍA FETAL DURANTE EL TRATAMIENTO CON TEMPOL**

	CONTROL	L-NAME	TEMPOL	L-NAME + TEMPOL
<b>NUMERO DE FETOS VIVOS</b>	10,11 ± 0,5	9,0 ± 0,5	10,01 ± 1,02	11,1 ± 0,9
<b>PESO /No. DE FETOS VIVOS (g)</b>	3,24 ± 0,2	1,95 ± 0,1*	3,8 ± 0,3	2,13 ± 0,1##
<b>NUMERO DE FETOS REABSORBIDOS</b>	0	1,5 ± 0,1***	0	0,33 ± 0,02###

Los valores representan la media ± EEM. \*p<0,05 y \*\*\*p<0,001 comparado con control. ##p<0,01 y ###p<0,001 comparado con tempol. N=4.

### Efecto del tempol sobre los cambios en la presión arterial renal en ratas preñadas tratadas con L-NAME.

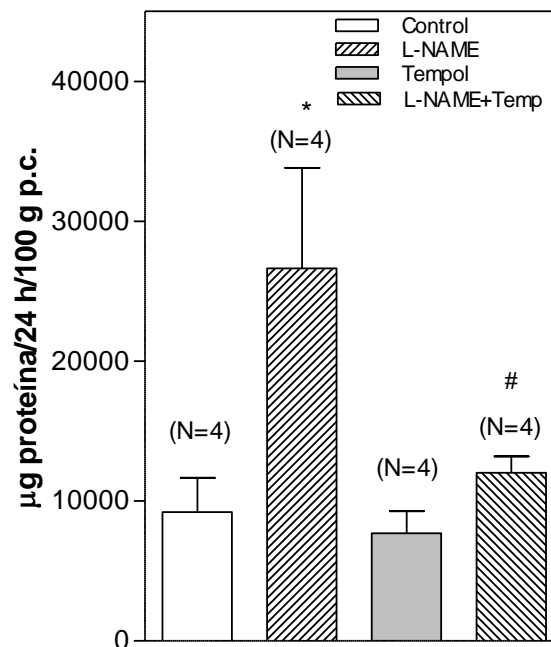
El tratamiento con L-NAME durante 7 días consecutivos a ratas preñadas, incrementó significativamente la presión arterial media desde el día 2 hasta el día 6 de tratamiento. El valor promedio máximo de PAM fue de  $157,3 \pm 3$  mmHg ( $p < 0,001$ ). El pretratamiento de las ratas preñadas con tempol (20 mg/Kg/día) no alteró el curso temporal de la PAM; sin embargo, en el día 6 se observó una reducción significativa cuando se compara con el grupo control ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, el pretratamiento con tempol previno parcialmente el incremento en la PAM inducido por la inhibición de la síntesis del óxido nítrico en ratas preñadas ( $p < 0,01$ ) (figura 38).



**FIGURA 38. CURSO TEMPORAL DEL EFECTO DEL TEMPOL (20 mg/kg/día), DURANTE SIETE DIAS, SOBRE EL INCREMENTO DE LA PRESIÓN ARTERIAL INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME EN RATAS PREÑADAS.** (△) Control (NaCl 0,9% i.p.), (▲) nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 50 mg/Kg/día, (○) Tempol: 20 mg mg/Kg/día y (●) L-NAME+Tempol. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. N=4 por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con ratas preñadas control; \* $p < 0,05$  comparado con ratas preñadas Tempol. # $p < 0,05$  comparada contra ratas preñadas control.

## Efecto del tempol sobre los cambios de la excreción de proteínas urinarias en ratas preñadas tratadas con L-NAME

El tratamiento de ratas preñadas con L-NAME durante siete días continuos incrementó significativamente la excreción urinaria de proteínas (C:  $9216,47 \pm 2440$  vs L-NAME:  $26626,5 \pm 7190$ ,  $\mu\text{g}$  proteínas/24 h/100 g p.c.). El tratamiento con tempol no alteró la excreción urinaria de proteínas basales, pero previno el incremento inducido por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico (Tempol:  $7695,3 \pm 1580,5$  vs L-NAME+Tempol:  $12006,02 \pm 1180$   $\mu\text{g}$  proteínas/24 h/100 g p.c. (figura 39).



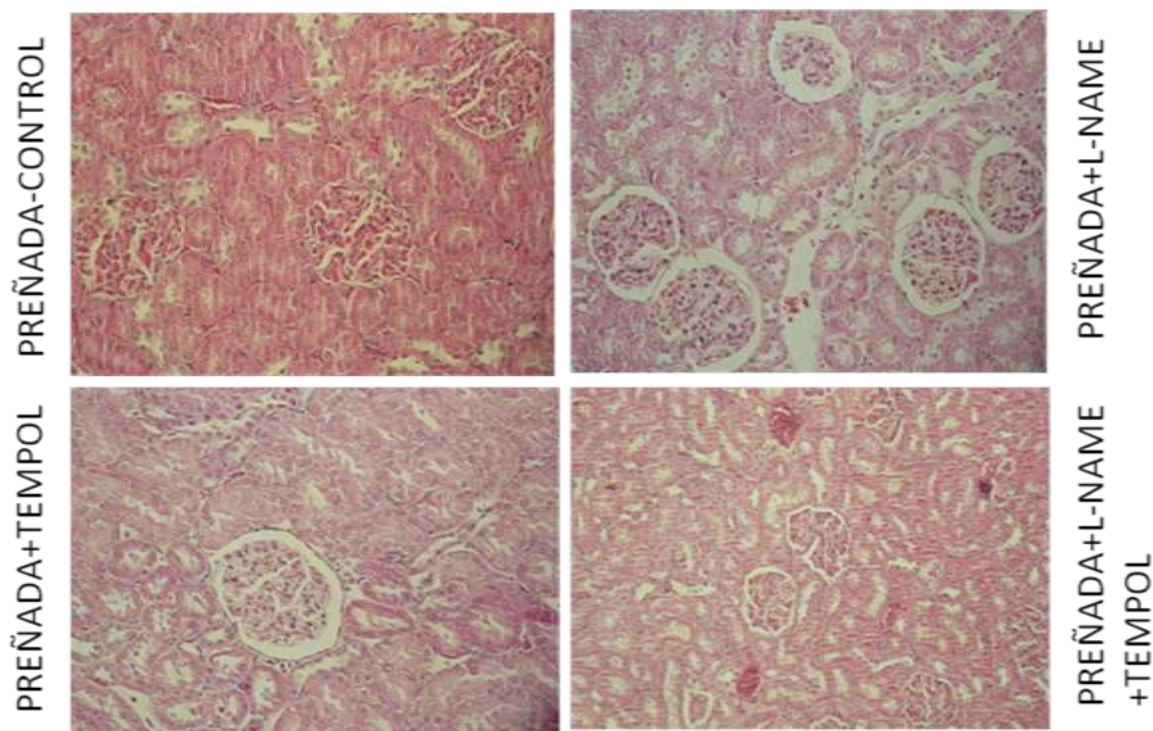
**FIGURA 39. EFECTO DEL TEMPOL (20 mg/kg/día) DURANTE SIETE DÍAS, SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA DE PROTEÍNAS EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. Tempol: 20 mg/Kg/día. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con ratas preñadas controles. # $p < 0,05$  comparado con ratas preñadas tratadas con L-NAME.

### **Efecto del tempol sobre las alteraciones microscópicas observadas durante el tratamiento con L-NAME en ratas preñadas.**

El tratamiento a ratas preñadas con tempol (20 mg/kg/día) durante 7 días consecutivos revirtió el efecto del L-NAME en las alteraciones renales observadas por microscopía óptica. Efectivamente, la observación al microscopio de luz (figura 40) muestra que el riñón de la rata preñada sin tratamiento presenta tumefacción turbia y edema glomerular (CONTROL); mientras que en el riñón proveniente de las ratas preñadas y tratadas con L-NAME presenta tumefacción turbia de los epitelios tubulares, focos hemorrágicos y congestión de los capilares glomerulares (L-NAME). Los riñones provenientes de animales tratados con tempol muestran tumefacción turbia del epitelio tubular, edema glomerular (Tempol); mientras que el tratamiento simultáneo con L-NAME y tempol muestra riñones con tumefacción turbia de epitelios tubulares, congestión de los capilares glomerulares y, pequeños focos hemorrágicos.

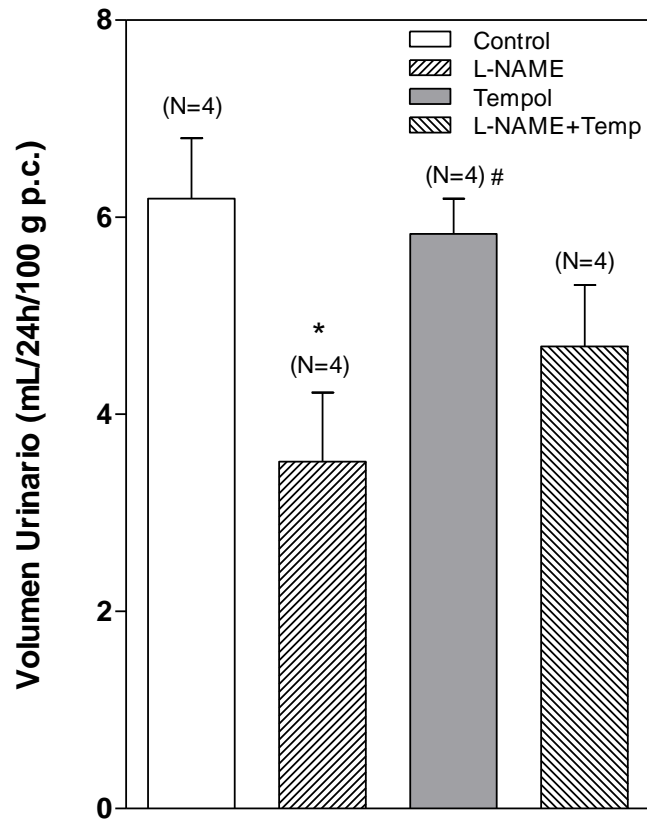
### **Efecto del tempol sobre el volumen urinario y la excreción de sodio y potasio en ratas preñadas con tratadas con L-NAME**

En la figura 41 se muestra el efecto del tempol sobre el volumen urinario en ratas preñadas controles y tratadas durante 7 días con L-NAME 50 mg/Kg/días. Como se observa, el L-NAME redujo significativamente el volumen urinario y el tratamiento con Tempol previno dicha reducción (C:  $6,19 \pm 0,6164$ ; L-NAME:  $3,52 \pm 0,70$ ; Tempol:  $5,83 \pm 0,36$  y L-NAME+Tempol:  $4,69 \pm 0,62$  en mL/24h/100 g p.c.).

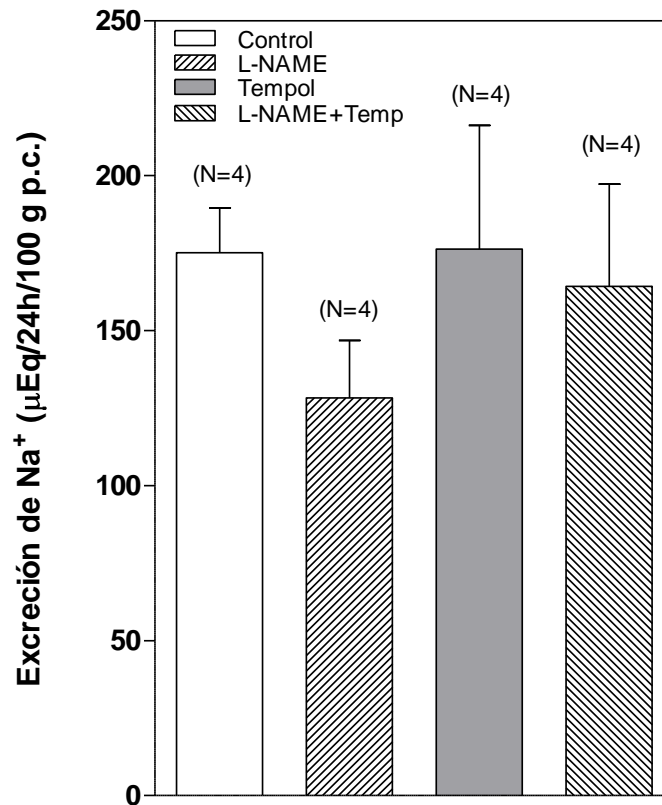


**FIGURA 40. MICROGRAFÍA DE UN CORTE DE CORTEZA RENAL DE RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE L-NAME PRETRATADAS CON TEMPOL. Riñón de ratas preñadas tratadas con vehículo:** tumefacción turbia. Edema glomerular. **Riñón de ratas tratadas con L-NAME:** tumefacción turbia del epitelio tubular, focos hemorrágicos, congestión de los capilares glomerulares; **Riñón de ratas tratadas con Tempol:** tumefacción turbia de epitelios tubulares, edema glomerular; **Riñón de ratas preñadas tratadas con Tempol+L-NAME:** tumefacción turbia del epitelio tubular, congestión de los capilares glomerulares, pequeños focos hemorrágicos. Tinción con eosina y hematoxilina.

En relación a la excreción de electrolitos, el tratamiento con L-NAME produjo una tendencia a la reducción, no significativa, de la excreción urinaria de sodio y potasio; el tempol previno dicha tendencia (C:  $175,138 \pm 14,51$  vs L-NAME:  $128,33 \pm 18,45$  en  $\mu\text{Eq}/24\text{h}/100$  g p.c.; Tempol:  $176,36 \pm 39,94$  vs L-NAME+Tempol:  $164,35 \pm 32,97$  en  $\mu\text{Eq}/24\text{h}/100$  g p.c.) (figuras 42 y 43).

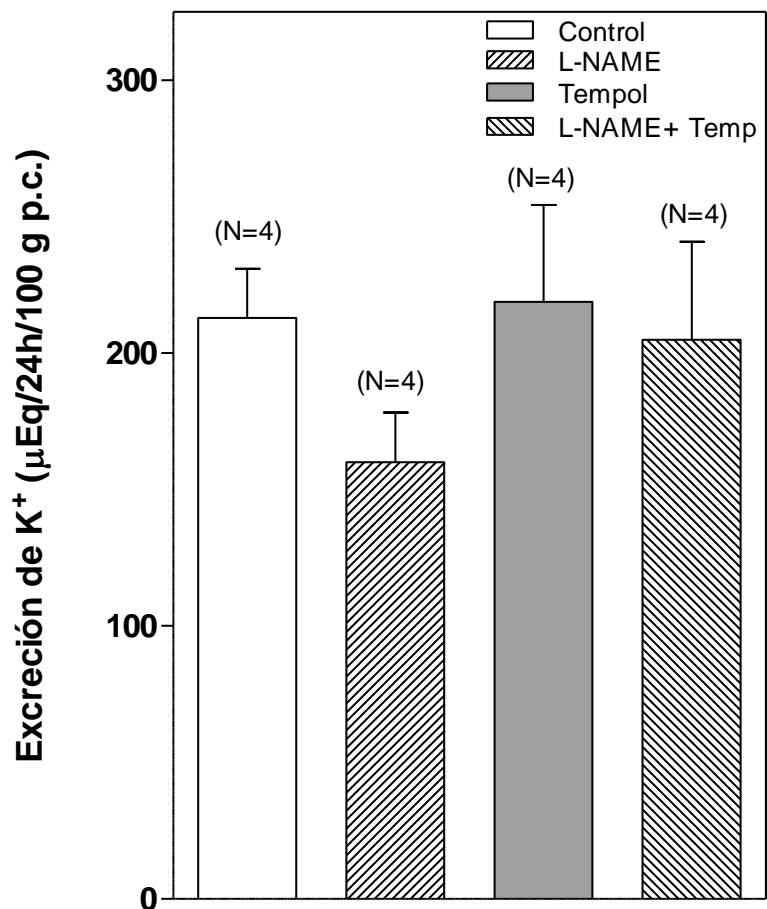


**FIGURA 41. EFECTO DEL TEMPOL (20 mg/kg/día) SOBRE EL VOLUMEN URINARIO EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días, Tempol 20 mg/Kg/día. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con ratas control. # $p < 0,05$  comparado con ratas tratadas con L-NAME.



**FIGURA 42. EFECTO DEL TEMPOL (20 mg/kg/día) SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA DE SODIO EN RATAS PREÑADAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 días. Tempol 20 mg/Kg/día. Los valores representan la media ± EEM.



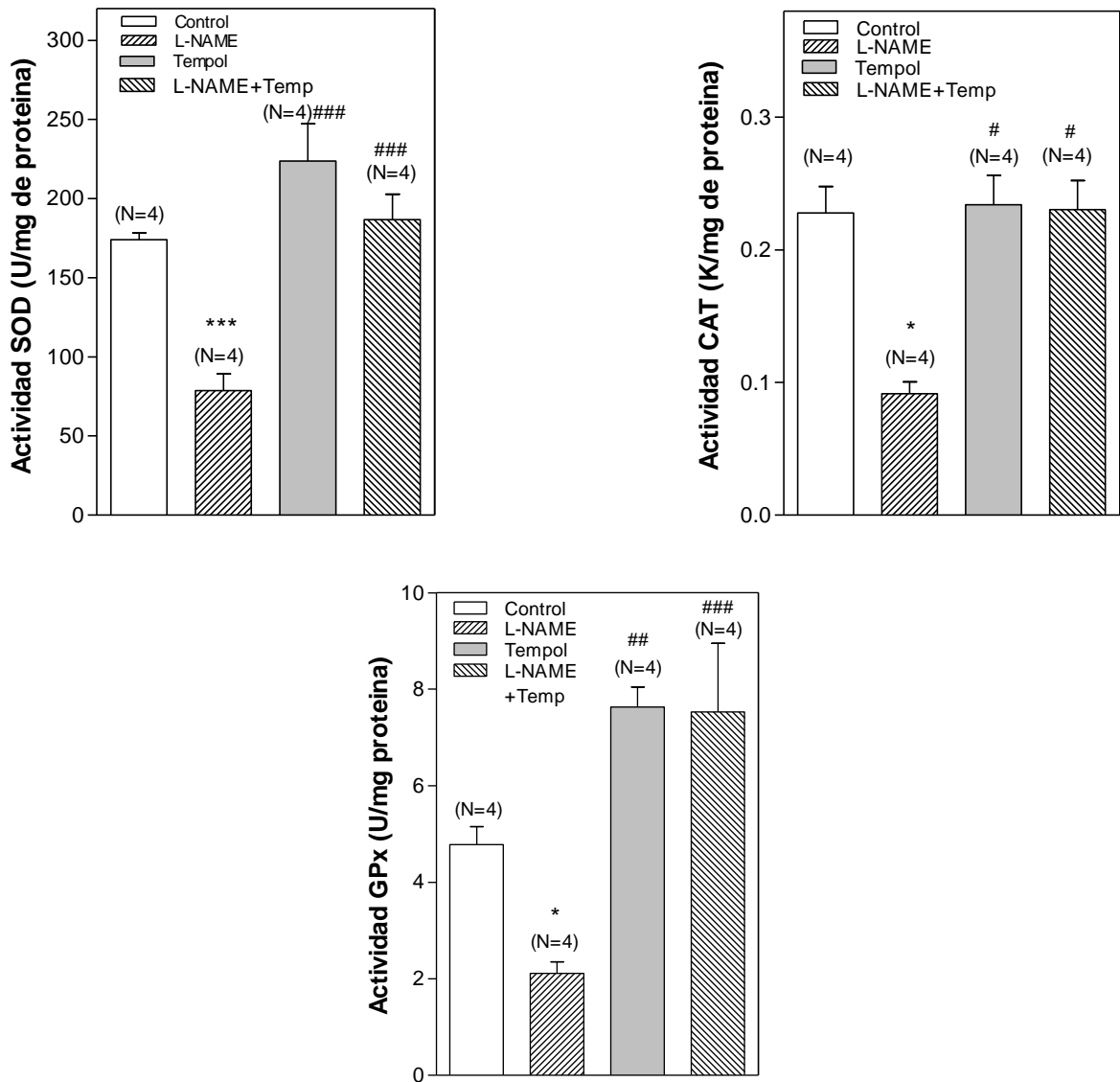


**FIGURA 43. EFECTO DEL TEMPOL (20 mg/Kg/día), SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA DE POTASIO EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. Tempol 20 mg/Kg/día. Los valores representan la media ± EEM.

### **Efecto del tempol sobre la actividad de las enzimas antioxidantes renales en ratas con preeclampsia experimental inducido por la administración de L-NAME**

En la figura 44, se muestra el efecto de la administración de tempol, un agente que mimetiza la acción de la enzima superóxido dismutasa, a la dosis de 20 mg/Kg/día sobre la actividad de las enzimas antioxidantes del tejido cortical renal de ratas preñadas controles y ratas preñadas tratadas con L-NAME. El tratamiento con L-NAME en las ratas preñadas redujo significativamente la actividad de las tres enzimas antioxidantes: catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (54,67; 59,87 y 55,85 % de reducción, respectivamente).

El tratamiento con Tempol no alteró, por si mismo, los valores basales de actividad de las tres enzimas antioxidantes, pero fue capaz de prevenir completamente la reducción inducida por L-NAME en la actividad de estas tres enzimas. Los valores obtenidos fueron: para la enzima superóxido dismutasa renal, C:  $174,03 \pm 4,19$  vs L-NAME:  $78,88 \pm 10,47$ ; Tempol:  $223,59 \pm 23,72$  vs L-NAME+Tempol:  $186,72 \pm 16,05$  en U/mg de proteínas; para la catalasa renal, C:  $0,2278 \pm 0,030$  vs. L-NAME:  $0,0914 \pm 0,001$ ; Tempol:  $0,2340 \pm 0,04$  vs L-NAME+Tempol:  $0,2304 \pm 0,04$ ; K/mg de proteína, y para la glutatión peroxidasa renal, C:  $4,78 \pm 0,37$  vs L-NAME:  $2,11 \pm 0,24$ ; Tempol:  $7,63 \pm 0,42$  vs L-NAME+Tempol:  $7,53 \pm 1,42$  U/mg proteína.



**FIGURA 44. EFECTO DEL TEMPOL (20 mg/kg/día) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES RENALES: SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD), CATALASA (CAT) Y GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx) EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días, Tempol 20 mg/Kg/día. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  comparado con ratas preñadas controles, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  Y ### $p < 0,001$  comparado con las ratas preñadas tratadas con L-NAME.

### **Efecto de la apocinina sobre la Morfometría fetal**

Aún, cuando se observó que no hubo variaciones en el número de fetos vivos posterior al tratamiento con L-NAME en las ratas preñadas cuando se compara con las ratas preñadas controles, sin embargo se observó una disminución significativa del peso fetal asociada a la presencia de reabsorción fetal. El tratamiento con apocinina, no alteró los parámetros evaluados; sin embargo, redujo la reabsorción fetal (Tabla V).

**TABLA V. MORFOMETRÍA FETAL DURANTE EL TRATAMIENTO CON APOCININA**

	<b>CONTROL</b>	<b>L-NAME</b>	<b>APOCININA</b>	<b>L-NAME + APOCININA</b>
<b>NUMERO DE FETOS VIVOS</b>	10,5 ± 0,5	10,65 ± 0,5	10,75± 1,02	11,0 ± 0,9
<b>PESOS /No. DE FETOS VIVOS(g)</b>	2,64 ± 0,2	2,0 ± 0,05**	2,88 ± 0,12	1,98±0,08 <sup>##</sup>
<b>NUMERO DE FETOS REABSORBIDOS</b>	0	1,66±0,33***	0	0,55±0,28

\*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 comparado con el control. <sup>##</sup>p<0,01 comparado con APO. N= 4 por grupo.

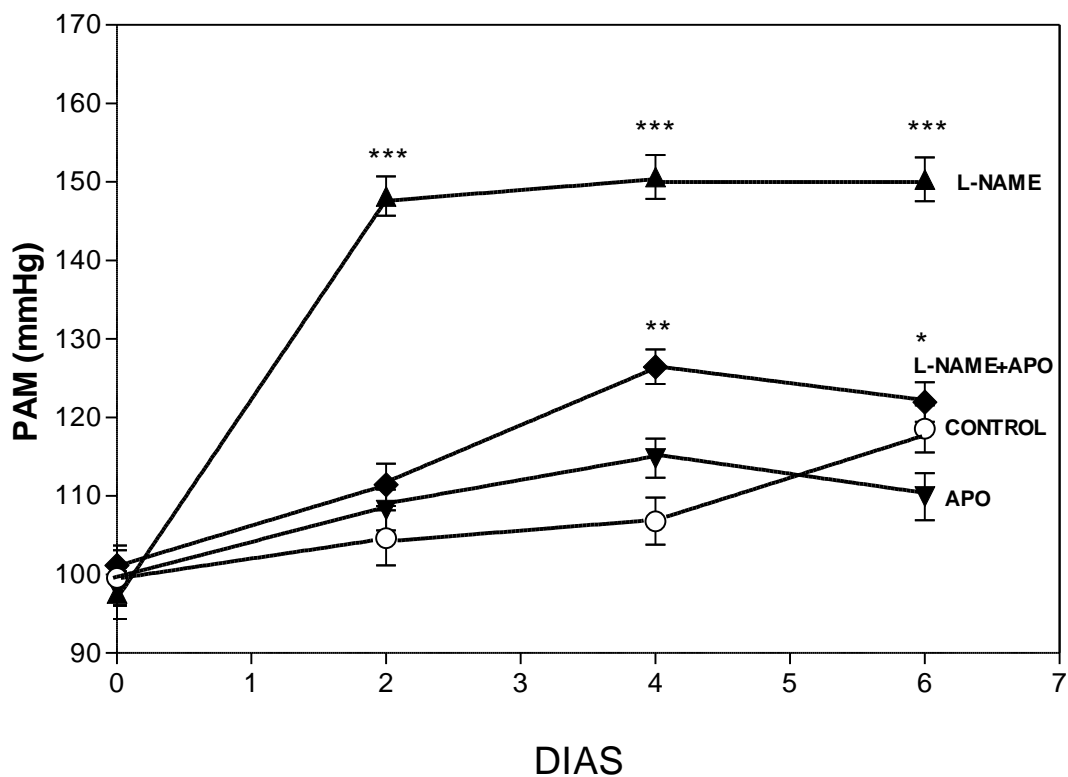
### **Efecto de la apocinina sobre los cambios en la presión arterial media y en la excreción urinaria de proteínas en ratas preñadas tratadas con L-NAME.**

El tratamiento a ratas preñadas con L-NAME durante 7 días consecutivos, incrementó la presión arterial media cuando se compara con las ratas preñadas controles. Los valores promedios de la PAM fueron: ratas preñadas controles: 107,41 ± 3,2 mmHg vs. L-NAME: 149,7 ± 3 mmHg (p<0,001).El

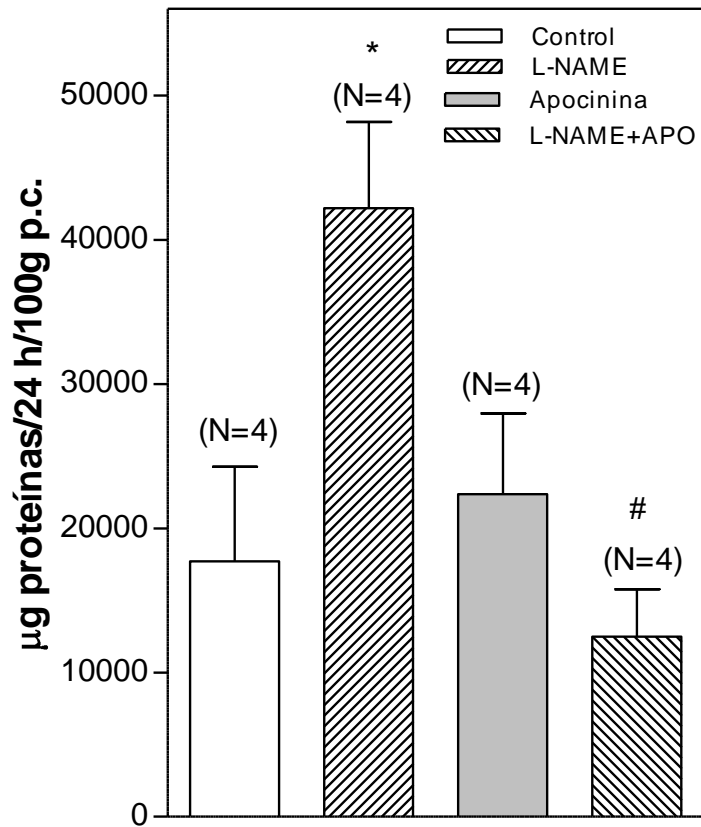
tratamiento de las ratas preñadas con apocinina, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa a la dosis de 33 µg/Kg/día, por si mismo no alteró el curso temporal de la presión arterial media; sin embargo, previno parcialmente el incremento de la PAM inducida por la inhibición de la síntesis del óxido nítrico en las ratas preñadas (figura 45).

Por otra parte, al cuantificar el efecto de la apocinina sobre el incremento de las proteínas totales excretadas en orina durante 24 horas en ratas preñadas tratadas con L-NAME, se observó que el tratamiento con L-NAME produjo un incremento significativo de las proteínas totales urinarias y el tratamiento con apocinina previno el incremento de la excreción urinaria de proteínas inducido por el L-NAME.

En el mismo orden, la APO por si misma, no afectó los niveles basales de excreción urinaria de proteínas (C: 17697,17 ± 6576 vs L-NAME 42185,31 ± 6003,4 y APO: 22373,28 ± 5603,6 vs. L-NAME+APO: 12495,75 ± 3266,4 µg proteínas/24 h/100 g p.c.) (figura 46).



**FIGURA 45. CURSO TEMPORAL DEL EFECTO DE LA APOCININA (33  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ ), SOBRE EL INCREMENTO DE LA PRESIÓN ARTERIAL INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME EN RATAS PREÑADAS.** (○) el grupo Control (NaCl 0,9% i.p.), (▲) nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 50 mg/Kg/día, (▼) Apocinina: 33  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$  y (◆) L-NAME+APO. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de N= 4 por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con ratas control, APO y L-NAME+APO; \*\* $p < 0,01$  comparado con ratas tratadas con APO y \* $p < 0,05$  comparado con ratas tratadas con APO.



**FIGURA 46. EFECTO DE LA APOCININA (33 µg/Kg/día) SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA DE PROTEÍNAS EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días, apocinina 33 µg/Kg/día. Los valores representan la media ± EEM. \*p<0,05 comparado con ratas preñadas control. #p<0,05 comparado con ratas preñadas tratadas con L-NAME.

### **Efecto de la apocinina sobre las alteraciones microscópicas observadas en ratas preñadas tratadas con L- NAME.**

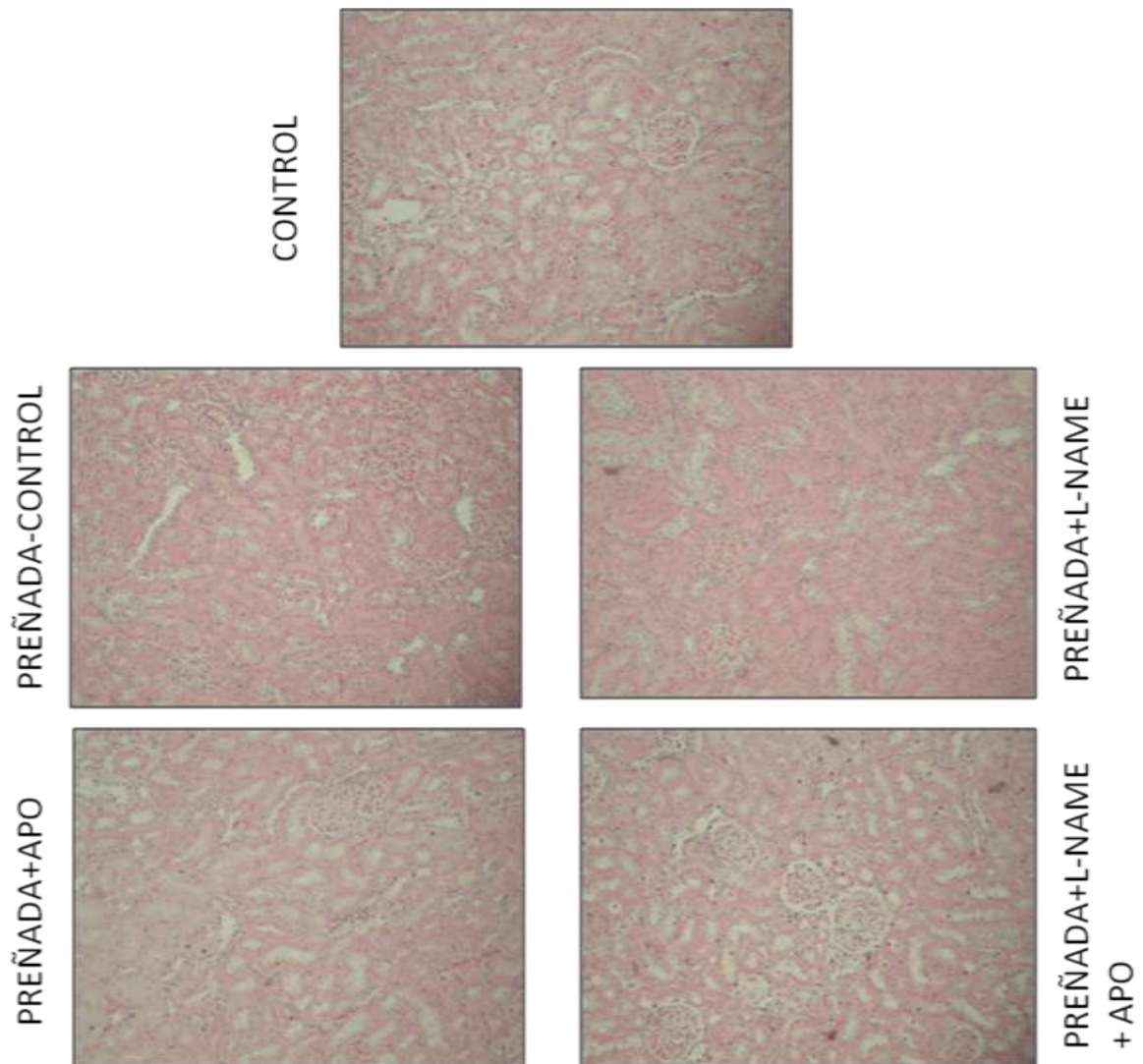
El tratamiento a ratas preñadas con apocinina (33 µg/kg/día) durante 7 días consecutivos revirtió el efecto del L-NAME en las alteraciones renales observadas por microscopía óptica. Efectivamente, la observación al microscopio de luz (figura 47) ilustra que el riñón de la rata control no preñada no muestra lesiones, mientras que los riñones provenientes de las ratas preñadas sin tratamiento presentan tumefacción turbia y edema glomerular leve; por su parte, el riñón proveniente de las ratas preñadas y tratadas con L-NAME presenta tumefacción turbia de las células epiteliales de los túbulos renales y congestión leve de los glomérulos. Los riñones provenientes de animales tratados con apocinina muestran tumefacción turbia de epitelios tubulares y edema glomerular leve. El tratamiento simultáneo con L-NAME y apocinina muestra riñones con tumefacción turbia del epitelio tubular y edema muy leve.

### **Efecto de la apocinina sobre el volumen urinario, y la excreción urinaria de sodio y potasio en ratas preñadas tratadas con L-NAME**

En la figura 48, se muestra el efecto de la Apocinina 33µg/Kg/día durante 7 días consecutivos, sobre el volumen urinario en ratas preñadas controles y tratadas durante 7 días con L-NAME 50 mg/Kg/día i.p. Como se observa, el tratamiento con apocinina redujo significativamente el volumen urinario y el tratamiento con apocinina revirtió el efecto reductor del volumen urinario

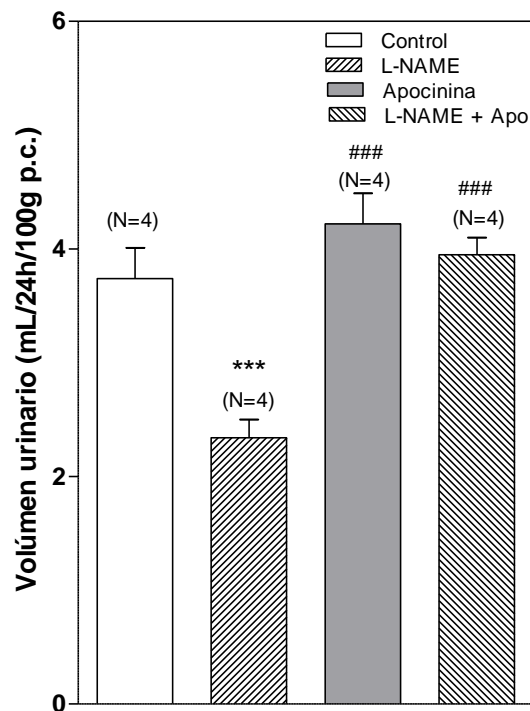


inducido por L-NAME (C:  $3,74 \pm 0,27$  vs L-NAME:  $2,34 \pm 0,16$  y APO:  $4,22 \pm 0,27$  vs. L-NAME+ APO:  $3,95 \pm 0,15$  mL).

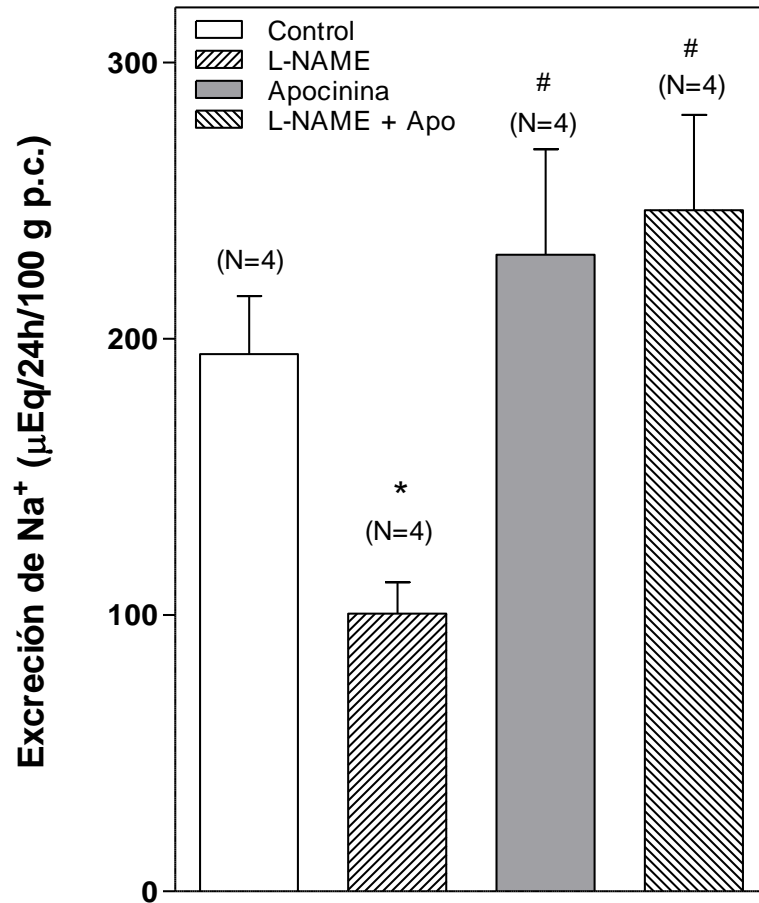


**FIGURA 47. MICROGRAFÍA DE UN CORTE DE CORTEZA RENAL DE RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE L-NAME PRETRATADAS CON APOCININA. RIÑÓN DE RATAS NO PREÑADAS (CONTROL). RIÑÓN DE RATA PREÑADA CONTROL: tumefacción turbia. Edema glomerular leve. RIÑÓN DE RATA PREÑADA+L-NAME: tumefacción turbia de epitelios tubulares y congestión de capilares glomerulares; RIÑÓN DE RATA PREÑADA+APO: tumefacción turbia de epitelios tubulares, congestión leve de los glomérulos. RIÑÓN DE RATA PREÑADA+L-NAME+APO: tumefacción turbia de epitelios tubulares, congestión muy leve de glomérulos. Tinción con eosina y hematoxilina. Se muestra una sección de riñón típica por grupo experimental.**

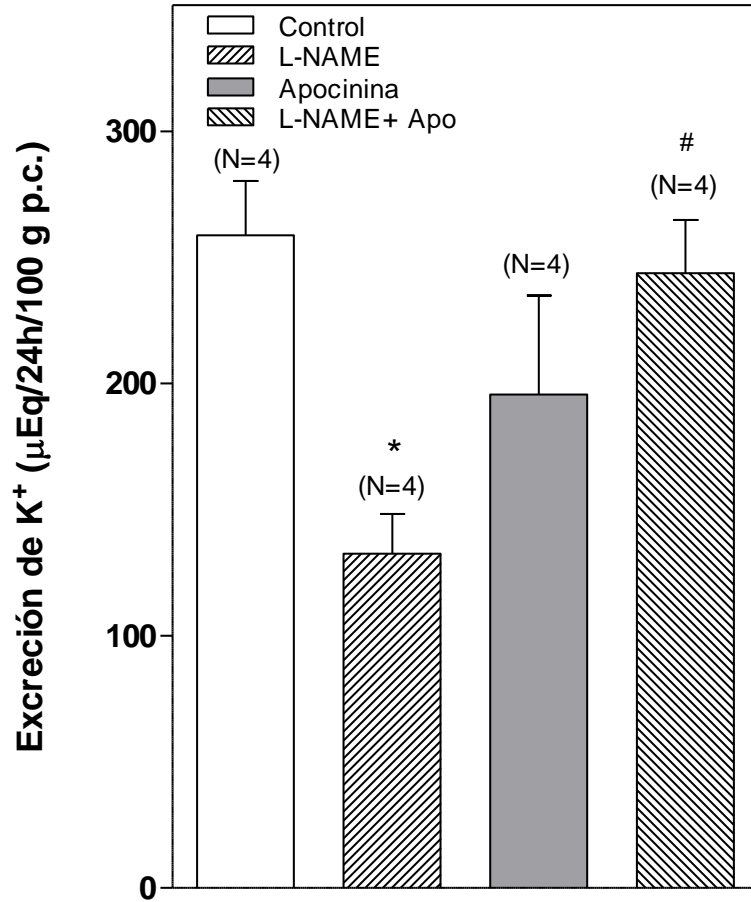
En relación a la excreción de electrolitos, el tratamiento con L-NAME redujo significativamente la excreción urinaria de sodio y potasio. La apocinina no alteró la excreción urinaria de sodio y potasio basal, pero logró prevenir la reducción de la excreción urinaria de sodio y potasio inducida por el L-NAME (Sodio en  $\mu\text{Eq}/24\text{h}/100\text{ g p.c.}$ , C:  $194,55 \pm 21,065$  vs L-NAME:  $100,62 \pm 11,34$ , Sodio en  $\mu\text{Eq}/\text{mL}$ , APO:  $230,48 \pm 38,27$  vs L-NAME+APO:  $246,62 \pm 34,54$ . Potasio en  $\mu\text{Eq}/24\text{h}/100\text{ g p.c.}$ , C:  $258,73 \pm 21,68$  vs. L-NAME:  $132,58 \pm 15,66$ ; APO:  $195,72 \pm 39,22$  vs L-NAME+APO:  $243,82 \pm 21,04$ ) (figuras 49 y 50).



**FIGURA 48. EFECTO DE LA APOCININA (33  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ ) SOBRE EL VOLÚMEN URINARIO EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días, apocinina 33  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ . Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el grupo control. ### $p < 0,001$  comparado con el grupo tratado con L-NAME.



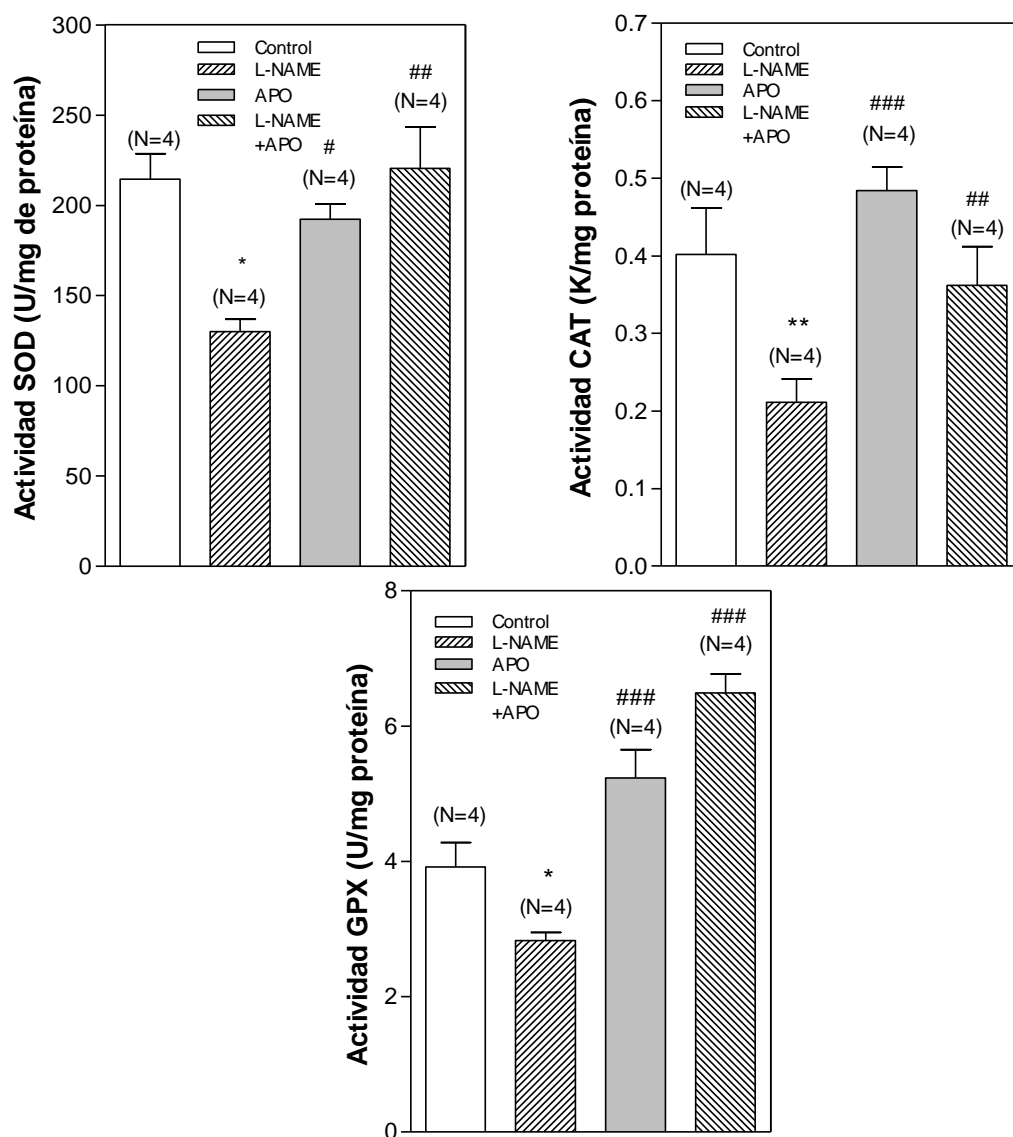
**FIGURA 49. EFECTO DE LA APOCININA (33 μg/Kg/día) SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA DE SODIO EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días, Apocinina 33 μg/Kg/día. Los valores representan la media ± EEM. \*p<0,05 comparado con ratas preñadas control. #p<0,05 comparado con ratas preñadas tratadas con L-NAME.



**FIGURA 50. EFECTO DE LA APOCININA SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA DE POTASIO EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON L-NAME.** Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días, Apocinina 33 µg/Kg/día. Los valores representan la media ± EEM. \*p<0,05 comparado con ratas preñadas control. #p<0,05 comparado con ratas preñadas tratadas con L-NAME.

### **Efecto la apocinina sobre la actividad de las enzimas antioxidantes renales en ratas con preeclampsia experimental inducida con L-NAME**

En la figura 51, se muestra el efecto de la administración de la apocinina a la dosis de 33 µg/Kg/día sobre la actividad de las enzimas antioxidantes del tejido cortical renal de ratas preñadas controles y ratas preñadas tratadas con L-NAME. El tratamiento con L-NAME en las ratas preñadas induce a una reducción significativa de la actividad renal de las tres enzimas antioxidantes, catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. El tratamiento con apocinina revirtió la reducción de la actividad de las tres enzimas antioxidantes inducida por el tratamiento con L-NAME. Así, los valores fueron; para la SOD en U/mg de proteínas: C:  $214,66 \pm 13,85$  vs L-NAME:  $130,08 \pm 6,77$ ; APO:  $192,20 \pm 8,58$  vs L-NAME+APO:  $220,40 \pm 22,96$ ); para la CAT en K/mg de proteínas: C:  $0,4020 \pm 0,004$  vs L-NAME:  $0,212 \pm 0,03$ ; APO:  $0,4842 \pm 0,03$  vs L-NAME+APO:  $0,362 \pm 0,1$ ) y GPx en de U/mg de proteína: C:  $3,92 \pm 0,36$  L-NAME:  $2,83 \pm 0,12$ , APO:  $5,23 \pm 0,42$  vs L-NAME+APO:  $6,4 \pm 0,28$ ).



**FIGURA 51. EFECTO DE LA APOCININA (APO) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES RENALES: SUPERÓXIDO DISMUTASA, CATALASA Y GLUTATIÓN PEROXIDASA, EN RATAS CON PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE L-NAME.** Control (NaCl 0.9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días, Apocinina 33 µg/Kg/día. Los valores representan la media ± EEM. \* $p < 0,05$  comparado con ratas preñadas control. \*\* $p < 0,01$  comparado con ratas preñadas control. ### $p < 0,001$  comparado con ratas preñadas tratadas con L-NAME. ## $p < 0,01$  comparado con ratas preñadas tratadas con L-NAME. # $p < 0,05$  comparado con ratas preñadas tratadas con L-NAME.

## DISCUSION

En la actualidad se desconoce con exactitud la etiología de la preeclampsia, pero la evidencia de los últimos años apunta hacia nuevos mecanismos potenciales que posiblemente media la patogénesis de la hipertensión durante la PE. Aún cuando se han implicado factores genéticos, inmunológicos y ambientales, el enfoque reciente establece una clara relación entre la disfunción endotelial y la hipertensión inducida por el embarazo (Roberts y col., 2003; Granger y col., 2001). Se ha propuesto que el proceso fisiopatológico que subyace en la PE ocurre en dos estadios: el primero la reducción de la perfusión de la placenta y el segundo en los síndromes clínicos maternos (Roberts y col., 2003; Roberts y col., 2005). La isquemia/hipoxia de la placenta, a su vez, resulta en la liberación de una variedad de factores que ejercen efectos profundos sobre el flujo sanguíneo y la regulación de la presión arterial (Roberts y col., 2003; Roberts y col., 2005; Granger y col., 2001; Granger y col., 2002). Estos factores incluyen la liberación de un conjunto de moléculas como el receptor-1 soluble de VEGF (sFlt-1), el auto-anticuerpo del receptor AT<sub>1</sub> de la angiotensina (AT1-AA) y, citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) el cual, a su vez, genera una disfunción endotelial generalizada en la madre (Roberts y col., 2003; Granger y col., 2002). Esta disfunción, a su vez, se manifiesta a través del incremento en la formación de factores circulantes como la endotelina, las especies reactivas de oxígeno (EROs), el tromboxano, el ácido 20-hidroxi-eicosatetraenóico (20-HETE), y un aumento de la sensibilidad vascular a la

ANG II (Roberts y col., 2003; Granger y col., 2002). Más aún, la PE se asocia con una reducción de la formación de vasodilatadores como el óxido nítrico y la prostaciclina (Roberts y col., 2003; Granger y col., 2002). Todas estas alteraciones vasculares no solo llevan a la hipertensión, sino a la disfunción de múltiples órganos, entre ellos el riñón (Roberts y col., 2003, Roberts y col., 2005, Granger y col., 2002).

El pretérmino inducido por la PE constituye, aún en el presente, una de las causas principales de la muerte materna y de la morbilidad perinatal. Recientemente se ha reconocido que la mujer que ha sufrido PE presenta un mayor riesgo cardiovascular durante su vida. Es por ello que resulta de suma importancia establecer la posible conexión entre la isquemia/hipoxia placentaria y las anormalidades cardiovasculares y renales (Roberts y col., 2003; Granger y col., 2001; Granger y col., 2002; Irgens y col., 2001). Por ésta razón, pensamos que es imperativo el desarrollo de un modelo experimental que pueda mimetizar los signos clínicos que ocurren en la PE.

Se han hecho numerosos intentos para mimetizar o inducir preeclampsia en diferentes animales incluyendo primates no-humanos. No obstante, un modelo animal ideal de hipertensión inducida por embarazo debe tomar con cautela aspectos tales como: la accesibilidad al uso de animales pequeños, la confiabilidad, la reproducibilidad y la capacidad de predecir las propiedades potenciales de un posible agente antihipertensivo (Badyal y col., 2003). Así, se han descrito varios modelos experimentales con aproximaciones diferentes, los



cuales mimetizan parcialmente los signos de la PE. Fundamentado en el concepto que la ingestión crónica de un exceso de sal produce hipertensión en la rata, la cual mimetiza la hipertensión morfológica humana, Badyal y col., (2003) establecieron un modelo de hipertensión inducida por el embarazo, la cual es producida por la ingestión de NaCl al 1-2 % durante la gestación (Badyal y col., 2003). Un modelo similar es en el que la hipertensión se induce mediante la administración conjunta de NaCl al 2% el agua y la inyección de un mineralocorticoide (DOCA-SAL). En este modelo el incremento de la presión arterial se asocia con un incremento de la secreción de vasopresina, hiperactividad simpática y del SRA, retención de agua y vasoconstricción generalizada (Badyal y col., 2003).

Por otro lado, basados en el concepto que la PE se debe a un defecto primario debido a la isquemia uteroplacentaria, Ogden y col., (1940) desarrollaron un modelo de preeclampsia en perros anestesiados mediante la inducción de isquemia uteroplacentaria, por reducción del flujo sanguíneo mediante la oclusión de la arteria aorta abdominal, esto produce la reducción aguda de 50% de la presión de perfusión placentaria (Woods y Brooks 1989), ratas (Clark y col., 1982). Este modelo también fue usado en conejos (Losonczy, 1992) y en monos Rhesus (Combs y col., 1993). El modelo incluye signos tales como: isquemia placentaria y necrosis, retardo en el crecimiento fetal (Alexander y col., 2001), cambios histológicos uteroplacentarios muy similares a la preeclampsia humana, e inclusive, muerte intrauterina en algunas especies e hipertensión (Woods y Brooks, 1989; Alexander y col, 2001).

Ahora bien, debido a que la enfermedad renal es un factor de riesgo para la PE, Podjarny y col., (2004) diseñaron un modelo de PE donde superponen la nefropatía inducida por la administración intravenosa de adriamicina con el embarazo en ratas. Así, se genera un modelo similar a la preeclampsia el cual se acompaña con hipertensión, proteinuria severa, y una disminución relativa de la filtración glomerular renal, así como de un aumento glomerular de la relación entre tromboxano B2/prostaglandina E2, similar a lo observado en la hipertensión inducida por el embarazo humano. Este modelo de PE experimental es útil para el estudio del deterioro irreversible que cursa en la función renal durante la PE. Por otra parte, Carlström y col., (2009), mediante el uso de un inhibidor de la angiogénesis, la suramina, desarrollaron un modelo experimental de PE en donde se genera un defecto en la placentación, además de la disfunción endotelial aparentemente relacionado con la liberación de mediadores inflamatorios en las ratas preñadas. En este modelo se demostró que la inhibición de la angiogénesis uterina incrementa la PA materna y compromete el desarrollo fetal y placentario, incrementa los niveles de renina y reduce de los niveles de sFlt-1, lo que indica que la hipoxia placentaria y la subsecuente activación del SRA juegan un papel primordial en la hipertensión.

Se han desarrollado numerosos modelos de PE basados en la estimulación simpática inducidos por condiciones del estrés ambiental, físico y mental, así como cambios en la postura y en los niveles de insulina (Seely y Salomon, 2003). Así, animales preñados que son sometido a estrés crónico inducido por

ruido intermitente, la superpoblación en la jaula, prueba al frío, que causan aumento en los niveles de las catecolaminas circulantes, de la presión sanguínea y que algunas veces se asocia con disminución de la invasión del trofoblasto y la presencia de congestión y depósitos fibrinoides en la placenta (Schobel y col., 1996).

El embarazo normal se caracteriza por un estado inflamatorio activado por los desechos placentarios y en donde la PE constituye la situación extrema en la que las citoquinas inflamatorias y los marcadores de estrés oxidativo (peroxinitrito y nitrotirosina) se encuentran incrementados. Basados en este concepto y mediante la administración de una dosis ultra-baja lipopolisacáridos en ratones preñados, que produce el desvío de la activación de citoquinas antiinflamatoria hacia las pro-inflamatorias, se induce hipertensión, proteinuria, y trombosis glomerular, bajo conteo plaquetario y una reducción de la invasión trofoblástica. Aún más, en ratas la administración crónica del factor de necrosis tumoral alfa, se traduce en una reducción de la enzima óxido nítrico sintasa amplificando la reactividad vascular. También el factor de necrosis tumoral alfa se correlaciona con incrementos en la resistencia a la insulina, sugiriendo que la inflamación y la resistencia a la insulina, podrían actuar sinérgicamente en los daños observados en la PE (Podjarny y col., 2004).

Recientemente se ha podido establecer un modelo de PE genética espontánea en ratón que resulta del apareamiento del ratón de la cepa BPH5 genéticamente “borderline” hipertensa con el ratón normotenso C57BL/6

(Davisson y col., 2002). El ratón hembra BPH5 preñada después de su apareamiento, presenta un cuadro similar a la PE que cursa con un incremento constante de la PA, asociado con proteinuria gestacional, glomeruloesclerosis progresiva y fetos significativamente menores. Este modelo ha sido propuesto como el modelo animal que espontáneamente desarrolla un síndrome semejante a la PE que podría tener un impacto en la comprensión de la fisiopatología de este desorden (Davisson y col., 2002).

Ahora bien, debido a la fuerte evidencia que indica el papel primordial del NO y su desregulación en la PE en el presente trabajo se caracterizó un modelo experimental que resulta de la inhibición crónica de la síntesis de NO mediante la administración de L-NAME a ratas preñadas. Efectivamente, el NO, es un potente vasodilatador liberado por las células endoteliales, que inhibe la agregación plaquetaria y adhesión al endotelio y, está involucrado en el control de la presión arterial (Lyall y col., 1996). El NO es producido en la circulación feto-placentaria y contribuye al control del tono vascular y atenua las acciones de los vasoconstrictores (Myatt y col., 1992; Lyall y col., 1996). La NO sintasa de la vasculatura vellosa placentaria corresponde a la isoforma endotelial tipo III dependiente calcio-calmodulina (Myatt y col., 1992), y está presente en las venas y arterias umbilicales, arterias y venas coriónicas, y del sinciciotrofoblasto.

La patogénesis de la PE, se asocia con hipertensión, proteinuria y edema, factores que reflejan una vasoconstricción generalizada, como resultado de una función endotelial anormal. Existe evidencia que en el endotelio vascular

se produce un gran número de agentes vasoactivos que regulan el tono vascular. Entre estos factores se encuentran el NO y las prostaciclinas. De manera que, un desbalance entre factores vasorelajantes y vasoconstrictores, a favor de los últimos, afecta significativamente la presión arterial sanguínea.

Actualmente no existen dudas que el incremento de la producción de NO en el endotelio vascular y su bioactividad normal constituyen mecanismos críticos que explican la adaptación hemodinámica en el embarazo normal (López-Jaramillo y col., 2008).

La característica más importante observada en la PE es la vasoconstricción generalizada. Debido a ello, se ha propuesto la existencia de una alteración endotelial en la síntesis de NO. Por otra parte, debido a la alta reactividad del NO en transformarse en nitratos y nitritos, se postula que posiblemente exista una baja bioactividad del mismo. Debido a ello, muchos investigadores han realizado estudios clínicos en mujeres embarazadas con PE versus mujeres embarazadas controles, para evaluar la concentración plasmática y sérica de nitratos y nitritos. Los hallazgos, aún cuando son controversiales, demuestran definitivamente que durante la PE ocurre una disminución de la concentración de nitratos y nitritos, asociada a disminución de los niveles de GMPc, cuando se compara con pacientes controles. Esto indica una disminución de la biodisponibilidad del NO, posiblemente mediado por un incremento del estrés oxidativo y que explicaría la vasoconstricción periférica, la disfunción endotelial y las manifestaciones clínicas de la enfermedad (López-Jaramillo y col., 2008).

La baja producción de nitratos y nitritos en la preeclampsia han sido adjudicadas a la alteración en diferentes niveles de la vía de la L-arginina-NO. Entre dichas alteraciones se han sugerido las que se enumeran a continuación:

1. deficiencia en el sustrato de L-arginina o su transporte (McCord y col., 2006; Neri y col., 2006); la depleción de L-arginina causada por la sobre-expresión de arginasa II, la enzima que metaboliza a la L-arginina, que puede desviar a la sintasa del óxido nítrico a generar EROs (López-Jaramillo y col., 2008; Buhimschi y col., 1998).
2. Reducción de la producción de NO por deficiencia en los cofactores requeridos para el buen funcionamiento de la SONE, como lo son el ión calcio (López-Jaramillo, 2008) y la BH4 (Tóth, 2002).
3. La acumulación de un inhibidor endógeno de la SON, como lo es la dimetil-arginina asimétrica (ADMA), que se encuentra en concentraciones elevadas en preeclampsia (LaMarca y col., 2008; LaMarca y col, 2009) y finalmente
4. La alteración polimórfica de la SONE que resulta de la disminución de la actividad enzimática (Serrano y col., 2004).

Si bien se ha reportado datos controversiales de mujeres con PE que muestran más bien un aumento de la producción de NO y niveles de nitritos y nitratos incrementados o normales, se ha postulado que los mismos se deben a aumentos en la degradación del NO, pero con una bioactividad reducida. Se ha sugerido que el incremento del estrés oxidativo que ocurre en la PE es el responsable de la rápida degradación del NO, especialmente debido a la gran reactividad del NO y el anión superóxido para formar peroxinitrito.

Los resultados del presente trabajo están en concordancia con la evidencia acerca de un modelo experimental de PE que resulta de la inhibición crónica

de la síntesis de NO mediante la administración de L-NAME a ratas preñadas y ratifican el papel primordial del NO y su desregulación en la PE. En efecto, se demostró que el tratamiento crónico con L-NAME, produjo un incremento significativo de la PA que se asocia a cambios fisiológicos como la potenciación de las respuestas presoras a la angiotensina II, la vasopresina y la noradrenalina, proteinuria e incremento de la agregación plaquetaria, similar a los cambios que ocurren en la preeclampsia humana (Molnar y Hertelendy, 1992).

Nuestros resultados apoyan este concepto ya que la PE inducida por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico, mostró una disminución significativa de la actividad de la SON renal, de la producción de GMPc urinario y de la excreción urinaria de sodio en ratas preñadas la cual estuvo asociada a la disfunción endotelial en el riñón. Esto se manifestó por una proteinuria significativa, así como por evidencia morfológica 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 los capilares glomerulares, posibles responsables de las alteraciones de la función renal. Al respecto, se ha demostrado que en el embarazo normal aumenta la tasa de filtración glomerular (TFG) de un 40 a un 60%; además, se presenta hiperfiltración que incrementa el flujo plasmático renal (FPR) de un 50-85% atribuible a una profunda reducción de la resistencia arteriolar eferente y aferente.

Se sabe que las hormonas ováricas como el estrógeno ejerce una pequeña influencia sobre el flujo plasmático renal y sobre la tasa de filtración glomerular, mientras que la progesterona incrementa el flujo plasmático renal y la tasa de filtración glomerular. Además de otras hormonas como la relaxina, que incrementa la conversión de la endotelina grande a endotelina-1, y con ello al interactuar con el receptor ET<sub>B</sub>, permite la vasodilatación renal mediante la producción de óxido nítrico (Hubel, 1999; Merviel y col., 2004). Se ha demostrado que el óxido nítrico media la vasodilatación renal, la hiperfiltración renal e inhibe la reactividad miogénica en las arterias renales observadas en las ratas preñadas (Kassab y col, 1998).

Por el contrario, se ha demostrado que en la PE las alteraciones funcionales a nivel renal incluyen disminución del flujo plasmático renal (FPR) como consecuencia del incremento de la resistencia arteriolar aferente y/o reducción en el coeficiente de ultrafiltración. Esta reducción en el FPR, permite una disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG), y contribuye a la disminución del volumen plasmático, lo cual favorece a un incremento en la reabsorción tubular proximal acoplada al sodio. Todo ello lleva al incremento de la excreción de proteínas urinarias en PE, la cual resulta de alteración secundaria del tamaño y/o selectividad de la carga en el filtrado glomerular, que posiblemente incrementa la presión capilar, y con ello compromete la reabsorción tubular, generando proteinuria aún en rango nefrótico (Moran y col., 2003; Jeyabalan y Conrad, 2007).



Al respecto, nuestros resultados revelan la disfunción renal al observarse que la administración crónica de L-NAME durante 7 días consecutivos, genera una prominente excreción urinaria de proteínas totales, asociada a una reducción significativa en la excreción urinaria de sodio y creatinina, acompañada de un incremento de la creatinina plasmática.

Otro hallazgo significativo en este estudio fue la observación de la reproducción de los signos clásicos de la PE en ratas. En efecto, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con L-NAME en las ratas preñadas disminuyó el peso y el crecimiento fetal, e incrementó la reabsorción fetal en forma significativa, signos que probablemente son debidos a la vasoconstricción y a la isquemia de la unidad feto-placentaria descrita en la preeclampsia. De manera que, los signos observados en este modelo por la privación de óxido nítrico en las ratas preñadas podría apoyar aún más su similitud a la preeclampsia desarrollada en humanos (Pandhi y col., 2001). Igualmente en ratas hembras *Sprague-Dawley* preñadas el tratamiento con L-NAME produjo una reducción significativa del número de plaquetas por centímetro cúbico con respecto al grupo control de ratas preñadas, lo cual demuestra la existencia de una tendencia a la trombocitopenia, y sugiere una activación o consumo de plaquetas por deposición de la fibrina mesangial, proteinuria, necrosis placentaria, lo cual ha sido descrito en la PE (Podjarny y col., 2004).

La asociación entre la disfunción renal y la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico se ratifica en este modelo experimental por el hallazgo de la reducción significativa de la actividad de la SON renal y de la excreción urinaria de GMPc descrita en nuestros experimentos. La SON se encuentra en abundancia en el riñón, el glomérulo, la vasculatura, así como en los túbulos renales donde participa en el control de la tasa de filtración, el flujo sanguíneo medular renal, la regulación del manejo de sodio, el transporte epitelial de sodio, y la producción de varios factores como la renina, entre otros (Zatz y Baylis, 1998). La reducción de la excreción urinaria del GMPc en ratas preñadas reportado en el presente estudio, confirma aún más, el bloqueo de la síntesis del NO y su asociación a la disfunción endotelial en el riñón, que se manifestó por la presencia de proteinuria, así como evidencia morfológica de endoteliosis glomerular, lo que confirma que la participación de la vía NO-GMP cíclico no solo afecta la respuesta de la relajación en el músculo liso vascular, sino también la regulación de la función renal (Munkhaugen y Egil, 2009, Alexander y col., 2001).

La actividad del sistema del NO también ha sido evaluada en otros modelos experimentales como el de isquemia placentaria y exceso de citoquinas. Así, la isquemia placentaria en ratas preñadas no afecta la excreción urinaria de nitratos y nitritos cuando se compara con las ratas controles (Alexander y col., 2001<sup>a</sup>; Alexander y col., 2004); sin embargo los anillos de aorta provenientes de ratas preñadas con isquemia placentaria mostraron una reducción significativa en la liberación basal y estimulada de NO (Crews y col., 2000), lo

que sugiere una desregulación vascular del sistema del NO. Adicionalmente, estudios de Orshal y Khalil (2004) demostraron una reducción en la relajación vascular mediada por NO en ratas preñadas infundidas con citoquinas inflamatorias como la interleuquina-6 (IL-6).

Lo interesante de nuestros hallazgos constituye el hecho, que los resultados obtenidos parecen ser específicos de una desregulación durante el la gestación, y no un efecto inespecífico del tratamiento con L-NAME (Buhimschi y col, 1998). Efectivamente, aún cuando el tratamiento con L-NAME en ratas no preñadas o preñadas induce un incremento de la presión arterial de similar magnitud, las alteraciones renales y de los marcadores circulantes resultan exclusivos del modelo experimental de PE. Así, observamos que asociado al incremento similar de la PAM ocurre un incremento de la excreción de proteínas totales en orina tanto en las ratas preñadas como en las no preñadas, sin embargo la magnitud de la proteinuria fue superior en las ratas preñadas que las no preñadas (Molnar y Hertelendy, 1992; Khalil y col., 1998). Este hecho ratifica la presencia de un trastorno de la función renal evidenciado por una disminución de la reabsorción de las proteínas a nivel glomerular que se acentúa de forma prominente en las ratas preñadas y que apoya el papel fundamental del NO en la regulación del flujo sanguíneo renal, la resistencia vascular renal, e inclusive en la tasa de filtración glomerular y la vasodilatación materna. Aún más, estas alteraciones observadas en nuestro trabajo demuestran que las ratas preñadas conscientes presentan una

alteración en la función renal comparable a los cambios observados en la mujer en estado de gravidez (Molnar y Hertelendy, 1992).

Otro hallazgo interesante es el hecho que aún cuando la reducción de la actividad de la SON renal y la excreción urinaria de GMPc inducida por el L-NAME fue similar entre ambos grupos experimentales (ratas preñadas y no preñadas). El hecho de observarse un incremento de los niveles basales del GMPc urinario en las ratas preñadas cuando se compara con las ratas no preñadas, apoya el concepto que el embarazo normal existe una adaptación hemodinámica y renal, relacionada con un incremento de la síntesis del NO, que permite disminuir la resistencia vascular periférica, así como regular la reactividad vascular. Igualmente se apoya el concepto que la deficiencia de la síntesis del NO contribuye a la vasoconstricción renal y con ello al aumento del tono vascular renal, así como en otros lechos vasculares en respuesta a un embarazo anormal, y su deficiencia contribuye a una vasoconstricción del riñón y otros lechos vasculares (corazón, pulmón, hígado, musculo esquelético, músculo liso entre otros) así como el desarrollo de la PE (Kassab y col., 1998; Danielson y Conrad, 1995). Al respecto, se ha reportado que la reactividad vascular en ratas preñadas tratadas con L-NAME es superior en las ratas no preñadas, lo cual sugiere que el L-NAME no sólo bloquea la síntesis de NO en las células endoteliales, sino que puede causar incremento en la sensibilidad a los compuestos vasoactivos que podrían incrementar la reactividad vascular contribuyendo aún más, a la disfunción endotelial manifestada en la PE (Khalil y col., 1998; Gilbert y col., 2008).

En relación a la especificidad de la acción del tratamiento con L-NAME como inductor de un modelo experimental de PE, nuestros resultados están en concordancia con los relativos a la función renal en los que en primer lugar, se demostró que el volumen urinario en las ratas no preñadas (tratadas o no) fue significativamente superior con respecto al volumen urinario de las ratas preñadas, lo que indica que la condición del estado de gestación involucra un aumento de volumen plasmático, así como un aumento de la tasa de filtración glomerular en la nefrona, expansión del volumen plasmático, por aumento de la reabsorción de agua, mecanismos importantes para la regulación y adaptación hemodinámica, como consecuencia de los cambios hormonales en las ratas preñadas (Jeyabalan y Conrad, 2007). En segundo lugar, la cuantificación de la excreción de sodio en la orina mostró alteraciones específicas en cada grupo experimental. Así, se observó un incremento de la excreción urinaria de sodio en las ratas no preñadas, como consecuencia del incremento de la PA y el no desplazamiento a la derecha de la curva PA/natriuresis. Por el contrario, una reducción de la excreción urinaria de sodio en las ratas preñadas tratadas con L-NAME apoya el efecto selectivo de retención de sodio y alteración renal observado en la PE, donde la reducción de la excreción de sodio es debida a un aumento de la reabsorción tubular de sodio, que resulta en una disminución de la presión de perfusión renal, un incremento de la presión hidrostática renal intersticial, una reducción del flujo plasmático renal y, con ello, una disminución de la tasa de filtración glomerular (Nakamura y col., 1993).

Aunado a lo anterior, la observación que el tratamiento con L-NAME a ratas no preñadas no altera el conteo plaquetario, mientras que reduce significativamente el mismo en las ratas preñadas, sugiere que la alteración en algunos de los parámetros previamente evaluados está relacionado con el desarrollo de un modelo experimental de PE y no son consecuencia de una acción inespecífica del tratamiento con el L-NAME.

El tono vascular juega un papel importante en la regulación de la PA en el embarazo. Así, la gestación normal se asocia con una significativa reducción de la PA y de la resistencia vascular periférica. Esta reducción en la resistencia periférica ha sido atribuída a diferentes mecanismos, los cuales incluyen el aumento de los requerimientos metabólicos maternos y del tejido feto-placentario y/o a la disminución de la reactividad vascular. Se ha propuesto que la disminución de la reactividad vascular durante la gestación normal se debe a la disminución de la respuesta presora frente a los vasoconstrictores, específicamente en la pared vascular y a un incremento en la síntesis de óxido nítrico y del GMPc, este último segundo mensajero del NO y mediador celular de la relajación del músculo liso vascular (Khalil y col., 1998; Khalil y Granger, 2002).

Estos cambios hemodinámicos beneficiosos no ocurren en la PE, la cual más bien se caracteriza por un incremento de la PAM, vasoconstricción generalizada e incremento de la resistencia vascular periférica. Durante la PE,

se ha demostrado un incremento de la respuesta presora a agentes vasoactivos como la ANG II y agentes agonistas alfa-adrenérgicos, los cuales se han involucrado en la reducción del flujo plasmático renal y en la disminución de los mecanismos de vasorelajación debido a la disfunción endotelial. Se han sugerido varios mecanismos para el incremento de la reactividad vascular observada en la PE, entre ellos la reducción de la síntesis del NO y/o cambios en la afinidad o densidad de los receptores con los agonistas vasoconstrictores.

Consistente con esto, están nuestros resultados preliminares sobre reactividad vascular. En efecto, en anillos de aorta provenientes de ratas preñadas tratadas o no con L-NAME y estimuladas *in vitro*, la respuesta contráctil a la fenilefrina fue de mayor magnitud en las ratas con PE experimental, al observarse un desplazamiento a la izquierda de la curva de dosis-respuesta a la fenilefrina, lo que indica una mayor reactividad vascular. En este mismo orden de ideas, demostramos que en anillos de aorta precontraídas con fenilefrina, se observa una disminución de la capacidad de relajación tanto por carbacol como por un donador de NO como el nitroprusiato de sodio (NPS). Estos hallazgos demuestran que la inhibición de la síntesis de óxido nítrico en las ratas preñadas genera un modelo en el que la hipertensión se asocia con el incremento de la reactividad vascular. Los resultados observados con el NPS indican que, además de los efectos de la reducción de la síntesis del óxido nítrico hay que considerar que el incremento de la PA se asocia frecuentemente con un aumento del grosor de la pared

vascular, así como un el daño endotelial (Clark col., 1982; Cid y col., 1994) que podría mediar, en parte, el efecto del NPS. Igualmente, estos resultados sugieren que el tratamiento con L-NAME a las ratas preñadas no solo bloquea la síntesis de NO de las células endoteliales, sino que además podría causar un aumento de la síntesis o de la sensibilidad a otros agentes vasoactivos responsables del incremento de la reactividad vascular. Resultados similares han sido reportados por Khalil y col. (1998) quienes demuestran que la reducción de la síntesis de NO en la gestación se asocia a un ascenso de la PA y de la sensibilidad vascular a la estimulación alfa-adrenérgica posiblemente debidos a un aumento de la entrada de calcio desde el espacio extracelular; y Richer y col. (1996) mostraron que un dador de NO como la molsidomina, administrado en ratas preñadas tratadas con L-NAME, paradójicamente incrementó aún más la reactividad vascular; y, finalmente, en otro modelo experimental como el de reducción de la perfusión intrauterina (RUPP), Khalil y Granger (2002) demostraron una disminución de la vasorelajación en anillos de aorta en presencia de acetilcolina, sugiriendo una relajación dependiente del endotelio. En la actualidad, el incremento de la reactividad vascular se encuentra asociada a la liberación de neutrófilos, que a su vez liberan EROs, las cuales incrementan la reactividad vascular, activado por la RhoA Kinasa, el factor de necrosis tumoral alfa, y el incremento de la expresión de la metaloproteinasa-1 presentes en los vasos sanguíneos de mujeres con PE. Igualmente, en estudios en cultivo celular se encontró una desregulación de los genes de colágeno en vasos sanguíneos de pacientes preeclámplicas (Estrada y col., 2011), así como la presencia de



receptores solubles como VEGF, PLGF y el factor de crecimiento 1 y 3 que causan disfunción endotelial en los tejidos maternos (Beause y col., 2003; Nugent y col., 2011).

El sistema renina angiotensina está constituido por una cascada enzimática que se inicia con la liberación de la renina desde las células yuxtglomerulares del riñón, lo que finalmente genera un potente péptido vasoactivo, la ANG II. La ANG II es una hormona circulante importante que participa en la regulación de la presión arterial y del balance hidromineral. La ANG II interactúa con receptores de membranas del tipo AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, ubicados en múltiples tejidos del organismo, como lo son: el sistema nervioso central y periférico, las células musculares lisas, las glándulas suprarrenales, el riñón, y la placenta (Irani y Xia, 2011). El papel del sistema renina angiotensina en la PE aún no está aún totalmente esclarecido. Se sabe que la ANG II se produce localmente en la placenta por una quinasa, que es una serina proteasa similar a la quimotripsina, la cual se produce en las vellosidades del sinciotrofoblasto y que no es una enzima convertidora de angiotensina (Taylor y col., 1990). La ANG II, a través de la estimulación del receptor AT<sub>2</sub> endotelial estimula la liberación de NO a través de la activación de NOSe (Tyurin y col., 2001) así como la síntesis de PGI<sub>2</sub> (Vanhoutte, 1998), las cuales se oponen a la acción vasoconstrictora de la ANG II. La ANG II a través de la estimulación del receptor AT<sub>1</sub>, promueve el remodelaje vascular y la vasoconstricción, además causa crecimiento vascular e inflamación (Khalil, 2002).

Se ha descrito la presencia de un agonista endógeno en la mujer preecláptica, el anticuerpo agonista del receptor AT<sub>1</sub> (AT<sub>1</sub>-AA), el cual se considera que constituye el vínculo entre la isquemia placentaria y la hipertensión inducida en el embarazo (Zhou y col., 2008). La presencia de niveles incrementados del anticuerpo AT<sub>1</sub>-AA en el suero, se ha asociado con el aumento de la concentración intracelular de calcio, la movilización de monocitos y la activación de IL-6, así como la estimulación de la expresión de sFlt-1 en células trofoblásticas, donde todos estos mecanismos convergen en la inducción del desarrollo de la PE (LaMarca y col., 2008). Efectivamente, AT<sub>1</sub>-AA activa la señalización de las células vasculares y activa a la proteína-1, la calcineurina y NFκB (Zhou y col., 2008). La administración de AT<sub>1</sub>-AA a ratas preñadas incrementa los niveles circulantes de ET-1 en la corteza renal y la placenta (LaMarca y col., 2009).

Se ha reportado que en la mujer con PE existe una mayor sensibilidad a la ANG II relativa a la mujer embarazada (Gant y col., 1973). Este aumento de la sensibilidad a la ANG II precede al desarrollo del incremento de la PA y podría reflejar mecanismos parcialmente responsables de la PE (Broughton-Pipkin y col., 1989; Wallenburg y col., 1986). Durante el embarazo normal, los niveles de la actividad de renina plasmática, así como de la concentración de ANG II y de aldosterona plasmática se encuentran elevados (Tapia y col., 1972), mientras que la sensibilidad vascular a la ANG II se encuentra muy reducida, tan temprano como a las 14 semanas del embarazo (Gunther y col., 1980).

Por otra parte, en la mujer que desarrolla PE se observa una reducción en la sensibilidad a la ANG II en etapas tempranas del embarazo, pero esta reducción se pierde después de la semana 22 de gestación y precede al desarrollo de la PE (Gant, 1973). Los niveles elevados de los componentes del SRA contribuyen a la retención de sodio resultando en la retención de agua, que explica el mecanismo de expansión de volumen durante el embarazo normal. (Shah, 2005). Al mismo tiempo, se observa un aumento significativo en la sensibilidad vascular a la ANG II, la cual se asocia con un incremento de la población de receptores de ANG II en las plaquetas (Graves y col., 1992), cuya regulación es paralela a la de los receptores de ANG II vasculares.

Adicional a estos cambios, existe evidencia acerca de una disminución significativa de la actividad de la renina plasmática, de la concentración de ANG II y de aldosterona plasmática en la mujer con hipertensión inducida por el embarazo al compararla con su contraparte normotensa (Graves y col., 1992; Israel y Peceño, 2000). Estos hallazgos parecen indicar que el incremento de la población de receptores para la angiotensina II observado en los órganos blanco en la PE es el reflejo de un mecanismo de regulación “hacia arriba” de los receptores debido a los niveles reducidos de la angiotensina circulante.

Si los cambios observados en estos parámetros bioquímicos en la mujer que desarrolla PE están relacionados con factores que regulan la síntesis o la degradación de la ANG II, o a otros factores, es una interrogante por resolver.

Se ha sugerido que la reducción de la sensibilidad a la ANG II en el embarazo normal se asocia a la expresión relativa de los subtipos de receptores, AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>; así que, la ausencia de los cambios adaptativos de la expresión de los receptores de ANG II podría contribuir a la PE (Anguiano-Robledo y col., 2007). Se ha sugerido que durante el embarazo normal los monómeros del receptor AT<sub>1</sub> son inactivados por las EROs conduciendo a la reducción de la sensibilidad a la ANG II. Por el contrario, se ha reportado que en la PE los receptores AT<sub>1</sub> de la angiotensina forman heterodímeros con el receptor B2 de la bradikina, el cual es resistente a la acción inactivadora de las EROs y más bien se hace hiperactivo ante la ANG II (AbdAlla y col., 2006).

La causa de la existencia de supersensibilidad a la ANG II como compuesto vasoactivo en la mujer con hipertensión inducida por el embarazo no se ha establecido hasta el presente. Existe considerable evidencia que en este tipo de pacientes se presenta una síntesis inadecuada de los vasodilatadores eicosanoides. Igualmente, se han propuesto mecanismos que implican la alteración de la síntesis y/o del metabolismo de otros compuestos vasoactivos. En relación al SRA, se sabe que la ECA representa una enzima clave en la regulación de la síntesis del vasoconstrictor ANG II; además esta enzima participa en la inactivación de las bradiquininas, de conocida actividad vasodilatadora. A su vez, se sabe que las bradiquininas regulan la producción de PGI<sub>1</sub> y PGI<sub>2</sub> (Crutchley, 1983). Es por ello que ha adquirido gran interés la medición de la actividad de la ECA en pacientes tanto con embarazo normal

como en aquella que presentan PE, y de ésta manera investigar los posibles mecanismos responsables de la elevación gestacional de la PA.

Los datos obtenidos de la literatura en relación a la variación de la actividad de la ECA en la PE son contradictorios. Algunos estudios reportan que los niveles séricos de actividad de la ECA en las pacientes con PE se encuentran elevados en comparación con las embarazadas normotensas (Sipes y col., 1989; Cugini y col., 1990; Jin y col., 1992), mientras otros no encuentran alteraciones en la actividad de dicha enzima circulante (Rasmussen y col., 1983). En oposición a éstos resultados nosotros sostenemos que si los niveles plasmáticos de la ANG II y de la actividad renina se encuentran reducidos en el tercer trimestre en la mujer con PE, es plausible hipotetizar que la biosíntesis de la ANG II reflejada en la actividad de ECA, debería estar alterada en la misma dirección.

Con el fin de aclarar esta controversia, en el presente estudio cuantificamos tres de los componentes del sistema renina angiotensina circulante: la actividad de ECA plasmática, y la concentración plasmática de la aldosterona y la renina en ratas preñadas tratadas o no con L-NAME.

La cuantificación de la ECA ha cobrado interés clínico desde que se ha reportado incrementos en los niveles plasmáticos en pacientes con sarcoidosis pulmonar (Lieberman, 1975) en enfermedades de origen extrapulmonar como Diabetes Mellitus (Lieberman y Sastre, 1980) y, en

pacientes con hipertensión inducida por el embarazo (Li y col., 1992). Nuestros resultados demuestran que tanto la actividad de la ECA plasmática como los niveles de renina plasmática, se encuentran marcadamente reducidos en las ratas preñadas tratadas crónicamente con L-NAME, cuando se comparan con las ratas preñadas normotensas, siendo este efecto nuevamente específico para la condición de gravidez y opuesto al observado en la rata no preñada. Igualmente, también se detectó una disminución de la concentración de aldosterona en el líquido amniótico. Estos hallazgos parecen indicar que la hipertensión inducida por el embarazo se caracteriza bioquímicamente por la supresión de los componentes circulantes del SRA, que se refleja en una disminución de la actividad de la ECA y de la concentración plasmática de la renina y de la aldosterona del líquido amniótico. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que reportan menores niveles de actividad de la renina plasmática, de la ANG II y la aldosterona en mujeres con hipertensión inducida por el embarazo al compararlas con sus contrapartes normotensas (Graves, 1992; Lubarsky y col., 1997; Israel y Peceño, 2000). Igualmente, en el modelo de preeclampsia inducido por la administración de marinobufagenina, un inhibidor endógeno de la Na/K ATPasa, en el cual se demuestra también la reducción de los componentes SRA circulantes como son la renina activa, la renina y la ANG II (Uddin y col., 2010), similar a lo que ocurre en la PE humana (Shah, 2005). Por ello, definitivamente en este modelo experimental de PE, al igual al cual estamos desarrollando en el presente estudio se demuestra que el sistema renina angiotensina circulante se encuentra regulado “hacia abajo”.

Se ha sugerido que la PE se caracteriza por un desbalance en la velocidad de producción de algunos de los metabolitos del ácido araquidónico. Se podría entonces especular que la reducción de la actividad de la ECA es, en parte el responsable del desbalance entre los sistemas vasoconstrictores y vasodilatadores observados en la PE y, posiblemente, de algunos de los síntomas de la PE. Aún más, la supresión de la síntesis de la ANG II y del metabolismo de las bradiquininas podría ser el responsable del incremento de la población de receptores de ANG II en los órganos blanco y por ende del incremento de la sensibilidad vascular a la angiotensina exógena observada en mujeres con PE y en modelos experimentales de PE. En efecto, se ha caracterizado la interacción de la angiotensina con sus receptores en las plaquetas de mujeres con hipertensión inducida por el embarazo, y se ha demostrado que ocurre un incremento significativo en la unión específica de angiotensina a su receptor comparado con las plaquetas de mujeres embarazadas normotensas (Graves y col., 1992).

Estudios previos han demostrado que los receptores de ANG II en la plaqueta se regulan en forma paralela con los receptores del músculo liso vascular (Gunther y col., 1980). Igualmente, se sabe que existe una relación inversa entre los receptores de angiotensina del músculo liso vascular y los niveles circulantes de la angiotensina. En consecuencia, se puede establecer que en nuestro modelo experimental inducido por la deprivación de NO, existe una actividad biosintética de ANG II reducida, y por ende una regulación “hacia

arriba” del número de receptores para la angiotensina II, tal y como se ha reportado en mujeres con hipertensión inducida por el embarazo. Aún más, la actividad disminuida de la actividad plasmática de la ECA, y la disminución de la concentración de renina en la PE, así como la concentración de aldosterona en líquido amniótico, podrían estar relacionada con la falta de efecto terapéutico de los inhibidores de la ECA en el tratamiento de la PE (Lindheimer y Katz, 1981).

En contraste a su acción vasoconstrictora en la mayoría de los lechos vasculares, se sabe que la angiotensina II aumenta el flujo sanguíneo uterino en perros, conejos y monos preñados (Watson y col., 1986; Brenner y col., 1989). Se ha propuesto que debido a que la ANG II aumenta la síntesis de PGI<sub>2</sub> en el útero, y esto causa un aumento del flujo sanguíneo mediado por un incremento de las prostaglandinas. Es por ello que los inhibidores de la ECA disminuyen el flujo sanguíneo uterino y disminuyen la sobrevivencia fetal en animales preñados y pueden ser la causa de la mortalidad fetal en mujeres tratadas con éstas drogas durante la gestación (Israel y Peceño, 1998).

Nuestros resultados en el modelo experimental de PE concuerdan con los reportados por Israel y Peceño (2000) en la PE en humanos, en el que el SRA plasmático se encuentra regulado “hacia abajo” y existe una correlación negativa entre la actividad de la ECA y el incremento de la presión arterial, sugiriendo que ésta alteración podría contribuir con la etiología del desarrollo de la PE. Sin embargo, en la literatura existen reportes controversiales en los



cuales se ha reportado que la actividad de la ECA no se altera (Rasmussen, 1983) ó más bien incrementa en las pacientes PE (Jin y col., 1992; Goldkran y Fuentes, 1986; Sipes, 1989) si se comparan con las embarazadas normotensas. Estas discrepancias podrían deberse a diferencias en la edad gestacional, el tratamiento con antihipertensivos y a la metodología empleada para determinar la actividad de la ECA. En nuestro estudio y el realizado por Israel y Peceño (2000) la actividad de la ECA fue cuantificada en muestras de plasma mediante un método radiométrico altamente sensible, mientras que en los otros estudios se utilizó muestra de suero y el método para cuantificar la actividad de la ECA fue colorimétrico.

Un hallazgo interesante y no reportado hasta el presente lo constituye la reducción significativa de los niveles de aldosterona en el líquido amniótico proveniente de ratas preñadas tratadas con L-NAME cuando se compara con las preñadas no tratadas, mientras que la renina amniótica aún cuando fue detectable los niveles no estaban alterados. El papel del SRA en el líquido amniótico no ha sido establecido hasta el presente, pero podría ser uno de los componentes importantes de SRA que participa en el transporte de nutrientes y oxígeno entre la placenta y el feto, donde podría contribuir con el desarrollo de la PE al no permitir una adecuada oxigenación y circulación de nutrientes hacia el feto. Se piensa que la ANG II en el líquido amniótico podría derivar tanto de la orina fetal o ser producto de reacciones enzimáticas del saco amniótico. Este último dependería de la presencia de la renina, de la ECA y del angiotensinogeno local. Estos hallazgos de una reducción de la

aldosterona del líquido amniótico en nuestro modelo experimental, podría tener un valor predictivo interesante. En efecto, aún cuando los niveles de aldosterona se han asociado poco con la PE, en la actualidad su cuantificación se ha utilizado como diagnóstico en complicaciones del Síndrome de Bartter, un desorden autosómico recesivo de hiperreninismo e hiperaldosteronismo, en el cual se detectan niveles elevados de aldosterona amniótica (Nakanishi y col., 2005). En relación a los valores reportados en nuestro estudio, encontramos que Siegel en 1981 reportó valores similares a los nuestros de renina y aldosterona en el líquido amniótico en oveja preñada. Adicionalmente, Caragounis y col., (2000) determinaron que la rata *Sprague Dawley* normotensa no contiene renina activa en el líquido amniótico, mientras que el líquido amniótico de la rata Ren-2 se detectaron niveles elevados de renina asociada a una reducción del peso fetal. Lo que indica que la sobreproducción de renina podría jugar un papel en el crecimiento fetal y la programación prenatal de la hipertensión.

El estrés oxidativo es un desbalance entre las fuerzas pro-oxidantes y anti-oxidantes, así se ha demostrado que en el embarazo con PE ocurre una disminución significativa de la protección antioxidante. Muchas son las causas que parecen estar 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 placentación anormal temprana con isquemia placentaria e hipoxia (Gilbert y col., 2008), a la presencia de anticuerpos agonista del receptor AT<sub>1</sub>

de ANG II (Xia y col., 2003), a alteraciones en el metabolismo de los 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, el sistema urinario y la 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 predispone a la mujer embarazada a desarrollar PE (Herrera y col., 2001). En estudios de la placenta de mujeres con PE comparada con la placenta normal, se demostró que las primeras presentaron un aumento de la peroxidación de lípidos mitocondriales y de la generación del anión superóxido, lo que podría contribuir y formar parte importante como fuente de estrés oxidativo en la placenta (Wang y Walsh, 2001; Wang y Walsh, 1998;). Debido a este desbalance oxidativo de origen placentario, se ha postulado que la hipoperfusión sanguínea mediada por la ANG II, la vasoconstricción sistémica y el estrés oxidativo placentario, son factores responsables de la disfunción endotelial vascular renal, y que contribuye con el desarrollo de la PE (Shah, 2005).

Uno de los factores que podrían influir en daño renal en la preeclampsia, 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 dirección ya que la inhibición de la síntesis de NO que genera un modelo de PE experimental con endoteliosis glomerular, estuvo asociada a la disminución significativa de la actividad de las tres de las enzimas

antioxidantes renales: la catalasa, la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. La disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes de la corteza renal, las cuales son mecanismos enzimáticos que defienden en situaciones de estrés oxidativo, en conjunto con la disminución de la actividad de la GPx plasmática y la tendencia a la disminución en el líquido amniótico y el simultáneo incremento de la concentración de TBARS plasmáticos como índice de peroxidación lipídica, sugiere que la desregulación de la funcionalidad generalizada y renal local están asociados a una baja protección oxidativa durante la PE, que favorece a la insuficiencia renal (Balal y col., 2003). Efectivamente, la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes se asocia a un aumento en la producción de EROs ya que se sabe que: primero, el peroxinitrito puede inactivar a la GPx (Padmaja y col., 1998) y la Mn-SOD (MacMillan-Crow y Thompson, 1999) y, segundo el  $O_2^{\cdot-}$  puede inactivar a la GPx (Blum y Fridovich, 1985) y a la catalasa (Rister y Baehner, 1976).

La inactivación de las enzimas antioxidantes por las EROs o por la especies reactivas de nitrógeno como el peroxinitrito, puede deberse a la oxidación o a la nitración de residuos específicos que forman parte del centro catalítico de la enzima. Por ejemplo, la GPx contiene un aminoácido raro, la selenocisteína (Sec45), el cual es esencial para la actividad de la enzima y es más reactiva que los grupos tiol. En este contexto, se ha propuesto que la inactivación de la GPx por el peroxinitrito se debe a la modificación de la Sec45, la cual puede ocurrir a través de 2 vías: la nitración del selenio o bien la formación de un

puente Se-S, entre la Sec45 y la Cys95, lo que daría como consecuencia la inactivación de la enzima (Asahi y col., 1997). Por otro lado, se ha observado que la inactivación de la SOD por peroxinitrito puede ocurrir a nivel de los residuos de tirosina independientes del sitio activo de la enzima. La modificación de los residuos de tirosina, incluye no solo la nitración de residuos críticos para la actividad catalítica, sino también la oxidación y la subsiguiente formación de residuos de ditirosina (MacMillan-Crow y Thompson, 1999).

La reducción de la protección oxidativa incrementa la producción de EROs como el  $H_2O_2$  (Guidet y Shah, 1989, Yang y col., 1995) y de  $O_2^{\cdot-}$  (Cuzzocrea y col., 2002), y estas EROs inducen la contracción de las células mesangiales del glomérulo (Duque y col., 1992; Martínez-Salgado y col., 2002). La contracción de estas células altera el área de superficie de filtración y el coeficiente de ultrafiltrado glomerular, factores que llevan a una disminución de la velocidad de filtración glomerular típico de la PE. Además, la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes encontradas en este estudio, favorecería el incremento en los niveles de  $O_2^{\cdot-}$ . Se sabe que este radical puede reaccionar con el óxido nítrico para formar peroxinitrito, una especie reactiva de nitrógeno citotóxica. Aún más, la inactivación del NO por el  $O_2^{\cdot-}$  llevaría a la disminución de los niveles de este vasodilatador, lo que finalmente también estaría asociado a la disminución de la velocidad de filtración glomerular observada en la PE (Rivas-Cabañero y col., 1995,1997).

Lo que si queda claro del análisis de nuestros resultados es que la desregulación de la protección oxidativa es un efecto específico del modelo de PE que se ha caracterizado, y no de una acción inespecífica del tratamiento con L-NAME. Efectivamente, nuestros resultados demuestran que aún cuando el tratamiento del L-NAME en ratas vírgenes y preñadas genera un aumento de la presión arterial de similar magnitud, los marcadores de estrés oxidativo se modifican en forma diferencial; así, en primer lugar, el tratamiento con L-NAME no afectó los niveles de las enzimas antioxidantes de la corteza renal en las ratas vírgenes, mientras que en las ratas preñadas causó una reducción adicional a la producida por la gestación misma. Todo ello, sumado al hecho del incremento de la peroxidación lipídica que se refleja con el aumento de la concentración de TBARS plasmática y la reducción selectiva de la GPx plasmática exclusivamente en la ratas preñadas tratadas con L-NAME, sugiere que la PE constituye un estado de desregulación de la protección antioxidante. Estos hallazgos sustentan fuertemente, y por primera vez en la literatura, el papel del estrés oxidativo en la PE y el potencial de este modelo experimental de preeclampsia.

La peroxidación lipídica es un proceso que ocurre normalmente en bajos niveles en todas las células y tejidos. Durante el embarazo normal los productos de la peroxidación lipídica sérica se encuentran elevados, pero la existencia de un contrabalance del sistema antioxidante permite la normalización del sistema y el control del estrés oxidativo. Múltiples estudios han reportado que la PE se asocia con hiperlipidemia comparativamente con

el embarazo normal ya que existe evidencia que indica que el desequilibrio a favor del estrés oxidativo en contra de la actividad antioxidante ocurre en la preeclampsia, y que los ácidos grasos libres, y los triglicéridos son los principales determinantes en la regulación de los niveles y distribución de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y sus partículas son capaces de inducir disfunción endotelial (López-Jaramillo, 2008).

Los productos de la peroxidación lipídica como el MDA se encuentran incrementados en las pacientes con PE. En la actualidad se ha establecido que el inicio del desbalance de la actividad pro-oxidante y antioxidante proveniente de la hipoxia en la placenta, es responsable de la peroxidación lipídica en modelos experimentales de PE en ratas. El hecho que en las ratas preñadas tratadas con L-NAME, y no así la vírgenes tratadas con L-NAME, se produce un aumento de los niveles de TBARS plasmático, confirma la existencia de un desbalance entre factores oxidantes y antioxidantes en nuestro modelo experimental y apoya nuestra propuesta de un efecto selectivo en la rata preñada similar a la patología en ser el humano (Buhimschi y col., 1998).

Tal y como hemos comentado previamente, se sabe que el organismo normalmente contiene mecanismos enzimáticos antioxidantes que limitan 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 NO y formar peroxinitrito. Este último, al unirse a las proteínas es altamente citotóxico; además, los niveles elevados de peroxinitrito reducen la biodisponibilidad de NO con todos los efectos perjudiciales que a nivel vascular y renal esto implica.

Si el incremento temprano del estrés oxidativo placentario, que cursa antes del inicio de los síntomas maternos, juega un papel fundamental en la disfunción endotelial generalizada y el daño renal, nos planteamos que el tratamiento temprano con antioxidantes o con inhibidores de la NAD(P)H oxidasa podría interrumpir el proceso de este síndrome.

Nuestros resultados apoyan ésta posibilidad ya que demuestran que el tratamiento crónico con un compuesto que mimetiza a la SOD, el tempol, o con el desacoplante del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa como la apocinina, fueron capaces de reducir significativamente los signos y síntomas inducidos por el L-NAME. Igualmente ambos compuestos fueron capaces de prevenir tanto las alteraciones de la morfometría fetal observadas en este modelo experimental como la proteinuria promovida por la inhibición de la síntesis de NO. Aún más, la inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno inducida por el L-NAME en ratas preñadas previno el daño renal observado bajo microscopía de luz, así como, la reducción de la excreción urinaria de sodio presente en la PE experimental.



Lo más interesante de nuestros hallazgos reportados por primera vez en la literatura, es que el tempol y la apocinina fueron capaces de revertir la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal inducida por el bloqueo de la SON. El hecho que un reductor de los niveles del anión superóxido y un desacoplante de la enzima productora de dicho anión fueron capaces de prevenir los signos característicos de la preeclampsia experimental ratifican el papel determinante del estrés oxidativo en las manifestaciones disfuncionales generales y renales en este modelo experimental de la PE.

Aun cuando en el presente estudio no evaluamos el agonista responsable de la estimulación de la NAD(P)H oxidasa durante la PE y el posible mecanismo de acción de la reversión por apocinina, existe evidencia en la literatura de la posible mediación de la ANG II y/o del anticuerpo agonista del receptor AT<sub>1</sub> (AT<sub>1</sub>-AA) en la fisiopatología de la PE. Efectivamente, Dechend y col. (2003), en células musculares lisas, en trofoblastos y en la placenta, demostraron que tanto la ANG II como los AT<sub>1</sub>-AA provenientes de la sangre de madres preeclámpticas fueron capaces de incrementar la producción de EROs, los componentes de la NAD(P)H oxidasa, p22, p47 y p67 cuantificado por Western blot y la activación de la NF-κB. Estos efectos fueron bloqueados por el losartán, un bloqueante del receptor AT<sub>1</sub>, por el difenil-eneiodonio (DPI) un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa y por la administración de un mimético de la SOD. Por lo tanto, aún cuando no pudimos determinar en el presente estudio la presencia de AT<sub>1</sub>-AA en el plasma de las ratas preñadas tratadas con L-

NAME, podríamos inferir que el efecto de la apocinina observado se podría deber a la interferencia del efecto de este anti-anticuerpo en la activación de la NAD(P)H oxidasa a través de la activación receptor AT<sub>1</sub>. Queda por determinar en experimentos futuros la veracidad de esta aseveración.

En apoyo a nuestros hallazgos se encuentran los descritos por Hoffmann y col. (2008), quienes demostraron que el tempol es capaz de prevenir la hipertensión, la proteinuria y la función feto-placentaria en un modelo de preeclampsia en ratón, el BPH/5, el cual desarrolla de forma espontánea las características clínicas de la preeclampsia humana. Esto sugiere que la producción de especies reactivas de oxígeno parece ejercer un efecto causal importante en la disfunción endotelial generalizada y del daño renal, y por ello el uso de terapéutico de los antioxidantes como tratamiento de la preeclampsia parece ser prometedor.

En conclusión, la PE experimental inducida por la inhibición crónica de la síntesis del óxido nítrico, reproduce los signos clásicos de la PE en humanos, y se acompaña de una desregulación del SRA y de disfunción renal. Esto nos permite aseverar que este un modelo experimental de PE constituye una buena aproximación de la PE humana. Se demuestra que el daño renal encontrado en éste modelo experimental, se asocia a una disminución de los mecanismos antioxidantes renales, que induce a un incremento del estrés oxidativo, y conduce a una reducción de la protección de la función renal. Estos resultados indican que la sobreproducción de EROs tanto placentaria

como renal, son causa fundamental en la disfunción endotelial generalizada y del daño renal. Finalmente, la inhibición del estrés oxidativo mediante el uso de agentes antioxidantes como el tempol o la apocinina, pudiesen ser uno de los posibles blancos terapéuticos en el tratamiento de la hipertensión inducida por el embarazo humano y abren nuevos horizontes como estrategia terapéutica en el tratamiento de este síndrome.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AbdAlla S, Abdel-Baset A, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. (2006) Mesangial AT1/B2 receptor heterodimers contribute to angiotensin II hyperresponsiveness in experimental hypertension. *J Mol Neurosci* 26(2-3):185-192.
- Adiga U, D'souza V, Kamath A, Mangalore N. (2007) Antioxidant Activity and Lipid Peroxidation in Preeclampsia. *J Chin Med Assoc* 70:435-438.
- Aebi H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- Alemán I, Alex R, Margelis M, Hung A, Ramírez C. (2008) Expresión de la óxido nítrico sintasa constitutiva endotelial e inducible en pacientes venezolanas con preeclampsia. *Invest Clin* 49(3): 321 – 330.
- Alexander B, Cockrell K, Cline F, Llinas M, Sedeek M, Granger J. (2001) Effect of Angiotensin II Synthesis Blockade on the Hypertensive Response to Chronic Reductions in Uterine Perfusion Pressure in Pregnant Rats. *Hypertension* 38: 742-745.
- Alexander B, Kassab S, Miller M, Abram S, Reckelhoff J, Bennett W, Granger J. (2001a) Reduction uterine perfusion pressure during pregnancy in the rats is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide. *Hypertension* 37: 1191-1195.
- Alexander B, Llinas M, Kruckeberg, Granger J. (2004) L-arginine attenuates hypertension in pregnant rats with reduced uterine perfusion pressure. *Hypertension* 43:832-836.
- Anguiano-Robledo L, Reyes-Melchor P, Bobadilla-Lugo R, Pérez-Alvarez V, López-Sánchez P. (2007) Renal angiotensin-II receptors expression changes in a model preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 26(2):151-161.
- Ariza A, Bobadilla N, Halhali A. (2006) Acciones de la endotelina y de la angiotensina II en embarazos complicados con preeclampsia. *Rev de Invest Cient* 56(1): 48-56.
- Arthur J, Beckett G. (1994) New aspects of micronutrients in at risk groups. New metabolic roles for selenium. *Proc Nutr Soc* 53:615-624.
- Asahi M, Fujii J, Takao T, Kuzuya T, Hori M, Shimonishi Y, Taniguchi N. (1997) The oxidation of selenocysteine is involved in the inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide donor. *J Biol Chem* 272:19152-19157.

Avissar N, Ornt D, Yagil Y, Horowitz S, Watkins R, Kerl E, Takahashi K, Palmer I, Cohen H. (1994) Human kidney proximal tubule is the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 266:C367-C375.

Badyal D, Lata H, Dadhich A. (2003) Animals Models of Hypertension And Effect Of Drugs. *Indian J Pharmacol* 35: 349-362.

Baker P, Broughton F, Symonds M. (1992) Comparative study of platelet angiotensina II binding and the angiotensina II sensitivity test as predictors of pregnancy-induced hypertension. *Clin Sci* 83: 89-95.

Balal M, Karayaylah I, Paydaş S, Seyrek N, Canacankatan N, Kayrin L. (2003) Oxidative Oxidative-Anti-Oxidative System In Peripartum Acute Renal Failure And Preeclampsia–Eclampsia. *J Turk Soc Sephr.* 12 (3): 141-147.

Barbieri S, Cavalca V, Eligini S, Brambilla M, Caiani A, Tremoli E, Colli S. (2004) Apocynin Prevents Cyclooxygenase 2 Expression In Human Monocytes Through Nadph Oxidase And Glutathione Redox-Dependent Mechanisms. *Free Radic Biol Med* 37(2): 156 – 165.

Beause A, Jour, Auger K, St-Louis J, le Brochu M. (2003) High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H375–H383.

Beauséjour A, Auger K, ST-Louis J, Brochu M. (2003) Hight sodium intake prevents pregnancy induced decreased of blood pressure in the rat. *Am J Physiol Heart Physiol* 285:H375-H383.

Beyer Wayne F, Fridovich I Jr. (1991) Phosphate, not superoxide dismutase, facilitates electron transfer from ferrous salts to cytochrome Archives *Biochem Biophys.* 285:60-63.

Biberstine-Kinkade K, Gunaydina G, Korucuoglu U, Durakb I, Kavutcu C. (2001) Heme-liganting histidines in flavocytochrome b (558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem.* 276:31105-31112.

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

Blum J, Fridovich M. (1985) Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 240(2):500-508.

Bredt D, Snyder S. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(2):6826-6835.

Brenner M, Troy J, Ballerman B. (1989) Endothelium dependent vascular response mediators and mechanisms. *J Clin Invest* 84(5):1373-1378.

Broughton-Pipkin F, Morrison R, O'Brien P. (1989) Prostacilin attenuates both pressor and adrenocortical response to angiotensin II in human pregnancy. *Clin Sci* 76:529-534.

Buhimschi I, Saade G, Chwalisz K, Garfield R. (1998) The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications Human Reproduction Update. *Eur Soc Human Reprod Embryol* 4(1):25-42.

Caragounis A, Koutsis K, Wlodek M, Wilkinson-Berka J, Di Nicolantonio R. (2000) First report of active renin in rat amniotic fluid. First report of active renin in rat amniotic fluid. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 27(8):631-633.

Carlsson L, Marklund S y Edlund T. (1996) The rat extracellular superoxide dismutase dimer is converted to a tetramer by the exchange of a single aminoacid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:5219-5222.

Carlström M, Wentzel P, Skøtt O, Persson A, Eriksson U. (2009) Angiogenesis inhibition causes hypertension and placental dysfunction in a rat model of preeclampsia. *J Hypertens* 27(4):829-837.

Cavanagh D, Knuppel R. (1992) Obstetricia y Perinatología. Principios y Practicas., Prinera edn, pp 1276-1280. Eds. L. Iffy y H.A. Kaminetsky. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Chance B, Oshino N. (1971) Kinetics and mechanisms of catalase in peroxisomes of the mitochondrial fraction. *J Biochem* 122(2):225-233.

Chen G, Wilson R, Boyd P, McKillop J, Leitch C, Walker J, Burdon R. (1994) Normal superoxide dismutase (SOD) gene in pregnancy-induced hypertension: is the decreased SOD activity a secondary phenomenon? *Free Radical Res* 21:59-66.

Chen K, Merrill D, Rose J. (2007) The importance of angiotensin II subtype receptors for blood pressure control during mouse pregnancy. *Reprod Sci* 14(7):694-704.

Chu F, Doroshov J, Esworthy R. (1993) Expression, characterization, and tissue Distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Bio Chem* 268:2571-2576.

Cid M, Kleinman H, Grant D, Schnaper H, Fauci A, Hoffman G. (1994) Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion

molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1, and vascular cell adhesion molecule type 1. *J Clin Invest* 93: 17–25.

Clambers J, Fusi, L, Malik I, Haskard D, De Swiet M, Kooner J. (2001) Association of Maternal Endothelial Dysfunction with Preeclampsia. *JAMA* 285(12): 1607-1612.

Clark K, Durnwald M, Austin J. (1982) A model for studying chronic reduction in uterine blood flow in pregnant sheep. *Am J Physiol* 242:H297-H301.

Combs C, Katz M, Kitzmiller J. (1993) Experimental preeclampsia produced by chronic constriction of the lower aorta: validation with longitudinal blood pressure measurements in conscious rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 169:215-223.

Contreras J, Martínez C, Fouilliou M, Betancourt Y, Colmenares E, Guevarra, D, Torres D, Magaldi L, Jiménez S, Velasco M. (2002) Endotelio y trastornos hipertensivos en el embarazo. *Rev Fac Med* 25(1):121-129.

Crapo J, Oury T, Rabouille C, Slot J, Chang L. (1992) Copper, Zinc Superoxide Dismutase is Primarily a Cytosolic Protein in Human Cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10405-10409.

Crews J, Herrington J, Granger J, Khalil R. (2000) Decreased endothelium dependent vascular relaxation during reduction of uterine perfusion pressure in pregnant rats. *Hypertension* 35: 367-372.

Crutchley D, Ryan J, Ryan U, Fischer G, Paul S. (1983) Effects of bradykinin and its homologs on the metabolism of arachidonic acid by endothelial cell. *Adv Exp Med Biol* 156: 527-532.

Cugini P, Letizia C, Di Palma L, Battisti P, Caserta D, Morcarini M, Scavo D. (1990) Effects of bradykinin and its homologs on the metabolism of arachidonic acid by endothelial cell. *Adv. Exp Med Biol.* 156:527-530.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Britti D, De Sarro A, Pierpaoli S, Caputi A, Masini E, Salvemini D. (2002) A role for superoxide in gentamicin mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 450:67-76.

Danielson L, Conrad K. (1995) Acute blockade of nitric oxide synthase inhibits renal vasodilation and hyperfiltration during pregnancy in chronically instrumented conscious rats. *Am Soc Clin Invest* 96: 482-490.

Davey D, MacGillivray I. (1988) The Classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 158(4): 892-898.

Davisson R, Hoffmann D, Butz G, Aldape G, Schlager G, Merrill D, Sethi S, Weiss R, Bates J. (2002). Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 39:337-342.

Dechend R, Viedt C, Muller D, Ugele B, Brandes R, Wallukat G, Park J, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V, Dietz R, Haller H, Kreuzer J, Luft FC. (2003) AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation* 107:1632–1639.

Deisseroth A, Dounce A. (1970) Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 50: 319-375.

Dekker G, Sibai B. (1998) Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 179:1359-1375.

Dinh D, Frauman A, Johnston C, Fabiani M. (2001) Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci* 100(5):481-492.

Duque I, García-Escribano C, Rodríguez-Puyol M, Díez-Márquez M, López-Novoa J, Arribas I, Hernando L, Rodríguez-Puyol D. (1992) Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 263:F466-F473.

Eiserich J, Rakesh P, Patel R, O'Donnell V. (1998) Pathophysiology Of Nitric Oxide And Related Species: Free Radical Reactions and Modification of Biomolecules. *Molec Aspects Med* 19:221-357.

Estrada G, Capello R, Mishra N, Romero R, Strauss J y Walsh S. (2011) Increased Expression of Matrix Metalloproteinase-1 in Systemic Vessels of Preeclamptic Women. *Am J Pathol* 178(1):451–460).

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

Flora S. (2009) Structural chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Long* 4:191-206.

Furchgott R. (1955) The Pharmacology of vascular smooth muscle. *Pharmacol Rev* 7:183-193.

Gallery E. (1995) Hypertension in Pregnancy. Practical Management Recommendations. *Drugs* 49(6): 555-562.

Ganong W. (1988) Fisiología Medica. 11ava ed. Cap 30 Ed. El Manual Moderno, Mexico. p485.



Gant N, Daley G, Chand S, Whalley P, MacDonald P. (1973) A prospective study of angiotensin II pressor responsiveness through primigravid pregnancy. *J Clin Invest* 52:2682-2690.

Gerretsen G, Huisjes H, Elema J. (1981) Morphological changes of spiral arteries in the placental bed in relation to preeclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 88:876-894.

Gilbert J, Ryan M, LaMarca B, Sedeek M, Murphy S, Granger J. (2008) Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H541–H550.

Goldkran J, Fuentes A. (1986) The relation of angiotensin converting enzyme to the pregnancy induced hypertension preeclampsia syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 154:792-800.

Granger J, Alexander B, Bennett W, Khalil R. (2002) Pathophysiology of pregnancy induced hypertension. *Microcirculation* 9:147-160.

Granger J, Alexander B, Llinas M, Bennett W, Khalil R. (2001) Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: Linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension* 38:718-722.

Graves S, Moor T, Seely E. (1992) Increased platelet angiotensin II receptor number in pregnancy induced hypertension. *Hypertension* 20(85): 627-632.

Guidet B, Shan S. (1989) In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am J Physiol* 256:F158-F164.

Gunther S, Gimbrone M, Alexander R. (1980) Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels. *Nature* 287 (5779): 230-232.

Harris E. (1992) Regulation of Antioxidant Enzymes. *FASEB J* 6:2675-2683.

Herrera J, Chaudhuri G, López-Jaramillo P. (2001) Is infection a major risk for preeclampsia? *Med Hypotheses* 57:393-397.

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

Herse F, Dechend R, Harsem N, Wallukat G, Janke J, Fatimunnisa Qadri L, Hering L, Dominik N, Muller, Friedrich C, Luft A. (2007) Staff. Dysregulation of the circulating and tissue-based renin–angiotensin system in preeclampsia. *Hypertension* 49: 604-611.

Hoffmann D, Weydert C, Lazartigues E, Kutschke W, Kienzle M, Leach J, Sharma J, Sharma E, Davisson R. (2008) Chronic tamol prevents hypertension, proteinuria, and poor feto-placental outcomes in BPH/5 mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 51: 1058-1065.

Hsu J, Visner G, Burr I, Nick H. (1992) Rat Copper/zinc Superoxide Dismutase Gene: Isolation, Characterization and Species Comparison. *Biochem Biophys Res Commun* 186:936-943.

Hubel C. (1999) Oxidative Stress en the pathogenesis of preeclampsia. *Pre Soc Exp Biol Medic* 222(3): 222-235.

Hung J. (2007) Oxidative Stress and Antioxidants in Preeclampsia. *J Chin Med Assoc* 10:430-432.

Hung T, Burton G. (2006) Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwanese J Obstet Gynecol* 45(3):189–200.

Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T. (1994) Renal Antioxidant Enzymes: Their Regulation and Function. *Kidney Int* 45:1-9.

Irani R, Xia Y. (2008) The Functional Role of Renin-Angiotensin System in Preganacy and Preeclampsia. *Placenta* 29: 763-771.

Irani R, Xia Y. (2011) Renin angiotensina signaling in normal pregnancy and preeclampsia. *Semin Nephro* 31(1): 47–58.

Irgens H, Reiser L, Irgens L, Lie R, Roberts J. (2001) Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: populations based cohort study pre-eclampsia and cardiovascular disease later in life: who is at risk? *BMJ* 323: 1213-1217.

Israel A, Peceño A. (1998) Actividad de la enzima convertidora de angiotensina en la hipertension inducida por el embarazo. *Arch Ven Farmacol Terap* 1(17): 21-27.

Israel A, Peceño A. (2000) Renin-angiotensin-aldosterone system in pregnancy-induced hipertensión. *J Hum Hypertens* 14 (1): S36-S39.

Ito M, Itakura A, Ohno Y, Nomura M, Senga T, Nagasaka T, Mizutani S. Possible (2002) Activation of the renin-angiotensin system in the feto-placental unit in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(4):1871-8.

Ivancich A, Jouve H Sartur B, Gaillard J. (1997) EPR Investigation of compound i in *proteus mirabilis* and bovine liver catalases: formation of

porphyrin and tyrosyl radical intermediates. *Biochem* 36 (31):9356–9364. 1997.

Jeyabalan A, Conrad K. (2007) Renal function during normal pregnancy and preeclampsia. *Front Biosci* 12:2425-2437.

Jin Li, Homg-Yuan H, Ya-Nan Z. (1992) Serum angiotensin converting enzyme activity (kininase II) after unilateral adrenalectomy. *Reg Peptides* 33:138-141.

Joffe G, 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 nulliparous women. Calcium for preeclampsia prevention. (CPEP) Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 179: 1032-1037.

Karumanchi S, Maynard S, Stillman I, Epstein F. (2005) Preeclampsia: A renal perspective. *Kidney* 67: 2101-2113.

Kassab S, Miller T, Hester R, Novak J, Granger R. (1998) Systemic Hemodynamics and regional blood flow during chronic nitric oxide synthesis inhibition in pregnant rats. *Hypertension* 31(2):315-320.

Kehrer J. (1993) Free Radicals as Mediators of tissue injury and disease. *Critical Rev in Toxicology* 1(23): 21-48.

Khalil R, Crews J, Novak J, Kassab S, Granger J. (1998) Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats *Hypertension* 31:1065-1069.

Khalil R, Granger J. (2002) Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am J Physiol Reg Integ Comp Physiol* 283: R29–R45.

LaMarca B, Gilbert J, Granger J. (2008) Recent progress toward the understanding of pathophysiology of hypertension during preeclampsia. *Hypertension* 51:982-988.

LaMarca B, Parrish M, Ray LF, Murphy S, Roberts L, Glover P, Wallukat G, Wenzel K, Cockrell K, Martin J Jr, Ryan M, Dechend R. (2009) Hypertension in response to autoantibodies to the angiotensin II type I receptor (AT1-AA) in pregnant rats: role of endothelin-1. *Hypertension* 54(4):905– 909.

Lawrence R, Burk R. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-958.

Levine R, Maynard S, Qian C. (2004) Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 7: 672-683.

Li J, Hong-Yuan, Ya-Nan Z. (1992) Serum angiotensin converting enzyme activity in pregnancy- induced hypertension. *Gynecol Obstet Invest* 33 (3): 138-141.

Lieberman J, Sastre A. (1980) Serum angiotensin converting enzyme: elevations in diabetes mellitus. *Ann Inter Med* 93 (6): 825-836.

Lieberman J. (1975) Elevation of serum angiotensin converting enzyme (ACE) level in sarcoidosis. *Am J Med* 59(3): 365-372.

Lindheimer M, Katz A. (1981) Pathology of preeclampsia. *Annu Rev Med* 32: 273-289.

-Gallán P, Cabero LL, Dominguez C. (2004) A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy. *Free Radic Biol Med* 37:557–570.

López-Jaramillo P, Arenas W, García R, Rincon M, López M. (2008) The Role of the L-Arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia. *Therapeutic Adv Cardiovas Dis* 2(3) 1-10.

Losonczy G, Brown G, Venuto R. (1992) Increased peripheral resistance during reduced uterine perfusion pressure hypertension in pregnant rabbits. *Am J Med Sci* 303:233-240.

Lowry O, Rosbrough N, Farr A, Randall R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Bio Chem* 193: 265-275.

Lubarsky S, Ahoka R, Friedman S, Sibai B. (1997) The effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on blood pressure and angiotensina II responsiveness in the pregnant rat. *Am J Obstet Gynecol* 176: 1069-1076.

Lyll F, Greer A. (1996) The vascular endothelium in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Rev Reprod* 1:107-116.

MacMillan-Crow L, Thompson J. (1999) Tyrosine modifications and inactivations of active sites manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 366:82-88.

Martínez-Salgado C, Eleno N, Tavares P, Rodríguez-Barbero A, García-Criado J, Bolaños J, López-Novoa J. (2002) Involvement of reactive oxygen species on gentamicin-induced mesangial cell activation. *Kidney Int* 62:1682-1692.

Maser R, Magenheimer B, Calvet J. (1994) Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. *J Biol Chem* 269:27066-27073.

Maynard S, Min J, Merchan J, Lim K, Li J, Mondal S, Libermann T, Morgan J, Sellke F, Stillman I, Epstein F, Sukhatme VP, Karumanchi SA. (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 111: 649-658.

McCord J, Fridovich I. (1969) Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (hemocypre). *J Biol Chem* 244:6049-6055.

McCord M, Ayuk P, McMahon M, Richard C, Boyd R, Sargent I, Redman C. (2006) system arginine transport and NO production in peripheral blood mononuclear cells in pregnancy and preeclampsia. *Hypertension* 47:109-115.

Merrill D, Karoly M, Chen K, Ferrario C, Brosnihan KB (2002) Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrinol* 18(3):239-45.

Merviel P, Carbillon L, Challier J-C, Rebreau M, Beaufils M, Uzan S. (2004) Pathophysiology of Preeclampsia: links with implantation disorders. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 115: 134-147.

Mills G (1957) Glutathione peroxidase an erythrocyte enzyme that protects haemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 229: 189-197.

Molnar M, Hertelendy F. (1992) N<sup>ω</sup>-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* 166:1560-1570.

Moncada S, Higgs A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012.

Moncada S, Palmer R, Higgs E. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.

Moran P, Baylis P, Lindheimer M, Davison J. (2003) Glomerular ultrafiltration in normal and preeclamptic pregnancy. *J Am Soc Nephrol* 14(3):648-652.

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

Myatt L, Brewer A, Langdon G, Brockman D. (1992) Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol* 166: 224-230.

Myatt L, Webster R. (2009) Vascular Biology of preeclampsia. *JThromb Haemost* 7: 375–84.

Nakamura T, Alberola A y Granger J. (1993) Role of renal interstitial pressure as a mediator of sodium retention during systemic blockade nitric oxide. *Hypertension* 6(2):956-960.

Nakanishi T, Suzumori N, Mizuno H, Suzuki K, Sato T, Tanemura M, Suzuki Y, Suzumori K. (2005) Elevated aldosterone in amniotic fluid and maternal blood has diagnostic potential in pregnancies complicated with a fetus of Bartter syndrome. *Fetal Diagn Ther* 20(6):481-484.

Nasir M, Agunanne E, Horvat D, Puschett J. (2010) Alteration in the renin angiotensin system in a rat model of human the preeclampsia. *Am J Nephrol* 31:171-177.

Neri I, Jasonni V, Gori F, Blasi I, Facchinetti F. (2006) Effect of L-arginine on blood pressure in pregnancy-induced hypertension: A randomized placebo-controlled trial. *J Mat- Fet Neo Med* 19(5):277-281.

Nugent W, Mahavadi S, Walsh S. (2011) Mechanisms of enhanced vascular reactivity in preeclampsia. *Hypertension* 58(5):867-873.

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

Ogden E, Hildebrand GJ, Page EW. (1940) Rise of blood pressure during ischemia of gravid uterus. *Proc Soc Exp Biol Med* 43:49-51.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.

Orshal J, Khalil R. (2004) Reduced endothelial NO-cGMP mediated vascular relaxation and hypertension in IL-6 infused pregnant rats. *Hypertension* 43:434-444.

Oury T, Day B, Crapo J. (1996) Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 75:617-636.

Pacheco J. (2003) Disfunción endotelial en la preeclampsia. *Ann Fac Med Univ Nac Mayor San Marcos* 64(1):43-54.

Pacher P, Beckman J, Liaudet L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87: 315–424.

Padmaja S, Squadrito G, Pryor W. (1998) Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 349(1):1-6.

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.

Patel R, ÓDonnell V. (1998) Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Molec Aspects Med* 19: 221-357.

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

Podjarny E, Losonczy G, Baylis C. (2004) Animal models of preeclampsia. *J Sem Nephrol* 24:596-606.

Poranen A, Ekblad U, Uotila P, Ahotupa M. (1996) Lipid peroxidation and antioxidants in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta* 17:401–405.

Prego E, Balboa J, Ela C, Miranda E. (1997) Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutati6n peroxidasa. *Rev Cub Invest Biomed* 16(1):10-15.

Raijmakers M, Dechend R, Poston L. (2004) Oxidative stressant preeclampsia. Rationale for antioxidants clinical trials. *Hypertension* 44:374-380.

Rasmussen A, Perderson E, Romer F, Johannesen P, Kristensen S, Lauritsen J, Wohler M. (1983) The influence of normotense pregnancy and preeclampsia on angiotensina converting enzyme. *Acta Obstet Gynecol* 62:341-344.

Rees M, Kennett E, Whitelock J, Davies J. (2008) Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radical Biol Med* 12(44):1973-2001.

Reyna-Villasmil E, Briceño-Pérez C. (2011) Sistema renina-angiotensina en el embarazo normal y la preeclampsia. *Rev Obstet Ginecol Venez* 71(3): 183-201

Richer C, Boulanger H, Es-Slami S, Giudicelli J. (1996) Lack of beneficial effects of the NO donor, molsidomine, in the L-NAME induced pre-eclamptic syndrome in pregnant rats. *Br J Pharmacol* 119(8):1642–1648.

Rister M, Baehner R. (1976) The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome C reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. *J Clin Invest* 58 (5):1174-1184.

Rivas-Cabañero L, López-Novoa J, Arévalo M. (1995) Effect of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester on nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Nephron* 1:203-207.

Rivas-Cabañero L, Rodríguez-López A, Martínez-Salgado C, Saura M, Lamas S, López-Novoa J. (1997) Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. *Exp Nephrol* 5:23-30.

Roberts J, Cooper D. (2001) Pathogenesis and genetics of preeclampsia. *Lancet* 357:53-56.

Roberts J, Gammill H. (2005) Preeclampsia: recent insights. *Hypertension* 46: 1243-1249.

Roberts J, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. (2003) Summary of NHLBI working group on research on hypertension during pregnancy. *Hypertension* 41:437-445.

Rochart R, Koonin L, Atrash H, Jewett J. (1988) The maternal mortality in the United States: Report from the maternal mortality collaborative. *Obstet Gynecol* 72: 91-95.

Rohrbach M. (1978) [Glycine-1-<sup>14</sup>C]-Hippuryl-L-leucinejm: a substrate for the radiochemical assay of angiotensin converting enzyme. *Anal Biochem* 84:272-276.

Rojo D, Garcia B, Clapes H, Alvarez C. (2003) El óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas en la preeclampsia. *Rev Cubana Invest Bioméd* 2(22):130-140.

Satoh, K. (1978) Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorder determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acts* 90:37-43.

Schobel H, Fischer T, Heuszer K, Geiger H, Schmieder R. (1996) Preeclampsia A state of sympathetic overactivity. *N Engl J Med* 20:1480-1485.



Schor N, Ichikawa I, Rennke H, Troy J, Brenner B. (1981) Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int* 19:288-296.

Seely E, Solomon C. (2003) Insulin resistance and its potential role in pregnancy-induced hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2393-2398.

Seligman S, Buyon J, Clancy R, Young B, Abramson S. (1994) The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 171:944-948.

Serrano N, Casas J, Diaz L, Paez C, Meza C, Cifuentes R, Monterrosa A, Bautista A, Alarcón M, Hawe E, Hingorani A, Vallance P, López-Jaramillo P. (2004) Endothelial nitric oxide synthase genotype and risk of preeclampsia: a multi-centre case-control study. *Hypertension* 44:702-707.

Shah D. (2005) Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F614-F625.

Sharma J, Sharma A, Bahadur A, Vimala N, Satyam A, Mittal S. (2006) Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and preeclampsia. *Int J Gynecol Obst* 94:23-27.

Siegel S. (1981) Amniotic fluid concentrations of renin and aldosterone during development in the fetal sheep. *Pediatr Res* 15(11):1419-1421.

Silver R, Kupferminc M, Russell T, Adler L, Mullen T, Caplan M. (1996) Evaluation of nitric oxide as a mediator of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 175: 1013-1017.

Sipes S, Weiner C, Gelhaus T, Goodspeed J. (1989) The plasma renin angiotensin system in preeclampsia: Effects of magnesium sulfate. *Obstet Gynecol* 73:934-937.

Slater T. (1987) Lipid peroxidation and intracellular messengers in relation to cell injury. *Ag Acts*. 22:333-334.

Steel R, Torrie J. (1960) Principles and Procedure of Statistics. Cap. 7, pp: 99-109. McGraw Hill Book Co., New York.

Takimoto E, Ishida J, Sugiyama F, Horiguchi H, Murakami K, Fukamizu A. (1996) Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science* 274:995-997.

Tanira H, Senner T, Inalb M, Akyuzb F, Uzunerc K, Sivria R. (2005) Effect of quercetin and glutathione on the level of superoxide dismutase, catalase,

malonyldialdehyde, blood pressure and neonatal outcome in a rat model of pre-eclampsia induced by N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine-methyl ester. *Reprod Biol* 118: 190–195.

Tapia H, Johnson C, Strong C. (1972) Renin-angiotensin system in normal and in hypertensive disease of pregnancy. *Lancet* 7782(300):847-850.

Taylor M, Varma M, Teng N, Roberts J. (1990) Woman with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than normal pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1675-1677.

Tóth M. (2002) Role of tetrahydrobiopterin in the regulation of activity of human placental nitric oxide synthase in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Orv Hetil.* 143(8):391-398.

Turner R. (1965) Screening Methods in Pharmacology. Cap. 22, pp: 213-217. Academic Press, New York and London.

Tyurin V, Liu S, Tyurina Y, Susman N, Hubel C, Roberts J, Taylor R, Kagan V. (2001) Elevated levels of s-nitrosoalbumin in preeclampsia plasma. *Circ Res* 88:1210-1215.

Uddin M, Agunanne Horvat D, Puschett J. (2010) Alterations in the renin angiotensin system in the rat model of human preeclampsia. *Am J Nephrol* 31:171-177.

Valdés G, Oyarzún E. (1999) Síndromes hipertensivos del embarazo. En Pérez A, Donoso E. (eds). *Obstetricia*. Santiago, Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo. 52-60.

Valdés G. (1995) Vasodilators in Normotensive and Hypertensive Pregnancy: New Concepts. *Progress in Pharmacology and Clinical Pharmacology*. 10/2. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. Jena. New York.

Vanhoutte P. (1998) Vascular biology. Old timer makes a come back. *Nature* 396: 213-216.

Vetrano A, Heck D, Mariano T, Mishin V, Laskin D, Laskin J. (2005) Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase. *J Biol Chem* 280(42):35372-35381.

Vignais P. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism CMLS. *Cell Mol Life Sci* 59:1428–1459.

Wallenburg H, Dekker G, Makovits J, Rotmans O. (1986) Low dose aspirin prevents pregnancy induced hypertension and pre-eclampsia in angiotensin sensitive primigravidae. *Lancet* 1(8471):1-3.

Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen J, Haller H, Luft F. (1999) Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* 103:945-952.

Wang Y, Walsh S. (1998) Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta* 19(8): 581-586.

Wang Y, Walsh S. (2001) Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta* (22)2-3:206-212.

Watson M, Workman R, Herze W, Branch R, Oates J, Brash. (1986) Systemic synthesis of prostaglandin I<sub>2</sub> follows infusion of angiotensin II in dogs. *Eur J Pharmacol* 127(1-2):9-16.

Weisiger R, Fridovich I. (1973) Mitochondrial superoxide dismutase site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 248(13):4793-4796.

Wilson M, Morganti A, Zervoudakis I. (1980) Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. *Am J Med* 68(1): 97-103.

Woods L, Brooks V. (1989) Role of the renin-angiotensin system in hypertension during reduced uteroplacental perfusion pressure. *Am J Physiol* 257(1-2):R204-R209.

Woon-Seok Y, Soo J, Jung R, Kwang P. (2008) Nitrosative protein tyrosine modifications: biochemistry and functional significance. *BMB Reports* 41(3):194-203.

Xia Y, Hong H, Sol B, Day M-C, Rodney K. (2003) Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activates angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Inv* 10(2):82-93.

Yagi, K. (1976) A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Res* 15:212-216.

Yallampalli C, Garfield R. (1993) Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 169(5):1316-1320.

Yang C, Du X, Han Y. (1995) Renal cortical mitochondria are the source of free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail* 17(1):21-26.

Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T. (1991) Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J Biochem* 109(6):918-923.

Zatz R, Baylis C. (1998) Chronic Nitric oxide model six years on. *Hypertension* 32(6):958-964.

Zhou C, Ahmad S, Mi T, Abbasi S, Xia L, Day MC, Ramin S, Ahmed A, Kellems R, Xia Y. (2008) Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling. *Hypertension* 51(4):1010–1019.