ARTÍCULOS ORIGINALES

Modelo experimental de estrés oxidativo y preeclampsia

Experimental model of oxidative stress and pre-eclampsia

Msc. PhD. Deliana Rojas[1]
Dra. Sofía Da Silva-Marín[1]
Dra. Cilia Abad[1]
Dr. Fulgencio Proverbio†,[1]
PhD. Dr. Biol. Reinaldo Marín[2]

Cómo citar este artículo:
Rojas D., Da Silva-Marín S., Abad C., Proverbio F., Marín R.: Modelo experimental de estrés oxidativo y preeclampsia. Rev. Latin. Perinat. (2022) 25:333

Fecha de recepción: 29 de mayoagosto 2022
Fecha de aceptación: 12 de septiembre 2022

RESUMEN

La preeclampsia está asociada con un incremento sistémico del estrés oxidativo, tanto en madres como en recién nacidos. Ratas embarazadas sometidas a una sobrecarga salina (NaCl al 1,8%) en la última semana de embarazo, desarrollan signos similares a los de gestantes preeclámpticas. En este estudio, ratas embarazadas después de 14 días de gestación, se sometieron o no a sobrecarga salina y se esperó a que terminara el embarazo. Luego de 30 días del nacimiento, crías machos de ambos grupos se anestesiaron y se obtuvo sangre por punción cardíaca. Se aisló el plasma sanguíneo y se prepararon fantasmas de glóbulos rojos. Luego, se determinaron los niveles peroxidación lipídica a través del ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Los resultados obtenidos muestran, para ambas preparaciones, una mayor cantidad de TBARS en crías provenientes de madres sometidas a sobrecarga salina, que en crías de madres controles, demostrando no solo la transmisión vertical de los productos del estrés oxidativo, sino el mantenimiento del estrés oxidativo por lo menos durante las primeras etapas de vida del animal.

PALABRAS CLAVES: Preeclampsia, sobrecarga salina, peroxidación lipídica, embarazo.

ABSTRACT

Preeclampsia is associated with a systemic increase in oxidative stress in both mothers and newborns. Pregnant rats subjected to salt overload (1.8% NaCl) in the last week of pregnancy develop signs similar to those of preeclamptic pregnant women. In this study, pregnant rats after 14 days of gestation were either subjected to salt overload or not and waited until the end of pregnancy. After 30 days after birth, male pups from both groups were anesthetized and blood was obtained by cardiac puncture. Blood plasma was isolated and red blood cell ghosts were prepared. Lipid peroxidation levels were then determined by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. The results obtained show, for both preparations, a higher amount of TBARS in offspring from mothers subjected to salt overload than in offspring from control mothers, demonstrating not only the vertical transmission of the products of oxidative stress, but also the maintenance of oxidative stress at least during the first stages of the animal's life.

KEY WORDS: Preeclampsia, salt overload, lipid peroxidation, pregnancy.

INTRODUCCIÓN

La preeclampsia, es un síndrome multisistémico, en el cual se desarrolla un desorden a nivel de la placenta, que en la madre deriva hacia una disfunción endotelial difusa, que se traduce en disturbios circulatorios. El síndrome fetal, por otra parte, comprende restricción nutricional, respiratoria y neurológica, además de generar nacimientos prematuros [3]. Este trastorno es específico del embarazo humano, responsable de 75.000 muertes anuales en todo el mundo [1]. Incluye hipertensión, con recuento de plaquetas por debajo de 100.000/µL; concentración de creatinina sérica mayor de 1.1 mg/dL; niveles de transaminasas elevadas; edema pulmonar; síntomas visuales o cerebrales [2].

La terminación del embarazo alivia los síntomas de la madre, sin embargo, la morbilidad aumenta en el niño, como consecuencia de prematuridad iatrogénica. Se ha estimado que 15% de los recién nacidos pretérmino se deben a preeclampsia, cuya

1.Centro de Biofísica y Bioquímica
2. Instituto Venezolano de Investigación Científica
Caracas.Venezuela

incidencia ha aumentado en los últimos años, en especial en los países en desarrollo [4, 5]. Por otra parte, si bien durante el embarazo existe aumento en el grado de peroxidación lipídica en la placenta humana, el fenómeno se hace mucho mayor en la placenta preeclámptica [6, 7] . El alto nivel de peroxidación lipídica que se produce en la placenta de la gestante preeclámptica, también afecta al feto. En este particular se ha reportado un aumento en los niveles de peroxidación lipídica en sangre de cordón umbilical de hijos de gestantes preeclámpticas en comparación con aquellos de gestantes normotensas [8].

En la búsqueda de la etiología de esta enfermedad, así como de lo que ocurre en los diversos órganos durante la preeclampsia, se han intentado desarrollar modelos animales, dado que este síndrome es exclusivo del embarazo humano [9]. Entre ellos, uno de los más sencillos, consiste en hacer ingerir a ratas embarazadas una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 1,8%, durante la última semana de gestación. En este modelo, las ratas presentan hipertensión, proteinuria, estrés oxidativo placentario, disminución del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y disminución relación peso feto/ peso placenta. [10, 11]. Además, se ha encontrado que los niveles de peroxidación lipídica se encuentran aumentados, en homogeneizados de placenta, en fantasmas de glóbulos rojos y plasma de ratas sometidas a ingesta crónica de NaCl al 1.8% durante la última semana del embarazo, siendo todo ello comparativo a lo que sucede en mujeres preeclámpticas. [12]. Se conoce que los hijos de ratas madres con el modelo experimental de preeclampsia nacen con un menor peso y las placentas también tienen un peso disminuido, producto de un elevado estrés oxidativo, por lo que el objetivo de este estudio es determinar, si los hijos de ratas con el modelo experimental de preeclampsia presentan o no alteraciones en los niveles de estrés oxidativo en la sangre e identificar el nivel de afectación materno y fetal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Los experimentos se realizaron con ratas machos de 30 días de edad, provenientes de madres de la cepa Sprague-Dawley, controles y con modelo experimental de preeclampsia. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en conformidad con el comité de bioética animal del instituto venezolano de investigaciones científicas (Cobianim), Caracas, Venezuela. Las ratas madres con el modelo experimental de preeclampsia se prepararon en el laboratorio de Bioenergética Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC. Para ello, ratas hembras vírgenes, fueron colocadas con machos fértiles. El día cero de embarazo, se tomó como aquel en el cual se observaban espermatozoides en el tracto vaginal de la rata. Todas las ratas hembras fueron mantenidas bajo control de luz (12 h luz - 12 h oscuridad), temperatura específica (~25°C) y tenían libre acceso a la comida. Las ratas grávidas controles, tenían para beber agua de chorro durante todo el periodo de embarazo. A las ratas grávidas experimentales, a partir del día 14, hasta el día 21 de gestación, se les colocó para beber solución de 1.8% NaCl. Durante el embarazo de ambos grupos, se llevó a cabo un control de peso. Las ratas hijas de madres controles y experimentales fueron pesadas al nacer y se mantenían con sus madres hasta el destete a los 30 días de haber nacido, llevando un control de peso de las crías. En ese momento se separaron de las madres y se seleccionaron ratas machos provenientes de una misma camada. Los machos así seleccionados eran anestesiados con inyección intraperitoneal de 100 mg/kg peso de Tiopental entre las 9 am y 9:30 am. Luego, eran abiertos por el abdomen y se extraía sangre total mediante punción cardíaca con una jeringa heparinizada.

Obtención de plasma y fantasmas de glóbulos rojos

La sangre heparinizada fue centrifugada a 12000 xg durante 5 minutos. El plasma que resultó de esta centrifugación fue removido cuidadosamente y se almacenó a -70ºC hasta su posterior uso. El paquete celular remanente fue utilizado para la preparación de los fantasmas de glóbulos rojos.

Esta preparación se llevó a cabo mediante modificación del método de Heinz y Hoffman [13]. Una vez obtenido el paquete celular de la centrifugación de la sangre heparinizada, los glóbulos rojos empaquetados fueron resuspendidos en una solución salina de NaCl (150 mM) y Tris-HCl (10 mM), pH 7,5 a 0°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados consecutivos con la misma solución bajo las mismas condiciones de obtención de plasma. El paquete de glóbulos rojos concentrados se hemolizó durante 10 min a 0°C en una solución conteniendo Tris-HCl (17 mM) y EDTA (0.1mM) a pH 7,5 a 0ºC, en una relación

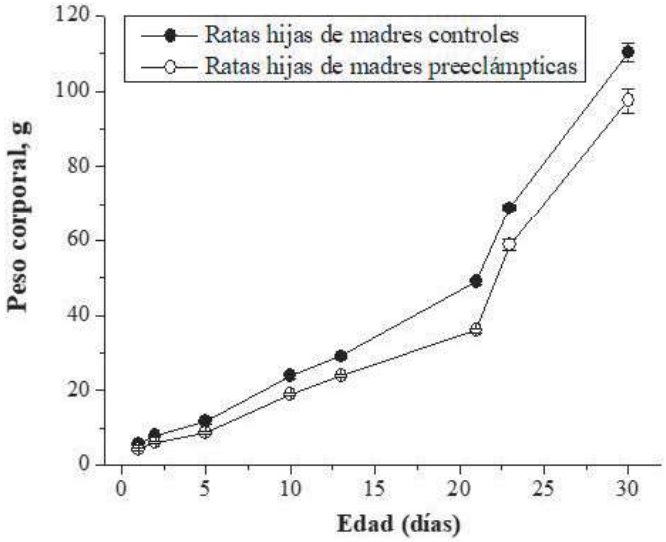

Figura 1. Variación del peso corporal de los hijos de madres sin administración de sobrecarga salina durante la última semana de gestación. Valores expresados como la media ± el error estándar, para n=5.

de 1 volumen de glóbulos rojos empaquetados por 9 volúmenes de solución de hemólisis, manteniéndose en agitación constante. La suspensión se centrifugó a 48.000 x g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue aspirado, el precipitado se volvió a resuspender en la misma solución de hemólisis y se realizaron lavados de 20 minutos, hasta obtener los fantasmas de glóbulos rojos libres de hemoglobina. Estos fueron almacenados a -70ºC hasta su posterior uso.

Ensayo de TBARS

Los niveles de peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos y plasmas sanguíneo fue estimado por la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) siguiendo el método descrito por Feix et al. [14] para los fantasmas de glóbulos rojos y utilizando una modificación del mismo, para los plasmas sanguíneos [12]. La absorbancia fue determinada a 540 nm, y los valores de TBARS fueron cálculos usando una curva estándar de malondialdehído (MDA), preparada por la hidrólisis acida 1,1-3,3-tetrametoxipropano (TMP). Los resultados son expresados como nmoles de MDA/ mg de proteína y nmoles de MDA/ml de plasma, respectivamente.

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos de los datos obtenidos, se realizaron utilizando la prueba t de Student, siendo (n) el número de animales que se utilizó en cada caso. Se aceptó como nivel de significancia estadística, una probabilidad menor a 0,05.

RESULTADOS

Variación del peso corporal de ratas hijas de madres, sometidas o no a sobrecarga salina durante la última semana de gestación.

En la **Figura 1** se presenta el peso ganado diariamente de las crías macho de madres sometidas o no a sobrecarga salina durante la última semana de gestación. Se puede observar que, si bien hay una diferencia en peso entre las crías de madres controles y madres experimentales, la tasa de aumento de peso durante el primer mes de vida de de estas crías, es prácticamente el mismo, siendo ambas curvas de crecimiento prácticamente paralelas. Al final del primer mes de vida de dichas ratas, el peso final fue de 110,3 ± 2,6 g en las crías controles y 97,5 ± 3,2 g en las crías experimentales ($p<0,02$, n=5).

Niveles de peroxidación lipídica, medidos en TBARS, en el plasma sanguíneo y en fantasmas de glóbulos rojos de ratas hijas de madres, sometidas o no a sobrecarga salina durante la última semana de gestación

En la **Tabla I** se presentan los resultados de los niveles de peroxidación lipídica, medidos como TBARS, en plasma sanguíneo y fantasmas de glóbulos rojos de crías de madres controles y experimentales (1,8% NaCl). Nótese como los valores de TBARS del

TABLA I. Niveles de peroxidación lipídica (medidos como TBARS) en plasma sanguíneo y fantasmas de glóbulos rojos de hijos de ratas madres, sometidas o no a sobrecarga salina durante la última semana de gestación.

Condición	TBARS	
	Plasma sanguíneo (nmoles MDA/ml plasma)	Fantasmas de Glóbulos Rojos (nmoles MDA/mg proteína)
Control	1,50 ± 0,09 (6)	0,51 ± 0,06 (6)
Sobrecarga salina	2,30 ± 0,25* (6)	0,83 ± 0,07* (6)

La edad de los hijos de las ratas fue de 30 días. El plasma sanguíneo y los fantasmas de glóbulos rojos fueron obtenidos como se indica en Material y Métodos. Valores expresados como la media ± el error estándar. Los números entre paréntesis indican el número de animales utilizados en cada determinación. * p < 0,01

plasma sanguíneo y de los fantasmas de glóbulos rojos de las crías de madres experimentales (1,8% NaCl) son significativamente mayores que los valores encontrados para las crías de madres controles. Estas diferencias, de ninguna manera, pueden ser atribuidas a procesos de estrés o estatus nutricional, ya que ambos grupos de ratas estuvieron sometidas a un mismo período de luz-oscuridad, humedad, nivel de ruido y variaciones de temperatura durante el día. Además, ambos grupos de animales recibieron agua y alimento ad libitum, sin ningún tipo de restricción.

DISCUSIÓN

La preeclampsia es la mayor causa de morbilidad y mortalidad materno-fetal [15-17]. Los mecanismos responsables de la patogénesis de la preeclampsia no están claros, sin embargo, se conoce que la placenta es factor clave en la patología [18], ya que, para que pueda existir preeclampsia, tiene que haber placenta. De hecho, la hipoperfusión uteroplacentaria que se produce durante la preeclampsia, lleva a un aumento del estrés oxidativo y dispara una cascada de respuestas inflamatorias, activación y daño en células endoteliales en todo el organismo, lo que al final se traduce en trastornos hemodinámicos en el medio [1], que afectan tanto a la madre como al feto.

Aunque no existe indicación en la literatura de que la incidencia de la preeclampsia se incrementa con el consumo de NaCl o que, alternativamente, el bajo consumo de NaCl previene el desarrollo de la hipertensión gestacional se ha demostrado que el aumento o disminución en la ingesta de NaCl en la dieta ha sido causante de trastornos hemodinámicos, tanto en humanos como en ratas [10, 19, 20], viéndose alteraciones en la presión arterial, porcentaje de hematocrito, volemia, aumento de peso, entre otros.

Varios estudios epidemiológicos (20,21) apoyan el hecho de que un aumento en el consumo de sal, promueve el desarrollo de hipertensión en humanos [21] y una reducción o "normalización" de la presión arterial puede ser llevada a cabo por cambios en el estilo de vida y, entre estos cambios, la restricción de la ingesta de NaCl en la dieta es frecuentemente recomendada para proteger en contra de incrementos de la presión sanguínea [20]. Esto no es diferente para las mujeres embarazadas, sobre todo si estas presentan un alto factor de riesgo de desarrollar hipertensión inducida por el embarazo o, aún más grave, desarrollar preeclampsia.

No obstante, en ratas vírgenes normotensas el aumento de la ingesta de sodio, durante un período relativamente corto de tiempo, no conlleva a cambios en la presión arterial o en la reactividad vascular [20, 22]. Estudios realizados en ratas embarazadas demostraron que esta condición gestacional las hace más susceptibles a los efectos provocados por un aumento en consumo de NaCl en la dieta [10], al ser comparadas con ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento. Específicamente, se reportó un incremento en la presión arterial al día siguiente de comenzada la ingesta de solución 1,8% NaCl, la cual sigue en aumento hasta el día 22 del embarazo [12, 23]. Las ratas vírgenes, por el contrario, mantuvieron la presión arterial constante durante los 8 días de la

ingesta de solución 1,8% NaCl. Adicional a ello, se presentan también varios de las signos conocidos para la preeclampsia, tales como decrecimiento en la actividad del sistema renina angiotensina aldosterona (RAAS), proteinuria, decrecimiento en el volumen circulatorio, estrés oxidativo placentario, entre otros [11].

En trabajos realizados por Beauséjour et al. [11], y en nuestro laboratorio [12], se ha demostrado que la ingesta de una solución de 1,8% NaCl por ratas embarazadas en la última semana del embarazo, trae como consecuencia un aumento del estrés oxidativo en la placenta, plasma sanguíneo y fantasmas de glóbulos rojos. El estrés oxidativo es un proceso de oxidación de los diferentes componentes de la célula, el cual está mediado por radicales libres y, en particular en los tejidos biológicos, por especies reactivas derivadas del oxígeno [24]. El ataque por radicales libres a los fosfolípidos de membrana se centra fundamentalmente en el proceso de peroxidación lipídica de los residuos de ácidos grados de estos fosfolípidos. Se considera que el proceso de peroxidación lipídica ocasiona cambios en la composición química y deterioros en la organización ultraestructural de las membranas celulares [25, 26], disminuyendo la fluidez de las mismas, alterando su permeabilidad e inactivando receptores y enzimas unidas a la membrana [25, 27]. Células circulantes de la sangre como glóbulos rojos, plaquetas y leucocitos, pueden ser oxidados durante su paso por la placenta con altos niveles de estrés oxidativo, llevando de esta manera la peroxidación lipídica a diferentes tejidos.

Los hidroperóxidos lipídicos producidos como una consecuencia del daño en los tejidos por estrés oxidativo, pueden promover la peroxidación lipídica localmente o en lugares distantes al área del daño inicial [28, 29]. Nuestros hallazgos indican claramente que hay un incremento significativo en los niveles de TBARS en el plasma y en los fantasmas de glóbulos rojos de las crías del modelo animal de preeclampsia, comparado con las crías de ratas controles (Tabla I). Esto indicaría que el daño producido en los sistemas de defensa antioxidante materno en el modelo animal de preeclampsia, no solo se transmite verticalmente de la madre a los fetos, sino que, además, el daño oxidativo se mantiene, por lo menos durante el primer mes de vida de las crías. Esto es sumamente importante para el funcionamiento de los distintos órganos de las crías, ya que el proceso de peroxidación lipídica está asociado con diversos procesos patológicos [30]. Hay que destacar que la elevación de los niveles de peroxidación lipídica se ha reportado previamente en sangre de cordón umbilical proveniente de mujeres preeclámpticas [8, 31], lo cual está de acuerdo con nuestros resultados. Por otro lado, el que los hijos de las gestantes preeclámpticas mantengan elevados los niveles de peroxidación lipídica, es algo que debiera ser estudiado, poniendo atención a los resultados del presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. E. Eiland, C. Nzerue, M. Faulkner, Preeclampsia 2012, J Pregnancy, 2012 (2012) 586578.
2. A.R. Vest, L.S. Cho, Hypertension in pregnancy, Curr. Atheroscler. Rep., 16 (2014) 395.
3. S. Baumwell, S.A. Karumanchi, Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms, Nephron Clin Pract, 106 (2007) c72-81.
4. K. Kanasaki, R. Kalluri, The biology of preeclampsia, Kidney Int, 76 (2009) 831-837.
5. Program NHBPE, Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of the National High Blood Pressure Education Program, Am J Obstet Gynecol, 183 (2000) S1-S22.
6. C. Abad, M. Carrasco, S. Piñero, E. Delgado, D. Chiarello, A. Teppa-Garrán, T. Proverbio, F. Proverbio, R. Marín, Effect of magnesium sulfate on the osmotic fragility and lipid peroxidation of intact red blood cells from pregnant women with severe preeclampsia, Hypertension Preg, 29 (2010) 38-53.
7. Z. Serdar, E. Gur, O. Develioglu, M. Colakogullari, M. Dirican, Placental and decidual lipid peroxidation and antioxidant defenses in preeclampsia. Lipid peroxidation in preeclampsia, Pathophysiology, 9 (2002) 21.
8. M.M. Carreiras, T. Proverbio, F. Proverbio, R. Marín, Preeclampsia and calcium-ATPase activity of red cell ghosts from neonatal and maternal blood, Hypertens Pregnancy, 21 (2002) 97-107.
9. E. Podjarny, G. Losonczy, C. Baylis, Animal models of preeclampsia, Semin Nephrol, 24 (2004) 596-606.
10. A. Beauséjour, K. Auger, J. St-Louis, M. Brochu, High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 285 (2003) H375-383.
11. A. Beauséjour, K. Bibeau, J.C. Lavoie, J. St-Louis, M. Brochu, Placental oxidative stress in a rat model of preeclampsia, Placenta, 28 (2007) 52-58.
12. D. Rojas, F. Rodríguez, J. Barraez, S. Piñero, D.I.

Chiarello, C. Abad, R. Marín, F. Proverbio, Osmotic fragility of red blood cells, lipid peroxidation and Ca2+-ATPase activity of placental homogenates and red blood cell ghosts in salt-loaded pregnant rats, J Matern Fetal Neonatal Med, 29 (2016) 229-233.
13. E. Heinz, J.F. Hoffman, Phosphate incorporation of Na+,K+ ATPase activity in human red blood cell ghost, J Cell Comp Physiol, 54 (1965) 31-44.
14. J.B. Feix, G.J. Bachowski, A.W. Girotti, Photodynamic action of merocyanine 540 on erythrocyte membranes: structural perturbation of lipid and protein constituents, Biochim. Biophys. Acta, 1075 (1991) 28-35.
15. Y. Bdolah, S.A. Karumanchi, B.P. Sachs, Recent advances in understanding of preeclampsia, Croat. Med. J., 46 (2005) 728-736.
16. N.M. Page, The endocrinology of pre-eclampsia, Clin Endocrinol (Oxf), 57 (2002) 413-423.
17. J.J. Walker, Pre-eclampsia, Lancet, 356 (2000) 1260-1265.
18. J.P. Granger, B.T. Alexander, M.T. Llinas, W.A. Bennett, R.A. Khalil, Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction, Hypertension, 38 (2001) 718-722.
19. M.R. Weir, D.R. Dengel, M.T. Behrens, A.P. Goldberg, Salt-induced increases in systolic blood pressure affect renal hemodynamics and proteinuria, Hypertension, 25 (1995) 1339-1344.
20. L. dos Santos, M.V. Goncalves, D.V. Vassallo, E.M. Oliveira, L.V. Rossoni, Effects of high sodium intake diet on the vascular reactivity to phenylephrine on rat isolated caudal and renal vascular beds: Endothelial modulation, Life Sci, 78 (2006) 2272-2279.
21. E.D. Freis, Salt, volume and the prevention of hypertension, Circulation, 53 (1976) 589-595.
22. K. Matrougui, L. Loufrani, B.I. Levy, D. Henrion, High NaCl intake decreases both flow-induced dilation and pressure-induced myogenic tone in resistance arteries from normotensive rats: involvement of cyclooxygenase-2, Pharmacol Toxicol, 89 (2001) 183-187.
23. D. Rojas, C. Abad, S. Piñero, Y. Medina, D.I. Chiarello, F. Proverbio, R. Marín, Effect of Mg-gluconate on the osmotic fragility of red blood cells, lipid peroxidation and Ca2+-ATPase (PMCA) activity of placental homogenates and red blood cell ghosts from salt-loaded pregnant rats, Front Physiol, 13 (2022) 794572.
24. R. Marín, T. Proverbio, A. Rodríguez, G. Tiskow, Peroxidación lipídica y actividades ATPásicas, Acta Cient. Venez., 44 (1993) 125-130.
25. G.B. Bulkley, The role of oxygen free radicals in human disease processes, Surgery, 94 (1983) 407-411.
26. J.M.C. Gutteridge, B. Halliwell, The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems, TIBS, 15 (1990) 129-135.
27. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Free radicals in biology and medicine, Fifth ed., Oxford University Press, NYC, USA, 2015.
28. T. Slater, Lipid peroxidation and intracellular messegers in relation to cell injury, Agents and Actions, 22 (1987) 333-334.
29. A. Szczeklik, R.J. Gryglewski, Low density lipoproteins (LDL) are carriers for lipid peroxides and inhibit prostacyclin (PGI2) biosynthesis in arteries, Artery, 7 (1980) 488-495.
30. B. Halliwell, J. Gutteridge, Free radicals, aging and disease, Free radicals in biology and medicine, (1989) 416-508.
31. S. Mehendale, A. Kilari, K. Dangat, V. Taralekar, S. Mahadik, S. Joshi, Fatty acids, antioxidants, and oxidative stress in pre-eclampsia, Int J Gynaecol Obstet, 100 (2008) 234-238.

Prof. Dr. Reinaldo Marín
reinaldomarin@gmail.com
Caracas. Venezuela