



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



MARCADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN  
LA PREECLAMPSIA DE MUJERES CHILENAS

**RODRIGO MESSINA MÉNDEZ**

Memoria para optar al Título Profesional  
de Médico Veterinario Departamento de  
Ciencias Biológicas Animales.

PROFESOR GUIA: Prof. Dr. RAMÓN RODRIGO SALINAS

SANTIAGO, CHILE  
2005

## ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	: Oxígeno singlete o singulete
ADMA	: Dimetil-arginina asimétrica
ADN	: Ácido desoxiribonucleico
ALT	: Alanina aminotransferasa
ARNm	: Ácido Ribonucleico mensajero
AST	: Aspartato aminotransferasa
CAT	: Catalasa
eNOS	: Óxido nítrico sintasa endotelial
ERO	: Especies reactivas del oxígeno
FRAP	: Ferric reducing ability of plasma
GSH	: Glutación reducido
GSH-Px	: Glutación peroxidasa
GSSG	: Glutación oxidado
$\text{H}_2\text{O}_2$	: Peróxido de hidrógeno
HELLP	: Hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y bajo recuento plaquetario.
HIF-1 $\alpha$	: Factor de transcripción inducido por hipoxia
$\text{HO}_2\bullet$	: Radical perhidroxilo
ICAM-1	: Molécula de adhesión intercelular 1
kDa	: Kilodalton
MDA	: Malondialdehido
NF-kB	: Factor nuclear kappa-B
NO	: Óxido nítrico
$\text{NOO}\bullet$	: Dióxido de nitrógeno
NOS	: Óxido nítrico sintasa
$\text{O}_2\bullet^-$	: Anión superóxido
$\text{OH}\bullet$	: Radical hidroxilo
ONOO-	: Peroxinitrito

PAI-1	: Inhibidor del activador del plasminógeno 1 (endotelial)
PAI-2	: Inhibidor del activador del plasminógeno 2 (placentario)
PE	: Preeclampsia
PIGF	: Factor de crecimiento placentario
PUFA	: Ácidos grasos poli-insaturados
RCF	: Restricción del crecimiento fetal
sFlt1	: Factor soluble fms-like tyrosine kinase 1
SOD	: Superóxido dismutasa
TGF-β3	: Factor de crecimiento transformante-beta 3
TM	: Trombomodulina
VEGF	: Factor de crecimiento del endotelio vascular
vWF	: Factor de von Willebrand

# INDICE

	<i>Página</i>
<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>SUMMARY</b> .....	iii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 Generalidades.....	3
2.2 Características de la Preeclampsia .....	4
2.3 Etiopatogenia de la Preeclampsia .....	5
2.3.1 <i>Alteración de la Perfusión Placentaria</i> .....	7
2.3.2 <i>Disfunción endotelial</i> .....	9
2.4 Papel del Estrés Oxidativo en la Preeclampsia .....	14
2.4.1 <i>Sistema de Defensa Antioxidante</i> .....	21
2.4.1.1 <i>Enzimas Antioxidantes</i> .....	22
2.4.1.1.1 <i>Superóxido dismutasa</i> .....	22
2.4.1.1.2 <i>Catalasa</i> .....	23
2.4.1.1.3 <i>Glutación peroxidasa</i> .....	24
2.4.1.2 <i>Moléculas o sustancias antioxidantes</i> .....	26
2.4.2 <i>Daño sobre Biomoléculas</i> .....	28
2.4.2.1 <i>Lipoperoxidación</i> .....	28
2.4.2.2 <i>Daño oxidativo de las proteínas</i> .....	31
2.4.3 <i>Efecto sobre enzimas de membrana</i> .....	32
2.5 Predictores de Preeclampsia .....	33
2.5.1 <i>Factores de riesgo de la historia clínica y embarazo actual</i> .....	33
2.5.2 <i>Presión Arterial</i> .....	34
2.5.3 <i>Ácido úrico</i> .....	34
2.5.4 <i>Proteinuria</i> .....	34
2.5.5 <i>Doppler de las arterias uterinas</i> .....	35

2.6	Profilaxis en Preeclampsia .....	37
2.6.1	<i>Suplemento de calcio</i> .....	37
2.6.2	<i>Aspirina</i> .....	37
2.6.3	<i>Suplemento de ácidos grasos omega 3</i> .....	38
2.6.4	<i>Suplemento de vitaminas antioxidantes</i> .....	39
3.	<b>OBJETIVOS</b> .....	41
3.1	Objetivo general .....	41
3.2	Objetivos específicos .....	41
4.	<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	42
4.1	Diseño .....	42
4.2	Criterios de exclusión tamaño muestral .....	43
4.3	Técnicas analíticas y bioquímicas aplicadas .....	45
4.3.1	<i>Variables bioquímicas de defensas antioxidantes</i> .....	45
4.3.1.1	<i>Superóxido dismutasa</i> .....	45
4.3.1.2	<i>Catalasa</i> .....	45
4.3.1.3	<i>Glutación peroxidasa</i> .....	46
4.3.1.4	<i>Capacidad antioxidante del plasma (FRAP)</i> .....	47
4.3.2	<i>Variables bioquímicas de estrés oxidativo:</i> <i>lipoperoxidación y oxidación de proteínas</i> .....	47
4.3.2.1	<i>Malondialdehido</i> .....	47
4.3.2.2	<i>F<sub>2</sub>-Isoprostanos</i> .....	48
4.3.2.3	<i>Carbonilación de proteínas</i> .....	48
4.3.3	<i>Efectos sobre enzimas de membrana:</i> <i>Actividad de (Na<sup>+</sup> – K<sup>+</sup>) – ATPasa</i> .....	49
4.3.4	<i>Determinación de hemoglobina</i> .....	49

4.3.5	<i>Determinación del contenido total de proteínas</i> .....	
	49	
4.4	Análisis Estadístico .....	50
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	51
5.1	Pacientes .....	51
5.2	Variables bioquímicas de defensas antioxidantes .....	52
5.3	Variables bioquímicas de estrés oxidativo:	
	lipoperoxidación y oxidación de proteínas .....	57
5.4	Efectos Sobre Enzimas de Membrana:	
	actividad de $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPasa}$ .....	61
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	63
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	68
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	69
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	85
9.1	Características gestacionales de pacientes controles y con PE .....	85

## RESUMEN

La fisiopatología de la preeclampsia incluiría una disfunción endotelial, que estaría mediada por estrés oxidativo.

El objetivo de esta memoria fue establecer la presencia de estrés oxidativo a través de parámetros bioquímicos del plasma, de eritrocitos y de la placenta y compararlos en mujeres con embarazos normales y con PE al término del embarazo. Se realizó un estudio de tipo retrospectivo seleccionando mujeres embarazadas chilenas controladas en el Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Clínico de la Universidad de Chile. A un grupo de 30 mujeres con PE y a otro grupo de 30 mujeres con embarazo normal (control) se les tomó muestras de plasma, eritrocitos y placenta al término del embarazo.

Se realizaron determinaciones de las defensas antioxidantes a nivel plasmático, tales como la capacidad antioxidante del plasma (FRAP, ferric reducing ability of plasma) y a nivel tisular (eritrocitos y placenta), a través de evaluar la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px). Por otro lado el estrés oxidativo se cuantificó mediante los índices de lipoperoxidación [ $F_2$ -isoprostanos libres y malondialdehido (MDA)] y de carbonilación de proteínas (grupos carbonilos), analizando su impacto en la actividad enzimática de la  $(Na^+ + K^+) - ATPasa$  en eritrocitos y placenta.

Las mujeres con PE, respecto de sus controles, presentaron valores menores de FRAP, en plasma, de actividad de SOD, CAT y GSH-Px en eritrocitos y de actividad de SOD y CAT en placenta ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, se

detectó una mayor lipoperoxidación en las mujeres con PE respecto de sus controles, lo que se reflejó tanto en los elevados niveles plasmáticos de F<sub>2</sub>-isoprostanos libres en plasma como en el contenido de malondialdehído en eritrocitos y placenta ( $p < 0.05$ ). La carbonilación de proteínas en plasma fue mayor en las pacientes preeclámpticas que sus controles ( $p < 0.05$ ), confirmando el mayor nivel de estrés oxidativo en las primeras. También se detectó que la actividad enzimática de la (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>) – ATPasa, tanto en eritrocitos como en placenta, era menor en las pacientes con PE que en sus controles ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados apoyan la participación del estrés oxidativo en la patogenia de la PE y proporcionan las bases para la aplicación de un tratamiento precoz con antioxidantes, con el propósito de prevenir o atenuar aquellas manifestaciones derivadas de un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno.



## SUMMARY

The pathophysiology of preeclampsia has been related with the involvement of endothelial dysfunction, which could be mediated by oxidative stress.

The aim of the present thesis was to compare the occurrence of oxidative stress through the assessment of biochemical parameters in plasma, erythrocytes and placenta of women with normal pregnancies and of those with PE, at the end of pregnancy. A cohort retrospective case-control study was carried out over a population of pregnant women controlled at the Department of Obstetrics and Gynecology, Clinical Hospital, University of Chile. Samples of plasma, erythrocytes and placenta were obtained from a group of 30 women with PE (cases) and a group of 30 women with normal pregnancies (controls), at the end of pregnancy.

The samples served to perform determinations of antioxidant defenses in plasma, such as antioxidant capacity of plasma (FRAP, ferric reducing ability of plasma), and at tissue level (erythrocytes and placenta), such as the activity of antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px)]. The quantitative estimation of oxidative stress was made through the indexes of lipid peroxidation [ free F<sub>2</sub>-isoprostanes and malondialdehyde (MDA)] and of protein carbonylation (carbonyl groups), assessing its impact on the activity of (Na<sup>+</sup> – K<sup>+</sup>) – ATPase in erythrocytes and placenta.

Women with PE, respect to their controls, showed lower values of FRAP in plasma, of SOD, CAT y GSH-Px activity in erythrocytes and of SOD y CAT

activity in placenta ( $p < 0.05$ ). On the other hand, an increased lipid peroxidation was detected in women with PE, as compared with their controls, what was reflected either in elevated plasma levels of free  $F_2$ -isoprostanos as well as in the higher content of MDA in erythrocytes and placenta ( $p < 0.05$ ). Protein carbonylation in plasma proteins of preeclamptic women was higher than their respective controls ( $p < 0.05$ ), thus confirming the increased level of oxidative stress in the first group. Also, a lower activity of  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase activity was found in erythrocytes and placenta of patients with PE ( $p < 0.05$ ).

These data support the involvement of oxidative stress in the pathophysiology of PE and could provide the basis for the application of an early treatment based on antioxidants, with the purpose to prevent or attenuate the manifestations derived from an increase of reactive oxygen species.

## 1. INTRODUCCIÓN

La preeclampsia (PE) es uno de los mayores problemas en la salud de la mujer embarazada y una de las principales causas de morbi-mortalidad materna y perinatal, en especial aquellas denominadas severas, que alcanzan aproximadamente el 50% del total de este síndrome (Llurba *et al.*, 2004). La incidencia de PE, tanto en Chile como en el resto del mundo, es variable alcanzando entre el 3 al 7% de las embarazadas. El cuadro clínico se caracteriza por una tríada clásica de hipertensión arterial, proteinuria y edema, que desaparece completamente luego del parto. Su diagnóstico generalmente se realiza durante la segunda mitad del embarazo (Davison *et al.*, 2004). Esta patología se asocia también a una mayor frecuencia de restricción del crecimiento fetal (RCF) y a partos prematuros.

La etiopatogenia de esta enfermedad aún es desconocida. Se han formulado diversas teorías para explicar el mecanismo patogénico de la PE, siendo la más aceptada la teoría toxémica, la cual ha sufrido una serie de modificaciones desde su postulación. De acuerdo con esta teoría, este síndrome se caracterizaría por una alteración de la migración del trofoblasto extravelositario a partir de las 12 semanas de gestación. Esta invasión trofoblástica defectuosa llevaría a que la circulación útero-placentaria permanezca en un estado de alta resistencia durante la gestación, lo que produciría una hipoperfusión del territorio útero-placentario generando un factor desconocido que llevaría a la disfunción del endotelio vascular (Burton y Jauniaux, 2004). Existen diversas alternativas para este factor desconocido sintetizado en la placenta, entre las cuales se incluye al estrés oxidativo, al déficit de óxido nítrico (NO), al exceso de dimetil-arginina asimétrica

(ADMA), al incremento de homocisteína plasmática y al aumento de factores antiangiogénicos, entre otros. Sin embargo, el estrés oxidativo también podría ser el resultado de procesos de isquemia-reperfusión, aunque en ambos casos los productos de lipoperoxidación podrían jugar un papel como mediadores de la disfunción del endotelio vascular materno, contribuyendo así a explicar la activación de la cascada de la coagulación y el daño multisistémico observado en esta patología.

No se ha encontrado una intervención terapéutica que evite o retarde la aparición de esta enfermedad y la opción actual sólo consiste en la interrupción del embarazo, ya sea electivo o de urgencia, como el único medio efectivo actual para manejarla. Tampoco se ha validado un método de detección precoz con alto valor predictivo de la enfermedad, ya que el método de pesquisa de PE más aceptado en la práctica clínica es la medición de la resistencia de las arterias uterinas a través de la flujometría Doppler, sin embargo, este procedimiento permite detectar hechos que ocurren en forma tardía en el proceso preeclámptico.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Generalidades

La PE es un síndrome multisistémico propio del embarazo de mujeres, siendo uno de los problemas más importantes de la salud de la mujer embarazada y su hijo no-nacido y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y neonatal, que puede incluso causar abortos espontáneos (Wang *et al.*, 2004). Esta patología además puede causar restricción del crecimiento fetal y partos prematuros iatrogénicos, esto último es debido a que el único tratamiento conocido en la actualidad frente a la aparición de alguna de las manifestaciones de este síndrome clínico es la interrupción del embarazo. La tasa de parto prematuro asociado a esta condición alcanza al 15% como también el 40% de las causas de inducción del parto (Merviel *et al.*, 2004). Es un síndrome complejo de etiología aún indeterminada, diagnosticado generalmente durante la segunda mitad del embarazo, después de la vigésima semana de gestación, con las características clínicas de hipertensión, proteinuria y edema que desaparecen después del parto (Davison *et al.*, 2004). La hipertensión en este caso es definida como un incremento de las cifras de presión arterial sistólica por sobre 140 mm Hg y una presión arterial diastólica por sobre 90 mm Hg después de la semana 20 de gestación en pacientes previamente normotensas (Roberts *et al.*, 2003). Los desórdenes hipertensivos del embarazo complican alrededor del 10% de los embarazos, de estos desórdenes aproximadamente el 70% tienen como causa el embarazo propiamente tal (hipertensión relacionada con PE-eclampsia) y el 30% restante son debidos a una condición de hipertensión preexistente (hipertensión crónica) (Afifi y Churchill, 2003). La proteinuria se define como una excreción mayor de 300 mg en una recolección de orina de 24 horas (Moretti *et al.*, 2004),

con resolución de la hipertensión y de la proteinuria alrededor de 12 semanas post-parto (Maynard *et al.*, 2003). A pesar de las décadas de intensa investigación y del gran avance en el conocimiento de esta entidad patológica, sobre todo en los últimos 10 años, la etiología de este desorden exclusivo al embarazo es aún un enigma (Schlembach, 2003), aunque existen evidencias que la enfermedad es absolutamente dependiente de la presencia de la placenta (Hubel, 1999). Además de no conocer la causa de esta enfermedad, tampoco existe hasta hoy una intervención terapéutica para prevenirla, excepto la interrupción del embarazo (Bilodeau y Hubel, 2003).

## **2.2 Características de la Preeclampsia**

La PE es una de las enfermedades que causa más muertes maternas en nuestro país. Si no se la trata, puede causar problemas severos tanto en las madres como también en los fetos. En casos graves puede generar derrame cerebral en las mujeres preeclámplicas debido a la hipertensión. Con respecto a las consecuencias que esta enfermedad puede causar en los fetos está la RCF, debido a que hipertensión arterial contrae los vasos sanguíneos del útero, disminuyendo el suministro de oxígeno y nutrientes al bebé. Además de causar partos prematuros iatrogénicos con la consecuencia de neonatos débiles y posiblemente la muerte fetal.

Asociada a la PE se describe la eclampsia, la cual se define como la ocurrencia de convulsiones en asociación con el síndrome de PE. La presencia de la eclampsia en Europa y otros países desarrollados corresponde a aproximadamente 1 en 2.000 partos, mientras que en países en vías de desarrollo

las estimaciones varían entre 1 en 100 y 1 en 1.700. El 38% se presenta antes del parto, el 44% en el post-parto y el 18% durante el parto. Se cree que la eclampsia provoca alrededor de 50.000 muertes maternas mundiales al año (Reingardiene, 2003).

Otra complicación severa en las mujeres con PE es el síndrome HELLP [(H) hemólisis (“hemolysis”), (EL) enzimas hepáticas elevadas (“elevated liver enzymes”) y (LP) bajo recuento plaquetario (“low platelet count”)], que afecta al 20% de las mujeres que sufren PE severa, (Aslan *et al.*, 2004). Este síndrome se caracteriza por hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, niveles de bilirrubina indirecta elevada, niveles bajos de haptoglobina en el suero y trombocitopenia (menor a 100.000/mm). Después de eliminar otras causas posibles de hemólisis y trombocitopenia (Sibai, 2004), este síndrome incrementa notablemente el índice de mortalidad neonatal, la necesidad de ventilación mecánica y de cuidado intensivo neonatal (Aslan *et al.*, 2004).

### **2.3 Etiopatogenia de la Preeclampsia:**

La causa y el mecanismo responsable de este trastorno ha sido materia de intenso debate por muchos años, y a pesar de ello, en la actualidad constituye un problema aún no dilucidado (Lyell *et al.*, 2003). En un comienzo se planteó que pudiera estar involucrado un gen dominante, con una penetración reducida o una herencia multifactorial (Arngrimsson *et al.*, 1990). Posteriormente se propuso también, la existencia de un factor inmunológico “anti-paterno”, ya que es más frecuente en el primer embarazo y tras un cambio de pareja o una breve vida sexual antes de la gestación con PE (Robillard *et al.*, 1994).

En estos últimos años se han sugerido diferentes causas o predisposiciones subyacentes de la enfermedad (Schlembach, 2003) como son la invasión trofoblástica deficiente (Burton y Jauniaux, 2004), la disfunción endotelial (Wang *et al.*, 2004), el estrés oxidativo (Moretti *et al.*, 2004), factores genéticos (Roberts y Cooper, 2001), mala-adaptación inmune materna-fetal (Dekker y Sibai, 1999), o una combinación de éstas o incluso una potenciación entre ellas (Schlembach, 2003). Incluso algunos autores proponen que la patogenia de la PE no puede ser explicada por un solo mecanismo, sino por varias vías independientes, como son una función placentaria anormal, factores genéticos de la madre y factores genéticos del feto. Esto explicaría los factores de riesgo de la historia clínica, por lo tanto, la segregación de la enfermedad humana en subtipos diferentes puede ser una llave para identificar factores de riesgo genéticos (Cross, 2003).

Dado lo anterior, la teoría toxémica es la más aceptada en la actualidad, la cual indicaba la existencia de un estado de sub-perfusión placentaria, secundaria a una migración trofoblástica defectuosa (Meekins *et al.*, 1994), aunque se han realizado modificaciones a la teoría original, y por ello hoy en día se ha propuesto un modelo de dos etapas (Figura 1):

- Etapa 1. Alteración de la perfusión placentaria
- Etapa 2. Disfunción endotelial.



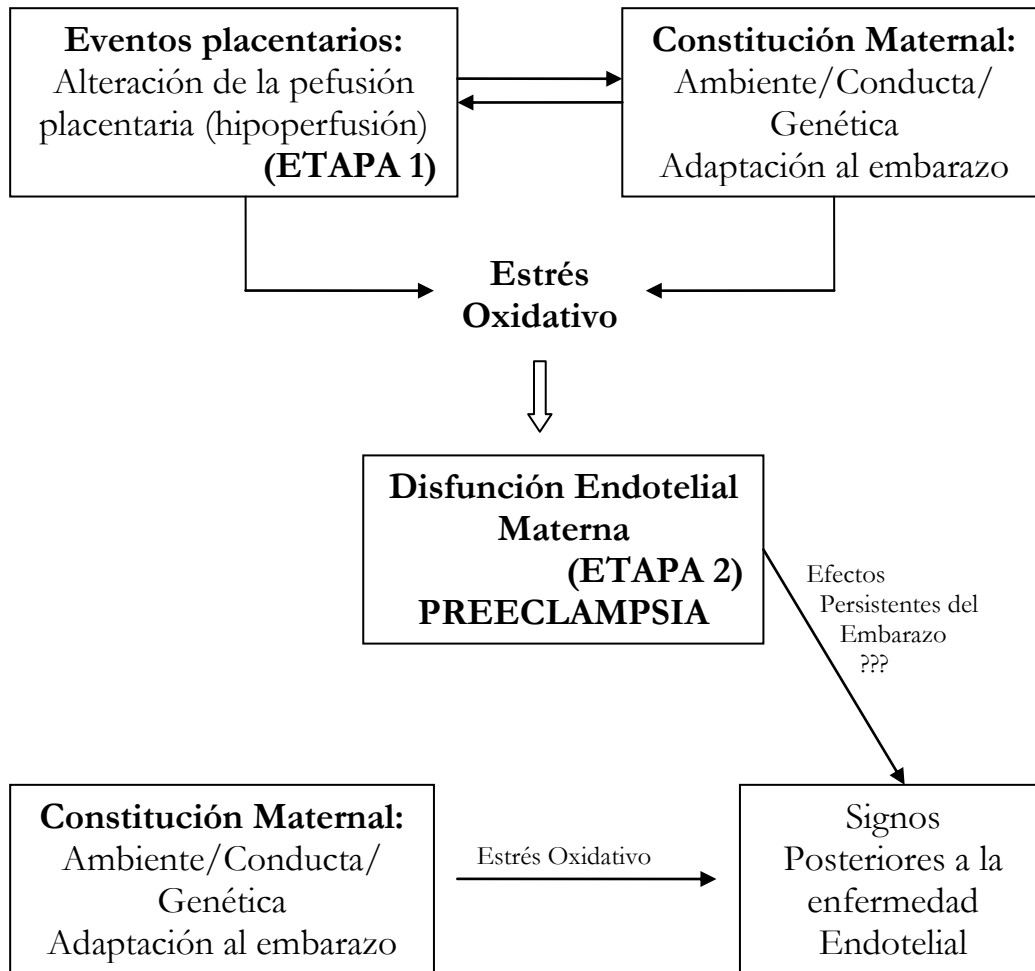


Figura 1: Modelo sugerido de 2 etapas de la preeclampsia  
(Fuente: Bilodeau y Hubel, 2003)

### 2.3.1 Etapa 1: Alteración de la Perfusión Placentaria

Dado el modelo anterior la PE representa un espectro de desórdenes secundarios a una invasión deficiente del trofoblasto o incluso una mala implantación (Merviel *et al.*, 2004). La placentación fisiológica comprende dos etapas, la primera donde predomina un citotrofoblasto con fenotipo de

proliferación hasta las 12 semanas de gestación, caracterizándose por una hipoxia relativa, con aumento del factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), aumento del factor de crecimiento transformante-beta 3 (TGF- $\beta$ 3), aumento de citoquinas inflamatorias y aumento del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). La segunda etapa, que comenzaría a las 12 semanas de gestación, consistiría en un cambio del citotrofoblasto de las vellosidades troncales hacia un fenotipo invasor (trofoblasto extravelositario), el cual es mediado por cambios en la presión parcial de oxígeno en el espacio intraveloso. Estas modificaciones llevan a una disminución del HIF-1 $\alpha$  y TGF- $\beta$ 3. El trofoblasto extravelositario invade el útero y también migra a las arterias espirales transformándolas en grandes vasos de baja resistencia.

En la PE, la invasión deficiente del trofoblasto en la gestación temprana hacia las arterias espirales sería la responsable de la mala adaptación de la circulación útero/placentaria (Burton y Jauniaux, 2004). La invasión deficiente del trofoblasto y la subsecuente remodelación de las arterias espirales en mujeres preeclámplicas resultarían en un diámetro de las arterias espirales de sólo un 40% respecto a los hallados en embarazos normales (Wilson *et al.*, 2003). Normalmente, las arterias espirales son remodeladas por el trofoblasto mediante invasión de sus paredes causando reemplazo de la capa muscular y de la lámina elástica interna (Haddad, 2002). Al existir una invasión deficiente se convierte el sistema placentario normal de alto flujo y baja resistencia en un sistema de bajo flujo y alta resistencia (puede ser detectada clínicamente por la velocimetría Doppler de las arterias uterinas). Como consecuencia, resulta una isquemia placentaria, que se cree es el desencadenante de este cuadro clínico, a través de sustancias liberadas por el útero o la placenta isquémica que afecta la función endotelial (Roberts y Cooper, 2001). La perfusión placentaria debido a lo anterior

se deteriora en mayor o menor grado, generando estrés oxidativo a nivel placentaria (Burton y Jauniaux, 2004), de hecho, la perfusión es disminuida prácticamente en todos los órganos (VanWijk, 2002). También, el compromiso de perfusión podría ser el resultado de activación de la cascada de coagulación, sobre todo plaquetarias, con la formación de microtrombos. Este probable estado de isquemia-reperusión generaría un estado de estrés oxidativo que provocaría un incremento de los radicales libres [Los radicales libres son las especies químicas que poseen un electrón desapareado que se puedan considerar como fragmentos de moléculas y que son generalmente muy reactivas (Cheeseman y Slater, 1993)] que daría como resultado un daño en las células endoteliales y con ello generar disfunción endotelial (Palan *et al.*, 2004).

### *2.3.2 Etapa 2: Disfunción Endotelial*

El endotelio en forma normal participa en la modulación del tono vascular, control de la hemostasis primaria, defensa e inflamación, transporte de nutrientes y otros solutos y activación e inactivación de varias hormonas vasoactivas. La disfunción endotelial es caracterizada por un cambio de las acciones del endotelio hacia la vasodilatación reducida, un estado pro-inflamatorio, y características pro-trómbicas (Endemann y Schiffrin, 2004).

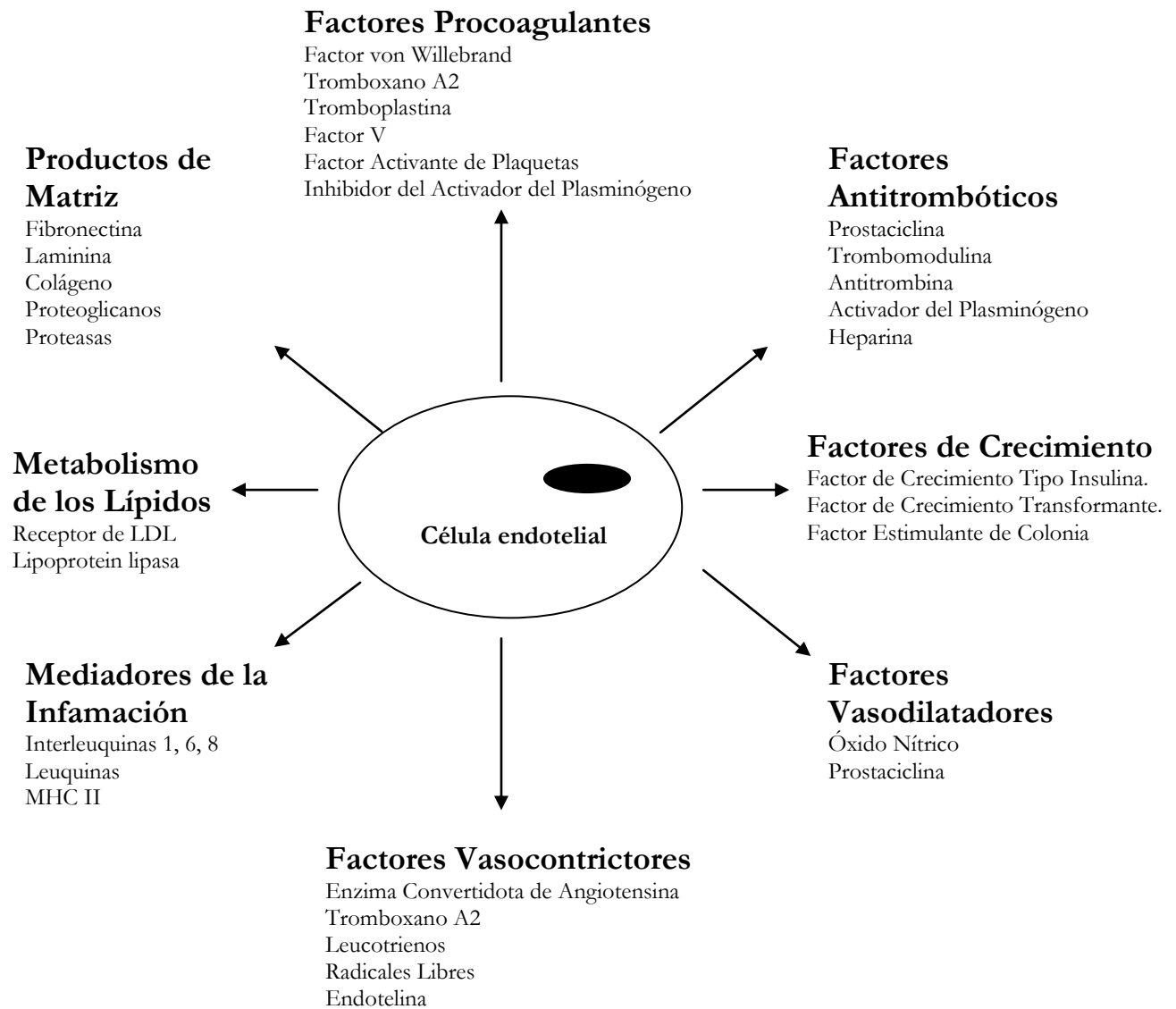


Figura 2: Funciones metabólicas y sintéticas de las células endoteliales  
(Fuente: Galley y Webster, 2004)

Evidencias de la disfunción endotelial son la demostración de un aumento de la concentración plasmática de marcadores de daño endotelial. Entre ellos es importante destacar al factor de von Willebrand (vWF), al activador del plasminógeno tisular y a los inhibidores del activador del plasminógeno endotelial y placentario (PAI-1 y PAI-2 respectivamente) y trombosmodulina (TM).

Entre las diversas proteínas secretadas y sintetizadas por las células endoteliales se encuentran algunas que participan en el proceso de hemostasia y que han sido utilizadas como marcadores de daño endotelial como son el PAI-1 y el PAI-2. El PAI-1 que es sintetizado por las células endoteliales, junto con el PAI-2 sintetizado por la placenta, son poderosos componentes antifibrinolíticos. Se ha observado que los niveles de PAI-1 aumentan progresivamente durante la gestación normal y más aún en las pacientes con PE. Este incremento en los niveles de PAI-1 podría causar una falla en la trombólisis en el lecho placentario. Por otro lado, los niveles de PAI-2 aumentan progresivamente durante la gestación normal, pero disminuyen cuando existe una alteración de la función placentaria. La relación PAI-1/PAI-2 aumenta en PE debido a la activación celular e insuficiencia placentaria (Roes, *et al.*, 2002).

El vWF sintetizado por las células endoteliales, y que participa en el proceso de coagulación como puente entre el subendotelio y las glicoproteínas de la membrana plaquetaria, experimenta un aumento en su liberación cada vez que el endotelio se daña. Además esta alza en los niveles de vWF contribuiría a una mayor adhesión de las plaquetas al endotelio en la PE (Felferning-Boehm *et al.*, 2000).

Otro marcador de daño endotelial es la TM que es una glicoproteína asociada a la membrana de las células endoteliales y juega un papel importante en el mecanismo anticoagulante del endotelio. Estas acciones se logran a través de 3 efectos: i) activando a la proteína C la que junto a su cofactor, la proteína S, participa inactivando a los factores V y VIII de la coagulación. ii) inhibiendo a los inhibidores del activador del plasminógeno. iii) uniéndose a la trombina para formar un complejo que provoca la inhibición de su efecto sobre el fibrinógeno para formar fibrina (Van De Wouwer *et al.*, 2004).

El factor nuclear kappa-B (NF-kB) es un factor de la transcripción implicado en la expresión de varios marcadores bioquímicos pro-inflamatorio incluyendo citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión celular como es la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (Baldwin, 1996). Existen estudios que indican que la transcripción de NF-kB podría ser estimulada por el anión superóxido (Poston y Reijmakers, 2004).

El déficit de NO ha sido involucrado en la génesis de la PE y en especial en este último tiempo el aumento de ADMA, inhibidor competitivo de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), el cual se ha asociado también al aumento del estrés oxidativo mediado por la inactivación de su enzima metabolizadora dimetil-aminotransferasa (Savvidou *et al.*, 2003). Una concentración disminuida de ADMA se ha atribuido a una hiperhomocisteinemia (Sydow *et al.*, 2003). La hiperhomocisteinemia también ha sido asociada a daño endotelial, producto del estrés oxidativo el cual podría causar déficit de NO (Rodrigo *et al.*, 2003). Recientemente, se ha publicado que un 20-30% de las mujeres con PE presentan aumentos de la concentración plasmática de homocisteína.

Es así como la disfunción endotelial ha sido identificada como la vía final en la patogénesis de la PE y se considera ser la base de manifestaciones clínicas tales como hipertensión, proteinuria y edema maternos; sin embargo, las vías exactas que están implicados aún siguen siendo confusos (Wilson *et al.*, 2003), pero no parece ser causada por la hipertensión (Roberts *et al.*, 2003), sino por daño tóxico, como podría ser el estrés oxidativo.

Alternativamente a lo anterior, en forma reciente se ha comunicado que la disfunción endotelial también puede generarse a través de un efecto antiangiogénico. El VEGF y factor de crecimiento placentario (PlGF) son factores de crecimiento endotelial, cuya principal acción es promover la vasodilatación vía prostaciclina y NO y la proliferación de células endoteliales. La placenta preecláptica en condiciones de hipoxia produciría elevadas concentraciones tanto en plasma como líquido amniótico del factor “soluble fms-like tyrosine kinase 1” (sFlt1), una proteína antiangiogénica que inhibe al PlGF y al VEGF (Levine *et al.*, 2004). De esta manera la unión de sFlt1 a VEGF y a PlGF disminuye la actividad angiogénica y reparadora del endotelio, lo que podría explicar en parte la disfunción endotelial y manifestaciones como la proteinuria y el edema (Maynard *et al.*, 2003). El mecanismo subyacente a esta alteración en la regulación de la producción de sFlt1 en la placenta es desconocido, pero se podría postular que el estrés oxidativo interviene, debido a que la hipoxia es un hecho que precedería al aumento de sFlt1 y por consecuencia una disminución de VEGF y PlGF. Además esto podría indicar una conexión entre la disminución de la actividad angiogénica y el estrés oxidativo (Nagamatsu *et al.*, 2004).

## 2.4 Papel del Estrés Oxidativo en la Preeclampsia

El estrés oxidativo se define como un desbalance entre la producción y degradación de las especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno en comparación a los antioxidantes (Gicheva *et al.*, 2004), favoreciendo un predominio de los radicales libres. Los radicales libres han cobrado importancia en forma creciente, durante los últimos 20 años, como factores que intervienen en el mecanismo de producción de diversas enfermedades. Los radicales libres son especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados (Rodrigo y Rivera, 2003). Debido a esto, pueden ser especies muy reactivas, que no tienen receptores específicos, y que atacan o inestabilizan todo lo que encuentran al frente, mediante acciones directas o indirectas, reversibles o irreversibles sobre distintas biomoléculas (Gutteridge y Halliwell, 2000).

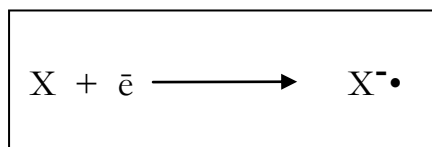
La importancia biológica de estas especies químicas radica en que pueden alterar la estructura de las membranas celulares, producir daño en las proteínas intracelulares, oxidación de las lipoproteínas plasmáticas y aceleración del envejecimiento celular. En los elementos químicos y en las moléculas en que ellos entran en combinación los electrones se encuentran habitualmente apareados. Así, en un enlace covalente se puede encontrar un par de electrones con el aporte de cada uno de los elementos que forman ese enlace. Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados, lo que generalmente se traduce en un aumento de la reactividad de la sustancia, en relación a la especie no radicalaria que la genera (Rodrigo y Rivera, 2003).

Los radicales libres pueden formarse químicamente por la transferencia de un electrón, o bien por la ruptura homolítica de un enlace covalente de una

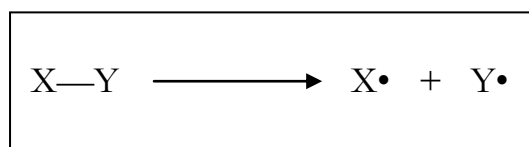


molécula normal, lo que significa que cada fragmento de la molécula retiene uno de los electrones que formaban el par del enlace (Rodrigo y Rivera, 2003).

Formación de un radical por la transferencia de un electrón:



Formación de radicales libres por ruptura homolítica:

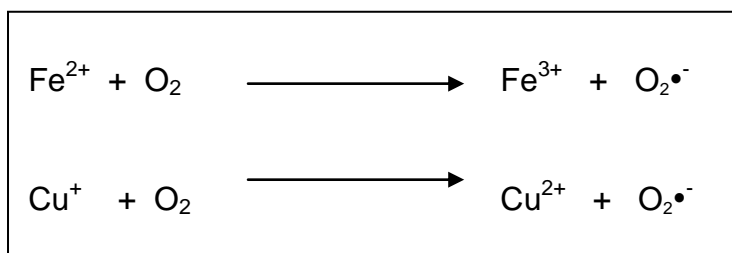


Durante el metabolismo aeróbico las células generan energía reduciendo al oxígeno molecular hasta la formación de agua. Esta reacción, que ocurre en la mitocondria catalizada por la citocromo c oxidasa, involucra la transferencia de cuatro electrones al oxígeno sin formación de intermediarios. Pero una pequeña proporción del oxígeno (2-4%) puede aceptar un número menor de electrones, dando lugar a la formación de intermediarios conocidos como ERO. De esta manera, el oxígeno se puede reducir sucesivamente a anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) al incorporar un electrón, a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al aceptar 2 electrones y a radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) al aceptar 3 electrones. Otra ERO es el oxígeno singlete o singulete ( $^1O_2$ ), que puede generarse, por ejemplo, cuando los electrones han sido excitados por la luz. Cuando las ERO se encuentran en exceso, reaccionarán con diversas biomoléculas causando citotoxicidad y daño mutagénico (Rodrigo y Rivera, 2003).

La ERO más común es el  $O_2^{\bullet-}$  generado en células vivas por: xantina oxidasa, NADPH oxidasa, citocromo P450 microsomal y las enzimas mitocondriales de la cadena de transportadora de electrones, entre otras. La expresión de xantina oxidasa, se encontró aumentada en una subpoblación de citotrofoblastos de mujeres preeclámpticas que también mostraban una disminución de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) (Many *et al.*, 2000). La hipoxia se ha demostrado como un incrementador de la expresión de la xantina oxidasa (Hassoun *et al.*, 1994), sin embargo, la implicancia de la xantina oxidasa en la generación de la estrés oxidativo placentario no ha sido confirmada (Myatt y Cui, 2004). Las placentas de pacientes preeclámpticas demuestran la expresión creciente de los componentes p22, p47 y p67 de la NADPH oxidasa (Dechend *et al.*, 2003).

Bajo condiciones fisiológicas cada día el 3% de la hemoglobina total se convierte a la forma oxidada (metahemoglobina). La autoxidación de la hemoglobina resulta en la generación de  $O_2^{\bullet-}$ . Además, el  $O_2^{\bullet-}$  también es producido a través de reacciones de algunas moléculas con el oxígeno (adrenalina, dopamina, tetrahidrofolato, citocromos, etc.) y por células en que se produce la fagocitosis (polimorfonucleares neutrófilos, monocitos, macrófagos). El  $O_2^{\bullet-}$  en sí no es una especie química particularmente nociva para las células, excepto cuando se encuentra protonado (radical perhidroxilo:  $HO_2^{\bullet}$ ), lo que sólo ocurre en la proporción del 1% al pH fisiológico. Sin embargo, el  $O_2^{\bullet-}$  puede ejercer acciones deletéreas derivadas de los productos que genera o consume en las reacciones químicas en que interviene (Rodrigo y Rivera, 2003).

Los iones metálicos de los elementos de transición, especialmente cuando se encuentran en el estado reducido, pueden sufrir una autooxidación a la vez que transforman a la molécula de oxígeno en  $O_2^{\bullet-}$ .



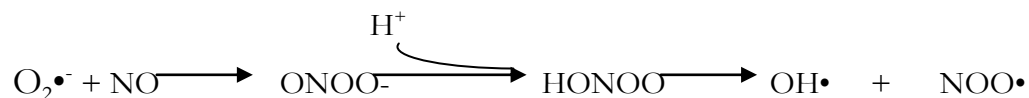
(Fuente: Rodrigo y Rivera, 2003)

El  $H_2O_2$  aunque no es un radical libre (pero se considera también una de las especies reactivas de oxígeno) puede generar un radical libre extremadamente reactivo, como es el  $OH^{\bullet}$  en presencia de iones metálicos como  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$  ó  $Mn^+$  a través de la reacción de Fenton. Por otra parte, estos iones al estado reducido también pueden catalizar la reacción entre el  $H_2O_2$  y el  $O_2^{\bullet-}$ , conocida como la reacción de Haber-Weiss (Rodrigo y Rivera, 2003).

Es importante señalar que los iones metálicos de elementos de transición pueden catalizar estas reacciones químicas solamente cuando se encuentran libres. Por lo tanto, una manera de controlar este efecto es a través de la formación de complejos con sustancias quelantes, que por esta vía previenen la formación de radicales libres.

Otro radical libre (de nitrógeno) que se produce en condiciones fisiológicas normales en el organismo es el  $NO$ , compuesto formado a partir de la arginina en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS). El  $NO$

es una sustancia que participa en la regulación de la presión arterial, ya que posee un marcado efecto vasodilatador, pero cuando se produce en exceso puede ocasionar daño tisular en varias enfermedades. Resulta interesante analizar la reacción que se produce entre los radicales libres  $O_2^{\bullet-}$  y  $NO$ , ya que pueden resultar efectos deletéreos tanto derivados del consumo del agente vasodilatador  $NO$  (hipertensión) como del producto de esta reacción que es el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el cual se inestabiliza después de ser protonado descomponiéndose en forma espontánea para formar el  $OH^{\bullet}$  y dióxido de nitrógeno ( $NOO^{\bullet}$ ). Como ya fue señalado, el  $OH^{\bullet}$  es extremadamente reactivo y puede reaccionar con cualquier molécula orgánica abstrayéndole un átomo de hidrógeno a la vez que se forma otro radical libre (Rodrigo y Rivera, 2003).



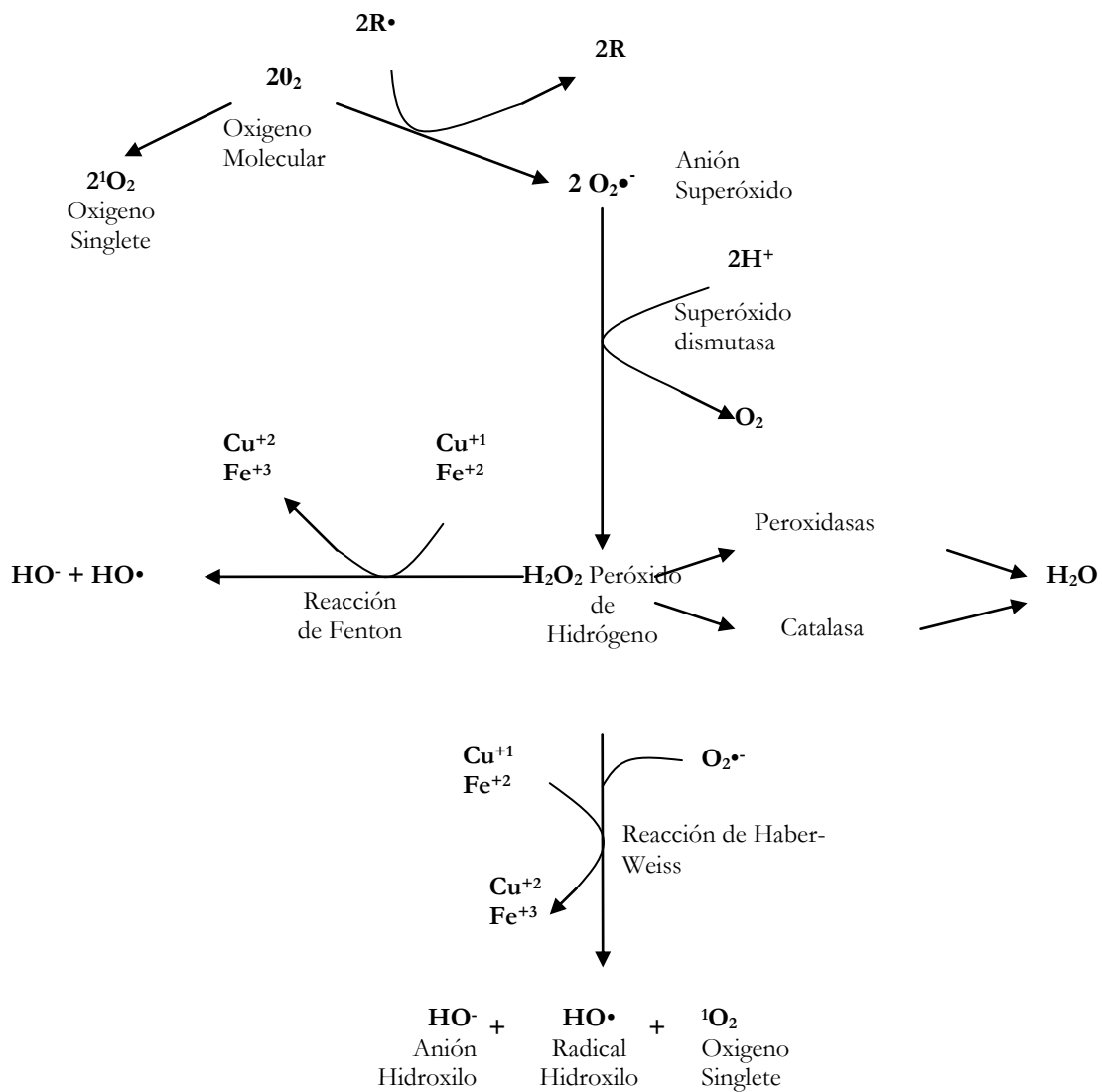


Figura 3: Especies oxigenadas activas y sus reacciones  
(Fuente: Lozano *et al.*, 2000)

El endotelio es un tejido altamente sensible al daño producido por los radicales libres, afectando con esto, entre otros, a lípidos, proteínas y ADN. El daño puede ser inducido tanto por las ERO o de nitrógeno, como el ONOO-

(Davidge, 1998). Por esto el estrés oxidativo sería un factor que podría dar como resultado disfunción de células endoteliales, aunque su mecanismo no está completamente identificado (Roberts y Lain 2002). Además el estrés oxidativo está implicado en la fisiopatología de una gran variedad de enfermedades vasculares incluida enfermedad coronaria, arritmias, falla cardiaca congestiva, miocardiopatía, hipertensión, aterosclerosis y diabetes (Maulik y Das, 2002). Las ERO, al ser tan inestables y reactivas, no pueden ser detectadas directamente en el organismo debido a su corta vida media. Sin embargo, sí son detectables los productos resultantes de su reacción con distintas biomoléculas, o el descenso de las concentraciones de sustancias antioxidantes (Gratacós *et al.*, 1998).

El embarazo de por sí es un estado de estrés oxidativo principalmente debido a un incremento de la actividad metabólica de las mitocondrias placentarias y la reducción del poder antioxidante (Wisdom *et al.*, 1991). Se ha visto que el embarazo es un estado de estrés oxidativo que presenta una actividad y producción aumentada de ERO, principalmente  $O_2\bullet^-$ . La placenta también produce especies reactivas del nitrógeno como son el NO y el peroxinitrito que generarían efectos deletéreos sobre la función placentaria incluyendo la proliferación del trofoblasto y diferenciación y actividad vascular. Por tal motivo la producción excesiva del ERO podría ocurrir en embarazos patológicos, y contribuir al desarrollo de la PE (Myatt y Cui, 2004; Wiktor *et al.* 2004), ya que recientes estudios sugieren que el estrés oxidativo está involucrado en la fisiopatología de la PE y se ha propuesto como la conexión entre las dos etapas del modelo de la PE (Patrick *et al.*, 2004; Fainaru *et al.*, 2003). Además se propone que estaría involucrado de alguna manera en la RCF (Takagi, *et al.*, 2004).

#### 2.4.1 *Sistema de Defensas Antioxidantes*

Los organismos disponen de sistemas de defensas antioxidantes que actúan para impedir o al menos atenuar los efectos deletéreos de los radicales libres sobre las biomoléculas (Gutteridge y Halliwell, 2000). Se ha propuesto la siguiente definición para antioxidante: "Aquella sustancia que se encuentra en pequeñas concentraciones comparada a un sustrato oxidable e inhibe o retarda significativamente la oxidación de dicho sustrato" (Halliwell y Gutteridge, 1995).

A partir de esta definición se considera que las defensas antioxidantes incluyen:

- a) Los agentes que remueven catalíticamente las ERO y del nitrógeno.
- b) Las proteínas que minimizan la disponibilidad de pro-oxidantes como iones de hierro o cobre.
- c) Las proteínas que protegen biomoléculas por otros mecanismos.
- d) Agentes de bajo peso molecular que reducen las especies reactivas.

Posteriormente, este concepto fue aplicado a los antioxidantes aportados por la dieta, los que quedaron definidos como "sustancias presentes en los alimentos que disminuyen los efectos de las especies reactivas, tales como ERO y nitrógeno" (Rodrigo y Rivera, 2003).

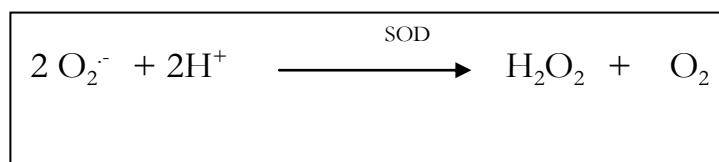
Los sistemas de defensa antioxidante de los organismos animales incluidos el hombre se pueden clasificar en 2 categorías: enzimas y sustancias antioxidantes.

#### 2.4.1.1 *Enzimas Antioxidantes:*

Las enzimas antioxidantes, constituyen la primera línea o barrera de defensa contra los radicales libres y esta acción se lleva a cabo neutralizando a estas especies químicas a través de la conversión en otras de efecto menos dañino (Halliwell y Gutteridge, 1995).

##### 2.4.1.1.1 *Superóxido Dismutasa*

Esta enzima cataliza la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  (dismutación es una reacción de destrucción de radicales libres en que a partir de éstos se forman especies no radicalarias). Así, reaccionan dos moléculas de  $O_2^{\bullet-}$  para formar  $H_2O_2$ , el cual a su vez puede ser destruido por las actividades de catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa (GSH-Px).



(Fuente: Bilodeau y Hubel, 2003)

En el ser humano existen 3 clases de superóxido dismutasa (SOD): Mn-SOD (mitocondrial), Cu/Zn-SOD (citosólica) y SOD extracelular. La Mn-SOD es un homotetrámero de 96 kDa que contiene un átomo de Mn en cada subunidad y es esencial para la supervivencia de la vida aerobia y el desarrollo de resistencia celular a la toxicidad inducida por las ERO; además, es inducida por

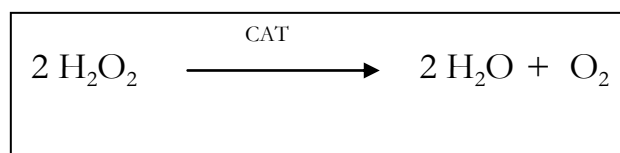


su sustrato u otros oxidantes y su expresión es aumentada por el factor de necrosis tumoral-alfa (Gutteridge y Halliwell, 2000).

Un nivel creciente de  $O_2\bullet^-$  en el tejido placentario de mujeres preeclámpticas (Sikkema et al., 2001), se encontró asociado a una disminución de la actividad y la expresión del ARNm para el SOD-CuZn en las células del trofoblasto aisladas de placenta preeclámpticas (Wang y Walsh, 2001). También recientemente se encontró una disminución de los niveles plasmáticos de SOD (Aydin *et al.*, 2004). Estos datos concuerdan con otros estudios que indican una disminución de la actividad de SOD en placenta (Madazli *et al.*, 2002) y eritrocitos (Llurba, *et al.*, 2004).

#### 2.4.1.1.2 *Catalasa*

La CAT es una enzima tetramérica de 60 kDa formada por cuatro subunidades idénticas. Es una de las enzimas conocidas más eficientes, tanto que no puede ser saturada por  $H_2O_2$  a ninguna concentración, catalizando su conversión en  $H_2O$  y  $O_2$ .



(Fuente: Bilodeau y Hubel, 2003)

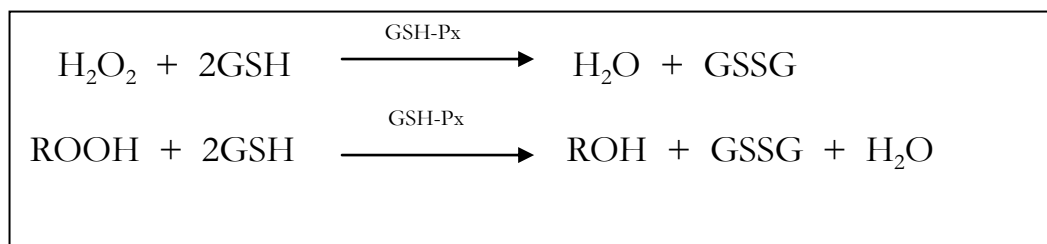
En animales, el  $H_2O_2$  se detoxifica mediante las actividades de la CAT y la GSH-Px. Aunque la CAT no es esencial para algunos tipos de células en

condiciones normales, como son por ejemplo las neuronas, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células. (Cheeseman y Slater, 1993)

También se ha estudiado la actividad de la CAT en mujeres preeclámpticas, detectándose su disminución en placenta (Vaughan y Walsh, 2002) y eritrocitos (Orhan *et al.*, 2003).

#### 2.4.1.1.3 *Glutación Peroxidasa*

Es una enzima formada por cuatro subunidades idénticas y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína, que es esencial para su actividad enzimática. La GSH-Px comparte su sustrato con la CAT, pero además puede reaccionar en forma efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) usando glutación reducido (GSH), el cual se oxida transformándose en glutación oxidado (GSSG), y así contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo. (Cheeseman y Slater, 1993)



(Fuente: Bilodeau y Hubel, 2003)

Se han encontrado al menos cinco isoenzimas de GSH-Px en mamíferos, cuyos niveles varían dependiendo del tejido. La GSH-Px citosólica o mitocondrial reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos y el  $H_2O_2$  a expensas del glutatión. El ciclo redox del glutatión es la mayor fuente de protección en situaciones de bajo nivel de estrés oxidativo, pero la CAT es más importante a la hora de proteger contra el estrés oxidativo severo. En células animales, y especialmente en eritrocitos humanos, la principal enzima antioxidante para la detoxificación de  $H_2O_2$  es la GSH-Px, ya que la CAT presenta mucha menos afinidad por el  $H_2O_2$ . La GSH-Px es una enzima dependiente del aporte dietético de selenio, elemento traza que puede por lo tanto, modular la actividad de esta enzima (Rodrigo y Rivera, 2003).

En el caso de la actividad de la GSH-Px en la PE existen antecedentes contradictorios mientras algunos estudios han observado que en la PE existiría una disminución de la actividad de la GSH-Px en la placenta (Vaughan y Walsh, 2002), eritrocitos (Llurba, *et al.*, 2004), otros estudios han indicado que no hay cambios significativos en la actividad de la GSH-Px en mujeres preeclámpticas versus controles (Funai et al., 2002). En contraste a lo anterior, en la placenta de mujeres con PE asociado al síndrome de HELLP, la actividad total de GSH-Px era más elevada que en embarazos controles (Kumar y Das, 2000).

Aunque hay una cierta contradicción en la relación existente entre la PE y la actividad de enzimas antioxidantes, si se considera la totalidad de los factores contribuyentes a la generación y remoción de ERO pareciese que estaría prevaleciendo un desequilibrio hacia la formación del ERO.

#### 2.4.1.2 *Moléculas o Sustancias Antioxidantes*

La segunda barrera antioxidante es de tipo no enzimático, dada por compuestos antioxidantes que actúan a nivel celular y extracelular, que son responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos (plasma) y de la protección del daño oxidativo de las distintas partículas y macromoléculas circulantes. Las moléculas antioxidantes son vitaminas, minerales y otras sustancias de bajo peso molecular que inhiben la tasa de oxidación provocada por los radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1995). Pueden aumentar su velocidad de ruptura, prevenir la participación de iones de metales de transición (quelación), inactivar y barrer ERO (scavengers), para así proteger el organismo del deterioro celular, envejecimiento prematuro y cáncer. (Cheeseman y Slater, 1993).

Las enzimas antioxidantes requieren metales como cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn) o selenio (Se) para su acción, éstos se conocen como metales antioxidantes. A diferencia de las enzimas antioxidantes, que no se consumen, las sustancias antioxidantes se modifican y consumen al reaccionar con los radicales libres y deben reemplazarse porque sí se consumen. Algunos de origen endógeno, tales como glutatión, urato, ubiquinol y proteínas plasmáticas, deben ser reemplazados por síntesis. Si son de origen exógeno, (provenientes de la dieta) para ser reemplazados necesitan ser nuevamente ingeridos. Una molécula antioxidante al reaccionar con un radical libre se puede transformar en otro radical libre más estable y por lo tanto, menos dañino para el organismo. Otra de las acciones de los antioxidantes consiste en formar complejos con los iones metálicos (acción quelante) impidiendo de esta manera que estos iones lleguen a favorecer la formación de radicales libres. Son fundamentales para la prevención

de enfermedades porque son fácilmente modificables (Jaeschke, 1995). Entre los compuestos más representativos de antioxidantes endógenos intracelulares se puede mencionar al glutatión reducido (GSH), la tioredoxina, la glutaredoxina, aminoácidos, melatonina y otros. Entre los antioxidantes exógenos se encuentran la vitamina E, ácido ascórbico (vitamina C), beta-caroteno (provitamina A), vitamina A, polifenoles, entre otros.

Se ha observado que el potencial antioxidante del plasma esta alterado en la PE observándose disminución de éste (Aksoy *et al.*, 2003) y es así que la capacidad antioxidante total del plasma expresado como FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) podría servir como marcador bioquímico para diferenciar la condición de las mujeres con embarazos normales y pacientes con PE (Zusterzeel *et al.*, 2001). La disminución de la capacidad antioxidante del plasma se podría deber más específicamente a los niveles disminuidos de vitaminas antioxidantes como ácido ascórbico y alfa tocoferol, entre otras (Bilodeau y Hubel, 2003).

#### 2.4.2 *Daño Sobre Biomoléculas:*

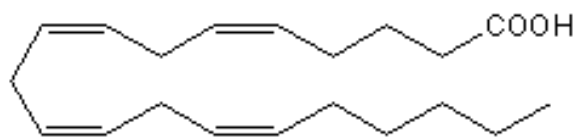
Las reacciones de las ERO con sustratos orgánicos son complejas y pueden afectar diversas estructuras de la célula según el tipo de biomolécula (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) que resulte atacado por ellas, pudiendo llegar incluso a producir la muerte celular.

#### 2.4.2.1 *Lipoperoxidación*

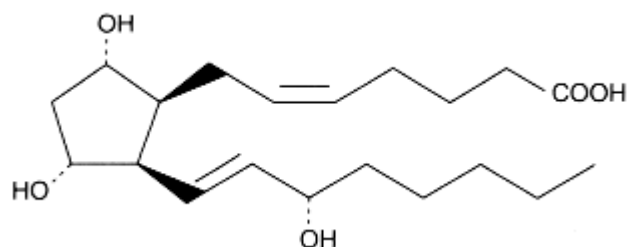
De todas las biomoléculas que pueden ser atacadas por las ERO los lípidos, especialmente fosfolípidos de membranas, son probablemente las más susceptibles. Esto parece estar relacionado con el grado de insaturación de estas moléculas. Las reacciones de lipoperoxidación consisten en un proceso de oxidación de los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA). Como consecuencia de este proceso, se destruyen los PUFA, compuestos que poseen tres o más uniones carbono-carbono con doble enlace, que les confiere una zona de enlace lábil (hidrógeno alílico) que permite que una molécula activa como el radical hidroxilo les sustraiga un átomo de hidrógeno (etapa de iniciación). Así, se genera un radical lipídico que continúa participando de reacciones en cadena (etapa de propagación), ya que se trata de un proceso autocatalítico, perpetuando así el proceso. El radical lipídico se combina con el oxígeno formando un lipoperóxido, el que a su vez puede retirar un nuevo átomo de hidrógeno de otro carbono molecular y formar un hidroperóxido. La lipoperoxidación sigue propagándose de esta manera y llega a su término cuando dos hidroperóxidos reaccionan entre sí dando un tetróxido o cuando son neutralizados por los antioxidantes. Los tetróxidos son inestables, al romperse generan aldehídos de bajo peso molecular [como por ejemplo el malondialdehído (MDA) que puede ser medido espectrofotométricamente] y cadenas hidrocarbonadas (etano, etileno, pentano, dienos conjugados, etc.). Los aldehídos son moléculas muy reactivas y, por lo tanto, se desplazan sólo hasta escasa distancia del sitio de su formación (Rodrigo y Rivera, 2003).

Se ha observado que los marcadores bioquímicos de lipoperoxidación tales como MDA en placenta (Madazli *et al.*, 2002) eritrocitos (Basbug *et al.*, 2003) y plasma (Aydin *et al.*, 2004), están elevados en la PE. Al ser el MDA un producto de la descomposición del peroxidación del lípido, se considera que el MDA elevado en la PE se debe al estrés oxidativo (Var *et el al.*, 2003). Se ha visto que la severidad de la enfermedad está correlacionada con la concentración de MDA en suero (Serdar *et al.*, 2002) y eritrocitos (Mazdali *et el al.*, 2002). Por consiguiente, se propuso que mientras mayor es la lipoperoxidación, mayor es la severidad de la PE (Panburana *et el al.*, 2000). Además, la determinación de MDA en el cordón umbilical podría ser útil en el reconocimiento de los recién nacidos que están en el riesgo de la asfixia (Zeteroglu *et el al.*, 2004).

La lipoperoxidación tal como se mencionó anteriormente afecta principalmente a los fosfolípidos de las membranas celulares, donde residen los ácidos grasos poli-insaturados. En el caso del ácido araquidónico, su lipoperoxidación forma compuestos entre los que se encuentran los F<sub>2</sub>-isoprostanos [8-isoprostanos u 8-iso-prostaglandina F<sub>2</sub>α (8-iso-PGF<sub>2</sub>α)] que poseen una estabilidad que permite utilizarlos como biomarcadores de estrés oxidativo *in vivo*, ya que sus niveles pueden ser medidos en el plasma. De esta manera, se puede evaluar la contribución del estrés oxidativo en una determinada situación fisiológica o fisiopatológica; o bien, probar la eficacia que un tratamiento o intervención pueden tener en disminuir los niveles de estrés oxidativo (Rodrigo y Rivera, 2003).



**Ácido araquidónico**



**F<sub>2</sub>-isoprostanos**

Es así como se ha utilizado los F<sub>2</sub>-isoprostanos como indicadores de estrés oxidativo en la PE observándose un aumento de éstos en el plasma de mujeres preeclámpticas (Staff y Halvorsen, 2003). El mecanismo subyacente de estos efectos puede incluir un estímulo de IP<sub>3</sub>, y mitogenesis en células de la musculatura lisa vascular (Fukunaga *et al.*, 1993) y la liberación de endotelina-1 por parte de las células endoteliales (Fukunaga *et al.*, 1995). Es así como se ha demostrado *in vitro* que las ERO generan F<sub>2</sub>-isoprostanos que estimulan la expresión y proliferación de endotelina-1 por parte de las células endoteliales (Yura *et al.*, 1999). En consecuencia se ha propuesto que estos compuestos pueden contribuir para mediar el desarrollo de hipertensión encontrada en pacientes preeclámpticas, ya que el aumento de la secreción placentaria de F<sub>2</sub>-isoprostanos a la circulación materna podría causar vasoconstricción en las células vasculares maternas (McGiff y Quilley, 2001), ya que los F<sub>2</sub>-isoprostanos son potentes vasoconstrictores en riñón, pulmón, corazón, cerebro y placenta



entre otros (Walsh *et al.*, 2000) y al favorecer además la formación de endotelina 1 (Khedun *et al.*, 2002), otro agente vasoconstrictor (Duerrschmidt *et al.*, 2000) podría contribuir a explicar en parte el mecanismo de la hipertensión arterial de las mujeres con PE (Walsh *et al.*, 2000).

Aunque existen estudios que indican la importancia de la lipoperoxidación en la presentación de la PE, hay autores que no le han atribuido esta trascendencia, indicando que no hay evidencias que sostengan su importancia (Regan *et al.*, 2001).

#### 2.4.2.2 *Daño Oxidativo de las Proteínas*

El ataque de las ERO a las proteínas se ejerce a través de modificaciones de determinados amino-ácidos, los cuales poseen mayor susceptibilidad. Los sitios más susceptibles son las cadenas laterales de amino-ácidos azufrados y los grupos tiol (-SH). Las ERO pueden atrapar un átomo de H de la cisteína para formar un radical libre en la proteína, el que se unirá a un segundo grupo de estas características para formar un puente disulfuro (unión cruzada). El  $O_2^{\bullet-}$  puede destruir en forma irreversible funciones enzimáticas que dependen del centro hierro-azufre, por oxidación de este grupo. Algunos amino-ácidos como histidina, lisina, prolina, arginina y serina forman grupos carbonilo por su oxidación (carbonilación), proceso que puede ser utilizado para evaluar el grado de estrés oxidativo. Como consecuencia, se altera la estructura primaria, secundaria y terciaria de las proteínas afectadas, cambia su carga eléctrica y se producen reacciones de unión cruzada formando productos de agregación. Resulta particularmente relevante señalar que, en estas condiciones, las proteínas

aumentan la susceptibilidad a la proteólisis y se produce la fragmentación de la cadena polipeptídica.

Se ha visto que la oxidación de proteínas podría contribuir a la patogénesis de la PE, debido a que se ha detectado aumento en la producción de carbonilos tanto en plasma como en placenta de mujeres con PE (Serdar *et al.*, 2003) y se ha sugerido que podría ser utilizado como un marcador de estrés oxidativo en la PE (Llurba, *et al.*, 2004).

A pesar de todo lo expuesto anteriormente, existen algunos trabajos que indican que no se puede concluir que el estrés oxidativo tenga un rol patogénicamente relevante en la PE (Llurba, *et al.*, 2004).

#### 2.4.3 Efectos Sobre Enzimas de Membrana

La actividad de la (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPasa en PE ha sido muy poco estudiada, sin embargo, si se ha descrito lo sucedido con la calcio-ATPasa en el miometrio, la que arrojó una actividad reducida de esta. La disminución de la actividad de la calcio-ATPasa puede resultar en un aumento en la concentración citosólica de calcio en las células del músculo liso vascular de mujeres preeclámpticas, y esto implicaría la elevada presión arterial desarrollada por estos pacientes. Esto, podría explicar el aumento de la contractibilidad del músculo liso vascular (vasoespaso) (Carrera *et al.*, 2003). En cambio la actividad de la (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPasa en la PE no ha sido descrito con anterioridad.

## 2.5 Predictores de Preeclampsia

Hasta la actualidad no se ha validado un método de detección precoz con alto valor predictivo de la enfermedad, pero se han propuestos muchos métodos para predecir la aparición de PE. A continuación se señalen algunos métodos que han sido utilizados con este propósito:

### 2.5.1 Factores de Riesgo de la Historia Clínica y Embarazo Actual

Entre los factores pre-concepcionales y/o patologías crónicas cabe mencionar la primipaternidad, exposición espermática limitada y padres con antecedentes de PE con otra pareja. Entre los factores asociados a la madre destacan la historia previa de PE, edad materna, intervalo gestacional e historia familiar. Entre las patologías crónicas asociadas a PE están la hipertensión esencial, obesidad, diabetes gestacional, diabetes mellitus tipo I, déficit de proteína S y resistencia a proteína C, anticuerpos antifosfolípidos e hiperhomocisteinemia. Por último existen factores durante la gestación que se asocian mayormente con PE como son el embarazo múltiple y las malformaciones congénitas. La detección clínica de estos factores de riesgo pregestacionales y asociados al embarazo podrían eventualmente ayudar a realizar una prevención primaria de esta patología (Dekker y Sibai, 2001).

### 2.5.2 *Presión Arterial*

Su medición ya a finales de los '80 había demostrado escasa utilidad en la predicción de esta condición (Villar y Sibai, 1989), debido a que la alteración de la presión arterial ocurre en un estado ya tardío de la enfermedad. Aunque una elevación de la presión arterial diastólica o presión arterial media en el segundo trimestre puede predecir adecuadamente la aparición del síndrome hipertensivo del embarazo, este cambio no está asociado a una mayor morbi-mortalidad perinatal (Conde-Agudelo y Belizan, 2000).

### 2.5.3 *Ácido Úrico*

La uricemia se ha empleado desde comienzos de los '90 como un indicador de la severidad de la PE y sería un mejor predictor que la presión arterial del mal pronóstico perinatal (Dekker y Sibai, 1991). Pero la baja sensibilidad de esta prueba, encontrada en muchos estudios, ha hecho que su uso no se haya masificado (Masse *et al.*, 1993).

### 2.5.4 *Proteinuria*

Es un signo tardío de hipertensión inducida por el embarazo, y al parecer influenciado por la disfunción endotelial que presentarían las pacientes con el síndrome preeclámptico. Además, en complicaciones mayores del síndrome preeclámptico, tales como el síndrome HELLP y la eclampsia, la proteinuria puede estar ausente. Debido a su baja sensibilidad y especificidad y el hecho de

que es un signo de aparición tardía, su uso como predictor de PE ha sido desechado, aunque sigue siendo considerado como un claro signo de PE (Roberts *et al.*, 2003).

#### 2.5.5 *Doppler de las Arterias Uterinas*

La flujometría Doppler es una técnica no invasiva que mide la velocidad de los flujos sanguíneos e indirectamente la resistencia vascular útero-placentaria. La pesquisa de PE por medio de flujometría Doppler de las arterias uterinas en poblaciones no seleccionadas ha mostrado resultados variables, debido esencialmente a las diferentes edades gestacionales al momento del examen, la metodología empleada, y las definiciones de mal resultado perinatal.

La incorporación de la información hemodinámica a través de la ecografía Doppler, que permite el estudio adicional de una variedad de parámetros fisiológicos en obstetricia, se inició hace más de 20 años en Dinamarca y Estados Unidos. A través de la ecografía Doppler se puede evaluar tanto la circulación uterina como la fetal, la arteria uterina tiene sus primeras ramas a nivel del orificio cervical interno y después transcurre a lo largo de la cara lateral del cuerpo uterino donde a menudo puede obtenerse información. Es posible evaluar con Doppler la circulación uterina dentro del miometrio y esto refleja, en parte la irrigación arterial (materna) de la placenta y del espacio intervelloso. En un útero no grávido, la arteria uterina presenta escaso flujo diastólico, pero a medida que progresa la gestación normal se observa una caída progresiva de la resistencia especialmente durante el segundo trimestre. Esto se puede evidenciar por el aumento de la velocidad del flujo diastólico en el estudio Doppler, debido a que

fisiológicamente a partir de las 12 semanas de gestación se produce la segunda invasión del trofoblasto, siendo reemplazado el endotelio por células del citotrofoblasto y de ahí en adelante se origina un circuito de baja resistencia, alto flujo y desaparece la incisura diastólica. De esta manera se forma una onda característica posterior a esta invasión trofoblástica. Por lo tanto sólo se puede evaluar el riesgo que tiene una embarazada de sufrir PE severa, realizando una ecografía Doppler de la arteria uterina. El defecto en la migración trofoblástica puede ser detectado por flujometría Doppler de las arterias uterinas, manifestándose por un aumento de la resistencia de este territorio (Albaiges *et al.*, 2000).

Se ha descrito su uso en dos etapas, a las 20 y 24 semanas de gestación, con el objeto de seleccionar a un grupo de alto riesgo de desarrollar PE. En un trabajo se realizó este examen a una edad gestacional uniforme de 23 semanas, encontrándose que un 5 % de las embarazadas estudiadas, han sido clasificadas en el grupo de alto riesgo de desarrollar PE, correspondiendo al 90% de las mujeres que desarrollaron PE antes de la semana 34 de gestación (Albaiges *et al.*, 2000).

Por último se realizó una rigurosa revisión de 12.994 embarazadas, donde se empleó Doppler de las arterias uterinas como predictores de PE y restricción de crecimiento fetal (RCF). Aunque se concluyó que este examen tiene sólo una moderada capacidad para predecir estas patologías, un Doppler anormal en el segundo trimestre del embarazo, aumenta el riesgo de desarrollar PE en 6 veces, haciéndolo por lo tanto clínicamente relevante, tanto para la madre como para el médico tratante (Chien *et al.*, 2000).

## 2.6 Profilaxis en Preeclampsia

Diversos fármacos han sido ensayados en PE, con el objeto de disminuir su incidencia, los cuales han tenido como limitante el incompleto conocimiento de su patogénesis, dificultad en la detección precoz de PE y por ende una incapacidad de corregir efectivamente la alteración fisiopatológica, por medio de una intervención farmacológica (Dekker y Sibai, 2001). A continuación se exponen brevemente estas terapias:

### 2.6.1 *Suplemento de Calcio*

Tras la observación de que la PE, se presentaba especialmente en las poblaciones con bajo consumo de calcio (Marcoux *et al.*, 1991), se infirió que su suplementación podría reducir el riesgo de presentarla, la que produce un leve descenso de su incidencia, pero solamente en los países con baja ingesta de él (Crowter *et al.*, 1999).

### 2.6.2 *Aspirina*

Varios estudios transversales demostraron que la PE se caracteriza por una alteración de la relación del equilibrio Prostaciclina/tromboxano, que se produce en la PE, el cual se trata de normalizar, con un tratamiento con aspirina, la cual es capaz de disminuir la síntesis de tromboxano, manteniendo la síntesis de prostaciclina, con el objeto de mejorar la capacidad vasodilatadora endotelial (Dekker y Sibai, 1993), aunque no se ha observado el beneficio de este

tratamiento en los grupos de mayor riesgo a presentar esta enfermedad. Por lo tanto el uso de aspirina está aún en revisión, sobretodo en los grupos de mayor riesgo de presentarla.

### 2.6.3 *Suplemento de Ácidos Grasos Omega 3*

Bajo la misma base del desbalance tromboxano/prostaciclina, en la patogenia de la PE es que se han empleado los ácidos grasos omega 3 con la intención de prevenir esta enfermedad. Los ácidos grasos omega 3, ácido eicosapentaenoico y docosahexanoico compiten con el ácido araquidónico por la posición 2 en los fosfolípidos de membrana, reduciendo así la concentración de ácido araquidónico plasmático y celular; y el ácido eicosapentaenoico compite con el ácido araquidónico como el sustrato para la ciclo-oxigenasa, inhibiendo la producción plaquetaria de tromboxano  $A_2$  y produciendo sólo pequeñas cantidades de tromboxano  $A_3$ , fisiológicamente inactivo. En resumen se intenta disminuir la síntesis de ácido araquidónico y por ende la producción de tromboxano, por medio de la competencia que generan los ácidos grasos omega 3, con la ciclooxigenasa. Se han realizado estudios de suplementación con aceite de pescado, en Europa, los cuales han evidenciado una mejoría en el pronóstico perinatal, ya que disminuiría el riesgo de parto prematuro, pero no en la incidencia de PE o RCF (Olsen *et al.*, 2000).



#### 2.6.4 Suplemento de Vitaminas Antioxidantes

Esta intervención surgió bajo el marco que el estrés oxidativo, sería generado por la hipoperfusión placentaria, secundaria a la falla de la migración trofoblástica, y además, habiéndose detectado una marcada disminución de los niveles plasmáticos y placentarios de vitaminas antioxidantes y  $\beta$ -caroteno en los grupos de riesgo de desarrollar PE (Mohindra *et al.*, 2002; Palan *et al.*, 2001). Dentro de esta línea de pensamiento se ha recurrido al uso de vitamina C y E como agentes profilácticos del desarrollo de la enfermedad, y en algunos estudios se han realizado ensayos con vitaminas antioxidantes que no han demostrado reducir la incidencia de PE, probablemente por el hecho de que fueron administrados en forma tardía (Gulmezoglu *et al.*, 1997). Pero en estudios posteriores, realizando un tratamiento más precoz se observó que la ingesta de estas vitaminas resulta en una disminución del estrés oxidativo (Chappell *et al.*, 1999). En un estudio más reciente suplementando con vitamina C (1000 mg/día) y vitamina E (400 UI/día) como tratamiento antioxidante en las mujeres que estaban en riesgo de preeclampsia, se observó una mejoría en los índices bioquímicos de la enfermedad, evidenciando una menor lipoperoxidación, expresada entre otras, por la caída de la concentración plasmática de 8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , como también por una menor disfunción endotelial, expresada por una caída de la relación PAI-1/PAI-2 en comparación con lo observado en mujeres con PE sin el tratamiento antioxidante. Pero aún es necesario realizar estudios de suplementación precoz en mayor escala para obtener conclusiones definitivas (Chappell *et al.*, 2002).

En síntesis, los estudios disponibles en la actualidad no han llegado a identificar ningún marcador bioquímico que tenga un valor predictivo útil en la

población de embarazadas para el diagnóstico precoz de la enfermedad (antes de presentados los signos clínicos) y por lo tanto, es necesaria más investigación en esta área (Moretti *et al.*, 2004; Masse *et al.*, 2002). En el futuro, se espera tener una combinación de marcadores bioquímicos para determinar el riesgo de presentación de la enfermedad (Raijmakers, *et al.*, 2004; Lyell *et al.*, 2003) y para establecer un diagnóstico precoz y así poder optar por las estrategias de tratamiento más adecuadas para las mujeres con alto riesgo de PE e incluso prevenirla siendo ésta la última gran meta para evitar así las consecuencias deletéreas que puede generar esta patología (Schlembach, 2003).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Identificar los marcadores bioquímicos más representativos de estrés oxidativo en el plasma, los eritrocitos y la placenta de mujeres con preeclampsia y compararlos con los obtenidos en mujeres con embarazos controles.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

En mujeres con embarazos normales y PE:

- Evaluar la capacidad antioxidante total del plasma materno, y conocer la actividad de las enzimas antioxidantes en los eritrocitos y la placenta.
- Determinar la lipoperoxidación a nivel plasmático y a nivel tisular en los eritrocitos maternos y la placenta; y cuantificar el grado de carbonilación de proteínas a nivel sistémico.
- Conocer la relación entre la lipoperoxidación y la actividad enzimática de la  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPasa}$  en los eritrocitos y la placenta.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Diseño

Se realizó un estudio de cohorte retrospectivo seleccionando mujeres embarazadas chilenas institucionales del Servicio de Obstetricia del Hospital Clínico de la Universidad de Chile durante los años 2002 y 2003 (que controlaron todo su embarazo en este hospital (iniciando su control a las 11 semanas continuándolo hasta el parto). Se seleccionaron 2 grupos: un grupo preecláptico (n=30) y grupo control (n=30), en que las embarazadas no desarrollaron la enfermedad, siendo evaluadas en primera instancia por medio de ecografía Doppler de la arteria uterina y posteriormente por los signos clínicos. Estas mujeres se controlaron durante toda la gestación en el Servicio de Obstetricia de dicho Hospital.

En ambos grupos se tomaron muestras de sangre, las cuales se recibieron en tubos con EDTA como anticoagulante al término del embarazo, posteriormente las muestras de sangre se centrifugaron a 2.000 x g / 15 minutos y se obtuvo plasma y eritrocitos, los eritrocitos fueron sometidos a tres lavados sucesivos con solución NaCl 0.9%, y luego se hemolizaron con agua bidestilada. Los hemolizados de eritrocitos y las muestras de plasma fueron recibidas en tubos individuales de plásticos rotulados con la cédula de identidad de la paciente y fecha de obtención. Además, después del alumbramiento se obtuvieron muestras de tejido placentario que fueron recibidas en frascos plásticos rotulados de la misma forma que los tubos de sangre y plasma. Las muestras fueron almacenadas rápidamente en congelador a -70°C hasta practicar las determinaciones.

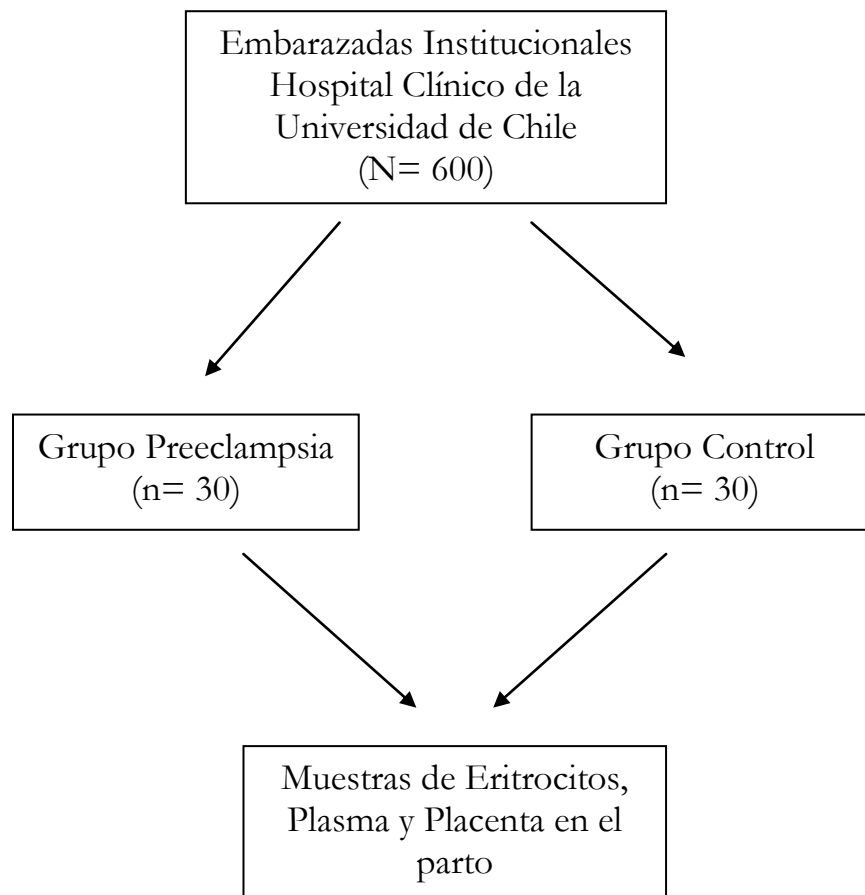
El Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile aprobó el estudio y las mujeres sometidas a este estudio accedieron a ingresar al protocolo de estudio firmando un consentimiento informado.

#### **4.2 Criterios de Exclusión y Tamaño Muestral**

De la población de embarazadas chilenas institucionales del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, que fueron aproximadamente 600 en el periodo de selección, se eliminaron del estudio aquellas mujeres que presentaban patologías como: hipertensión crónica, nefropatías, enfermedades cardiovasculares, diabetes Mellitus, obesidad, dislipidemia, antecedentes de alcoholismo o tabaquismo, debido a que estas patologías de por sí generan un estrés oxidativo. Además se eliminaron aquellas mujeres que presentaban embarazos múltiples y enfermedades mentales. Las mujeres que se diagnosticaron como preeclámpticas y que no presentaban las patologías antes mencionadas fueron 30 y se compararon con un grupo muestral control de 30 mujeres con embarazos normales y sin las patologías mencionadas anteriormente, tomadas en forma aleatoria. Este número fue estimado considerando la dispersión de resultados obtenidos en estudios preliminares de medición de los parámetros de estrés oxidativo, que serán determinados en el presente estudio, utilizando el programa computacional “Vestat, simple size and other statistical parameters, software for portable microcomputers by Rodolfo Cantarelli, D.V.M.” ‘(C) UC. Davis, Regent 1983’ en base al siguiente modelo estadístico:

$$n = 2 (ZS + ZP)^2 S / (MA - MB)^2$$

Donde “*n*” es el tamaño de la muestra para ambos grupos, “*ZS*” es valor de *Z* para el nivel de significación (que en este caso fue de 5%), “*ZP*” es el valor de *Z* para la potencia (que en este caso fue de 95%), “*MA*” es el promedio del grupo A (control), “*MB*” es el promedio del grupo B (tratamiento) y “*S*” es la varianza. Con estos antecedentes y nuestros datos, se obtuvo un tamaño mínimo de muestra entre 11 y 29, dependiendo de la variable en estudio. Por ende se optó por un tamaño de 30 individuos para ambos grupos.



## 4.3 Técnicas Analíticas y Bioquímicas Aplicadas

### 4.3.1 Variables Bioquímicas de Defensas Antioxidantes:

#### 4.3.1.1 Superóxido Dismutasa

Para la determinación de la actividad de la SOD los tejidos de placenta o de eritrocitos fueron homogeneizados con una solución amortiguadora fosfato salino 0,01 M pH 7,4 centrifugados a 100.000 x g / 1 h. Se midió la Cu/Zn-SOD (citósólica). El ensayo de la SOD está basado en el aumento de la velocidad de autoxidación de catecoles mediada por SOD en solución acuosa alcalina, para dar un cromóforo que tiene su máxima absorbancia a 535 nm. (Nebot *et al.*, 1992).

Una unidad de SOD se define como la actividad que duplica el nivel de autoxidación basal. La actividad de SOD fue expresada como U/mg proteína o U/mg de hemoglobina, dependiendo si la muestra era placenta o eritrocitos, respectivamente.

#### 4.3.1.2 Catalasa

Para la determinación de la actividad de CAT se tomaron muestras de tejido de placenta o de hemolizados de eritrocitos los que se homogeneizaron al 20% en una solución amortiguadora fosfato 50 mM pH 7,0 en un homogeneizador realizando 10 pasadas, manteniendo el homogeneizado en hielo. El homogenizado posteriormente se centrifugó a 1.000 x g durante 6 minutos. La

actividad de CAT se midió a partir de la cinética de descomposición del peróxido de hidrógeno 30 mM, midiendo la absorbancia a 240 nm (Aebi, 1974).

El resultado se expresó basándose en una constante de cinética de primer orden k/mg de proteína o k/mg de hemoglobina, dependiendo si la muestra era placenta o eritrocitos, respectivamente

#### 4.3.1.3 *Glutación Peroxidasa*

Para la determinación de la actividad de la GSH-Px se homogenizaron muestras de placenta o de eritrocitos con buffer KCl-Tris pH 7,4. La actividad de GSH-Px fue medida en la fracción citosólica (sobrenadante de 100.000 x g / 1 h), usando un método espectrofotométrico a 340 nm, basado en la oxidación del glutati6n reducido (GSH) por acci6n de la enzima GSH-Px acoplada a la reducci6n del glutati6n oxidado (GSSG) por la glutati6n reductasa en presencia de NADPH. (Flohé y G6nzler, 1984)

La actividad de GSH-Px fue expresada como U/mg prote6na o U/mg de hemoglobina, dependiendo si la muestra era placenta o eritrocitos respectivamente (una unidad es definida como la actividad de la enzima que oxida un  $\mu\text{mol}$  NADPH/minuto).



#### 4.3.1.4 *Capacidad Antioxidante del Plasma*

Los compuestos reductores del plasma (antioxidantes) reducen al hierro férrico a ferroso y este último da una reacción de coloración que permite medirlo por medio de una técnica espectrofotométrica a 593 nm, de acuerdo al método Benzie y Strain (1996) y que se expresa como FRAP (ferric reducing ability of plasma) en  $\mu\text{M}$ .

#### 4.3.2 *Variables Bioquímicas de Estrés Oxidativo: Lipoperoxidación y Oxidación de Proteínas*

##### 4.3.2.1 *Malondialdehido*

Las membranas de eritrocitos fueron separadas por centrifugación en centrífuga refrigerada a 20.000 x g por 15 minutos. Las muestras de placenta fueron homogeneizadas en amortiguador Tris 10 mM pH 7.4. Luego se procedió a determinar la concentración de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico 0,8% pH 3,5 mediante incubación de las muestras de membranas de eritrocitos y homogeneizados de placenta, seguida de extracción con solvente utilizando una mezcla de n-butanol/piridina (15/1, v/v) (Ohkawa *et al.*, 1979). El MDA, producto de peroxidación de lípidos, se midió por espectrofotometría a 532 nm. Se usó como estándar externo tetrametoxipropano y los resultados fueron expresados como nmoles equivalentes de MDA/mg de proteína o nmol MDA/mg hemoglobina, dependiendo si la muestra era de placenta o eritrocitos, respectivamente.

#### 4.3.2.2 *F<sub>2</sub>-Isoprostanos*

Las muestras de plasma destinadas a la medición de F<sub>2</sub>-isoprostanos se recibieron en tubos plásticos impregnados de hidroxitolueno butilado (concentración final 1mM), como antioxidante. Los F<sub>2</sub>-Isoprostanos son productos formados *in vivo* por la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico, catalizada por radicales libres. La determinación se realizó en una muestra de 500 µL de plasma a la que se aplicó una técnica de inmunoensayo enzimático (EIA) (Pradelles *et al.*, 1985) utilizando kits para 8-isoprostanos (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Las muestras de plasma fueron leídas a 420 nm en un lector de microplacas modelo Sunrise (Tekan, Salzburgo, Austria). Los resultados fueron expresados como pg/mL.

#### 4.3.2.3 *Carbonilación de proteínas*

La carbonilación de proteínas es el proceso mediante el cual como consecuencia de la oxidación de algunos aminoácidos de la proteína se forma un doble enlace carbono-oxígeno (grupo carbonilo). La medición de la carbonilación de las proteínas del plasma se basa en una derivatización de los grupos carbonilo mediada por su reacción con de 2,4 dinitrofenilhidrazina y su determinación espectrofotométrica a 350-390 nm (Reznick y Packer, 1994). Los resultados fueron expresados como nmol grupos carbonilos/mg proteínas.

#### 4.3.3 *Efectos sobre Enzimas de Membrana: Actividad de $(Na^+ - K^+) - ATPasa$ :*

La determinación de la actividad de esta enzima unida a membrana, la cual se espera sea influenciada por la peroxidación de fosfolípidos, se medirá en un homogeneizado completo de placenta y en membranas de eritrocitos extraídos del precipitado de la centrifugación a 100.000 x g. El método está basado en la medición de la hidrólisis de ATP por liberación de fósforo inorgánico, según Katz y Epstein (1967).

La actividad de esta enzima fue expresada como  $\mu\text{mol}$  de fosfato inorgánico/mg de proteína/hora, o  $\mu\text{mol}$  de fosfato inorgánico/mg de hemoglobina/hora, dependiendo si la muestra era de placenta o eritrocitos, respectivamente

#### 4.3.4 *Determinación de hemoglobina*

Esta medición se realizó por un método espectrofotométrico añadiendo a la muestra de hemolizado de eritrocitos el reactivo de Drabkin, ( $\text{NaHCO}_3$ , KCN,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ), generando al reaccionar con la muestra cianometahemoglobina que da su máxima absorbancia a 540 nm.

#### 4.3.5 *Determinación del contenido total de Proteínas*

Se realizó por método espectrofotométrico descrito por Lowry *et al* (1951), en que se realiza una hidrólisis alcalina seguida de una reacción de coloración con

el reactivo de Folín-Giocalteau. Como estándar se utilizó una preparación liofilizada de albúmina de bovino.

#### **4.4 Análisis Estadístico**

Los resultados fueron expresados como promedios  $\pm$  desviación estándar o desviación típica (S). El análisis estadístico de los datos fue realizado con la prueba de “t” de Student para muestras no pareadas de estrés oxidativo en la placenta, el plasma y los eritrocitos entre embarazadas normales y con PE. Se consideró diferencias significativas aquellas que tuvieron un  $p < 0,05$ . Los resultados fueron analizados por el programa Primer of Biostatistics Statistical Software Program by Stanton A. Glantz.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Pacientes**

El anexo 1 muestra las características clínicas de las mujeres embarazadas incorporadas al protocolo en el momento del parto. No se encontraron diferencias significativas en la edad gestacional entre las mujeres preeclámpticas y los controles debido a que muchos de los embarazos controles presentaron partos prematuros por una causa distinta a la PE, por lo cual se les puede considerar partos pre-término. Se encontró que el tamaño del recién nacido de las mujeres preeclámpticas fue inferior que los controles ( $p < 0.05$ ). No hubo diferencias en la actividad de enzimas hepáticas (ALT y AST) entre ambos grupos, pero las mujeres con PE mostraron anomalías renales caracterizadas por una disminución de tasa de filtración glomerular y proteinuria. Finalmente, en el grupo PE se encontró una moderada trombocitopenia.

## 5.2 Variables bioquímicas de Defensas Antioxidantes:

La actividad de la SOD en eritrocitos y placenta de mujeres con PE (Figura 4) mostró valores menores que los controles en un 26 y 49% en eritrocitos y placenta, respectivamente ( $p < 0.05$ ). La PE tuvo un efecto similar en la CAT (Figura 5), que resultó ser menor en eritrocitos y placenta en un 45 y 32%, respectivamente ( $p < 0.05$ ). A diferencia de las otras dos enzimas antioxidantes, la actividad de GSH-Px (Figura 6) mostró diferencia estadísticamente significativa sólo en eritrocitos, siendo en mujeres con PE un 35% menor que en controles ( $p < 0.05$ ), mientras que en placenta no acusó diferencias estadísticamente significativas.

La capacidad antioxidante del plasma (FRAP) se muestra en la Figura 7. Las mujeres con PE presentaron un FRAP de un 22% menor al de las controles ( $p < 0.05$ ).

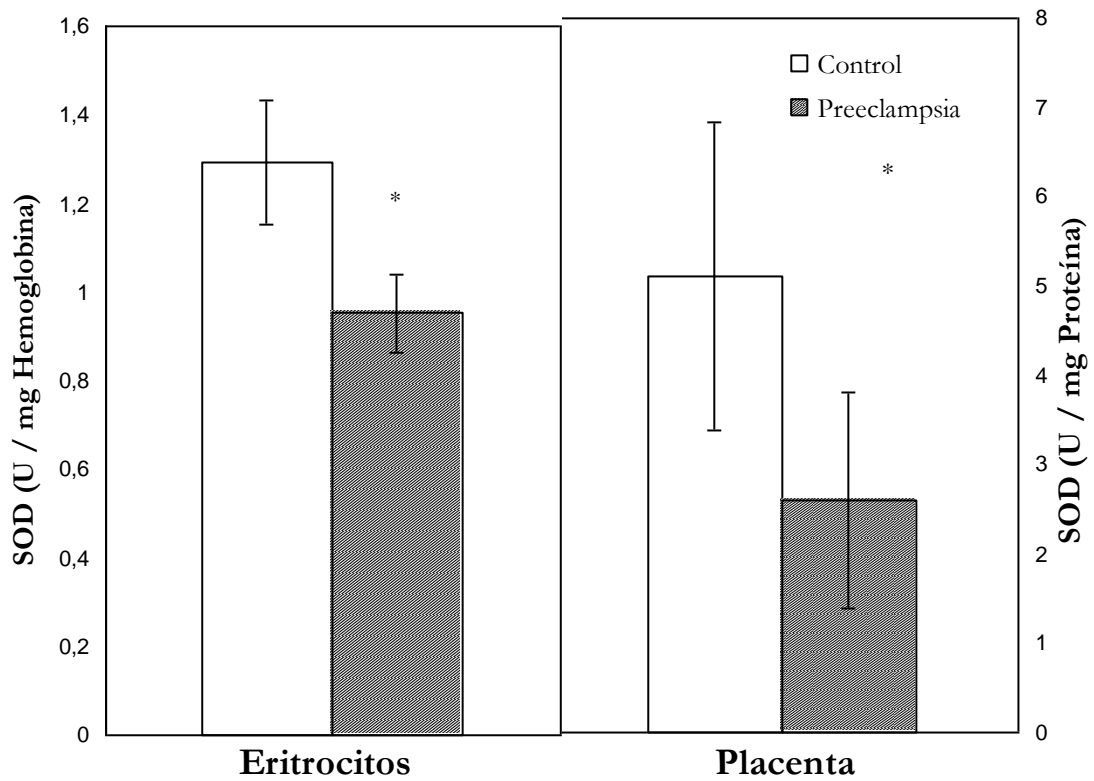


Figura 4: Actividad de superóxido dismutasa en eritrocitos y placenta de embarazos controles y con Preeclampsia. Los valores están expresados como promedio  $\pm$  S. \* $p < 0.05$  vs control. U: unidad de SOD (la actividad que duplica el nivel de autoxidación basal)

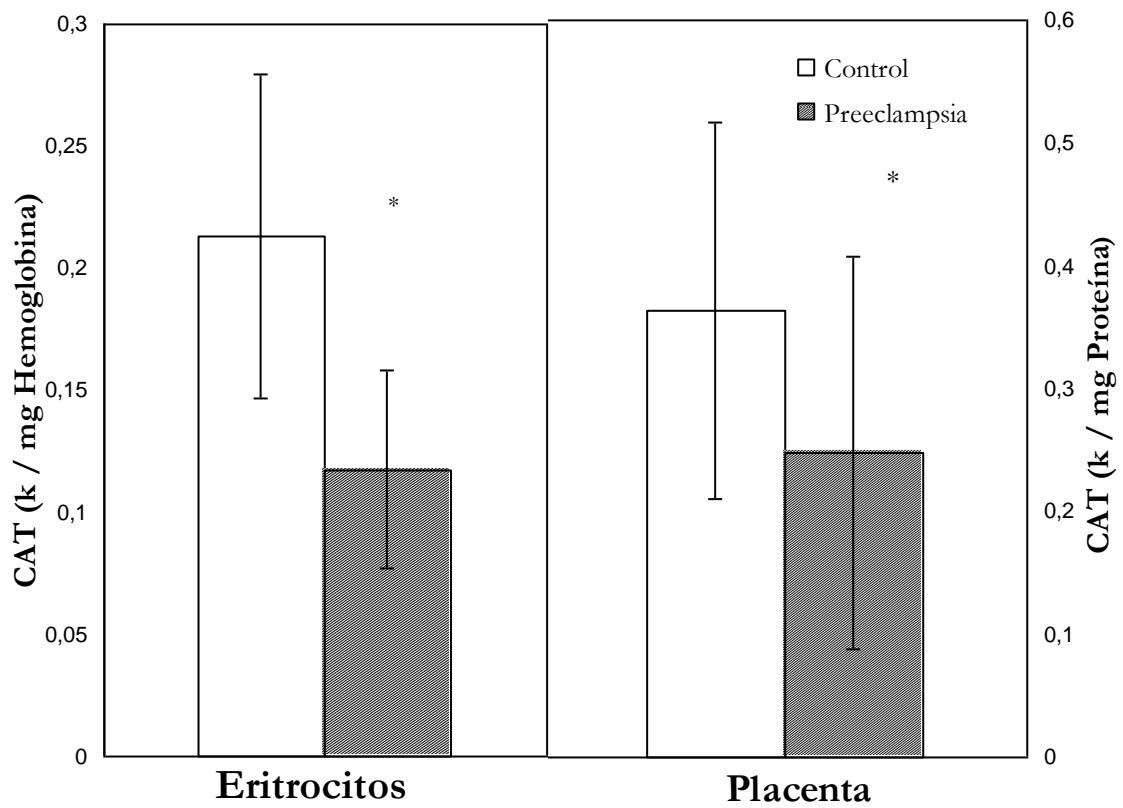


Figura 5: Actividad de catalasa en eritrocitos y placenta de embarazos controles y con Preeclampsia. Los valores están expresados como promedio  $\pm$  S. \* $p < 0.05$  vs control; k: constante cinética de primer orden de catalasa para la degradación del peróxido de hidrógeno.



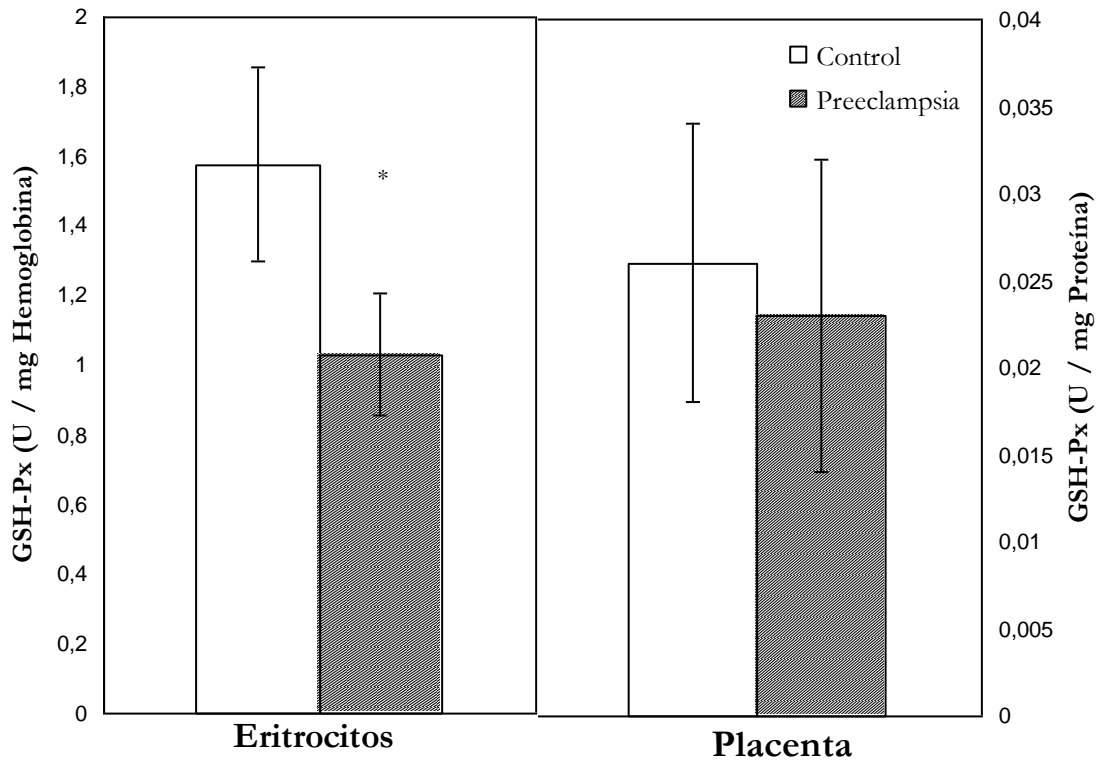


Figura 6: Actividad de glutatión peroxidasa en eritrocitos y placenta de embarazos controles y con Preeclampsia. Los valores están expresados como promedio  $\pm$  S. \* $p < 0.05$  vs control. U: unidad de GSH-Px (la actividad de la enzima que oxida un  $\mu\text{mol}$  NADPH/minuto)

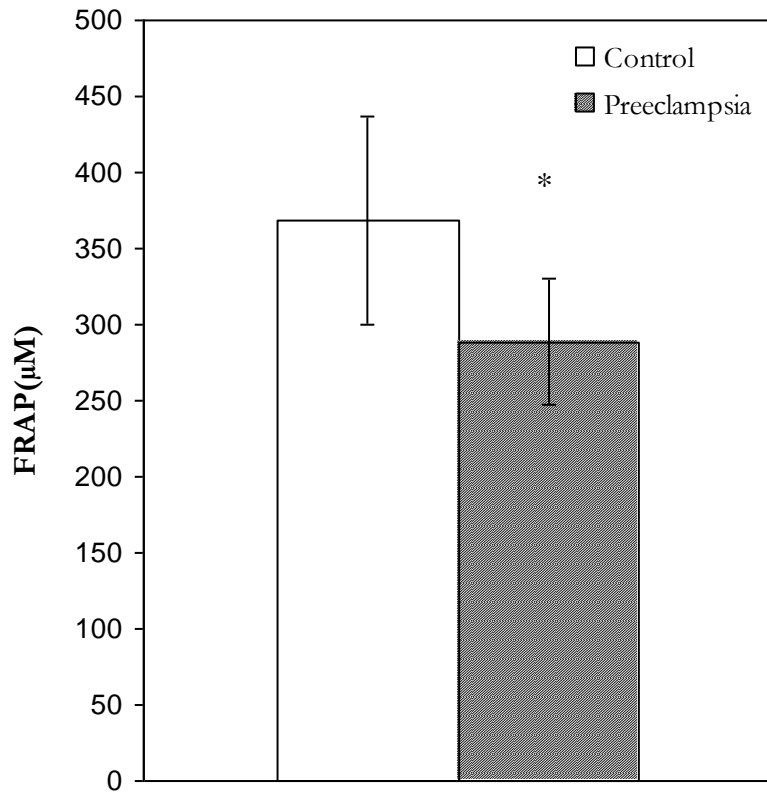


Figura 7: Capacidad Antioxidante del Plasma (FRAP) en mujeres con embarazos controles y con preeclampsia. Los valores están expresados como promedio  $\pm$  S. \* $p < 0.05$  vs control.

### **5.3 Variables bioquímicas de Estrés Oxidativo: lipoperoxidación y oxidación de proteínas**

Las mujeres con PE, respecto de sus controles, presentaron evidencias de aumento de lipoperoxidación ya que sus niveles de MDA (Figura 8) fueron mayores que los controles en un 60% en eritrocitos y un 39% en placenta ( $p < 0.05$ ). Además al comparar los niveles plasmáticos de  $F_2$ -Isoprostanos (Figura 9) las mujeres con PE presentaron valores 63% mayores que los de embarazos controles ( $p < 0.05$ ).

La Figura 10 muestra la oxidación de proteínas en el plasma, medidas por la formación de grupos carbonilos. Las pacientes con PE mostraron valores 63% mayores en comparación con sus controles ( $p < 0.05$ ).

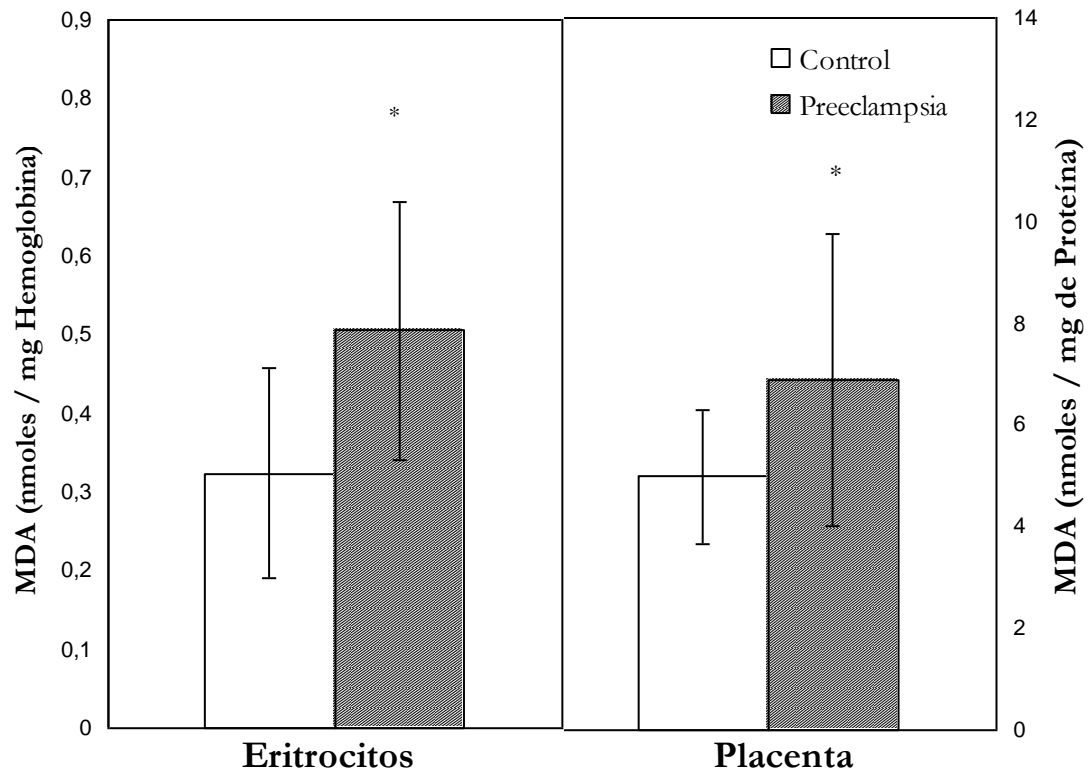


Figura 8: Lipoperoxidación (MDA) en eritrocitos y placenta de mujeres con embarazos normales y con preeclampsia. Los valores están expresados como promedio  $\pm$  S. \* $p < 0.05$  vs control.

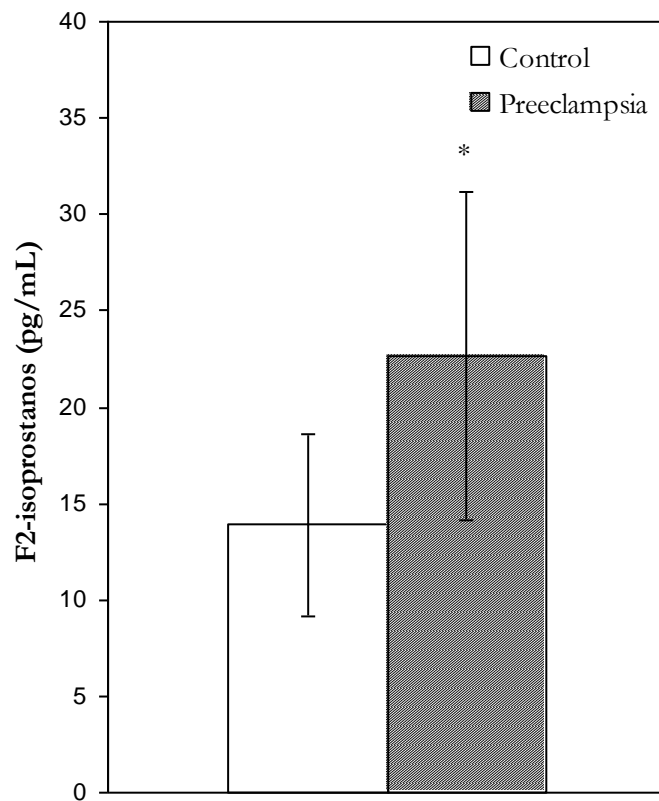


Figura 9: Lipoperoxidación (F<sub>2</sub>-isoprostanos) en plasma de mujeres con embarazos normales y con preeclampsia. Los valores están expresados como promedio  $\pm$  S. \*p<0.05 vs control.

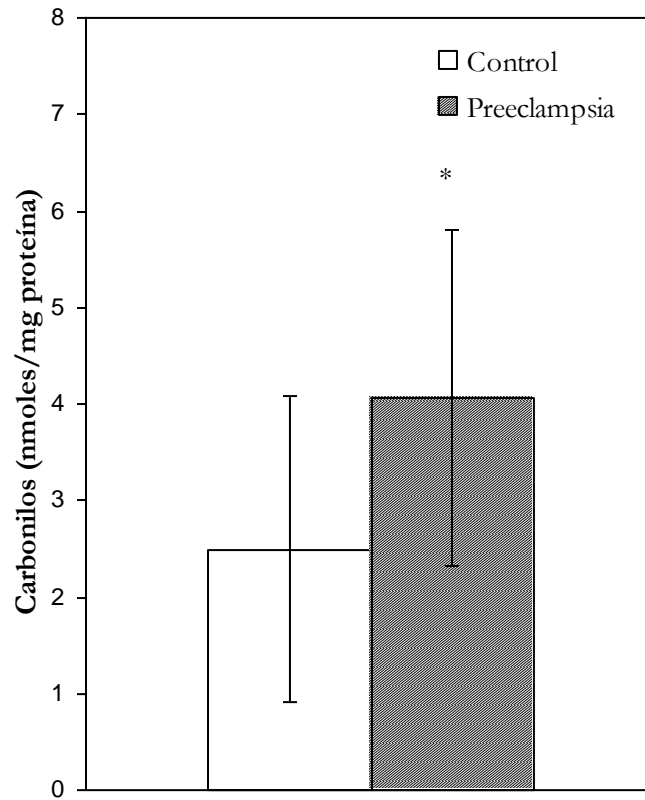


Figura 10: Oxidación de Proteínas (Grupos Carbonilos) en Plasma de mujeres con embarazos normales y con preeclampsia. Los valores están expresados como promedio  $\pm$  S. \* $p < 0.05$  vs control.

#### 5.4 Efectos Sobre Enzimas de Membrana: Actividad de $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPasa}$

La Figura 11 muestra la actividad de la  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPasa}$  en eritrocitos y placenta, donde se observa que las mujeres preeclámpticas en comparación a sus controles, presentaron valores menores en un 28% en eritrocitos y en un 23% placenta ( $p < 0.05$ ).

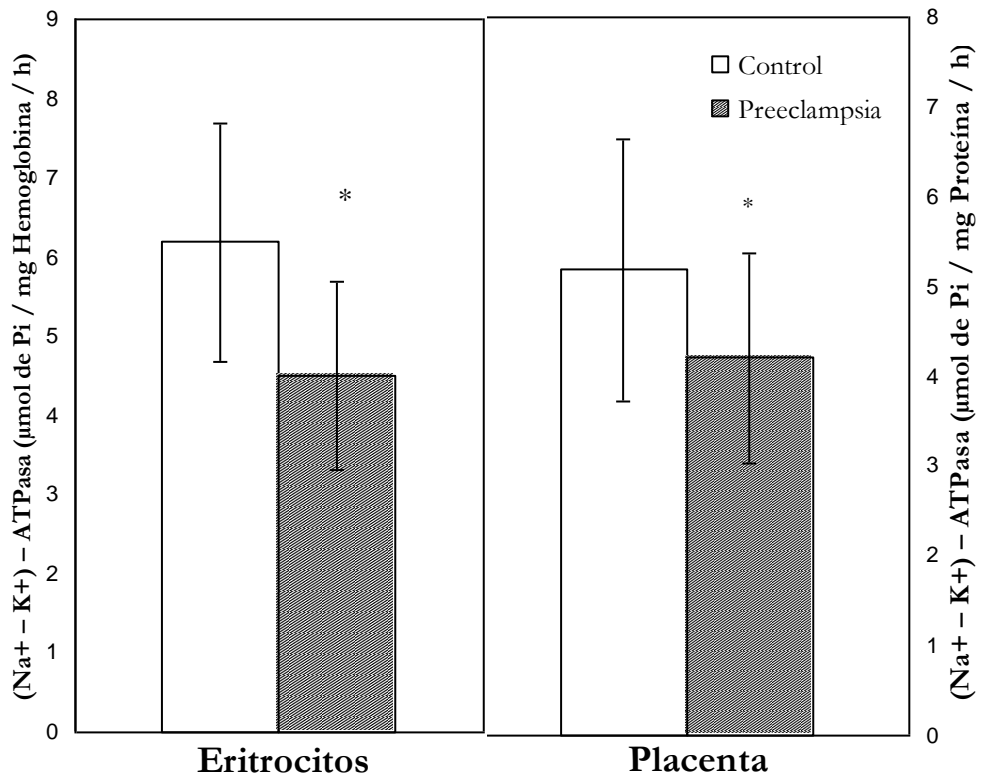


Figura 11: Actividad  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPasa}$  en eritrocitos y placenta de mujeres con embarazos normales y con preeclampsia. Los valores están expresados como promedio  $\pm$  S. \* $p < 0.05$  vs control. Pi: Fósforo inorgánico.



## 6. DISCUSIÓN

Las características fisiopatológicas del cuadro clínico de la PE, en gran medida obedecen a alteraciones en la función endotelial, cuyo origen se asocia con el estrés oxidativo (Roberts y Lain, 2002), lo que coincide con los resultados de esta memoria, demuestran la participación del estrés oxidativo en la PE. Aunque el embarazo ya es una condición que favorece el estrés oxidativo, se ha observado que esta condición se exagera en las mujeres con PE. Se ha sugerido que estas mujeres podrían tener una predisposición subyacente al estrés oxidativo, la que podría contribuir a una respuesta inflamatoria persistente de baja magnitud (Barden *et al.*, 2001). Este punto de vista es consistente con el descubrimiento más reciente de que la PE está asociada con una predisposición al aumento de la producción de ERO mediado por NADPH oxidasa (Lee *et al.*, 2003).

El estrés oxidativo es un trastorno metabólico que surge de un desbalance, en que predominan los mecanismos formadores de ERO en relación a la defensa antioxidante, y en esta memoria se encontró que la defensa antioxidante de las mujeres preeclámpticas está disminuida en comparación a sus controles, lo que se evidenció a través de la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes y que coincide con estudios anteriores (Sagol *et al.*, 1999). Respecto a la SOD y la CAT se observó que la actividad de ambas enzimas disminuyó en las mujeres con PE tanto en eritrocitos como en placenta, lo que estaría de acuerdo a otros estudios (Madazli *et al.*, 2002; Orhan *et al.*, 2003; Vaughan y Walsh, 2002). En cambio la actividad de la GSH-Px sólo se encontró disminuida en eritrocitos lo que coincide con Llurba, *et al.*, (2004), pero en placenta no se encontraron diferencias estadísticamente significativa lo que sería contradictorio con algunos

estudios que indican lo contrario (Vaughan y Walsh, 2002), aunque si concuerda con otros autores que no encontraron diferencias significativas entre controles y PE (Funai *et al.*, 2002).

Con respecto a la disminución de la defensa antioxidante, otra variable que nos explica esta disminución, sería una menor capacidad antioxidante del plasma expresado por una disminución de FRAP, lo que está de acuerdo con estudios anteriores, que indicaban que las mujeres con preeclampsia severa asociada a síndrome HELLP presentaban un FRAP disminuido (Zusterzeel *et al.*, 2001). La disminución de FRAP en estas pacientes podría deberse a una disminución de antioxidantes plasmáticos como la vitamina C, la vitamina E, los carotenoides u otros antioxidantes plasmáticos, tal como lo indica Palan *et al.*, (2001).

Los resultados de la presente memoria muestran un aumento de la lipoperoxidación en las mujeres con PE, evidenciado por un incremento de los F2-isoprostanos a nivel plasmáticos y MDA a nivel tisular (eritrocitos y placenta), lo que se debería al efecto prooxidante provocado por el aumento de ERO a nivel celular que explicarían la mayor lipoperoxidación (Takacs *et al.*, 2001). Este efecto se observó tanto a nivel plasmático como a nivel tisular. Es un hecho conocido que la deficiente placentación observada en la PE genera un estado de hipoxia en este tejido a causa de la disminución del calibre de las arterias espirales (Myatt, 2002). Este hecho trae diversas consecuencias metabólicas y fisiopatológicas que determinan tanto la producción de ERO en la placenta, como difusión sistémica a través de leucocitos activados o por diversos productos, entre los cuales se encuentran los peróxidos de lípidos, tales como MDA y F2-isoprostanos. Además, el aumento de los lipoperoxidos en la PE podría ser responsable de la activación y disfunción endotelial en esta

enfermedad (Roberts, 1998). Más aún, en otros estudios se ha encontrado que cotiledones de placentas preeclámpticas en incubación, muestran una producción de F<sub>2</sub>-isoprostanos y MDA significativamente mayor que la de sus controles, lo que indicaría que existe un aumento de la lipoperoxidación en este tejido, siendo ésto compatible con la presencia de estrés oxidativo (Walsh *et al.*, 2000).

A la disminución de un potente vasodilatador como es el NO descrita por algunos trabajos, hay que añadir el incremento de los F<sub>2</sub>-isoprostanos, que al ser un potente vasoconstrictor (McGiff y Quilley, 2001), y al estimular la proliferación y la expresión de otro agente vasoconstrictor como es la endotelina 1 por parte de las células endoteliales (Khedun *et al.*, 2002; Yura *et al.*, 1999), podrían contribuir a explicar en parte el mecanismo de la hipertensión arterial de las mujeres con PE.

Los resultados de algunos autores como Serdar *et al* (2003) han demostrado un aumento de carbonilación de proteínas en pacientes con PE, lo que concuerda con nuestros resultados. En este caso, el estrés oxidativo provocaría oxidación de algunos aminoácidos de las proteínas y formaría un doble enlace carbono-oxígeno (grupo carbonilo), lo que altera la estructura de la proteína haciéndola más sensible a las enzimas proteolíticas, y por lo tanto, nuestros datos concuerdan con otros que indican que la oxidación de las proteínas puede ser utilizado como un marcador de estrés oxidativo. Estos datos implican que el estrés oxidativo estaría presente alterando las macromoléculas como lípidos y proteínas.

Además se encontró una disminución de la actividad de la enzima de membrana (Na<sup>+</sup> – K<sup>+</sup>) – ATPasa en eritrocitos y placenta de mujeres con PE, lo

que constituye un hallazgo no descrito anteriormente. Esta enzima es en gran parte responsable del mantenimiento del potencial electroquímico y del voltaje de membrana de la mayoría de las células del organismo. La actividad contráctil del músculo es un fenómeno mecánico precedido por un fenómeno eléctrico, y está determinada por la concentración de iones  $\text{Ca}^{++}$  a uno y otro lado de la membrana celular y de la membrana de organelos como el retículo sarcoplásmico o la mitocondria. Estos iones  $\text{Ca}^{++}$  regulan la interacción entre los filamentos de actina y miosina, al igual que en el músculo esquelético. La concentración de  $\text{Ca}^{++}$  mioplásmica es regulada por varios mecanismos. Entre ellos, el flujo de entrada de calcio dependiente del potencial de membrana a través de los canales de  $\text{Ca}^{++}$  dependientes de voltaje desde el espacio extracelular, y el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  a través del sarcolema, donde los gradientes mantenidos por la bomba  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPasa}$  suelen dar lugar a la salida de  $\text{Ca}^{++}$  y la entrada de  $\text{Na}^+$  hacia el interior de la célula. Por lo tanto, una disminución de la actividad  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPasa}$ , generaría despolarización en la fibra muscular lisa, con un consecuente aumento del  $\text{Ca}^{++}$  mioplásmico por ambos mecanismos, y de ésta manera del aumento del  $\text{Ca}^{++}$  intracelular (Berne y Levy, 1999). Esto, explicaría en parte el aumento de contractilidad del músculo liso vascular (vasoespasma) (Roberts, 1998) encontrado en la PE, como un mecanismo independiente y aditivo de la disminución de la biodisponibilidad de NO.

Por otra parte, el aumento de peroxidación lipídica revela el daño oxidativo directo de los fosfolípidos de membrana provocado por las ERO, en especial a los ácidos grasos poli-insaturados, lo cual indirectamente podría alterar el microambiente lipídico que rodea a la  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPasa}$ , y podría explicar el deterioro de su función. Sin embargo, estos resultados fueron obtenidos en placenta y glóbulos rojos de pacientes con PE, por lo cual es necesario y se

justifica investigar con mayor profundidad si los resultados obtenidos concuerdan con lo que sucede en otros tipos celulares tales como el músculo liso vascular. La disminución de la actividad de la enzima podría deberse a daño directo e indirecto inducido por estrés oxidativo. Además, no se puede establecer categóricamente si esta alteración de la  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPasa}$  es causa o efecto del estrés oxidativo, aunque pareciera más probable lo segundo.

Los resultados obtenidos apoyan el uso de una terapia antioxidante en mujeres con PE, ya que en el desbalance que genera un estatus de estrés oxidativo, estarían implicados tanto un aumento en la producción de ERO como una disminución de los sistemas antioxidantes, aunque este tratamiento tendría que ser realizado en estados tempranos de la enfermedad. (Chappell *et al*, 2002).

## 7. CONCLUSIONES

La preeclampsia es un síndrome que puede ser mediado por el incremento del estrés oxidativo, asociado a disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, y de la capacidad antioxidante del plasma. En la preeclampsia el predominio de ERO provocaría daño de macromoléculas de placenta, plasma y eritrocitos como son los lípidos y proteínas. En la preeclampsia la actividad de la  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPasa}$  disminuiría posiblemente por la peroxidación de fosfolípidos de membrana tanto en eritrocitos como en placenta.

Estos resultados apoyan el empleo de terapia antioxidante en un periodo precoz en embarazos con riesgo de sufrir PE.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- **AEBI, H.** 1974. Catalase. **In:** Methods in Enzymatic Analysis. 29 Ed. Academic Press, New York. USA. pp. 673-678.
- **AFIFI, Y.; CHURCHILL, D.** 2003. Pharmacological treatment of hypertension in pregnancy. *Curr. Pharm.* 9:1745-1753.
- **AKSOY, H.; TAYSI, S.; ALTINKAYNAK, K.; BAKAN, E.; BAKAN, N.; KUMTEPE, Y.** 2003. Antioxidant potential and transferrin, ceruloplasmin, and lipid peroxidation levels in women with preeclampsia. *J. Investing. Med.* 51:284-287.
- **ALBAIGES, G., MISSFELDER-LOBOS, H., LEES,C., PARRA, M., NICOLIDES,K.** 2000. One-stage screening for pregnancy complications by color Doppler assasment of the uterina arteries at 23 weeks´ gestation. *Obstet. Gynecol.* 96:559-564.
- **ARNGRIMSSON, R., BJORNSSON, S., GEIRSSON, R.T., BJORSSON, H., WALKER, J.J.; SNAEDAL, G.** 1990. Genetic and familiar predisposition to eclampsia and preeclampsia in a defined population. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 97: 762-769.
- **ASLAN, H.; GUL, A.; CEBECI, A.** 2004. Neonatal outcome in pregnancies after preterm delivery for HELLP syndrome. *Gynecol. Obstet. Invest.* 58:96-99.
- **AYDIN, S.; BENIAN, A.; MADAZLI, R.; ULUDAG, S.; UZUN, H.; KAYA, S.** 2004. Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 113:21-25.

- **BALDWIN, A.S. JR.** 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14:649-683.
  
- **BARDEN, A.; RITCHIE, J.; WALTERS, B.; MICHAEL, C.; RIVERA, J.; MORI, T.; CROFT, K.; BEILIN, L.** 2001. Study of plasma factors associated with neutrophil activation and lipid peroxidation in preeclampsia. *Hypertension.* 38:803-808.
  
- **BASBUG, M.; DEMIR, I.; SERIN, I.S.; OZCELIK, B.; SARAYMEN, R.; NARIN, F.; TAYYAR, M.** 2003. Maternal erythrocyte malondialdehyde level in preeclampsia prediction: a longitudinal study. *J. Perinat. Med.* 31:469-474.
  
- **BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J.** 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power. The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239:70-76.
  
- **BERNE R, LEVY M.** 1999. El músculo en las paredes de los órganos huecos. **In:** *Fisiología.* 2ª Ed. Harcourt Brace. Madrid, España. pp. 197-210.
  
- **BILODEAU, J.F.; HUBEL, C.A.** 2003. Current concepts in the use of antioxidants for the treatment of preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 25:742-750.
  
- **BURTON, G.J.; JAUNIAUX, E.** 2004. Placental oxidative stress: From miscarriage to preeclampsia. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 11:342-352.
  
- **CARRERA, F.; CASART, Y.C.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F.; MARIN, R.** 2003. Preeclampsia and calcium-ATPase activity of plasma membranes from human myometrium and placental trophoblast. *Hypertens. Pregnancy.* 22:295-304.



- **CHAPPELL, L.C.; SEED, P.T.; BRILEY, A.L.; KELLY, F.J.; LEE, R.; HUNT, B.J.; PARMAR, K.; BEWLEY, S.J.; SHENNAN, A.H.; STEER, P.J.; POSTON, L.** 1999. Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet.* 354:810-816.
  
- **CHAPPELL, L.C.; SEED, P.T.; KELLY, F.J.; BRILEY, A.; HUNT, B.J.; CHARNOCK-JONES, D.S.; MALLET, A.; POSTON, L.** 2002. Vitamin C and E supplementation in women at risk of preeclampsia is associated with changes in indices of oxidative stress and placental function. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187:777-784.
  
- **CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F.** 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Brit. Med. Bull.* 49:481-493.
  
- **CHIEN, P. F., ARNOTT, N., GORDON, A., OWEN, P., KHAN, K. S.** 2000. How useful is uterine artery doppler flow velocimetry in the prediction of preeclampsia, intrauterine growth retardation and perinatal death? An overview. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 107:196-208.
  
- **CONDE-AGUDELO, A.; BELIZAN, J.M.** 2000. Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 107: 75-83.
  
- **CROSS, J.C.** 2003. The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem?. *Clin. Genet.* 64:96-103.
  
- **CROWTER, C.A.; HILLER, J.E.; PRIDMORE, B.; BRYCE, R.; DUGGAN, P.; HAGUE, W.M.; ROBINSON, J.S.** 1999. Calcium supplementation in nulliparous women for the prevention of pregnancy – induced hypertension, preeclampsia and preterm birth: an Australian randomized trial. PRACOG and the ACT Study Group. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 39:12-18.

- **DAVIDGE, S. T.** 1998. Oxidative stress and altered endothelial cell function in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 16:65-73.
  
- **DAVISON, J.M.; HOMUTH, V.; JEYABALAN, A.; CONRAD, K.P.; KARUMANCHI, S.A.; QUAGGIN, S.; DECHEND, R.; LUFT, F.C.** 2004. New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15:2440-2448.
  
- **DECHEND, R.; VIEDT, C.; MULLER, D.N.; UGELE, B.; BRANDES, R.P.; WALLUKAT, G.; PARK, J.K.; JANKE, J.; BARTA, P.; THEUER, J.; FIEBELER, A.; HOMUTH, V.; DIETZ, R.; HALLER, H.; KREUZER, J.; LUFT, F.C.** 2003. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation.* 107:1632-1639.
  
- **DEKKER, G.A.; SIBAI, B.M.** 1991. Early detection of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165:160-172.
  
- **DEKKER, G.A.; SIBAI, B.M.** 1993. Low-dose aspirin in the prevention of preeclampsia and fetal growth retardation: rationale, mechanisms, and clinical trials. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 168:214-227.
  
- **DEKKER, G.A.; SIBAI, B.M.** 1999. The immunology of preeclampsia. *Semin. Perinatol.* 23:24-33.
  
- **DEKKER, G.A.; SIBAI, B.M.** 2001. Primary, secondary, and tertiary prevention of pre-eclampsia. *Lancet.* 357:209-215.
  
- **DUERRSCHMIDT, N.; WIPPICH, N.; GOETTSCH, W.; BROMME, H.J.; MORAWIETZ, H.** 2000. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269:713-717.

- **ENDEMANN, D.H.; SCHIFFRIN, E.L.** 2004. Endothelial dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15:1983-1992.
  
- **FAINARU, O.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I.; ALMOG, B.; GAMZU, R.; KUPFERMINC M.** 2003. Preeclampsia is associated with increased susceptibility of serum lipids to copper-induced peroxidation in vitro. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 82:711-715.
  
- **FELFERNING-BOEHM, D.; SALAT, A.; VOGL, S.E.; MURABITO, M.; FELFERNING, M.; SCHMIDT, D.; MITTLBOECK, M.; HUSSLEIN, P.; MULLER, M.R.** 2000. Early detection of preeclampsia by determination of platelet aggregability. *Thromb. Res.* 98:139-146.
  
- **FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A.** 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology.* 105:114-121.
  
- **FUKUNAGA, M.; MAKITA, N.; ROBERTS, L.J.; MORROW, J.D.; TAKAHASHI, K.; BADR, K.F.** 1993. Evidence for the existence of F2-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am. J. physiol.* 264:1619-1624.
  
- **FUKUNAGA, M.; YURA, T.; BADR, K.F.** 1995. Stimulatory effect of 8-epi-PGF<sub>2α</sub>, an F2-isoprostane, on endothelin-1 release. *J. cardiovasc. Pharmacol.* 26:S51-S52.
  
- **FUNAI, E.F.; MACKENZIE, A.; KADNER, S.S.; ROQUE, H.; LEE, M.J.; KUCZYNSKI, E.** 2002. Glutathione peroxidase levels throughout normal pregnancy and in pre-eclampsia. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 12:322-326.

- **GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R.** 2004. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 93:105-13.
  
- **GICHEVA, M.; CHUKANOV, K.; MAZNEIKOVA, V.; IVANOV, S.** 2004. Effect of antioxidants in women with increased risk of preeclampsia. The role of oxidative stress in preeclampsia. *Akush. Ginekol. (Sofia).* 43:62-64.
  
- **GRATACÓS, E.; CASALS, E.; DEULOFEU, R.; CARARACH, V.; ALONSO, P.L.; FORTUNY, A.** 1998. Lipid peroxide and vitamin E patterns in women with different types of hipertensión in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178:1072-1076.
  
- **GULMEZOGLU, A.M.; HOFMEYR, G.J.; OOSTHUISEN, M.M.** 1997. Antioxidants in the tretment of severe preeclampsia: an explanatory randomised controlled trial. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 104:689-696.
  
- **GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B.** 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899:136-147.
  
- **HADDAD, T.** 2002. Uptdate on preeclampsia. *Intrer. Anesth. Clin.* 40:115-135.
  
- **HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.** 1995. The definition and measurement of antioxidants and biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 18:125-125.
  
- **HASSOUN, P.M.; YU, F.S.; SHEDD, A.L.; ZULUETA, J.J., THANNICKAL; V.J., LANZILLO; J.J., FANBURG, B.L.** 1994. Regulation of endothelial cell xanthine dehydrogenase xanthine oxidase gene expression by oxygen tension. *Am J Physiol.* 266:163-171.

- **HUBEL, C.A.** 1999. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:222-235..
  
- **JAESCHKE, H.** 1995. Mechanism of oxidant Stress-induced acute tissue injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 209:104-111.
  
- **KATZ, A.I.; EPSTEIN, F.H.** 1967. The role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the reabsorption of sodium by the kidney. *J. Clin. Invest.* 46:1999-2011.
  
- **KHEDUN, S.M.; NAICKER, T.; MOODLEY, J.** 2002. Endothelin-1 activity in pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol.* 22:590-593.
  
- **KUMAR, C.A.; DAS, U.N.** 2000. Lipid peroxides, anti-oxidants and nitric oxide in patients with pre-eclampsia and essential hypertension. *Med. Sci. Monit.* 6:901-907.
  
- **LEE, V.M.; QUINN, P.A.; JENNINGS, S.C.; NG, L.L.** 2003. NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models. *Hypertension.* 41:925-931.
  
- **LEVINE, R.J.; MAYNARD, S.E.; QIAN, C.; LIM, K.H.; ENGLAND, L.J.; YU, K.F.; SCHISTERMAN, E.F.; THADHANI, R.; SACHS, B.P.; EPSTEIN, F.H.; SIBAI, B.M.; SUKHATME, V.P.; KARUMANCHI, S.A.** 2004. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 350:672-683.
  
- **LLURBA, E.; GRATACOS, E.; MARTIN-GALLAN, P.; CABERO, L.; DOMINGUEZ, C.** 2004. A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy. *Free Radic. Biol. Med.* 37:557-570.

- **LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.**  
1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
  
- **LOZANO, J.A.; GALINDO, J.D.; GARCÍA-BORRÓN, J.C.; MARTÍNEZ-LIARTE, J.H.; PEÑAFIEL, R.; SOLANO, F.** 2000. *Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud.* 2ª Ed. McGraw-Hill Interamericana. Barcelona, España. 140 p.
  
- **LYELL, D.J.; LAMBERT-MESSERLIAN, G.M.; GIUDICE, L.C.**  
2003. Prenatal screening, epidemiology, diagnosis, and management of preeclampsia. *Clin. Lab. Med.* 23:413-442.
  
- **MADAZLI, R.; BENIAN, A.; AYDIN, S.; UZUN, H.; TOLUN, N.**  
2002. The plasma and placental levels of malondialdehyde, glutathione and superoxide dismutase in pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol.* 22:477-480.
  
- **MANY, A.; HUBEL, C.A.; FISHER, S.J.; ROBERTS, J.M.; ZHOU, Y.**  
2000. Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am. J. Pathol.* 156:321-331.
  
- **MARCOUX, S.; BRISSON, J.; FABIA, J.** 1991. Calcium intake from diary products and supplements and the risks of preeclampsia and gestacional hypertension. *Am. J. Epidemiol.* 133:1266-1272.
  
- **MASSE, J.; FOREST, J.C. MOUTQUIN, J.M.; MARCOUX, S.; BRIDEAU, N.A.; BELANGER, M.** 1993. A prospective study of several potential biologic markers for early prediction of the development of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169:501-508.

- **MASSE, J.; GIGUERE, Y.; KHARFI, A.; GIROUARD, J.; FOREST, J.C.** 2002. Pathophysiology and maternal biologic markers of preeclampsia. *Endocrine*. 19:113-125.
  
- **MAULIK, N.; DAS D.K.** 2002. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 1047-1060.
  
- **MAYNARD, S.E.; MIN, J.Y.; MERCHAN, J.; LIM, K.H.; LI, J.; MONDAL, S.; LIBERMANN, T.A.; MORGAN, J.P; SELLKE, F.W.; STILLMAN, I.E.; EPSTEIN, F.H.; SUKHATME, V.P.; KARUMANCHI, S.A.** 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.
  
- **MCGIFF, J.C.; QUILLEY, J.** 2001. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids and blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 10:231-237.
  
- **MEEKINS, J.W.; PIJNENBORG, R.; HANSENS, M.; MCFADYEN, I.R.; VAN ASSHE, A.** 1994. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe preeclamptic pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 101:669-674.
  
- **MERVIEL, P.; CARBILLON, L.; CHALLIER, J.C.; RABREAU, M.; BEAUFILS, M.; UZAN, S.** 2004. Pathophysiology of preeclampsia: links with implantation disorders. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 115:134-147.
  
- **MOHINDRA, A.; KABI, B.C.; KAUL, N.; TRIVEDI, S.S.** 2002. Vitamin E and carotene status in pre-eclamptic pregnant women from India. *Panminerva. Med.* 44:261-264.

- **MORETTI, M.; PHILLIPS, M.; ABOUZEID, A.; CATANEO, R.N.; GREENBERG, J.** 2004. Increased breath markers of oxidative stress in normal pregnancy and in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190: 1184-1190.
  
- **MYATT, L.** 2002. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine.* 19:103-11
  
- **MYATT, L.; CUI, X.** 2004. Oxidative stress in the placenta. *Histochem. Cell. Biol.* 122:369-382.
  
- **NAGAMATSU, T.; FUJII, T.; KUSUMI, M.; LI Z.; YAMASHITA T.; OSUGA, Y.; MOMOEDA, M.; KOZUMA, S.; TAKETANI, Y.** 2004. Cytotrophoblasts up-regulate Soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1 Expression under Reduced Oxygen: An Implication for the Placental Vascular Development and the Pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology.* 145:4838-4845.
  
- **OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K.** 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95:351-357.
  
- **OLSEN, S.; SECHER, N.J.; TABOR, A.; WEBER, T.; WALKER, J.J.; GLUUD, C.** 2000. Randomised clinical trial of fish oil supplementation in high risk pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 107:382-395.
  
- **ORHAN, H.; ONDEROGLU, L.; YUCEL, A.; SAHIN, G.** 2003. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch. Gynecol. Obstet.* 267:189-195.



- **PALAN, P.R.; MIKHAIL, M.S.; ROMNEY, S.L.** 2001. Placental and serum levels of carotenoids in preeclampsia. *Obstets. Gynecol.* 98:459-462.
  
- **PALAN, P.R., SHABAN, D.W.; MARTINO, T.; MIKHAIL, M.S.** 2004. Lipid-soluble antioxidant and pregnancy: maternal serum levels of coenzyme Q(10), alpha-tocopherol and gamma-tocopherol in preeclampsia and normal pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.* 58:8-13.
  
- **PANBURANA, P.; PHUAPRADIT, W.; PUCHAIWATANANON, O.** 2000. Antioxidant nutrients and lipid peroxide levels in Thai preeclamptic pregnant women. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 26:377-381.
  
- **PATRICK, T.E.; HUBEL, C.A.; ROERT, J.M.** 2004. Evidence of increased oxidative stress, unexplained by lipid changes, is present in nulliparous black women from early gestation. *Hypertens. Pregnancy.* 23:91-100.
  
- **POSTON, L.; RAIJMAKERS, M.T.** 2004. Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome—a review. *Placenta.* 25:S72-S78.
  
- **PRADELLES, P.; GRASSI, J.; MACLOUF, J.** 1985. Enzyme immunoassay of eicosanoids using AchE as label. An alternative to radioimmunoassay. *Anal. Chem.* 57:1170-1173.
  
- **RAIJMAKERS, M.T.; DECHEND, R.; POSTON, L.** 2004. Oxidative stress and preeclampsia: Rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension.* 44:374-380.
  
- **REINGARDIENE, D.** 2003. Preeclampsia and eclampsia. *Medicina (Kaunas).* 39:1244-1252.

- **REGAN, C.L.; LEVINE, R.J.; BAIRD, D.D.; EWELL, M.G; MARTZ, K.L.; SIBAI, B.M.; ROKACH, J.; LAWSON, J.A.; FITZGERALD, G.A.** 2001. No evidence for lipid peroxidation in severe preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185:572-578.
  
- **REZNICK, A.Z.; PACKER, L.** 1994. Oxidative damage to protein: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods. Enzimol.* 233:357-363.
  
- **ROBERTS, J.M.** 1998. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 16:5-15.
  
- **ROBERTS, J.M.; COOPER, D.W.** 2001. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet.* 357:53-56.
  
- **ROBERTS, J.M.; LAIN, K.Y.** 2002. Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta.* 23:359-372.
  
- **ROBERTS, J.M.; PEARSON, G.; CUTLER, J.; LINDHEIMER, M.** 2003. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension.* 41:437-445.
  
- **ROBILLARD, P. Y., HULSEY, T. C., PERIANIN, J., JANKY, E., MIRI, E. H., PAPIERNIK, E.** 1994. Association of pregnancy-inducer hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet.* 344: 973-975.
  
- **RODRIGO, R.; PASSALACQUA, W.; ARAYA, J.; ORELLANA, M.; RIVERA, G.** 2003. Homocysteine and essential hypertension. *J Clin Pharmacol* 43:1299-1306.

- **RODRIGO, R.; RIVERA, G.** 2003. Papel del estrés oxidativo y de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles. Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
  
- **ROES, E.M.; SWEEP, C.G.; THOMAS, C.M.; ZUSTERZEEL, P.L.; GEURTS-MOESPOT, A.; PETERS, W.H.; STEEGERS, E.A.** 2002. Level of plasminogen activators and their inhibitors in maternal and umbilical cord plasma in severe preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187:1019-1025.
  
- **SAGOL, S.; OZKINAY, E.; OZSENER, S.** 1999. Impaired antioxidant activity in women with pre-eclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 64:121-127.
  
- **SAVVIDOU, M.D.; HINGORANI, A.D.; TSIKAS, D.; FROLICH, J.C.; VALLANCE, P.; NICOLAIDES, K.H.** 2003. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet.* 361:1511-1517.
  
- **SCHLEMBACH D.** 2003. Pre-eclampsia--still a disease of theories. *Fukushima J. Med. Sci.* 49:69-115.
  
- **SERDAR, Z.; GUR, E.; DEVELIOGLU, O.; COLAKOGULLARI, M.; DIRICAN, M.** 2002. Placental and decidual lipid peroxidation and antioxidant defenses in preeclampsia. *Lipid peroxidation in preeclampsia. Pathophysiology.* 9:21.
  
- **SERDAR, Z.; GUR, E.; COLAKOETHULLARY, M.; DEVELIOETHLU, O.; SARANDOL, E.** 2003. Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia. *Arch. Gynecol. Obstet.* 268:19-25.

- **SIBAI, B.M.** 2004. Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet. Gynecol.* 103:981-991.
  
- **SIKKEMA, J.M.; VAN RIJN, B.B.; FRANX, A.; BRUINSE, H.W.; DE ROOS, R.; STROES, E.S.; VAN FAASSEN, E.E.** 2001. Placental superoxide is increased in pre-eclampsia. *Placenta.* 22:304-308.
  
- **STAFF AC, HALVORSEN B.** 2003. Isoprostanes--new markers of oxidative stress. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 123:315-318.
  
- **SYDOW, K.; SCHWEDHELM, E.; ARAKAWA, N.; BODE-BOGER, S.M.; TSIKAS, D.; HORNIG, B.; FROLICH, J.C.; BOGER, R.H.** 2003. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res.* 57:244-252.
  
- **TAKACS, P.; KAUMA, S.W.; SHOLLEY, M.M.; WALSH, S.W.; DINSMOOR, M.J.; GREEN, K.** 2001. Increased circulating lipid peroxides in severe preeclampsia activate NF-kappaB and upregulate ICAM-1 in vascular endothelial cells. *FASEB J.* 15:279-281.
  
- **TAKAGI, Y.; NIKAIDO, T.; TOKI, T.; KITA, N.; KANAI, M.; ASHIDA, T.; OHIRA, S.; KONISHI, I.** 2004. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows. Arch.* 444:49-55.
  
- **VAN DE WOUWER, M.; COLLEN, D.; CONWAY.** 2004. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1374-1383.

- **VANWIJK, M.J.; BOER, K.; VAN DER MEULEN, E.T.; BLEKER, O.P.; SPAAN, J.A.; VANBAVEL, E.** 2002. Resistance artery smooth muscle function in pregnancy and preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 186:148-154.
  
- **VAR, A.; KUSCU, N.K.; KOYUNCU, F.; UYANIK, B.S.; ONUR, E.; YILDIRIM, Y.; ORUC, S.** 2003. Atherogenic profile in preeclampsia. *Arch. Gynecol. Obstet.* 268:45-47.
  
- **VAUGHAN, J.E.; WALSH, S.W.** 2002. Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy.* 21:205-223.
  
- **VILLAR, M.A.; SIBAI, B.M.** 1989. Clinical significance of elevated mean arterial blood pressure in second trimestre and threshold increase in systolic or diastolic blood pressure during tirad trimestre. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 160:419-423.
  
- **WALSH, S.W.; VAUGHAN, J.E.; WANG, Y.; ROBERTS, L.J.** 2000 Placental isoprostane is significantly increased in Preeclampsia. *FASEB J.* 14:1289-1296.
  
- **WANG, Y.; WALSH, S.W.** 2001. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta.* 22:206-212.
  
- **WANG, Y.; GU Y, ZHANG Y, LEWIS DF.** 2004. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia: decreased endothelial nitric oxide synthase expression is associated with increased cell permeability in endothelial cells from preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190:817-824

- **WIKTOR, H.; KANKOFER, M.; SCHMEROLD, I.; DADAK, A.; LOPUCKI, M.; NIEDERMULLER, H.** 2004. Oxidative DNA damage in placentas from normal and pre-eclamptic pregnancies. *Virchows Arch.* 445:74-78.
  
- **WILSON, M.I.; GOODWIN, T.M.; PAN, V.I.; INGLES, S.A.** 2003. Molecular epidemiology of preeclampsia. *Obstet. and Gynecol. Survey.* 58:39-66.
  
- **WISDOM, S.J.; WILSON, R.; MCKILLOP, J.H.; WALKER, J.J.** 1991. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165:1701-1704.
  
- **YURA, T.; FUKUNAGA, M.; KHAN, R.; NASSAR, G.N.; BADR, K.F.; MONTERO, A.** 1999. Free-radical-generated F2-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int.* 56:471-478.
  
- **ZETEROGLU, S.; USTUN, Y.; USTUN, Y.E.** 2004. Placental and cord malondialdehyde and maternal and perinatal outcomes. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 85:47-49.
  
- **ZUSTERZEEL, P.L.; RUTTEN, H.; ROELOFS, H.M.; PETERS, W.H.; STEEGERS, E.A.** 2001. Protein carbonyls in decidua and placenta of pre-eclamptic women as markers for oxidative stress. *Placenta.* 22:213-219.

**ANEXO 1. Características gestacionales de pacientes controles y con preeclampsia**

	Control	Preeclampsia
Edad gestacional (semanas)	34.1 ± 2.1	34.3 ± 3.2
Desviación del peso del Recién nacido	- 0.06 ± 0.18	- 0.93 ± 0.17*
Proteinuria (g/día)	insignificante	3.52 ± 0.3*
Recuento de plaquetas (u/mm <sup>3</sup> )	203,315 ± 742	118,317 ± 635*
Hematocrito (%)	32.9 ± 0.3	35.8 ± 0.2
ALT (UI/ml)	26.0 ± 6.2	26.6 ± 4.8
AST (UI/ml)	17.0 ± 7.2	28.1 ± 8.3
Creatinina sérica (mg/dL)	0.60 ± 0.05	0.83 ± 0.07*

Los valores están expresados como promedio ± desviación estándar; u, unidades; UI, unidades internacionales; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; \*p<0.05 vs. control