



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ANIMALES



EVALUACIÓN DE LA PROFILAXIS DE LA PREECLAMPSIA DE
LA MUJER CON VITAMINAS E Y C, A TRAVÉS DEL USO DE
INDICADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO

IGOR VERDUGO PONTIGO

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

PROFESOR GUIA: Prof. Dr. RAMÓN RODRIGO SALINAS

SANTIAGO, CHILE
2008



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



EVALUACIÓN DE LA PROFILAXIS DE LA PREECLAMPSIA DE LA MUJER CON VITAMINAS E Y C, A TRAVÉS DEL USO DE INDICADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO

IGOR VERDUGO PONTIGO

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: RAMÓN RODRIGO SALINAS
PROFESOR CONSEJERO	: MARIO DUCHENS
PROFESOR CONSEJERO	: VICTOR HUGO PARRAGUEZ

SANTIAGO, CHILE
2008

INDICE

	<i>Página</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Generalidades.....	3
2.2 Características de PE.....	4
2.3 Etiopatogenia de PE.....	5
<i>Etapa 1: Alteración de la Perfusión Placentaria</i>	8
<i>Etapa 2: Disfunción endotelial</i>	10
2.4 Estrés Oxidativo en la PE.....	14
2.4.1 <i>Sistema de Defensa Antioxidante</i>	20
2.4.1.1 <i>Enzimas Antioxidantes</i>	22
2.4.1.1.1 <i>Superóxido dismutasa (SOD)</i>	23
2.4.1.1.2 <i>Catalasa (CAT)</i>	24
2.4.1.1.3 <i>Glutación peroxidasa (GSH-px)</i>	25
2.4.1.2 <i>Moléculas o sustancias antioxidantes</i>	26
2.4.2 <i>Daño oxidativo sobre Biomoléculas</i>	29
2.4.2.1 <i>Lipoperoxidación</i>	30
2.4.2.2 <i>Daño oxidativo de las proteínas</i>	34
2.4.2.3 <i>Daño oxidativo sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN)</i> ...	34
2.4.3 <i>Efectos del estrés oxidativo sobre (Na⁺ – K⁺) – ATPasa (enzima de membrana)</i>	35
2.5 Predictores de PE.....	36
2.5.1 <i>Factores de Riesgo de la Historia Clínica y Embarazo Actual</i>	36
2.5.2 <i>Presión Arterial</i>	37
2.5.3 <i>Ácido Úrico</i>	37
2.5.4 <i>Proteinuria</i>	38
2.5.5 <i>Doppler de la Arteria Uterina</i>	38

2.6	Profilaxis en PE.....	40
2.6.1	<i>Suplemento de Calcio</i>	40
2.6.2	<i>Aspirina</i>	41
2.6.3	<i>Suplemento de Ácidos Grasos Omega 3.</i>	42
2.6.4	<i>Suplemento de Vitaminas Antioxidantes</i>	43
3.	OBJETIVOS	46
3.1	Objetivo general.....	46
3.2	Objetivos específicos	46
4.	MATERIALES Y METODOS	47
4.1	Diseño y tamaño de muestra.....	47
4.1.1	Pacientes.....	47
4.1.2	Unidad de análisis.....	47
4.1.3	Muestra.....	49
4.2	Técnicas analíticas y bioquímicas aplicadas	50
4.2.1	<i>Variables bioquímicas de defensas antioxidantes</i>	50
4.2.1.1	<i>SOD</i>	50
4.2.1.2	<i>CAT</i>	50
4.2.1.3	<i>GSH-px</i>	51
4.2.1.4	<i>Capacidad antioxidante del plasma</i>	51
4.2.2	<i>Variables bioquímicas de estrés oxidativo: lipoperoxidación</i>	52
4.2.2.1	<i>MDA</i>	52
4.2.2.2	<i>F₂-Isoprostanos</i>	52
4.2.3	<i>Efectos sobre Enzimas de Membrana: Actividad de (Na⁺ – K⁺) – ATPasa</i>	53
4.2.4	<i>Determinación de hemoglobina</i>	53
4.2.5	<i>Determinación del contenido total de proteínas</i>	53
4.3	Análisis Estadístico	54

5	RESULTADOS	55
5.1	Pacientes.....	55
5.2	Defensas Antioxidantes (SOD, CAT, GSH-px y FRAP).....	56
5.3	Lipoperoxidación (MDA y F2 Isoprostanos).....	58
5.4	Efectos Sobre Enzimas de Membrana en placenta:	
	Actividad de (Na ⁺ – K ⁺) – ATPasa	59
6	DISCUSIÓN	60
7	CONCLUSIÓN	69
8	BIBLIOGRAFÍA	70

RESUMEN

La fisiopatología de la preeclampsia (PE) ha sido relacionada recientemente con la ocurrencia de estrés oxidativo. Consecuentemente, se sugirió que los antioxidantes, tales como la vitamina E (alfa tocoferol) y la vitamina C (ácido ascórbico), pueden ayudar a prevenir la enfermedad y ser utilizados como posibles tratamientos durante la gestación.

El propósito de este estudio, fue conocer el efecto de la administración precoz de vitaminas antioxidantes en mujeres con alto riesgo de desarrollar PE. Además, se determinaron valores predictivos de indicadores de estrés oxidativo en el plasma, eritrocitos y la placenta. Se realizó un estudio de cohorte retrospectivo seleccionando mujeres embarazadas chilenas controladas en el Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Clínico de la Universidad de Chile. A un grupo de 31 mujeres con alto riesgo de PE fueron administradas con dosis diarias de 400 UI de vitamina E sobre 1000 mg de ácido ascórbico. Otro grupo similar de 31 mujeres recibió placebo. Muestras de sangre fueron obtenidas en ambos grupos a las 12 semanas de gestación y al parto. También, se obtuvieron muestras de las placentas al parto.

Se realizaron determinaciones de las defensas antioxidantes en el plasma, (ferric reducing ability of plasma (FRAP)) y a nivel tisular (eritrocitos y placenta), tales como la actividad de las enzimas antioxidantes [superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px)]. El estrés oxidativo, se cuantificó mediante los indicadores bioquímicos de lipoperoxidación F_2 -isoprostanos libres y malondialdehído (MDA). También, se evaluó el impacto del

estrés oxidativo sobre la actividad enzimática de la $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPasa}$ en placenta como indicador funcional.

Las mujeres que recibieron tratamientos con vitaminas antioxidantes, respecto de las del grupo con placebo, presentaron valores similares de FRAP en plasma, de actividad de SOD, CAT y GSH-Px en eritrocitos y placenta ($p > 0.05$). Además, se detectó el mismo grado de lipoperoxidación, el cual se reflejó tanto en los niveles plasmáticos de F_2 -isoprostanos libres en plasma como en el contenido de malondialdehído en eritrocitos y placenta ($p > 0.05$). También se detectó que la actividad enzimática de la $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPasa}$ en placenta, no fue significativamente diferente entre las pacientes tratadas con vitaminas respecto al grupo placebo ($p > 0.05$).

Estos resultados rechazan la hipótesis de la eficacia de un tratamiento con vitaminas antioxidantes en la patogenia de la PE y apoyan la evaluación de la condición de esta enfermedad a través de los indicadores bioquímicos de estrés oxidativo señalados.

SUMMARY

The pathophysiology of preeclampsia (PE) has been recently related to the occurrence of oxidative stress. Consequently, it was suggested that antioxidants, such as vitamin E (alpha tocopherol) and the vitamin C (ascorbic acid), could help to prevent the disease and be used as possible treatments during pregnancy.

The aim of this study was to ascertain the effect of early administration of antioxidant vitamins in women with high risk of developing preeclampsia. In addition, the determination of the prediction value of plasma, erythrocytes and placenta indicators of oxidative stress. A retrospective study of cohort was done selecting pregnant Chilean women controlled in the Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Chile Clinical Hospital. A group of 31 women with high risk of preeclampsia were administered with daily doses of 400 IU vitamin E plus 1000 mg ascorbic acid. Another similar group of 31 women received placebo. Blood samples were drawn in both groups at 12 weeks of gestation and at delivery. Also, placenta was obtained after delivery.

Measurements of antioxidant defense capacity were performed in plasma (ferric reducing ability of plasma (FRAP)) and at tissue level (erythrocytes and placenta), the activity of antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione peroxidase (GSH-Px)] was assessed. The oxidative stress was quantified by means of the lipid peroxidation indexes of free F2-isoprostanes and malondialdehyde (MDA). The effect of oxidative stress on the activity of (Na + K)-ATPase in placenta was also analyzed as a functional indicator.

The women who received treatment with antioxidant vitamins, respect to the placebo group, showed similar FRAP values in plasma, and in the activity of SOD, CAT and GSH-Px in erythrocytes and placenta ($p > 0.05$). In addition, it was found the same extent of lipid peroxidation, which was reflected in the plasma levels of F2-isoprostanos free in plasma as in the content of malondialdehyde in erythrocytes and placenta ($p > 0.05$). Also the activity of (Na + K)-ATPase in placenta was not significantly different between the patients treated with vitamins respect to placebo group ($p > 0.05$).

These results reject the hypothesis of the efficiency of a treatment with antioxidant vitamins in the pathogeny of the PE and support the evaluation of the condition of this disease across the biochemical indicators of oxidative stress indicated.

1. INTRODUCCIÓN

La preeclampsia (PE) es un síndrome que afecta alrededor de un 5% de los embarazos, causando una importante morbilidad y mortalidad materna y fetal (Maynard *et al.*, 2003). 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). El síndrome es extremadamente impredecible, ya que en algunos casos evoluciona en pocas horas a una PE severa o, peor aún, a una eclampsia fulminante, aunque en la mayoría de los casos no llega más allá de una PE ligera (Laigaard *et al.*, 2005). Entre sus posibles efectos negativos se encuentran retraso en el crecimiento fetal asociado a subperfusión placentaria, partos prematuros, Eclampsia, síndrome HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y bajo recuento de plaquetas), mortalidad materna y/o fetal (Roberts *et al.*, 2003).

Hasta ahora, la única forma de frenar el desarrollo de esta enfermedad es la interrupción del embarazo, tampoco existen medidas preventivas terapéuticas que eviten su aparición. Además, el método de detección de PE más efectivo hasta el momento es la flujometría Doppler, sin embargo, realiza una predicción tardía cuando la enfermedad ya está en progreso y no permite ensayar ningún tipo de intervención preventiva.

Las causas de PE son complejas y múltiples, con una combinación de efectos ambientales y genéticos de origen materno y/o paterno. A nivel histológico PE es caracterizada por una colonización superficial del endometrio materno (y más específicamente la pared de las arterias uterinas) por los trofoblastos invasivos. Este proceso ocurre alrededor del final del primer trimestre de la gestación, generando una alta resistencia vascular útero-placentaria. Esto puede producir una trombosis local que disminuiría la presión de oxígeno en el territorio placentario (Vaiman *et al.*, 2005). Se ha dicho que la isquemia placentaria es el evento desencadenante de PE, llevando a la producción de un factor soluble o factores placentarios que causan disfunción endotelial (Laigaard *et al.*, 2005).

Aunque el factor desencadenante y el mecanismo responsable de esta patología no está aún totalmente entendido, el estrés oxidativo y/o la elevada respuesta inflamatoria materna serían factores contribuyentes en la fisiopatología de PE (Austgulen, 2004).

Basándose en lo señalado anteriormente, una terapia consistente en la administración de sustancias antioxidantes (vitaminas C y E) en la dieta de las mujeres con alto riesgo de desarrollar PE podría disminuir en forma importante sus efectos dañinos e incluso prevenir su aparición (Chapell *et al.*, 2002).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Generalidades

PE es una enfermedad única de etiología desconocida que complica el 5-7% de los embarazos. A pesar de la extensa investigación realizada, actualmente no existe ningún medio eficaz de predicción o prevención de esta enfermedad (Fainaru *et al.*, 2003). Se define, como un síndrome propio del embarazo que se observa después de la 20^a semana de gestación, con presión sistólica ≥ 140 mmHg o presión diastólica ≥ 90 mmHg acompañado por proteinuria significativa (excreción urinaria ≥ 300 mg de proteína durante al menos 24 horas). En mujeres con PE, la presión sanguínea retorna a niveles basales en los días o semanas posteriores al parto (Roberts *et al.*, 2003).

La PE ha sido causa de retraso en el crecimiento fetal, partos prematuros y de recién nacidos con bajo peso. PE es un desorden hipertensivo de la preñez caracterizado por una vasoconstricción incrementada que lleva a una hipertensión maternal y reducido flujo de sangre a órganos y tejidos, incluidos los riñones, el útero y la placenta. La agregación plaquetaria aumentada, la coagulación intravascular diseminada, la disfunción de las células endoteliales, proteinuria y el edema son otras anormalidades asociadas a PE. PE severa puede llevar a producir eclampsia, que se caracteriza por la presentación de convulsiones en la madre, causadas por la vasoconstricción cerebral producida en el síndrome. A pesar de la extensa investigación sobre PE, el único tratamiento disponible hasta el momento es la remoción de la placenta y el feto (Walsh *et al.*, 2000).

2.2 Características de PE

PE es caracterizada por la aparición de hipertensión y proteinuria durante el último tercio de la gestación. También está asociada con hiperuricemia y edema. PE severa puede llevar a retraso del crecimiento fetal en los bebés. El inicio clínico de PE es a menudo asintomático e insidioso. Pero puede incluir dolor de cabeza, disturbios visuales, dolor epigástrico y edema en las manos y la cara. Las complicaciones severas de PE pueden incluir falla renal aguda, edema cerebral, hemorragia cerebral y convulsiones (eclampsia); edema pulmonar; coagulopatías como trombocitopenia y anemia hemolítica; y síndrome HELLP (Maynard *et al.*, 2005).

PE está asociada con hipoperfusión placentaria, la cual puede llevar a producir una restricción del crecimiento intrauterino y oligohidroamnios (disminución del líquido amniótico). El desprendimiento placentario complica alrededor del 4% de los casos de PE severa. La morbilidad neonatal es dada más a menudo como secuela de los partos prematuros y el bajo peso al nacimiento, incluyendo los prolongados cuidados intensivos neonatales, distress respiratorio, enterocolitis necrotizante, hemorragia intraventricular, sepsis y muerte (Maynard *et al.*, 2005).

Eclampsia, se define como la ocurrencia de convulsiones (debido a la hipoperfusión generalizada que también afecta al cerebro) en asociación con el síndrome de PE. En Europa y otros países desarrollados la eclampsia complica aproximadamente 1 en 2.000 partos, mientras que en los países en vías de desarrollo las estimaciones varían entre 1 en 100 y 1 en 1.700. El 38% ocurre antes del parto, el 44% ocurren en el post-parto y un 18% ocurre en el parto. La eclampsia produce en el mundo cerca de 50.000 muertes maternas al año (Reingardiene, 2003).

El síndrome HELLP afecta al 20% de las mujeres que sufren PE severa, (Aslan *et al.*, 2004) y ha sido asociado con un 10-20% de incidencia de mortalidad perinatal, atribuido ampliamente a la producción de partos prematuros (Maynard *et al.*, 2005). Se caracteriza por presentar hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, bilirrubina indirecta elevada, niveles bajos de haptoglobina en el suero y trombocitopenia (recuento menor a 100.000 plaquetas/mm³). Este síndrome, genera que la necesidad de ventilación mecánica y de cuidado neonatal intensivo sean mucho mayores (Aslan *et al.*, 2004).

2.3 Etiopatogenia de PE:

PE ha sido llamada una “enfermedad de teorías” debido a las múltiples hipótesis propuestas para explicar su ocurrencia (Solomon y Seely, 2004), pero ninguna de ellas ha podido explicar en la totalidad su origen y desarrollo (Serrano *et al.*, 2002). Dentro de éstas hay cuatro hipótesis etiopatogénicas principales: mala adaptación inmunológica (Myers y Baker, 2002) susceptibilidad genética (Dekker, 1999), isquemia placentaria (Burrow, 1996) y estrés oxidativo (Wilson *et al.*, 2003). Sin embargo, de todas las teorías antes nombradas, ninguna es

totalmente excluyente de la otra, existiendo aún la posibilidad de estar frente a una enfermedad de origen multifactorial.

Respecto a la teoría de la **mala adaptación inmunológica**, se propone que existe una mala-adaptación inmune materna-fetal (Dekker y Sibai, 1999), o también, la existencia de un factor inmunológico “anti-paterno”, ya que la PE es más frecuente en el primer embarazo y tras un cambio de pareja o una breve vida sexual antes de la gestación (Robillard *et al.*, 1994).

Respecto a la teoría de la **susceptibilidad genética**, los factores genéticos que contribuyen a su origen suelen ser múltiples, por ejemplo, al estar interactuando dos o más genes entre sí (herencia poligénica), o al interactuar dos o más genes con diferentes factores medioambientales (herencia multifactorial), en este caso, la heterogeneidad genética del individuo determina diferentes respuestas a un factor externo (Serrano *et al.*, 2002).

Según la teoría de la **isquemia placentaria**, la lesión primaria en la PE está ubicada en la unión útero-placentaria, provocando un estado de subperfusión placentaria (Meekins *et al.*, 1994). Esta subperfusión, es causada por una mala o incompleta invasión de las células citotrofoblásticas dentro de las arterias espirales, provocando la constricción y rigidez de estas arterias al no poder ser remodeladas. Esto hace que disminuya el flujo sanguíneo útero-placentario y se provoque la disfunción endotelial característica de ésta enfermedad (Aydin *et al.*, 2004). Esta teoría puede ser complementaria con la **teoría del estrés oxidativo** (Moretti *et al.*, 2004), donde la resultante unidad feto-placentaria pobremente irrigada es propuesta como el origen de radicales libres (RL) y lipoperóxidos (Aydin *et al.*, 2004). En este proceso, el estrés oxidativo

(asociado o no a fenómenos de isquemia y reperfusión) jugaría un rol esencial tanto en la génesis (provocando la disfunción endotelial) como en el desarrollo y agravamiento del cuadro (Austgulen, 2004).

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 y de estos factores también dependerá la gravedad del cuadro clínico presentado (Cross, 2003).

Últimamente se ha postulado la llamada “**teoría toxémica**”, la cual es la más aceptada en la actualidad. En esta teoría, la fisiopatología de PE se expresa en dos niveles.

1. La patología en el nivel primario no es aún conocida pero últimamente ha sido asociada con la actividad deficiente del trofoblasto invasivo y la subsecuente alteración en la perfusión placentaria.
2. La patología secundaria de PE es la adaptación maternal a la deficiente invasión trofoblástica y aterosclerosis aguda. La disfunción endotelial aparece como el camino común final en la patogénesis de la PE y está asociado con las otras características de la enfermedad: vasoespasmo, incrementada permeabilidad capilar y agregación plaquetaria (Bolte *et al.*, 2001). La patología secundaria incluye a los signos definitivos de la PE: hipertensión y proteinuria. Bajo ciertas circunstancias, los disturbios periféricos de la PE pueden volverse tan severos que ellos por sí mismos pueden iniciar una patología nueva o terciaria: el tercer nivel. Las expresiones más

significativas de la patología terciaria son la eclampsia, la hemorragia cerebral, falla renal y síndrome HELLP.

Etapas 1: Alteración de la perfusión placentaria:

La placentación fisiológica o normal comprende dos etapas. En la primera predomina un citotrofoblasto con fenotipo de proliferación hasta las 12 semanas de gestación, caracterizándose por una hipoxia relativa. En 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. El trofoblasto extravelositario invade el útero y también migra a las arterias espirales, transformándolas en grandes vasos de baja resistencia (Burton y Jauniaux., 2004), debido a que se destruyen las capas musculares de las arterias espirales reemplazando el endotelio, cambiando la morfología del vaso y optimizando su capacidad vasodilatadora (Valdés, 2005). En el endometrio, el trofoblasto extravelositario forma cordones que posteriormente se canalizan y forman una luz en la cual comienza a circular sangre. Alrededor de estos cordones trofoblásticos se forman los senos sanguíneos por donde circula la sangre materna. Las células trofoblásticas emiten cada vez más proyecciones hasta convertirse en las vellosidades placentarias, dentro de las cuales se desarrollan capilares fetales. La sangre fetal circula siguiendo dos arterias umbilicales, avanza luego por los capilares de las vellosidades y finalmente, regresa al feto por una sola vena umbilical.

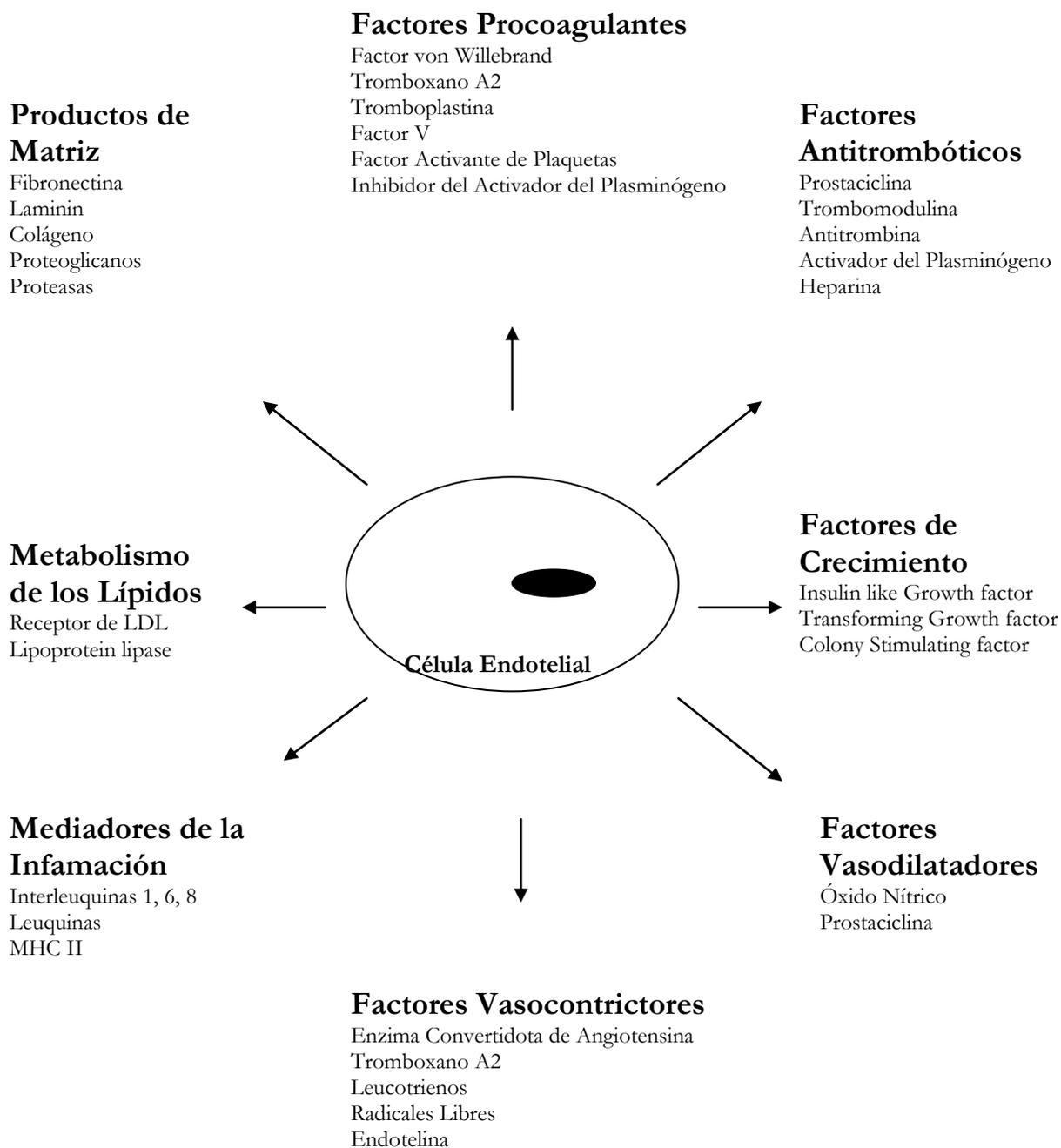
En la PE dos tipos de fallas pueden ser vistas en el mismo espécimen. Primero, la invasión del parénquima uterino por el trofoblasto es uniformemente

superficial y la invasión de la vasculatura no llega más allá de la porción decidual de las arterias espirales. Por esto, la vasculatura maternal no experimenta el espectro completo de cambios fisiológicos. Como resultado, el diámetro de los vasos miometriales es aproximadamente un 40% de los de gestaciones normales (Zhou *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 2003). Segundo, el número de vasos que muestra evidencias de invasión trofoblástica es bajo. Estos hallazgos tienen interés particular debido a que por ellos se puede producir la reducción en el flujo sanguíneo útero placentar observado en PE (Zhou *et al.*, 1993), que resulta en isquemia placentaria, que se cree es desencadenante de este cuadro clínico, a través de sustancias liberadas por el útero o la placenta isquémica que afectan la función endotelial, ya sea por liberación de sustancias vasoconstrictoras o inhibición de vasodilatadores (Roberts y Cooper, 2001). La isquemia placentaria además causa un estrés oxidativo importante sobre el endotelio vascular (Wilson *et al.*, 2003). También, el compromiso de perfusión podría ser el resultado de activación de la cascada de coagulación, sobre todo plaquetarias, con la formación microtrombos. Este probable estado de isquemia-reperfusión generaría un estado de estrés oxidativo que provocaría un incremento de los RL [especies químicas que poseen un electrón desapareado que se pueden considerar fragmentos de moléculas y que son generalmente muy reactivos (Cheeseman y Slater, 1993)] que daría como resultado un daño en las células endoteliales y disfunción endotelial (Palan *et al.*, 2004).

Etapa 2: Disfunción endotelial:

El endotelio ha sido visto por largo tiempo como una membrana inerte, semipermeable, existente entre la sangre y la pared del vaso. Hoy día, dicho concepto ha cambiado totalmente y se observa al endotelio como un importante órgano endocrino, responsable de un número de funciones fisiológicas vitales (Verhaar y Rabelink, 2001). Se conoce que la célula endotelial posee múltiples funciones y que la alteración de ésta es la responsable del desencadenamiento de varias patologías. Las principales funciones son: el mantenimiento de los fluidos en su compartimiento, la prevención de la coagulación intravascular, el mantenimiento de la respuesta inflamatoria e inmune y la modificación de la respuesta contráctil del músculo liso de la pared (Beilin *et al.*, 1997). El endotelio intacto tiene propiedades anticoagulantes. Mientras tanto, el endotelio dañado activa las células endoteliales, se produce liberación de gran cantidad de sustancias químicas con múltiples funciones a nivel local y periférico (Writer, 1994) y aumenta la sensibilidad a los agentes vasopresores, promoviendo la coagulación (Lyall y Greer, 1996).

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



Las alteraciones de la función endotelial pueden explicar la fisiopatología de la PE. Originalmente se postula que la placenta pobremente irrigada, que es característica de la PE, produce sustancias que entran a la circulación y alteran la actividad endotelial celular (Roberts, 1998). Una vez instaurada la lesión endotelial se incrementa la permeabilidad de la membrana, se aumenta la sensibilidad a la angiotensina II, produciéndose vasoespasmo severo con compromiso de la perfusión tisular, se altera la producción de prostaciclina a nivel endotelial, se eleva el factor de von Willebrand, aumentan los niveles de fibronectina, se activan los neutrófilos y se liberan de éstos elastasas y proteasas. Estas sustancias son mediadoras de la lesión endotelial que unidas a la mayor producción de RL empeoran el daño y exacerbaban la vasoconstricción, la activación de factores procoagulantes y la liberación de otros factores humorales que perpetuarán la alteración (Writer, 1994).

Evidencias de la disfunción endotelial en PE 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) (Felferning-Boehm *et al.*, 2000), al activador del plasminógeno tisular y a los inhibidores del activador del plasminógeno endotelial y placentario (PAI-1 y PAI-2 respectivamente) (Roes, *et al.*, 2002). y trombomodulina (TM) (Van De Wouwer *et al.*, 2004). Algunos de estos marcadores preceden a la aparición de la enfermedad clínica y desaparecen luego de su resolución (Roberts, 1998).

El déficit de óxido nítrico (NO) ha sido involucrado en la génesis de la PE (Savvidou *et al.*, 2003). El NO juega un papel clave en la relajación vascular endotelial, es sintetizado desde L-arginina por la enzima óxido nítrico sintetasa (eNOS) endotelial, la cual puede ser inhibida por componentes endógenos (Hermenegildo *et al.*, 2002), tales como la dimetil arginina asimétrica (ADMA), que compite con el substrato de la eNOS, la L-arginina, impidiendo la liberación de NO. Por lo tanto, se ha postulado que ADMA contribuye al desarrollo de PE (Savvidou *et al.*, 2003).

Se concibe PE como un síndrome con base inicial en la reducción de la perfusión placentaria, que lleva a la liberación de factores placentarios a la circulación materna. Estos factores originarían una disfunción endotelial que se manifestaría por la alteración de las funciones vasomotoras del endotelio, un aumento de su permeabilidad y la activación de factores trombogénicos (Lorentzen y Henriksen, 1998). Sea cual sea aquel factor placentario desconocido, existen fuertes evidencias de que el estrés oxidativo sería el desencadenante directo de la disfunción endotelial (Maydata, 2005). Apoyan esta hipótesis el hecho de que se han identificado en tejido placentario numerosos marcadores que revelan la existencia de un estrés oxidativo en PE, como disminución de enzimas antioxidantes (SOD, GSH-px), aumento de enzimas generadoras de RL como la xantina oxidasa, aumento de los productos de lipoperoxidación, anticuerpos contra LDL oxidada, así como una disminución de ácido ascórbico (Steinert *et al.*, 2002).

2.4 Estrés Oxidativo en la PE.

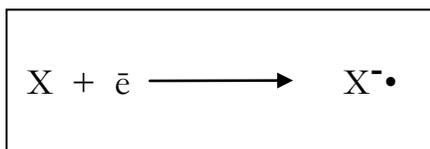
El estrés oxidativo describe un estado de daño causado por el desbalance entre las especies reactivas de oxígeno y del nitrógeno (NO y ONOO-) y el sistema de defensas antioxidantes del organismo (Gicheva *et al.*, 2004) favoreciendo un predominio de los primeros (González, 2003).

Cuando esto ocurre, la hipoxia, la hipoperfusión, el daño endotelial y la activación celular, dan origen a grandes cantidades de radicales libres (RL) (Taylor *et al.*, 1995), que son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en la órbita externa, esto le confiere una gran inestabilidad que los lleva a colisionar con otras moléculas a las cuales oxida al sustraerles un electrón. En las biomoléculas (lipoproteínas, cadenas de ácidos grasos, proteínas enzimáticas y no enzimáticas y bases del ADN), la oxidación altera sus estructuras y pierden sus funciones e, incluso, pueden transformarse, a su vez, en RL como sucede con los ácidos grasos.

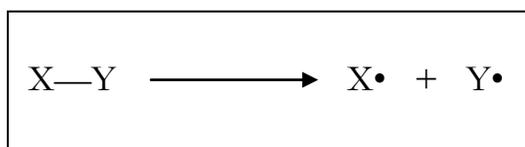
Los RL, son capaces de participar en la defensa frente a noxas infecciosas, pero también son capaces de producir daño sobre estructuras celulares y tejidos, activando y perpetuando la respuesta inflamatoria. Los mecanismos que explican el daño inducido por RL en la PE son principalmente la activación del sistema monocito/macrófago y de neutrófilos, la activación mitocondrial intracelular y el mecanismo de isquemia y reperfusión (Castillo *et al.*, 2003).

Los RL 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 RL 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 especies reactivas de oxígeno (ERO). De esta manera, el oxígeno se puede reducir sucesivamente a anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) al incorporar un electrón, a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al aceptar 2 electrones y al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) al aceptar 3 electrones. Otra ERO es el oxígeno singlete o singulete ($^1\text{O}_2$), que puede generarse, por

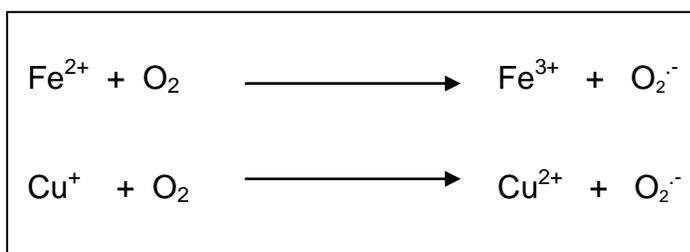
ejemplo, cuando los electrones han sido excitados por la luz. Cuando las ERO se encuentran en exceso, reaccionarán con diversas biomoléculas causando citotoxicidad y daño mutagénico (Rodrigo y Rivera, 2003).

La ERO más común es el anión superóxido (O_2^-) formado como el primer paso en la reducción de un electrón de oxígeno molecular. El anión superóxido es producido por todas las células, sin embargo, en el paciente se genera mayoritariamente en los polimorfonucleares activados. Actúa como un agente proinflamatorio, siendo capaz de reclutar neutrófilos, inducir liberación de factores quimiotácticos y otros mediadores proinflamatorios (Castillo *et al.*, 2003). El superóxido es generado intracelularmente por NADPH oxidasa, citocromo P450, Xantina oxidasa, enzimas del grupo flavín y enzimas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (METC). La reactividad debida al electrón desapareado en el superóxido conduce a la producción de otras EROs incluyendo radicales Hidroxilo (OH^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Myatt y Cui, 2004).

Bajo condiciones fisiológicas cada día el 3% de la hemoglobina total se convierte a la forma oxidada (metahemoglobina). La autooxidación de la hemoglobina resulta en la generación de O_2^- . Además, el O_2^- también es producido a través de reacciones de algunas moléculas con el oxígeno (adrenalina, dopamina, tetrahydrofolato, citocromos, etc.) y por células en que ocurre el mecanismo de la fagocitosis (polimorfonucleares neutrófilos, monocitos, macrófagos). El anión superóxido 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^- 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 autoxidación a la vez que transforman a la molécula de oxígeno en anión superóxido:



(Fuente: Rodrigo y Rivera, 2003)

El peróxido de hidrógeno aunque no es un radical libre (pero se considera también una de las ERO) puede generar un radical libre extremadamente reactivo, como es el hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) en presencia de iones metálicos como Fe^{2+} , Cu^+ ó Mn^+ a través de la reacción de Fenton (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 RL.

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. 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 RL O_2^- 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 radical hidroxilo y dióxido de nitrógeno. Como ya fue señalado, el radical $\bullet OH$ es extremadamente reactivo y puede reaccionar con cualquier molécula orgánica extrayéndole un átomo de hidrógeno a la vez que se forma otro radical libre (Rodrigo y Rivera, 2003).



La presencia de RL de oxígeno puede llevar a la formación de peróxidos lipídicos en un proceso de auto-propagación. En los embarazos normotensos, los niveles de peróxidos se elevan por encima de los niveles de las pacientes no embarazadas (Walsh, 1994), pero esto es probablemente balanceado por la actividad antioxidante (Bowen *et al.*, 2001). En la PE, este balance está aparentemente alterado, lleva a estrés oxidativo y, por lo tanto, a daño celular o tisular. El apoyo a esta hipótesis ha sido suministrado por estudios que muestran aumento del nivel de peróxidos lipídicos en pacientes que sufren PE (Reyna *et al.*, 2002).

En PE el estrés oxidativo y los RL parecen ser los promotores en la activación y del daño de las células endoteliales vasculares (Davidge, 1998). Esto se observa de forma indirecta por el aumento de los niveles de productos de la peroxidación lipídica (Cekmen *et al.*, 2003), disminución de la actividad antioxidante (Sagol *et al.*, 1999) y alteración de la peroxidación lipídica en los lípidos de la membrana de las plaquetas en las pacientes preeclámpticas (Garzetti *et al.*, 1993).

El estrés oxidativo promovería un ciclo de eventos que comprometerían la "defensa" vasodilatadora, antiagregante y la barrera funcional del endotelio vascular. A semejanza de lo que sucede en la enfermedad coronaria, arritmias, falla cardíaca congestiva, miocardiopatía, hipertensión, aterosclerosis y la vasculopatía diabética (Maulik y Das, 2002), el estrés oxidativo sería un componente de la PE y constituiría un enlace entre la disminución de la perfusión de la placenta y el síndrome materno (León *et al.*, 2002).

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 peroxinitrito (Davidge, 1998). Por ésto 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 cardíaca 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).

2.4.1 Sistema de Defensas Antioxidantes

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este (Venereo, 2002).

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

- a) Los agentes que remueven catalíticamente las especies reactivas de oxígeno y del nitrógeno.
- b) Las proteínas que minimizan la disponibilidad de prooxidantes 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.

La importancia antioxidante de estas biomoléculas depende de la especie reactiva sobre la que actúan, donde y como se genera este, así como del daño que produce. Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción (Halliwell y Gutteridge, 1999).

En los organismos aerobios existe una gran variedad de sistemas de defensa antioxidante tanto enzimáticos como no enzimáticos, que se coordinan cooperativamente y protegen al organismo de los riesgos que conlleva el estrés oxidativo. Entre ellos destacan las actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-px) y catalasa (CAT); glutatión (GSH), además del ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno, vitamina A, flavonoides y ácidos fenólicos. Otros son los sistemas auxiliares donde destacan la glutatión reductasa y los antioxidantes extracelulares, donde encontramos la transferrina y deferoxamina entre otros (Castillo *et al.*, 2003).

Algunas de estas sustancias antioxidantes pueden ser aportadas por la dieta, en este sentido, la definición de antioxidante dietario propuesta está basada en varios criterios:

- 1.- La sustancia está presente en la dieta humana.
- 2.- Se ha medido la cantidad de dicha sustancia en alimentos de consumo común.
- 3.- En humanos, la sustancia disminuye los efectos adversos de las ERO y del nitrógeno *in vivo*.

De acuerdo a esto, la definición para antioxidante dietario sería la siguiente: “Un antioxidante dietario es una sustancia presente en los alimentos que disminuye significativamente los efectos adversos de las ERO, especies reactivas de nitrógeno, o ambas sobre las funciones fisiológicas normales en humanos” (Urquiaga *et al.*, 1999).

Los antioxidantes derivados de la dieta parecen ser importantes para mantener una buena salud complementando las funciones de las defensas celulares. Entre los más importantes antioxidantes obtenidos a partir de la dieta están los carotenoides, el α -tocoferol y el ácido ascórbico, los dos primeros son antioxidantes liposolubles que disminuyen el daño fotoquímico en la oxidación de lípidos en el ojo y en la piel. El ácido ascórbico es requerido como cofactor por diferentes enzimas y en diversas enfermedades que producen estrés oxidativo hay disminución de su nivel (Halliwell, 1999). Algunos antioxidantes tienen funciones paradójicas ya que pueden funcionar como prooxidante, por ejemplo, el ácido ascórbico cuando está en presencia de hierro o cobre (Stocker y Frei, 1991).

Entre los antioxidantes sintetizados en las células animales se encuentran enzimas y agentes de bajo peso molecular (Urquiaga *et al.*, 1999).

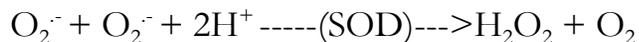
2.4.1.1 *Enzimas Antioxidantes:*

La primera defensa antioxidante es intracelular y es principalmente de tipo enzimático. Las enzimas antioxidantes requieren de la presencia de metales como Cu, Fe, Mg, Zn, o Se para su acción, por esto se les llama a veces metaloenzimas antioxidantes. Las más importantes son CAT, SOD y GSH-px, y requieren Fe, Zn y Cu o Mn, y Se, respectivamente (Urquiaga *et al.*, 1999). Estas realizan su acción principalmente a través de la conversión de especies reactivas en otras menos dañinas (Halliwell y Gutteridge, 1995), por ejemplo, al descomponer el radical anión superóxido en H₂O₂ y este en H₂O y O₂ respectivamente (Castillo

et al., 2003). En situaciones fisiopatológicas, como la hipoxia, las enzimas antioxidantes pueden ser inhibidas (De Rosa, 1998).

2.4.1.1.1 *Superóxido Dismutasa (SOD).*

Constituye la primera fase de defensa antioxidante. Cataliza la reacción de destrucción de los radicales superóxido (O_2^-) mediante su transformación en peróxido de hidrógeno, el cual puede ser destruido a su vez por las actividades de CAT o GSH-px.



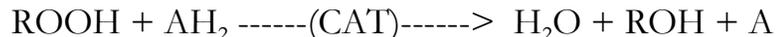
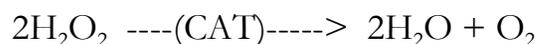
Se han identificado cuatro clases de SOD: una de ellas contiene un cofactor con dos átomos metálicos, uno de Cu y otro de Zn. Las demás presentan cofactores mononucleares de Fe, Mn o Ni. FeSODs y MnSODs presentan homologías en cuanto a sus secuencias y estructura tridimensional. Además poseen residuos quelantes idénticos en el sitio activo. En humanos existen tres tipos de SOD: la Mn-SOD mitocondrial, la Cu/Zn-SOD citosólica y la SOD extracelular (EC-SOD). 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- α (Halliwell y Gutteridge, 2000).

Se ha encontrado que los niveles de SOD son menores en el endotelio vascular de mujeres preeclámpticas que en normotensas (Kharb, 2000), a la vez que las sustancias oxidantes como anión superóxido (Sikkema *et al.*, 2001) y lipoperóxidos (Wang y Walsh, 1998) están aumentadas. También, se ha

encontrado que existe una baja expresión de ARNm y actividad para Cu/Zn SOD en la placenta de mujeres con PE (Wang y Walsh, 2001). Esto se relaciona con el bajo poder antioxidante observado en PE.

2.4.1.1.2 *Catalasa (CAT).*

Es una enzima tetramérica, con cuatro subunidades idénticas de 60 kDa dispuestas tetraédricamente y contiene cuatro grupos de ferro-protoporfirina por molécula. Es una de las enzimas conocidas más eficientes, tanto que no puede ser saturada por H₂O₂ a ninguna concentración, catalizando su conversión en H₂O y O₂, para proteger a las células del H₂O₂ que se genera en su interior. Con dadores de H (metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles...) presenta actividad peroxidasa.

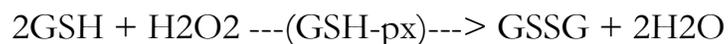
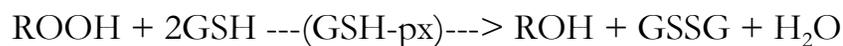


En los animales, el H₂O₂ es destoxificado mediante las actividades de CAT y GSH-px. Aunque CAT no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células. La CAT captura el H₂O₂ antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular. Su sitio de acción está limitado a los peroxisomas (De Rosa, 1998). El ciclo redox del glutatión es la mayor fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo, pero CAT es más importante a la hora de proteger contra el estrés oxidativo severo. Tiene una amplia distribución en el organismo humano, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo, epitelios y prácticamente nula en tejido nervioso (Venereo, 2002).

Se ha encontrado que los niveles de CAT están disminuidos en la placenta de mujeres con PE (Vaughan y Walsh, 2002), al igual que en sus eritrocitos (Orhan *et al.*, 2003).

2.4.1.1.3 *Glutación Peroxidasa (GSH-px).*

La GSH-px, única enzima humana que contiene selenio (Castillo et al., 2003), está formada por cuatro subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína, que es esencial para su actividad enzimática. GSH-px comparte su sustrato con CAT, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes peróxidos inestables (ROOH y H₂O₂) que se forman cuando los RL atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, usando glutación reducido (GSH) que es transformado en glutación oxidado (GSSG) y así contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo. Los ácidos grasos poliinsaturados son muy susceptibles a la peroxidación, a nivel de sus dobles enlaces (De Rosa, 1998).



La GSH-px se localiza en el citosol (eritrocitos) y lisosomas (neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune). Existen 3 formas de GSH-px: GSH-px-c o forma celular, tiene mayor afinidad por el H₂O₂ que por los lipoperóxidos; GSH-px -p o forma extracelular, presenta afinidad semejante para ambos sustratos; GSH-px-PH, tiene afinidad específica para los lipoperóxidos. Las formas GSH-px-c y GSH-px-p no son capaces de utilizar los lipoperóxidos (Venereo, 2002).

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 (Maydata, 2005) y 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 fué más elevada que en embarazos controles (Kumar y Das, 2000).

2.4.1.2 *Moléculas o Sustancias Antioxidantes*

La segunda barrera antioxidante es de tipo no enzimática y está dada por compuestos antioxidantes que actúan tanto a nivel celular como extracelular. Son los responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos como el plasma y de la protección del daño oxidativo de las distintas partículas y macromoléculas circulantes. 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 RL (Jaeschke, 1995).

Esta segunda defensa antioxidante está formada por distintos compuestos endógenos y exógenos (Urquiaga *et al.*, 1999). A diferencia de las enzimas

antioxidantes, las sustancias antioxidantes se modifican al reaccionar con los RL y necesitan ser reemplazados.

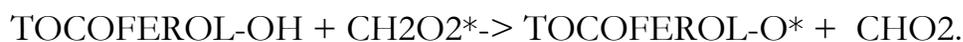
Algunos antioxidantes son de origen endógeno y necesitan ser reemplazados por síntesis (Urquiaga *et al.*, 1999). Entre los compuestos más representativos de antioxidantes endógenos intracelulares se puede mencionar al glutatión reducido (GSH), la tioredoxina, glutaredoxina, aminoácidos, melatonina y otros.

Si las sustancias antioxidantes son de origen exógeno, es decir, provenientes de la dieta, para ser reemplazados necesitan ser nuevamente ingeridos en ésta. Estos compuestos antioxidantes, llamados hoy Antioxidantes Dietarios, son fundamentales para la prevención de enfermedades ya que son fácilmente modificables. Algunos de estos Antioxidantes Dietarios son bien conocidos (vitamina C, vitamina E, carotenoides y Se) y otros son novedosos, particularmente los Polifenoles Antioxidantes (Urquiaga *et al.*, 1999). Entre los antioxidantes exógenos se encuentran, además, la vitamina A, la bilirrubina y el ácido úrico, entre otros.

Los productos vitamínicos captadores de RL han llamado la atención de los investigadores clínicos en la última década, en la hipótesis de que, administrándolos por vía oral durante períodos prolongados, su capacidad antioxidante quedaría demostrada (Urquiaga *et al.*, 1999). Los antioxidantes vitamínicos en la célula, actúan a distintos niveles: El ácido ascórbico (vitamina C), al ser hidrosoluble, normalmente se ubica en el citoplasma celular. El betacaroteno (vitamina A) y el α -tocoferol (vitamina E), al ser liposolubles, se ubican en la membrana celular (De Rosa, 1998).

Mientras más elevada sea la concentración plasmática de LDL (Lipoproteína de baja densidad que transporta el colesterol a las arterias), mayor será su oxidación; las altas concentraciones plasmáticas de antioxidantes hidrosolubles, como la vitamina C, contribuyen a prevenir la oxidación de la LDL. Además, los mismos antioxidantes contenidos dentro de la LDL, como tocoferoles, betacaroteno y licopenos, influyen negativamente la susceptibilidad de la lipoproteína a la oxidación (De Rosa, 1998).

La vitamina E (α -tocoferol) encontrada en las membranas celulares y las LDL circulantes, es una molécula lipídica que actúa deteniendo la reacción en cadena iniciada por los RL. Contiene un radical OH cuyo átomo de hidrógeno es fácil de separar. De esta manera, cuando se generan los radicales peróxido y alcoholoxilo, se combinan con este antioxidante.



Esto convierte el tocoferol en un nuevo RL, que es poco reactivo y puede migrar a través de la membrana y ser convertido de nuevo en tocoferol al reaccionar con la vitamina C. En este caso, el tocoferol caería dentro de los sistemas antioxidantes extracelulares, como también lo son la transferrina, la lactoferrina y los flavonoles (Castillo *et al.*, 2003).

Se han determinado parámetros oxidativos plasmáticos en mujeres con embarazo normal y en preeclámpticas, detectándose que este último grupo ha tenido una baja capacidad plasmática para reducir hierro o FRAP (Ferric

Reducing Ability of Plasma). Simultáneamente se han realizado estudios postparto sobre la placenta y se encontró un mayor estrés oxidativo en las embarazadas con PE (Fernandez, 2005).

2.4.2 Daño oxidativo Sobre Biomoléculas:

Es muy difícil identificar y cuantificar RL, especialmente por tener una vida media muy corta: el más tóxico de ellos, el radical *OH , vive sólo algunos milisegundos. Los métodos de detección son indirectos, tales como resonancia magnética nuclear, medición de productos finales de lipoperoxidación (malonilaldehído, dienos conjugados, etc.), quimioluminiscencia y medición de H_2O_2 (De Rosa, 1998).

El posible destino celular bajo condiciones de estrés oxidativo, dependerá de varios factores: el contenido endógeno de defensas antioxidantes, el grado de estimulación de las mismas bajo la condición de estrés, la reversibilidad de las modificaciones a macromoléculas producidas, la magnitud del estrés oxidativo y sus consecuencias funcionales. Existen varios sistemas de reparación de daño al ADN, mientras que en las proteínas hay muchas reacciones que son reversibles, contrariamente, los lípidos quizás sean las macromoléculas más establemente afectadas y con consecuencias más directas sobre la integridad celular, de allí la gran atención que se ha puesto en ellos (Rios, 2003).

2.4.2.1 *Lipoperoxidación*

Es aquí donde se produce el daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular y se produce edema y muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal; sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los RL del oxígeno (Jerlick *et al.*, 2000).

Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son:

- a) La naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente inicializador.
- b) Los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad.
- c) La tensión de oxígeno.
- d) La presencia de hierro.
- e) El contenido celular de antioxidantes (betacarotenos, alfatocoferoles, glutatión).
- f) La activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-px).

Una vez que se inicia, el proceso toma forma de “cascada”, con producción de RL que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos (Rangon y Bulkley, 1993). Las reacciones de lipoperoxidación consisten en un proceso de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (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 aldehidos de bajo peso molecular (como por ejemplo el MDA que puede ser medido espectrofotométricamente) y cadenas hidrocarbonadas (etano, etileno, pentano, dienos conjugados, etc.). Los aldehidos son moléculas muy reactivas y por lo tanto, se desplazan a escasa distancia de su sitio de formación (Rodrigo y Rivera, 2003).

El MDA es un producto estable de la peroxidación lipídica y por lo tanto, se utiliza como indicador aceptado para medir indirectamente el estado de ésta (Ohkawa *et al.*, 1979; Kamath *et al.*, 1998) y también indica el grado de injuria tisular que se produce (Fukunaga *et al.*, 1995). Se usa la prueba de medición de las especies reactivas al ácido tiobarbiturico (Kharb *et al.*, 1998). Existe un incremento en los niveles de MDA en las mujeres con PE (Reyna *et al.*, 2002), tanto en el plasma (Yanik *et al.*, 1999), como en los glóbulos rojos (Ahmet *et al.*, 2003) y en la placenta (Walsh *et al.*, 2000), comparado con pacientes normotensas.

Otros productos de la lipoperoxidación son los isoprostanos, compuestos del tipo de las prostaglandinas, producidos por acción de las ERO sobre el ácido araquidónico que forma parte de los fosfolípidos de la membrana (Bilodeau y Hubel, 2003). Su formación es una medida directa de la formación de lipoperóxidos independiente de ciclooxigenasa. 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).

Los isoprostanos producidos mediante estrés oxidativo, también estimulan IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato, mecanismo primario para liberar Ca⁺⁺ de los depósitos intracelulares), mitogénesis en las células musculares lisas de la vasculatura, inducen la síntesis de ADN y liberación de endotelina-1 (un potente vasoconstrictor) desde las células endoteliales (Fukunaga *et al.*, 1995; Yura *et al.*,

1999). En pacientes preeclámpticas, se ha reportado un notable aumento de la endotelina circulante, lo cual, se piensa, produce disfunción endotelial (Nova *et al.*, 1991).

Las acciones biológicas de los isoprostanos sugieren que ellos contribuyen a las anomalías que se presentan en la PE, tales como hipertensión, ya que el aumento de la secreción placentaria de F2-isoprostanos a la circulación materna podría causar vasoconstricción celular vascular (McGiff y Quilley, 2001), ya que tienen una actividad vasoconstrictora semejante al tromboxano. Además, son capaces de generar disfunción endotelial, vasoconstricción renal, vasoconstricción placentaria y el vasoespasmo cerebral que se presenta en la eclampsia (Walsh *et al.*, 2000). En general, esto se apoya en que se ha visto que los niveles urinarios y circulantes de F2-isoprostanos son altos en patologías que involucran la participación del estrés oxidativo (Bachi *et al.*, 1996; Morrow *et al.*, 1995) y dentro de éstas, también se han encontrado niveles de isoprostanos notablemente aumentados en el plasma de mujeres preeclámpticas (Bilodeau y Hubel, 2003).

2.4.2.2 *Daño Oxidativo de las Proteínas*

A este nivel hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina. Los sitios más susceptibles son las cadenas laterales de amino-ácidos azufrados y los grupos tiol (-SH). 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. Además, se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas y por último, hay formación de grupos carbonilos (Rangon y Bulkley, 1993).

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).

2.4.2.3 *Daño oxidativo sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN).*

Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida de algunos genes supresores de tumores que pueden conducir a la iniciación, progresión, o ambas de la carcinogénesis). Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN (Roche, 1994).

2.4.3 Efectos del estrés oxidativo sobre $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa (enzima de membrana).

La $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa es un sistema de transporte ubicado en la membrana de las células, está encargado de mantener la concentración de sodio dentro de éstas más baja y la de potasio más alta que en el líquido que las circunda. Requiere un importante gasto de energía, que obtiene de la hidrólisis del ATP. Su funcionamiento es esencial para la transmisión de impulsos nerviosos, el mantenimiento del volumen celular, la absorción de nutrientes a través del intestino y la excreción y reabsorción de sustancias en el riñón. La actividad de la $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPasa}$ en la PE ha sido muy poco estudiada, pero, se ha encontrado una disminución en la actividad de esta en placenta y glóbulos rojos de mujeres preeclámplicas (Messina, 2004). Se había descrito anteriormente, que la calcio-ATPasa en el miometrio también tenía una actividad reducida. La disminución de la actividad de la calcio-ATPasa aumentaría la concentración citosólica de calcio en las células del músculo liso vascular de mujeres preeclámplicas y esto implicaría la elevada presión arterial desarrollada por estos pacientes. Esto, podría explicar el vasoespasmo y/o vasoconstricción uterinas (Carrera *et al.*, 2003).

El aumento de peroxidación lipídica revela el ataque oxidativo directo por las ERO a los fosfolípidos de membrana, en especial a los ácidos grasos poliinsaturados, 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 (Messina, 2004).

2.5 Predictores de PE

Como predictores de PE se han probado muchos métodos, pero ninguno tiene la eficacia ni la precocidad necesarias para poder ensayar algún sistema eficiente de prevención de la enfermedad. Algunos de los sistemas utilizados actualmente son los siguientes.

2.5.1 Factores de Riesgo de la Historia Clínica y Embarazo Actual

No se conocen las causas de la PE o mala implantación de la placenta en el útero, pero se conoce que hay una mayor predisposición de la enfermedad en pacientes con ciertas características especiales de embarazo que hacen sospechar una predisposición genética y/o inmunológica asociadas, tanto en el padre como en la madre. Entre los factores predisponentes relacionados con el padre se encuentran exposición limitada a espermatozoides por parte de la madre (Sexo oral, anticoncepción con métodos de protección, etc.), cónyuge que haya sido padre de un embarazo con PE con otra mujer (Dekker, 1999) y el ser hijo de madre con PE (Esplin *et al.*, 2001). La madre también tiene mayor predisposición a desarrollar PE cuando es de raza negra, cuando hay historia familiar con PE, cuando ha tenido PE anteriormente (Roberts *et al.*, 2003), si su edad es menor a 15 años o mayor de 40 años y cuando existe un intervalo entre embarazos mayor de 5 años (Esplin *et al.*, 2001).

También hay mayor predisposición a desarrollar PE en pacientes que presentan alteraciones como hipertensión crónica, enfermedad renal, obesidad, resistencia a la insulina, diabetes gestacional, diabetes mellitus tipo 1, resistencia a la proteína C activada, deficiencia de proteína S, anticuerpos anti fosfolípidos e hiperhomocisteinemia (Pridjian y Puschett, 2002). Por último, hay factores

asociados al embarazo como son los embarazos gemelares y anomalías congénitas estructurales (Dekker, 1999).

2.5.2 *Presión Arterial*

En la PE después de la semana 20 de gestación, la presión arterial aumenta por sobre los 140/90 mmHg y esto significa un incremento en la presión sanguínea diastólica de al menos 15 mmHg respecto al nivel previo a la semana 20 (Esplin *et al.*, 2001). Las mediciones de la presión arterial para detectar PE, deben ser medidas en al menos 2 ocasiones con por lo menos 6 horas de separación (Wilson *et al.*, 2003). Sin embargo, el intento de predecir PE en base a un incremento en la presión arterial ha sido eliminado debido a su escasa utilidad por presentarse en forma muy tardía en el embarazo y la enfermedad (Villar y Sibai, 1989).

2.5.3 *Ácido Úrico*

El ácido úrico aumenta antes que haya una elevación de la creatinina o BUN (nitrógeno ureico basal). Como en la PE no hay aumento de la producción de ácido úrico, la hiperuricemia indica una disminución de la depuración renal. La hiperuricemia (>5.5 mg/dL) sería un marcador valioso para diferenciar la PE de todas las demás causas de hipertensión durante el embarazo. Pero la baja sensibilidad de este marcador, ha hecho que su uso no se halla masificado (Masse *et al.*, 1993).

2.5.4 *Proteinuria*

La proteinuria se puede detectar por medio de muestras de orina que indiquen excreción urinaria ≥ 300 mg de proteína durante al menos 24 horas (Roberts *et al.*, 2003).

El aumento de la permeabilidad vascular a las proteínas que produce proteinuria podría ser secundario a una lesión de las células endoteliales de causa indeterminada, que se presenta en pacientes preeclámpticas. La proteinuria es una manifestación tardía de la PE, posterior a la hipertensión y en algunas ocasiones puede estar ausente, por lo tanto, no tiene mayor utilidad como predictor de la enfermedad (Roberts *et al.*, 2003), aunque es un signo importante a la hora de diagnosticarla.

2.5.5 *Doppler de la Arteria Uterina*

La velocimetría Doppler de la arteria uterina, es un método no invasivo para evaluar la circulación útero placentaria y ha sido propuesto como prueba de diagnóstico y predicción tempranos de PE, sin embargo, su papel exacto en la obstetricia moderna tiene que ser aún establecido (Patrick *et al.*, 2000).

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 arteria 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, a medida que progresa la gestación normal se observa una caída progresiva de la resistencia especialmente durante el segundo trimestre, puesta en evidencia por el aumento

de 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 a partir de esta segunda invasión trofoblástica (Coleman *et al.*, 2000).

Algunas investigaciones han definido una onda anormal de la arteria uterina como aquella con un índice sístole/diástole (S/D) mayor o igual a 2,7 o persistencia de la incisura diastólica después de las 26 semanas de gestación (Alfirevic y Neilson, 1995), esto está relacionado con una inadecuada modificación de las arterias espirales, ya que la invasión del citotrofoblasto es incompleta debido a que no cambia su fenotipo de proliferativo a invasivo y los vasos arteriales conservan su alta resistencia hasta el término del embarazo. Este planteamiento fue señalado desde las primeras investigaciones, donde se reportó una asociación entre alteraciones en el patrón de la onda de velocidad de flujo de la arteria uterina y la mayor frecuencia de pacientes con complicaciones médicas como PE (Campbell *et al.*, 1983). Debido a esto, las alteraciones del Doppler de la arteria uterina se han utilizado como predictores de PE con una muy alta sensibilidad y especificidad (North *et al.*, 1994; Harrington *et al.*, 1996).

2.6 Profilaxis en PE.

Tanto en el tratamiento como en la prevención de la PE se ha probado el uso de diferentes sustancias y fármacos, aún con el inconveniente de desconocer la causa de la enfermedad y de no disponer aún de algún método de detección temprana de ésta. Debido a esto sus resultados no han sido muy satisfactorios. A continuación se exponen algunas de estas terapias.

2.6.1 *Suplemento de Calcio*

La causa bioquímica más evidente del proceso contracción/relajación del músculo liso vascular reside en la variación en la concentración de Ca^{2+} citosólico. Así, el calcio libre intracelular es el mayor determinante del tono vascular. La disfunción de la célula endotelial se acompaña por disminución en la producción y/o secreción de óxido nítrico (NO) y aumento de los factores contráctiles. Ello induce a la movilización de Ca^{2+} de los depósitos extra- e intracelulares. La contracción del músculo liso ante la hipoxia es mediada por acúmulo de Ca^{2+} intracelular. Es válido recordar que la PE se asocia con ingesta dietética baja de calcio, que aparentemente mejora con la administración de suplementos de calcio (Berrazueta, 1999). Sin embargo, el descenso de la incidencia de PE con esta suplementación, se produce solamente en países y lugares con baja ingesta de él (Crowter *et al.*, 1999).

2.3.2 *Aspirina*

Algunos ensayos postulan que las dosis bajas de aspirina reducen el riesgo de PE en aproximadamente una quinta parte (19%), con una disminución similar en el riesgo de muerte de los niños (16%) y una disminución menor en el riesgo de nacimientos antes del término (7%). Las dosis hasta 75 mg parecen ser seguras. Es probable que las dosis más altas sean mejores, pero también pueden aumentar los efectos adversos (Rodríguez *et al.*, 2001). El uso de baja dosis de este medicamento (aproximadamente 60 mg diarios) se basa en el razonamiento de que produce una inhibición de tromboxano más que la síntesis de PGI₂, que resultaría protector contra los fenómenos de vasoconstricción y coagulación (Brown, 1994).

La aspirina ha sido implicada en un número de reacciones adversas que afectan a la madre y al feto (Dekker y Sibai, 1995). Las complicaciones obstétricas son las hemorragias anterior y posterior al parto, rotura prematura de membranas y el desprendimiento prematuro de la placenta normalmente insertada (Rodríguez *et al.*, 2001). La magnitud del efecto varía mucho en los estudios analizados, por esto, el uso de aspirina está aún en revisión, sobretodo en los grupos con mayor riesgo de presentar PE.

2.3.3 Suplemento de Ácidos Grasos Omega 3

Bajo la misma base del desbalance tromboxano/prostaciclina, en la patogenia de la PE, 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. 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 (Olsen *et al.*, 2000).

2.3.4 *Suplemento de Vitaminas Antioxidantes*

La PE es una complicación que amenaza el embarazo y una causa importante de morbilidad y mortalidad materna y puede ser causa de una disminución de la disponibilidad de óxido nítrico en la circulación sanguínea. Los bajos niveles de vitamina C plasmática que se han visto en esta condición, pueden ser responsables de conducir a esta disminución de la disponibilidad de óxido nítrico en la circulación general y causar vasoconstricción y vasoespasmo, que están asociados con los síntomas típicos de PE (Senior, 2001). Los RL han emergido como posibles promotores de la disfunción vascular materna y de las bajas concentraciones de vitaminas encontradas tanto en plasma como en la placenta de mujeres con PE, sugiriendo la existencia de un estado previo de estrés oxidativo (Hubel, 1999).

La vitamina C (ácido ascórbico) es hidrosoluble y su efecto contra los RL se manifiesta principalmente en la materia acuosa del organismo (Bielski, 1982). Neutraliza ciertos RL que se forman en el propio organismo o provienen de productos que se ingieren o se inhalan así como aquellos otros originados por radiaciones (Ballester, 1996). La vitamina C, además de actuar como antioxidante neutralizando la acción de los RL de oxígeno, estimula directamente la síntesis de colágeno a través de la activación de múltiples genes y sirve para su estabilización. Se encuentra naturalmente en frutas crudas y frescas, como la guayaba, el mango, la piña y los cítricos y en vegetales como el pimiento, el tomate, el perejil, la col y la acelga (Maydata, 2005).

La vitamina E (α -tocoferol), es también un eficaz rastriero de RL. Es liposoluble, y por ello su función contra los RL y/o antioxidante tiene lugar principalmente en los lípidos, siendo esencial su presencia para la protección de las membranas celulares. Químicamente es un fenol, que interrumpe las cadenas de peroxidación de los lípidos insaturados. La vitamina E, al actuar, da lugar también a un radical de alta estabilidad, baja agresividad y, por consiguiente, inocuo. En el organismo, los rastrieros de RL y sus formas oxidadas resultantes están en equilibrio entre sí, actuando concertadamente (Ballester, 1996). Estudios *in vitro* sugieren que la vitamina E puede jugar un papel sinérgico con la vitamina C, incrementando su capacidad antioxidante contra los RL. También se ha publicado que la vitamina C regenera a la vitamina E, por un mecanismo no enzimático (Chan, 1993). Las principales fuentes alimentarias de vitamina E son el huevo y la mantequilla entre las de origen animal y entre las de origen vegetal los aceites de soya, maíz, maní y girasol, los guisantes como el chícharo, garbanzos y lentejas y el arroz integral (Maydata, 2005).

Hay diversos estudios que han mostrado que los niveles plasmáticos circulantes de vitamina C se reducen significativamente en pacientes con PE, en comparación con pacientes normotensas (Mikhail *et al.*, 1994; Kharb, 2000; Zhang *et al.*, 2001). También se ha visto que las concentraciones de vitamina E son más bajas en mujeres con PE (Mikhail *et al.*, 1994; Kharb, 2000). Al parecer, los antioxidantes hidrosolubles (vitamina C reducida) se consumen inicialmente, seguido el consumo de los antioxidantes liposolubles (α -tocoferol). El concepto del aumento de la utilización de vitaminas C y E en PE, suscita la posibilidad de un papel protector potencial de estos nutrientes antioxidantes (Kharb, 2000).

De acuerdo a esto, se han realizado estudios de caso-control, en los cuales se ha relacionado la ingesta de vitamina C, consumo de frutas y verduras, concentraciones plasmáticas de esta vitamina y el riesgo de PE. En estos estudios, las mujeres que informaron tener una dieta pobre en vitamina C durante 12 meses antes del parto o que tuvieron bajos niveles de ascorbato durante el parto, tenían mayor riesgo de presentar PE (Zhang *et al.*, 2002).

También se han hecho estudios aleatorios, donde se muestra que la administración de complementos de vitamina C y E puede ser beneficiosa para la prevención de la PE en mujeres con mayor riesgo de esta enfermedad (Chappel *et al.*, 1999, 2002). Esto se basaría en que los antioxidantes contrarrestarían las alteraciones de los RL y de esta forma, protegerían las membranas celulares frente a la peroxidación lipídica mediada por los RL (Hubel *et al.*, 1989). Aunque se señala que algunos de estos estudios son muy limitados estadísticamente y que estos resultados, aunque son prometedores, deben confirmarse en estudios clínicos controlados (Wallenburg, 2001).

Otros estudios que incluyen la utilización de las vitaminas E y C, han revelado una ventaja mínima. Estos han mostrado que las concentraciones de peróxidos lipídicos no se alteraron significativamente con la ingesta de estos antioxidantes y tampoco mejoraron el resultado fetal (Gulmezoglu., *et al* 1997; Sibai, 1998; Stratta *et al.*, 1994).

Con estos resultados contradictorios, parece necesaria la realización de nuevos estudios que determinen las ventajas y las desventajas para el feto y para la madre de la ingesta de suplementos vitamínicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar el valor de los indicadores de estrés oxidativo MDA, F2-isoprostanos (8-iso-PG F2 alfa), enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GSH-px), la actividad de la enzima de membrana Na-K ATPasa y la capacidad antioxidante del plasma o FRAP en embarazadas con alto riesgo de PE, para conocer el efecto de la administración de vitaminas antioxidantes.

3.2 Objetivos Específicos

- 1.- Determinar el valor de los indicadores de estrés oxidativo en glóbulos rojos, plasma y placenta según corresponda.
- 2.- Determinar la variación en los indicadores de estrés oxidativo que produce la administración de vitaminas antioxidantes en pacientes preeclámpicas.
- 3.- Determinar la relación entre la variación producida en los indicadores de estrés oxidativo y la presentación de PE.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño y tamaño de muestra

4.1.1 Pacientes:

El universo de pacientes correspondió a las mujeres embarazadas que realizaron sus controles desde la semana 11 de embarazo hasta el parto en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, durante los años 2004 y 2005. Fueron excluidas del estudio las embarazadas con enfermedades previas, como diabetes mellitus, hipertensión crónica, nefropatías, lupus eritematoso sistémico y trombofilias, así como los embarazos múltiples, con malformaciones mayores.

4.1.2 Unidad de análisis:

Del universo de pacientes, se seleccionaron aquellas que, al ser evaluadas mediante flujometría Doppler, presentaron un alto riesgo de desarrollar PE a las semanas 11-14 de gestación. Las seleccionadas, se dividieron en 2 grupos iguales de 31 mujeres cada uno. A un grupo se le administró por vía oral vitamina E (400 UI / día) y Vitamina C (1000 mg / día), desde la semana de selección hasta el parto. El otro grupo recibió placebo en la misma forma y frecuencia. El tamaño de muestra o n, de 31 individuos, fue estimado mediante la utilización del programa computacional Win Episcopo 2.0, considerando la dispersión de resultados obtenidos en estudios preliminares de medición de indicadores bioquímicos de estrés oxidativo, en base al siguiente modelo estadístico:

$$n = ((Z(a) + Z(b)) SD)^2 / (m1 - m2)^2$$

Donde:

-Z(a) = valor de la t de Student para el nivel de confianza especificado

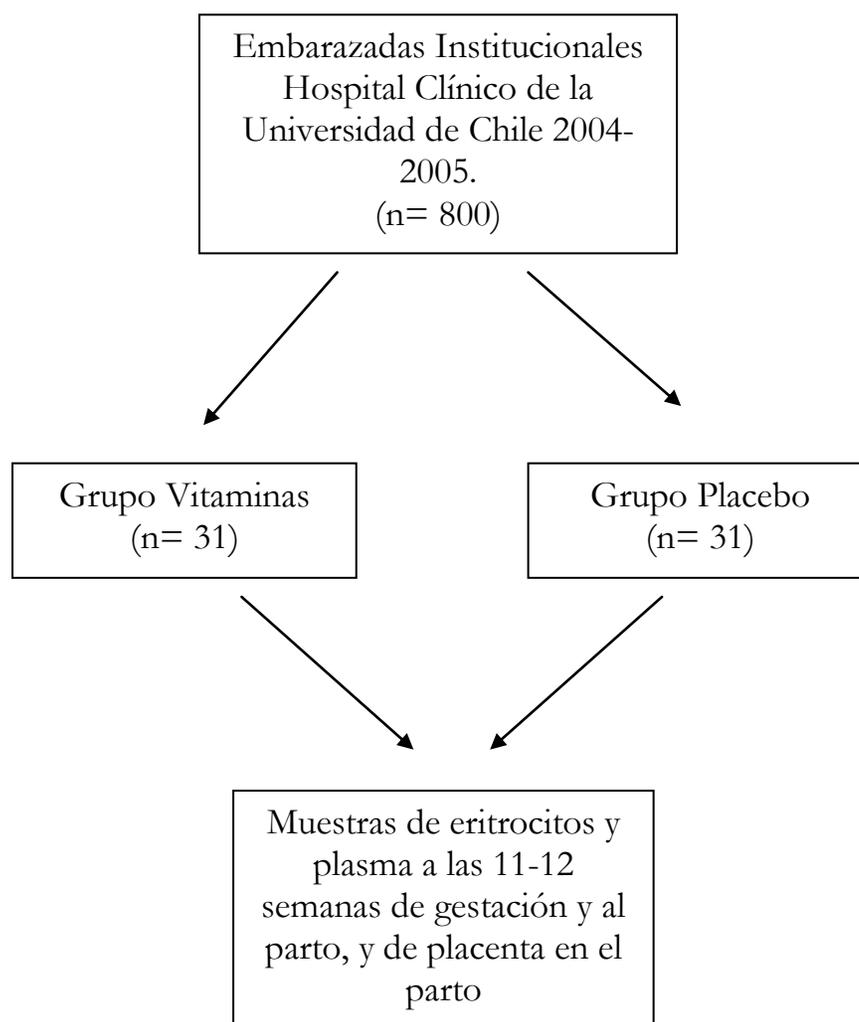
-Z(b) = valor de la t de Student para la potencia especificada

-SD = desviación estándar esperada

-m1 = media esperada de la población 1

-m2 = media esperada de la población 2

El estudio realizado fue de doble ciego; por ende, solo se conoció a qué grupo de pacientes correspondieron las muestras (placebo o vitaminas) cuando los resultados de todas las muestras fueron obtenidos.



Además se comparó la incidencia de PE, entre los dos grupos de pacientes, mediante una prueba de detección de diferencias entre proporciones, distribución Chicuadrado (χ^2).

4.1.3 Muestra:

Las pacientes fueron objeto de 5 controles ecográficos, estos controles se realizaron en las siguientes semanas gestacionales: 11-14, 22-25, 28, 32 y 36. Además, para realizar las mediciones de los indicadores de estrés oxidativo se utilizó una muestra de sangre obtenida al comenzar el estudio en la semana 11-14 y otra muestra de sangre y placenta al momento del parto. Las muestras fueron transportadas en hielo y almacenadas a -80° C en el laboratorio de fisiopatología renal, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en envases de plástico individuales, siendo rotuladas con la cédula de identidad de la paciente y fecha de obtención.

En plasma sanguíneo se determinaron la capacidad antioxidante del plasma o FRAP y F2-isoprostanos. En glóbulos rojos y placenta se realizaron las determinaciones de malonildialdehido (MDA), actividad de la enzima de membrana Na-K ATPasa y actividades de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GSH-px.

Mediante los datos clínicos aportados por los médicos, se obtuvo la información necesaria para determinar al final del estudio cuantas pacientes en cada grupo presentaron PE.

4.2 Técnicas Analíticas y Bioquímicas Aplicadas

4.2.1 Variables Bioquímicas de Defensas Antioxidantes:

4.2.1.1 SOD

Para la determinación de la actividad de SOD, los tejidos de placenta o de eritrocitos se centrifugaron a 33.000 g / 1 h y fueron mezclados en vortex con una solución amortiguadora de fosfato salino 0,01 M pH 7,4. Se midió la Cu/Zn-SOD (citósólica). La determinación, está basada 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.*, 1993).

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

4.2.1.2 CAT

Para la determinación de la actividad de CAT se tomaron muestras de tejido de placenta o de homogenizados de eritrocitos al 20% en solución amortiguadora de fosfato 50 mM pH 7,0. La mezcla posteriormente se centrifugó a 1.000 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.

4.2.1.3 *GSH-px*

Para la determinación de la actividad de la GSH-px, se mezclaron en vortex 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 33.000 g / 1 h), usando un método espectrofotométrico a 340 nm, basado en la oxidación del glutatión reducido (GSH) por acción de la enzima GSH-px, acoplada a la reducción del glutatión oxidado (GSSG) por la glutatión reductasa, en presencia de NADPH (Flohé y Günzler, 1984).

La actividad de GSH-px fue expresada como U/mg proteína o U/mg de hemoglobina, dependiendo si la muestra era de placenta o de eritrocitos respectivamente (unidad de GSH-px (U), es definida como la actividad de la enzima que oxida un μmol NADPH/minuto).

4.2.1.4 *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 y que se expresa como

FRAP (ferric reducing ability of plasma) en micromoles o μM (Benzie y Strain, 1996).

4.2.2 *Variables Bioquímicas de Estrés Oxidativo: Lipoperoxidación*

4.2.2.1 *MDA*

Las membranas de eritrocitos fueron separadas por centrifugación en centrífuga refrigerada a 20.000 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.

4.2.2.2 *F₂-Isoprostanos*

Las muestras de plasma destinadas a la medición de F₂-isoprostanos se recibieron en tubos plásticos impregnados de hidroxitolueno butilado (concentración final 1mM), como antioxidante. Los F₂-Isoprostanos son productos formados *in vivo* por la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico, catalizada por RL. 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.

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

La determinación de la actividad de esta enzima unida a membrana, la cual se esperaba fuese influenciada por la peroxidación de fosfolípidos, se midió en un homogenizado completo de placenta. El método está basado en la medición de la hidrólisis de ATP por liberación de fósforo inorgánico (Katz y Epstein, 1967).

La actividad de esta enzima fue expresada como μmol de fosfato inorgánico/mg de proteína/hora en placenta.

4.2.4 *Determinación de hemoglobina*

Esta medición se realizó por un método espectrofotométrico, añadiendo a la muestra de hemolizado de eritrocitos el reactivo de Drabkin (NaHCO_3 , KCN, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y H_2O), produciendo cianometahemoglobina al reaccionar con la muestra, que da su máxima absorbancia a 540 nm (Weatherburn, 1967).

4.2.5 *Determinación del contenido total de Proteínas*

Se utilizó un método espectrofotométrico, en que se realiza hidrólisis alcalina seguida de una reacción de coloración con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Como estándar se utilizó una preparación liofilizada de albúmina de bovino (Lowry *et al.*, 1951).

4.3 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 tratadas y no tratadas con vitaminas antioxidantes. Para analizar la diferencia de la presentación de la enfermedad entre el grupo de placebos y el de tratamientos, se utilizó la prueba chi cuadrado simple de detección de diferencias entre proporciones. En ambos casos, se consideraron diferencias significativas aquellas con un $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Pacientes

Los resultados obtenidos en los 31 pacientes sometidos a la administración de vitaminas E (400 mg) y C (1000 UI), mostraron que no existen diferencias significativas en la edad al parto de las pacientes y en el peso de los recién nacidos, al compararlo con los datos de las 31 pacientes que recibieron placebo. Tampoco existen diferencias en el número de casos con PE entre tratamientos y placebos (8 casos en cada grupo) al analizarlas en una prueba de Chi-cuadrado para detectar diferencias entre proporciones ($p > 0.05$) se confirma este hallazgo (Tabla 1).

TABLA 1: Presentación de PE, edad al parto y peso de recién nacido en pacientes sometidas a tratamiento y placebo.

	Tratamiento (n=31)	Placebo (n=31)	p
PE (% de casos)	25,8%	25,8%	1,00
Edad Gestacional (semanas)	37,8 ± 2,5	37,3 ± 2,6	0,39
Peso del recién nacido (gr)	2911,8 ± 547,3	2823,2 ± 669,3	0,53

Resultados expresados en promedios ± Desviación Estándar.

5.2 Defensas antioxidantes (SOD, CAT, GSH-px y FRAP)

La actividad de SOD en eritrocitos, en pacientes tratados con vitaminas antioxidantes, presentó una ligera disminución al parto respecto a la actividad presentada desde las semanas 11-14 de gestación. Por el contrario, en pacientes que recibieron placebo la actividad aumentó. Pero en general, no se presentaron diferencias significativas entre tratamiento y placebo. Por otra parte, tampoco se observan diferencias significativas en la actividad de SOD en muestras de placenta. Lo mismo ocurre en el caso de la GSH-px, tanto en eritrocitos como en placenta. La CAT presenta un ligero aumento de su actividad en eritrocitos desde las semanas 11-14 de gestación hasta el parto en tratamientos y placebo, pero las diferencias encontradas, como en el caso de encontradas en placenta, tampoco son significativas (Tabla 2).

En el caso de FRAP, en tratamiento y placebo se presenta un leve aumento en su actividad al parto respecto a las semanas 11-14 de gestación, pero las diferencias entre ambos grupos, en ambas etapas, tampoco son significativas (Tabla 2).

TABLA 2: Concentración de SOD, GSH-px, CAT y FRAP en pacientes sometidos a tratamiento y placebo.

	Tratamiento (n=31)	Placebo (n=31)	p
SOD (U/mg de Hb o Prot) Eritrocitos Semanas 11-14 de gestación.	0,79 ± 0,19	0,73 ± 0,09	0,26
SOD Eritrocitos Parto	0,59 ± 0,28	0,74 ± 0,46	0,25
SOD Placenta	6,4 ± 3,65	7,6 ± 3,75	0,44
GSH-px (U/mg de Hb o Prot) Eritrocitos Semanas 11-14 de gestación.	0,56 ± 0,14	0,48 ± 0,1	0,17
GSH-px Eritrocitos Parto	0,39 ± 0,16	0,59 ± 0,63	0,21
GSH-px Placenta	0,03 ± 0,01)	0,03 ± 0,01	0,22
CAT (k/mg de Hb o Prot) Eritrocitos Semanas 11-14 de gestación.	98,92 ± 28,25	81,1 ± 16,28	0,10
CAT Eritrocitos Parto	141,06 ± 94,26)	119,56 ± 73,61	0,46
CAT Placenta	0,31 ± 0,16)	0,58 ± 0,44	0,06
FRAP (µM) Semanas 11-14 de gestación.	329,24 ± 52,98	330,29 ± 52,61	0,97
FRAP (µM) Parto	457.36 ± 128,65	495.8 ± 91,97	0,42

Resultados expresados en promedios ± Desviación Estándar.

5.3 Lipoperoxidación (MDA y F2-isoprostanos)

No se presentaron diferencias significativas en los niveles de MDA en eritrocitos a las semanas 11-14 de gestación y al parto, en las mujeres que tomaron placebo respecto de las mujeres sometidas a tratamiento con vitaminas antioxidantes. Por otra parte, tampoco se encontraron diferencias importantes en los niveles de MDA presentes en el tejido placentario de ambos grupos de pacientes. Lo mismo sucede al comparar los niveles plasmáticos de F2-isoprostanos observados a las semanas 11-14 de gestación y al parto (Tabla 3).

TABLA 3: Concentración de MDA y F2-isoprostanos en pacientes sometidos a tratamiento y placebo.

	Tratamiento (n=31)	Placebo (n=31)	p
MDA (nmoles/ mg de Hb) Eritrocitos Semanas 11-14 de gestación.	0,28 ± 0,08	0,26 ± 0,04	0,39
MDA Eritrocitos Parto	0,31 ± 0,08	0,28 ± 0,07	0,25
MDA (nmoles/mg de prots) Placenta	5,72 ± 3,43	5,90 ± 4,45	0,92
F2-isoprostanos (pg/ml) Semanas 11-14 de gestación.	33.27 ± 18,16	35.23 ± 43,13	0,90
F2-isoprostanos Parto	27,58 ± 31,72	27.25 ± 32,02	0,97

Resultados expresados en promedios ± Desviación Estándar.

5.4 Efectos sobre enzimas de membrana en placenta: Actividad de (Na-K)- ATPasa.

En la tabla 4, se muestra que en tejido placentario no se observan diferencias significativas en la actividad de la enzima de membrana Na-K ATPasa entre los pacientes sometidos a tratamientos con vitaminas antioxidantes (E y C) y aquellos que recibieron placebo ($p > 0.05$).

TABLA 4: Actividad de Na-K ATPasa en pacientes sometidos a tratamiento y placebo.

	Tratamiento (n=31)	Placebo (n=31)	P(<0.05)
Na-K ATPasa (μ M de Pi/mg de prot/h) Placenta	2,56 \pm 1,98	2,54 \pm 1,98)	0,97

Resultados expresados en promedios \pm Desviación Estándar.

6. DISCUSIÓN

Se ha pensado que el estrés oxidativo está implicado en la génesis y desarrollo de PE, debido a lo cual, algunos autores han apoyado el uso de una terapia antioxidante en mujeres en riesgo de contraer esta enfermedad (Messina, 2004).

En la presente memoria, se midieron los indicadores bioquímicos FRAP y F2-isoprostanos en el plasma, SOD, CAT, GSH-px y MDA en eritrocitos (GR) y placenta (PL) y la enzima Na-K ATPasa en PL. Los resultados aportados por éstos indicadores nos permiten evaluar el efecto provocado por la administración de vitaminas antioxidantes tanto a nivel materno (plasma y GR), que reflejaría un efecto más inmediato de la terapia y a nivel placentario, donde es más difícil la llegada de los productos administrados.

Según estudios anteriores, estos marcadores revelarían la existencia de estrés oxidativo en la PE, dada la disminución de las enzimas SOD, CAT y GSH-px (PL y GR) y la disminución de FRAP (Zusterzeel *et al.*, 2001), lo que revelaría un deterioro del sistema defensivo antioxidante. También se ha observado un aumento de productos de lipoperoxidación como MDA (PL y GR) y F2-isoprostanos en plasma, además de la disminución en la actividad de la enzima de membrana Na-K ATPasa (PL) (Messina, 2004).

En función de los antecedentes conocidos, esperábamos que las pacientes sometidas a tratamiento con vitaminas antioxidantes tuviesen aumento en la actividad de los indicadores del sistema de defensas antioxidantes, una disminución de los valores en los indicadores de lipoperoxidación y un aumento

de la actividad de la enzima Na-K ATPasa (PL) respecto a pacientes preeclámpticas sin tratamiento.

En investigaciones realizadas anteriormente, en relación a la administración de antioxidantes en pacientes preeclámpticas, podemos mencionar un estudio caso-control de 109 mujeres con PE y 259 controles, donde se evaluó la dieta materna, los niveles plasmáticos de vitamina C y el riesgo de presentar PE. Los resultados, indicaron que después de ajustar edad materna, índice de masa corporal e ingesta de energía, las mujeres que consumen cantidades menores a 85 mg de vitamina C al día (por debajo de la asignación dietética recomendada), en comparación con otras, experimentaron una duplicación en el riesgo de PE. Además, aquellas con niveles plasmáticos de ácido ascórbico menores a 34,6 $\mu\text{mol/L}$, experimentaron un aumento de 3,8 veces el riesgo de presentar PE (95% CI). Este ensayo concluyó que estos resultados, en caso de confirmarse, podrían sugerir que aumentar la ingesta de frutas y vegetales ricos en vitamina C y otros antioxidantes puede reducir el riesgo de PE (Zhang *et al.*, 2002).

En otro estudio (Chappell *et al.*, 1999), se reclutó a 283 mujeres seleccionadas por presentar un mayor riesgo de PE según resultados anormales de Doppler en la arteria uterina entre las 18 y 22 semanas de gestación y por haber presentado PE o síndrome HELLP en el embarazo anterior. Las pacientes fueron asignadas aleatoriamente para recibir, a partir de las 22 semanas de gestación, vitamina C y vitamina E en dosis diarias de 1000 mg y 400 UI, respectivamente, o placebos. Se utilizaron ensayos de inmunoadsorción enzimática para cuantificar al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), un marcador de la activación de las células endoteliales y el PAI-2, que es

sintetizado por la placenta. Normalmente, la proporción PAI-I/PAI-2 disminuye a medida que aumenta la masa placentaria, pero se encuentran altos valores en pacientes con PE debido a la activación de las células endoteliales y a la insuficiencia placentaria. Los resultados de este experimento, indicaron que la administración diaria de suplementos de vitaminas C y E se asociaron a una reducción del 21% en la relación PAI-I/PAI-2 durante la gestación. Por otra parte, las concentraciones plasmáticas de vitamina C aumentaron en un 32% en promedio y las de vitamina E aumentaron en un 54%. El 17% de las pacientes que recibieron placebo desarrollaron PE, pero sólo el 8% de las mujeres que recibieron las vitaminas desarrollaron la enfermedad. Se concluye, que si estos resultados se confirman en un gran ensayo multicéntrico, el suministro extra de vitaminas C y E, puede ayudar a prevenir PE en mujeres de alto riesgo.

Posteriormente, los mismos autores, trataron con suplementos vitamínicos a 79 pacientes y a 81 pacientes les dieron placebos, ambos grupos de mujeres en alto riesgo de desarrollar PE (según los parámetros utilizados anteriormente). Ambos grupos, fueron comparados con otro de 32 pacientes que se encontraban en bajo riesgo de desarrollar PE y que no estaban tomando suplementos. En este experimento, se observó que los índices de estrés oxidativo y función placentaria fueron anormales en el grupo de placebo. Cuando el grupo placebo se comparó con las mujeres que se encontraban en bajo riesgo para PE, las concentraciones de ácido ascórbico y otros indicadores de función placentaria anormal disminuyeron, mientras que las de F2-isoprostanos y la relación PAI-1/ PAI-2 se incrementaron. En el grupo que recibió suplementos vitamínicos, las concentraciones de ácido ascórbico, F2-isoprostanos y la relación PAI-1/PAI-2 fueron similares a las mujeres que se encontraban en bajo riesgo de PE. Por lo que se llegó a la conclusión de que la administración de suplementos

antioxidantes en mujeres que se encontraban en situación de riesgo de PE se asoció con una mejoría en los índices bioquímicos de la enfermedad (Chappell *et al.*, 2002).

En otro ensayo se utilizaron 2410 mujeres de 25 hospitales, las cuales tenían un alto riesgo de desarrollar PE (elegidas según criterios similares a los estudios anteriores). A un grupo de 1199 mujeres se les asignó un tratamiento a base de 1000 mg de vitamina C y 400 UI de vitamina E y a otro grupo de 1205 mujeres se les dio placebo, la administración se realizó todos los días desde el segundo trimestre de embarazo hasta el parto. Se evaluó la incidencia de PE y como criterios de valoración secundarios se evaluaron el bajo peso al nacer (<2,5 kg) y el tamaño según la edad gestacional. La incidencia de PE fue similar en los grupos tratamiento y placebo (15% [n = 181] frente a 16% [n = 187]). El peso al nacer fue menor en los recién nacidos de las mujeres que tomaron antioxidantes que en los de las controles (28% [n = 387] frente a 24% [n = 335]), la edad gestacional fue similar en ambos grupos. Los autores concluyeron que la administración concomitante de suplementos de vitamina C y de vitamina E no previene la PE en mujeres en situación de riesgo, pero aumenta la tasa de niños nacidos con bajo peso al nacer. Por lo tanto, según estos resultados, el uso de estas altas dosis de antioxidantes no se justifica en el embarazo (Poston *et al.*, 2006).

En otro ensayo, mujeres entre las 12 y las 19 semanas de gestación, diagnosticadas previamente con hipertensión arterial crónica o historial previo de PE, fueron asignadas para recibir un tratamiento diario con vitamina C (1000 mg) y vitamina E (400 UI) o placebo [n=734 y p≤0.05]. Los análisis se ajustaron a cada sitio y grupo de riesgo (con historial previo de PE, hipertensión arterial

crónica, o ambos). Los resultados encontrados en este estudio, no revelaron una reducción significativa en la incidencia de PE, en la edad gestacional en el momento del parto, en las tasas de mortalidad perinatal, desprendimiento placentario, parto prematuro o peso al nacer. Según sus autores, este ensayo tampoco demostró que existiese un beneficio en la suplementación con antioxidantes en la reducción de la tasa de PE en pacientes con hipertensión arterial crónica y / o historial previo de PE (Spinnato *et al.*, 2007).

Debido a los resultados contradictorios encontrados en las pruebas realizadas para evaluar la efectividad de los tratamientos con vitaminas antioxidantes, el año 2006, se analizaron en conjunto cuatro estudios con un tamaño de muestra total de 4680 mujeres seleccionadas al azar, donde se administraban tratamientos de vitaminas E y C combinados v/s placebo. Los resultados obtenidos del análisis no mostraron diferencias significativas entre los grupos que recibieron vitaminas y los que recibieron placebo en el riesgo de presentar PE, pérdida neonatal o fetal e infantes nacidos con pequeño tamaño para la misma edad gestacional. Aunque hubo un mayor número de nacimientos prematuros dentro del grupo que recibió vitaminas, este hallazgo no fue significativo. Dentro de las 4 pruebas analizadas, una sola prueba temprana reportó que las vitaminas E y C reducían el riesgo de PE (Chappell *et al.*, 1999). Sin embargo, ninguna de las pruebas más recientes (Poston *et al.*, 2006; Rumbold *et al.*, 2005; Beazley *et al.*, 2005) ni revisiones sistemáticas calificando todas la pruebas pudieron sostener este hallazgo (Polysos *et al.*, 2007).

En el presente trabajo, entre las semanas 11-14 de gestación, recién se comienzan a administrar los suplementos y como es de esperar, el valor de los indicadores del sistema defensivo antioxidante (SOD, CAT, GSH-px y FRAP) y

el de los indicadores de lipoperoxidación (MDA y F2-isoprostanos) no muestra diferencias significativas entre tratamiento y placebo. Durante este período no se muestra ningún efecto temprano en el grupo sometido a tratamiento a nivel materno (GR y plasma) que pudiese ser detectado por los indicadores, ya que por desgracia, en ese momento, no se pueden evaluar los cambios en la PL, que es donde se iniciaría la enfermedad.

Los valores de los indicadores utilizados, tampoco difieren en forma significativa al parto en los grupos tratamiento y control (a nivel materno y placentario). Esto quiere decir que los indicadores del sistema de defensas antioxidante no muestran una mejoría notoria en las pacientes tratadas con antioxidantes respecto a las controles, lo mismo ocurre en el caso de los indicadores de lipoperoxidación y en la enzima Na-K ATPasa placentaria. Asimismo, esto es corroborado por la incidencia de la enfermedad en las pacientes, la cual fue casi la misma en ambos grupos.

De todos los indicadores utilizados, el que tuvo el valor más cercano a mostrar una diferencia significativa entre ambos grupos, fue la CAT placentaria ($p=0.057$). Pero, contrariamente a lo que se podría haber esperado, la actividad mostrada en el grupo sometido a tratamiento antioxidante es menor a la del grupo placebo, por lo que la enzima sería afectada negativamente por los tratamientos a este nivel. Sin embargo, no se puede concluir esto, ya que no se trata de una diferencia significativa y además, necesitaría corroborarse con otros estudios del mismo tipo.

Los indicadores bioquímicos utilizados, que antes habían sido confirmados como buenos indicadores de PE (Messina, 2004), mostrarían concordancia con la

incidencia real de la enfermedad, pero también, claramente refutarían la hipótesis de la importancia del uso de las vitaminas antioxidantes E y C en la prevención de la PE. Esto apoyaría los últimos hallazgos realizados en pruebas de este tipo, donde la incidencia de PE fue similar entre mujeres no suplementadas y las suplementadas con vitaminas E y C (Spinnato *et al.*, 2007; Poston *et al.*, 2006; Rumbold *et al.*, 2005; Beazley *et al.*, 2005; Polysos *et al.*, 2007), donde también se han observado algunos efectos negativos posiblemente atribuibles a estos tratamientos, como menores pesos al nacimiento entre otros (Lindheimer y Sibai, 2006).

Estos resultados, contradicen lo encontrado en las pruebas tempranas, donde se encontraron menores incidencias de PE y mejoras en los indicadores bioquímicos utilizados en pacientes tratados (Chappell *et al.*, 1999; 2002), aunque estas pruebas son consideradas muy pequeñas por algunos autores como para estimar sus resultados como definitivos (Polysos *et al.*, 2007). Los resultados de incidencia de PE en esta memoria, tampoco pueden ser considerados definitivos, debido a que ésta fue realizada principalmente para evaluar el comportamiento de los indicadores de estrés oxidativo al ser sometidos a tratamientos. Debido a la complejidad en la medición de estos indicadores, es que este estudio no pudo ser del tamaño necesario que muestran otras pruebas de incidencia.

Lo observado en los resultados de los indicadores, como en la incidencia de la enfermedad, podría deberse a que las dosis (dosis, ritmo y formas de administración fueron similares a las utilizadas en los otros estudios antes mencionados) o el tipo de antioxidantes utilizados (los mismos de los estudios mencionados) no serían lo suficientemente efectivos para recuperar las defensas antioxidantes en forma significativa. Lo mismo ocurriría con los indicadores de

peroxidación MDA y F2-Isoprostanos, pues estos indicadores tampoco disminuyeron en forma significativa como debería suceder si los antioxidantes usados fueran efectivos y esto debería haber sucedido tanto en las pacientes que presentaron o no PE al final del período de pruebas. Lo que sucede con la enzima de membrana Na-K ATPasa en placenta, que igualmente no varía entre tratamientos y placebo, tampoco nos aporta nada nuevo al respecto.

Las diferencias en la metodología de este estudio respecto a los estudios que tuvieron diferencias significativas fueron, principalmente, la selección por Doppler para encontrar a las mujeres en alto riesgo de presentar PE, que se realizó a las 11-14 semanas de gestación y no a las 18-22 semanas de gestación (Chappell *et al.*, 1999), aunque cuando se produciría un mayor número de aciertos sería a la semana 23 de gestación (Parra *et al.*, 2005). La razón de esto, es que se buscó observar el efecto de una administración más precoz de los tratamientos, asumiendo que estos, al darse más temprano, serían mucho más eficaces, por lo que la selección de las pacientes también fue mucho antes. Respecto al segundo estudio de los mismos autores (Chappell *et al.*, 2002), donde se utilizaron 3 grupos, aquí no se ocupó un grupo de pacientes con bajo riesgo de presentar PE como control.

En la selección de las pacientes fue utilizado el historial de PE, pero fueron descartadas las pacientes con hipertensión crónica preexistente, ya que ésta no es considerada PE, a diferencia de un estudio mencionado anteriormente (Spinnato *et al.*, 2007).

Pese a todas las contradicciones anteriormente señaladas, el hecho de que lo expresado por los indicadores utilizados coincida con que no hay diferencias en la incidencia real de la enfermedad, siendo éste, un estudio más precoz en la administración de los tratamientos que los precedentes, es algo que no se puede dejar de considerar. Basándonos solamente en los resultados encontrados en este estudio, los tratamientos a base de la administración oral diaria de vitamina E (400UI) y de vitamina C (1000mg) no serían eficaces en la prevención de la PE, ni en el alivio del estrés oxidativo producido por ésta.

Sin embargo, no se descarta la importancia del estrés oxidativo en la patogénesis de la PE y que nuevos tratamientos que apunten a prevenirlo puedan ser intentados en un futuro próximo.

6. CONCLUSIÓN

En la presente investigación, se observó que no existen efectos significativos por administración diaria desde la 12ª semana de gestación hasta el parto de vitaminas antioxidantes E (400UI) y C (1000mg) sobre la variación de los indicadores bioquímicos de estrés oxidativo en glóbulos rojos, plasma y placenta. Además, tanto el estrés oxidativo como la incidencia de PE, no presentaron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y control.

Por lo tanto, la administración diaria de vitaminas antioxidantes en pacientes preeclámpticas, no produciría un efecto positivamente significativo sobre el estrés oxidativo (tampoco negativo), ni disminuiría significativamente la incidencia de PE. Por esta razón, no se puede recomendar su administración como tratamiento paliativo o preventivo a pacientes afectadas por ésta enfermedad.

8. BIBLIOGRAFÍA

AEBI, H. 1974. Catalase. *In*: Methods in Enzymatic Analysis. Bergmeyer H.U. Acad Press N York. 29: 673-678.

AHMET, V.; KEMAL, N.; KUSCU, F.; KOYUNCU, S.; UYANIK, E.; YASEMIN, Y.; SEMRA, O. 2003. Atherogenic profile in preeclampsia. Arch Gyn Obst. 1: 45-47.

ALFIREVIC, Z.; NEILSON, J. 1995. Doppler ultrasonography in high risk pregnancies: Systematic review with meta-analysis. Am J Obst Gyn. 172: 1379-1387.

ASLAN, H.; GUL, A.; CEBECI, A. 2004. Neonatal outcome in pregnancies after preterm delivery for HELLP syndrome. Gyn Obst Inv. 58: 96-99.

AUSTGULEN, R. 2004. Recent knowledge on mechanisms underlying development of pre-eclampsia. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 70: 223-232.

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 Obst Gyn Rep Biol. 113: 21-25.

BACHI, A.; ZUCCATO, E.; BARALDI, M.; FANELLI, R.; CHIABRANDO, C. 1996. Measurement of urinary 8- Epi-prostaglandin F2a, a novel index of lipid peroxidation *in vivo*, by immunoaffinity extraction/gas chromatography-mass spectrometry. Basal levels in smokers and nonsmokers. Free Radic Biol Med. 20: 619-624.

BALLESTER, M. 1996. Antioxidantes Radicales Libres y Salud. Med Clin. 13: 509-515.

BEAZLEY, D.; AHOKAS, R.; LIVINGSTON, J.; GRIGGS, M.; SIBAI, B. 2005. Vitamin C and E supplementation in women at high risk for preeclampsia: A double-blind, placebo-controlled trial. Am J Obst and Gyn. 2: 520-521.

BEILIN, Y.; ZAHN, J.; COMEFORD, M. 1997. Safe Epidural Analgesia in Thirty Parturients With Platelet Counts Between 69.000 and 98.000. Anesth Analg. 85 : 385-388.

- BENZIE, I.; STRAIN, J.** 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power. The FRAP assay. *Analyt Biochem.* 239: 70-76.
- BERRAZUETA, R.** 1999. Rol del calcio en regular el tono vascular normal y en la hipertensión arterial. *Rev Esp Cardiol.* 3: 25-33.
- BIELSKI, B.** 1982. Ascorbic acid chemistry, metabolism and uses. *Am Chem Soc.* 1: 81-101.
- BILODEAU, J.; HUBEL, C.** 2003. Current concepts in the use of antioxidants for the treatment of preeclampsia *Obst Gyn.* 25: 742-750.
- BOLTE, A.; VAN GEIJN, H.; DEKKER, G.** 2001. Pathophysiology of preeclampsia and the role of serotonin. *Eur J Obst Gyn Rep Biol.* 95: 12-21.
- BOWEN, R.; MOODLEY, J.; DUTTON, M.** 2001. Oxidative stress in pre-eclampsia. *Acta Obst Gyn Scand* 80: 719-725.
- BROWN, M.** 1994. Non pharmacological management of pregnancy-induced hypertension. *J Hypert.* 8: 295-301.
- BURROW, G.** 1996. Complicaciones medicas durante el embarazo. *Mc Graw-Hill.* : 1-25.
- BURTON, G.; JAUNIAUX, E.** 2004. Placental oxidative stress: From miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gyn Inv.* 11:342-352.
- CAMPBELL, S.; GRIFFIN, D.; PEARCE, J.** 1983. New Doppler technique for assessing utero-placental blood flow. *Lancet.* 1:675-677.
- CARRERA, F.; CASART, Y.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F.; MARIN, R.** 2003. Preeclampsia and calcium-ATPase activity of plasma membranes from human myometrium and placental trophoblast. *Hypert Pregn.* 22:295-304.
- CASTILLO, R.; HUERTA, P.; CARRASCO, R.; RODRIGO, R.** 2003. Estrés oxidativo y daño renal. *CIMEL.* 1:44-53.

CEKMEN, M.; ERBAGCI, A.; BALAT, A. 2003. Plasma lipid and lipoprotein concentrations in pregnancy induced hypertension. *Clin Biochem* 36: 575-578.

CHAN, A. 1993. Partners in defense, vitamin E and C. *Canad J Physiol Pharm.* 71: 725-731.

CHAPPELL, L.; SEED, P.; BRILEY, A.; KELLY, F.; LEE, R.; HUNT, B.; PARMAR, K.; BEWLEY, S.; SHENNAN, A.; STEER, P.; 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.; SEED, P.; KELLY, F.; BRILEY, A.; HUNT, B.; CHARNOCK-JONES, D.; 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 Obst Gyn.* 187: 777-784.

CHEESEMAN, K.; SLATER, T. 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bullet.* 49:481-493.

COLEMAN, M.; MCCOWAN, L.; NORTH, R. 2000. Mid –trimester uterine artery Doppler screening as a predictor of adverse pregnancy outcome in high-risk women. *Ultrasound Obst Gyn.* 15: 7-12.

CROSS, J. 2003. The genetics of pre-eclampsia: a fetoplacental or maternal problem?. *Clin Genet.* 64: 96-103.

CROWTER, C.; HILLER, J.; PRIDMORE, B.; BRYCE, R.; DUGGAN, P.; HAGUE, W.; ROBINSON, J. 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 Obst Gyn.* 39: 12-18.

DAVIDGE, S. 1998. Oxidative stress and altered endothelial cell function in preeclampsia. *Sem Rep Endoc.* 16: 65-73.

DAVISON, J.; HOMUTH, V.; JEYABALAN, A.; CONRAD, K.; KARUMANCHI, S.; QUAGGIN, S.; DECHEND, R.; LUFT, F. 2004. New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol.* 15: 2440-2448.

- DEKKER, G.** 1999. Risk Factors for Preeclampsia. *Clin Obst Gyn.* 42:422-435.
- DEKKER, G.; SIBAI, B.** 1995. Low-dose aspirin in the prevention of preeclampsia and fetal growth retardation: rationale and clinical trials. *Am J Obst Gyn.* 168: 214-227.
- DEKKER, G.; SIBAI, B.** 1999. The immunology of preeclampsia. *Sem Perinatol.* 23 : 24-33.
- DE ROSA, J.** 1998. Estado actual de la terapéutica antioxidante: Oxidación y Antioxidación. *Rev Fed Arg Cardiol.* 27: 496-498.
- ESPLIN, M.; FAUSETT, M.; FRASER, A.** 2001. Paternal and maternal Components of the Predisposition to Preeclampsia. *N Engl J Med.* 12: 867-872.
- FAINARU, O.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I.; ALMOG, B.; GAMZU, R.; KUPFERMINEC M.** 2003. Preeclampsia is associated with increased susceptibility of serum lipids to copper-induced peroxidation in vitro. *Act Obst Gyn Scand.* 82: 711-715.
- FELFERNING-BOEHM, D.; SALAT, A.; VOGL, S.; MURABITO, M.; FELFERNING, M.; SCHMIDT, D.; MITTLBOECK, M.; HUSSLEIN, P.; MULLER, M.** 2000. Early detection of preeclampsia by determination of platelet aggregability. *Thromb Res.* 98: 139-146.
- FERNANDEZ, V.** 2005. Caracterización temporal de parámetros de estrés oxidativo y disfunción endotelial, en sangre y placenta de embarazadas chilenas, con riesgo de preeclampsia. Tesis para optar al grado de Magister Cs. Médicas. Universidad De Chile, Facultad De Medicina.
- FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.** 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology.* 105: 114-121.
- FUKUNAGA, K.; TAKAMA, K.; SUZUKI, T.** 1995. High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. *Analit Biochem.* 230:20-23.
- FUNAI, E.; MACKENZIE, A.; KADNER, S.; ROQUE, H.; LEE, M.; KUCZYNSKI, E.** 2002. Glutathione peroxidase levels throughout normal pregnancy and in preeclampsia. *J Matern Fetal Neonat Med.* 12:322-326.

GALLEY, H.; WEBSTER, N. 2004. Physiology of the endothelium. *Brit J Anaesth.* 93:105-13.

GARZETTI, G.; TRANQUILLI, A.; CUGINI, A. 1993. Altered lipid composition, increased lipid peroxidation, and altered fluidity of the membrane as evidence of platelet damage in preeclampsia. *Obst Gyn.* 81: 337-340.

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.

GONZÁLEZ, B. 2003. Progresión of chronic renal failure and oxidative stress. *Electron J Biomed.* 1: 5-11.

GRATACÓS, E.; CASALS, E.; DEULOFEU, R.; CARARACH, V.; ALONSO, P.; FORTUNY, A. 1998. Lipid peroxide and vitamin E patterns in women with different types of hipertensión in pregnancy. *Am J Obst Gyn.* 178: 1072-1076.

GULMEZOGLU, A.; HOFMEYR, G.; OOSTHUISEN, M. 1997. Antioxidants in the treatment of severe preeclampsia: an explanatory randomised controlled trial. *Brit J Obst Gyn.* 104: 689-96.

HALLIWELL, B. 1999. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutr. Rev.* 57: 104-113.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. 1995. The definition and measurement of antioxidants and biological systems. *Free Rad Biol Med.* 18: 125-129.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. 1999. "Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death". *Free Rad Biol Med.* 1: 247-350.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. 2000. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future. *N York Acad Sci.* 899: 136-147.

HARRINGTON, K.; COOPER, D.; LEES, C. 1996. Doppler ultrasound of the uterine arteries: The importance of bilateral notching in the prediction of preeclampsia, placental abruption or delivery of a small-for-gestational-age baby. *Ultrasound Obst Gyn.* 7:182-188.

HERMENEGILDO, C.; MEDINA, P.; PEIRO', M.; SEGARRA, G.; VILA, J.; ORTEGA, J.; LLUCH, S. 2002. Plasma Concentration of Asymmetric Dimethylarginine, an Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthase, Is Elevated in Hyperthyroid Patients. *J Clin Endoc Metab.* 87: 5636–5640.

HUBEL, C. 1999. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med.* 222: 222-235.

HUBEL, C.; ROBERTS, J.; TAYLOR, R. 1989. Lipid peroxidation in pregnancy: New Perspectives on preeclampsia. *Am J Obst Gyn.* 161: 1025-1034.

JAESCHKE, H. 1995. Mechanism of oxidant Stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med.* 209:104-111.

JERLICK, A.; PITT, A.; SCHAUR, R.;; SPICKETT, C. 2000. Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS. *Free Rad Biol Med.* 5: 673-682.

KAMATH, U.; RAO, G.; RAGHOTHAMA, C.; RAI, L.; RAO, P. 1998. Erythrocyte indicators of oxidative stress in gestational diabetes. *Acta Paediatric.* 87:676-679.

KATZ, A.; EPSTEIN, F. 1967. The role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the reabsorption of sodium by the kidney. *J Clin Inv.* 46:1999-2011.

KHARB, S. 2000. Altered Thiol Status in Preeclampsia. *Gyn Obst Inv.* 50: 36-38.

KHARB, S. 2000. Vitamin E and C in preeclampsia. *Eur J Obst Gyn Rep Biol.* 93: 37-39.

KHARB, S.; GULATI, N.; SINGH, V.; SINGH, G. 1998. Lipid peroxidation and vitamin E levels in preeclampsia. *Gyn Obst Inv.* 46:238-240.

KUMAR, C.; DAS, U. 2000. Lipid peroxides, anti-oxidants and nitric oxide in patients with preeclampsia and essential hypertension. *Med Sci Monit.* 6: 901-907.

LAIGAARD, J.; SORENSEN, T.; PLACING, S.; HOLCK, P.; FRÖHLICH, C.; WOJDEMANN, K.; SUNDBERG, K.; SHALMI, A.; TABOR, A.; NORGAARD-PEDERSEN, B.; OTTESEN, B.; CHRISTIANSEN, M.; WEWER, U. 2005. Reduction of the Disintegrin and Metalloprotease ADAM12 in Preeclampsia. *Obst Gyn.* 106: 144-149.

LEON, M.; TREITEL, A.; FERREIRA, R. 2002. Preeclampsia: Implicancia del estrés oxidativo. *Endoc Gin Rep.* 1: 7-17.

LINDHEIMER, M.; SIBAI, B. 2006. Antioxidant supplementation in preeclampsia. *Lancet.* 367: 1119-1120.

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 Rad Biol Med.* 37:557-570.

LORENTZEN, B.; HENRIKSEN, T. 1998. Plasma Lipids and vascular dysfunction in preeclampsia. *Sem Rep Endoc.* 16: 33-39.

LOWRY, O.; ROSENBERG, N.; FARR, A. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-269.

LYALL, F.; GREER, I. 1996. The vascular endothelium in normal pregnancy and preeclampsia. *Rep.* 1: 107-116.

MASSE, J.; FOREST, J.; MOUTQUIN, J.; MARCOUX, S.; BRIDEAU, N.; BELANGER, M. 1993. A prospective study of several potential biologic markers for early prediction of the development of preeclampsia. *Am J Obst Gyn.* 169: 501-508.

MAULIK, N.; DAS, D. 2002. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Rad Biol Med.* 33: 1047-1060.

MAYDATA, A. 2005. Estrés oxidativo en la gestación: ¿una nueva óptica en la atención a la embarazada?. *Rev Cub Obst Gin.* 1: 1-11.

MAYNARD, S.; MIN, J.; MERCHAN, J.; LIM, K.; LI, J.; MONDAL, S.; LIBERMANN, T.; MORGAN, J.; SELLKE, F.; STILLMAN, I.; EPSTEIN, F.; SUKHATME, V.; KARUMANCHI, S. 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial

dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Inv.* 111: 649-658.

MAYNARD, S.; VENKATESHA, S.; THADHANI, R.; KARUMANCHI, S. 2005. Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 and Endothelial Dysfunction in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Pediatric Research.* 5: 2.

MCGIFF, J.; QUILLEY, J. 2001. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids and blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypert.* 10: 231-237.

MEEKINS, J.; PIJNENBORG, R.; HANSSENS, M.; MCFADYEN, I.; VAN ASSHE, A. 1994. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe preeclamptic pregnancies. *Brit J Obst Gyn.* 101: 669-674.

MESSINA, R. 2004. Marcadores bioquímicos de estrés oxidativo en mujeres chilenas con preeclampsia. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.

MIKHAIL, M.; ANYAEGBUNAM, A.; GARFINKEL, D.; PALAN, P.; BASU, J.; ROMNEY, S. 1994. Preeclampsia ascorbic acid, alpha-tocopherol, and betacarotene in women with preeclampsia. *Am J Obst Gyn.* 171:150-157.

MORETTI, M.; PHILLIPS, M.; ABOUZEID, A.; CATANEO, R.; GREENBERG, J. 2004. Increased breath markers of oxidative stress in normal pregnancy and in preeclampsia. *Am J Obst Gyn.* 190: 1184-1190.

MORROW, J.; FREI, B.; LONGMIRE, A.; GAZIANO, J.; LYNCH, S.; SHYR, Y.; STRAUSS, W.; OATES, J.; ROBERTS, L. 1995. Increase in Circulating Products of Lipid Peroxidation (F₂-Isoprostanes) in Smokers — Smoking as a Cause of Oxidative Damage. *N Eng J Med.* 18: 1198-1203.

MYATT, L.; CUI, X. 2004. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 122:369-382.

MYERS, J.; BAKER, P. 2002. Hypertensive diseases and eclampsia. *Obst Gyn.* 14:119-125.

NEBOT, C.; MOUTET, M.; HUET, P. 1993. Spectrophotometric assay of superoxide dismutase based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Analyt Biochem.* 214: 442–451.

NOVA, A.; SIBAI, B.; BARTON, J.; MERCER, B.; MITCHELL, M. 1991. Maternal plasma level of endothelin is increased in preeclampsia. *Am J Obst Gyn.* 165:724-727.

NORTH, R.; FERRIER, C.; LONG, D. 1994. Uterine artery Doppler flow velocity waveforms in the second trimester for the prediction of preeclampsia and fetal growth retardation. *Obst Gyn.* 83: 378-386.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. 1979. Essay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analyt Biochem.* 95: 351-358.

OLSEN, S.; SECHER, N.; TABOR, A.; WEBER, T.; WALKER, J.; GLUUD, C. 2000. Randomised clinical trial of fish oil supplementation in high risk pregnancies. *Brit J Obst Gyn.* 107: 382-395.

ORHAN, H.; ONDEROGLU, L.; YUCEL, A.; SAHIN, G. 2003. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gyn Obst.* 267: 189-195.

PALAN, P.; SHABAN, D.; MARTINO, T.; MIKHAIL, M. 2004. Lipid-soluble antioxidant and pregnancy: maternal serum levels of coenzyme Q(10), alpha-tocopherol and gamma-tocopherol in preeclampsia and normal pregnancy. *Gyn Obst Inv.* 58: 8-13.

PARRA, M.; RODRIGO, R.; BARJA, P.; BOSCO, C.; FERNÁNDEZ, V.; MUÑOZ, H.; SOTO-CHACÓN, E. 2005. Screening test for preeclampsia through assessment of uteroplacental blood flow and biochemical markers of oxidative stress and endothelial dysfunction. *Am J Obst Gyn.* 4: 1486-1491.

PATRICK, F.; CHIEN, W.; ARNOTT, N.; GORDON, A. 2000. How useful is uterine artery Doppler flow velocimetry in the prediction of preeclampsia, intrauterine growth retardation and perinatal death? An overview. *Brit J Obst Gyn.* 107:196-208.

POLYZOS, N.; MAURI, D.; TSAPPI, M.; TZIORAS, S.; KAMPOSORAS, K.; CORTINOVIS, I.; CASAZZA, G. 2007. Combined

Vitamin C and E Supplementation During Pregnancy For Preeclampsia Prevention: A Systematic Review. *Obst Gyn Surv.* 3: 202-206.

POSTON, L.; BRILEY, A.; SEED, P.; KELLY, F.; SHENNAN, A. 2006. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for preeclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 357: 1145-1154.

PRADELLES, P.; GRASSI, J.; MACLOUF, J. 1985. Enzyme immunoassay of eicosanoids using AchE as label. An alternative to radioimmunoassay. *Analyt Chem.* 57: 1170-1173.

PRIDJIAN, G.; PUSCHETT, J. 2002. Preeclampsia. Part 1: Clinical and Pathophysiologic Considerations. *Obst Gyn Surv.* 9: 598-618.

RANGON, V.; BULKLEY, G. 1993. Prospects for treatment of free radicals-mediated tissue injury. *Brit Med Bullet.* 49: 700-718.

REINGARDIENE, D. 2003. Preeclampsia and eclampsia. *Medicina (Kaunas).* 39: 1244-1252.

REYNA, E.; PRIETO, M.; TORRES, M. 2002. Peroxidación lipídica en embarazos con preeclampsia y diabetes. *Rev Obst Gin Ven.* 2: 93-96.

RIOS, M. 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Química Viva.* 1: 2.

ROBERTS, J. 1998. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Sem Rep Endoc.* 16: 5-15.

ROBERTS, J.; COOPER, D. 2001. Pathogenesis and genetics of preeclampsia. *Lancet.* 357: 53-56.

ROBERTS, J.; LAIN, K. 2002. Recent Insights into the pathogenesis of preeclampsia. *Placenta.* 23: 359-372.

ROBERTS, J.; PEARSON, G.; CUTLER, J.; LINDHEIMER, M. 2003. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypert.* 41: 437-445.

ROBILLARD, P.; HULSEY, T.; PERIANIN, J.; JANKY, E.; MIRI, E.; PAPIERNIK, E. 1994. Association of pregnancy-inducer hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet*. 344: 973-975.

ROCHE E. 1994. Estrés oxidativo y degradación de proteínas. *Med Clin*. 103:189-196.

RODRIGO, R.; RIVERA, G. 2003. Papel del estrés oxidativo y de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles. Monografía Universidad de Chile. 1: 1-11.

RODRÍGUEZ, P.; BAEZ, A.; DOMÍNGUEZ, J. 2001. Uso de la aspirina en la prevención de la preeclampsia. *Rev Cub Med Gen Int*. 5: 441-445.

ROES, E.; SWEEP, C.; THOMAS, C.; ZUSTERZEEL, P.; GEURTS-MOESPOT, A.; PETERS, W.; STEEGERS, E. 2002. Level of plasminogen activators and their inhibitors in maternal and umbilical cord plasma in severe preeclampsia. *Am J Obst Gyn*. 187: 1019-1025.

RUMBOLD, A.; CROWTHER, C.; HASLAM, R. 2006. ACTS Study Group. Vitamins C and E and the risks of preeclampsia and perinatal complications. *N Eng J Med*. 354: 1796–1806.

SAGOL, S.; OZKINAY, E.; OZSENER, S. 1999. Impaired antioxidant activity in women with preeclampsia. *Int J Gyn Obst* 64: 121-127.

SAGOL, S.; ÖZKINAY, E.; ÖZTEKIN, K. 1999. The comparison of uterine artery Doppler velocimetry with the histopathology of the placental bed. *Aust N Z J Obst Gyn*. 39: 324-329.

SAVVIDOU, M.; HINGORANI, A.; TSIKAS, D.; FROLICH, J.; VALLANCE, P.; NICOLAIDES, K. 2003. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop preeclampsia. *Lancet*. 361: 1511-1517.

SENIOR, S. 2001. Possible molecular explanation for preeclampsia. *Lancet*. 357: 1857.

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 Gyn Obst*. 268: 19-

25.

SERRANO, N.; PÁEZ, M.; MARTÍNEZ, M.; CASAS, J.; GIL, L.; NAVARRO, A. 2002. Bases genéticas y moleculares de la preeclampsia. *Medunab.* 5: 185-194.

SIBAI, B. 1998. Prevention of preeclampsia: A big disappointment. *Am J Obst Gyn.* 179:1275-1278.

SIKKEMA, J.; VAN RIJN, B.; FRANX, A.; BRUINSE, H.; DE ROOS, R.; STROES, E.; VAN FAASSEN, E. 2001. Placental superoxide is increased in preeclampsia. *Placenta.* 22:304-308.

SOLOMON, C.; SEELY, E. 2004. Preeclampsia — Searching for the Cause. *New Engl J Med.* 7: 641-642.

SPINNATO, J.; FREIRE, S.; PINTO, J.; SERGIO, M.; KOCH, M.; GOCO, N.; DE BARROS, C.; CECATTI, J.; COSTA, R.; RAMOS, J.; MOSS, N.; SIBAI, B. 2007. Antioxidant Therapy to Prevent Preeclampsia: A Randomized Controlled Trial. *Obst Gyn.* 110: 1311-1318.

STEINERT, J.; WYATT A.; POSTON, L.; JACOB, R.; MANN, G. 2002. Preeclampsia is associated with altered C+ regulation and NO production in human fetal venous endothelial cells. *FASEB J.* 16: 721-3.

STOCKER, R.; FREI, B. 1991. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. *Ox Stress Ox Ant.* 1: 213-243.

STRATTA, P.; CANAVESE, C.; PORTU, M.; DOGLIANI, M.; TODROS, T.; GARBO, E.; BELLIARDO, F.; MAINA, A.; MAROZIO, L.; ZONCA, M. 1994. Vitamin E supplementation in preeclampsia. *Gyn Obst Inv.* 37: 246-249.

TAYLOR, D.; GHIO, A.; PIANTADOSI, C. 1995. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys.* 316: 70-76.

URQUIAGA, I.; URZÚA, U.; LEIGHTON, F. 1999. Antioxidantes Naturales. Impacto en la Salud. 8° Cong Lat Gra Ac. 1: 3.

VAIMAN, D.; MONDON, F.; GARCES-DURAN, A.; MIGNOT, T.; ROBERT, B.; REBOURCET, R.; JAMMES, H.; CHELBI, S.; QUETIN, F.; MARCEAU, G.; SAPIN, V.; PIUMI, F.; DANAN, J.; RIGOURD, V.; CARBONNE, B.; FERRE, F. 2005. Hypoxia-activated genes from early placenta are elevated in Preeclampsia, but not in Intra-Uterine Growth Retardation. *BMC Genomics*. 6: 111.

VALDÉS, G. 2005. Adaptaciones Vasoactivas en la Gestación Normal y Patológica. *Boletín de la Escuela de Medicina de la Universidad Católica de Chile*. 2: 21-25.

VAN DE WOUWER, M.; COLLEN, D.; CONWAY, A. 2004. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24:1374-1383.

VAUGHAN, J.; WALSH, S. 2002. Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. *Hypert Preg*. 21:205-223.

VENEREO, J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil*. 2: 126-133.

VERHAAR, M.; RABELINK, T. 2001. The endothelium: a gynecological and obstetric point of view. *Eur J Obst Gyn Rep Biol*. 94: 180-185.

VILLAR, M.; SIBAI, B. 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 Obst Gyn*. 160: 419-423.

WALLENBURG, H. 2001. Prevention of pre-eclampsia: status and perspectives 2000. *Eur J Obst Gyn Rep Biol*. 94: 13-22.

WALSH, S. 1994. Lipid peroxidation in pregnancy. *Hypert Preg* 13:1-31.

WALSH, S.; VAUGHAN, J.; WANG, Y.; ROBERTS, L. 2000 Placental isoprostane is significantly increased in Preeclampsia. *FASEB J*. 14:1289-1296.

WANG, Y.; WALSH, S. 1998. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in preeclampsia. *Placenta*. 8: 581-586.

WANG, Y.; WALSH, S. 2001. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta*. 22: 206-212.

WEATHERBURN, M. 1967. "Diagnósticos clínicos". *CENTIS*. 39: 971.

WILSON, M.; GOODWIN, T.; PAN, V.; INGLES, S. 2003. Molecular epidemiology of preeclampsia. *Obst Gyn Surv*. 58: 39-66.

WRITER, D. 1994. *Hypertensive Disorders in Obstetric Anesthesia, Principles and Practice*. Chestnut. 1: 847.

YANIK, F.; AMANVERMEZ, R.; YANIK, A.; CELIK, C.; KOKCU, A. 1999. Preeclampsia associated with increased lipid peroxidation and decreased serum vitamin E levels. *Int J Gyn Obst*. 1: 27-33.

YURA, T.; FUKUNAGA, M.; KHAN, R.; NASSAR, G.; BADR, K.; MONTERO, A. 1999. Free-radical-generated F2-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int*. 56: 471-478.

ZHANG, C.; LUTHY, D.; KING, I. 2001. Maternal plasma ascorbic acid concentrations in relation to risk of preeclampsia. *Am J Obst Gyn*. 184: S76.

ZHANG, C.; WILLIAMS, M.; KING, I. 2002. Vitamin C and the risk of preeclampsia. Results from dietary questionnaire and plasma assay. *Epidemiology*. 13: 409-416.

ZHOU, Y.; DAMSKY, C.; CHIU, K.; ROBERTS, J.; FISHER, S. 1993. Preeclampsia Is Associated with Abnormal Expression of Adhesion Molecules by Invasive Cytotrophoblasts. *J Clin Inv*. 91: 950-960.

ZUSTERZEEL, P.; RUTTEN, H.; ROELOFS, H.; PETERS, W.; STEEGERS, E. 2001. Protein carbonyls in decidua and placenta of preeclamptic women as markers for oxidative stress. *Placenta*. 22: 213-219.