

# Efecto de la apocinina

## sobre las alteraciones renales inducidas durante la preeclampsia experimental en rata

*Effect of apocynin on renal alterations induced during experimental preeclampsia in the rat*

Camacho Elsa e Israel Anita

Laboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas - Venezuela.

Recibido: 20/10/2013

Aceptado: 21/11/2013

### Resumen

La preeclampsia (PE) es un trastorno multisistémico del embarazo caracterizado por hipertensión, proteinuria y edema, que se asocia con la disfunción endotelial generalizada y el estrés oxidativo. En el embarazo normal, los mecanismos de vasodilatación sugieren que el óxido nítrico (NO) es el más importante mediador en la reducción de la resistencia vascular, mientras que en la PE la respuesta dilatadora dependiente de endotelio y mediada por el NO se encuentra reducida. Se ha demostrado que la inhibición de la síntesis del NO mediante la administración crónica de L-NAME en ratas preñadas, resulta en un modelo animal que ocasiona un síndrome similar a la PE, el cual cursa con hipertensión, insuficiencia renal, proteinuria, incremento de la producción anión superóxido y una reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes renales como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPX). Debido al papel preponderante del estrés oxidativo en la PE, en el presente estudio evaluamos si la inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno mediante el uso de un agente desacoplante de la NAD(P)H oxidasa como lo es la apocinina, podría revertir los signos de PE experimental en ratas. Para ello, se determinó el efecto de la apocinina sobre el número y el peso de los fetos, la presión arterial media, la proteinuria, la excreción urinaria de sodio y potasio y la ac-

tividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPx de la corteza renal, en un modelo experimental de preeclampsia inducido por el tratamiento con L-NAME en ratas de 13 días de gestación. El tratamiento crónico con L-NAME en ratas preñadas incrementó la PAM (+20 mmHg), produjo proteinuria, redujo el peso promedio de los fetos, sin embargo no alteró significativamente el número de ellos. La inhibición de la sintasa del óxido nítrico en las ratas preñadas redujo la actividad de las tres enzimas antioxidantes evaluadas. El tratamiento crónico con apocinina, revirtió el incremento de la presión arterial, la proteinuria, la reducción del volumen urinario y de la excreción urinaria de sodio y potasio, así como la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por el L-NAME en ratas preñadas. Estos hallazgos sugieren que la PE experimental cursa con alteración de la función renal asociada a la reducción de la actividad antioxidante. Igualmente indican que estas acciones están mediadas por un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno, por lo que el uso terapéutico de los antioxidantes como estrategia farmacológica en la preeclampsia parece ser prometedor.

**Palabras clave:** preeclampsia, apocinina, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa

### Abstract

Preeclampsia (PE) is a multisystem disorder of pregnancy characterized by hypertension, proteinuria and edema. PE is associated with endothelial dysfunction, oxidative stress and decreased endothelial nitric oxide synthase activity. The mechanisms of normal pregnancy-associated vasodilatation suggest that nitric oxide (NO) is the most important mediator for the reduction of vascular resistance. Many studies demonstrated reduction of endothelium-dependent dilator response mediated by NO in PE. It has been shown that the inhibition of NO synthesis by chronic administration of L-NAME to pregnant rats results in an animal model which causes a PE-

like syndrome, which is associated with hypertension, renal failure, proteinuria, increased superoxide anion production and a reduction of the kidney activity of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX). Due to the important role of oxidative stress in the PE, in this study we evaluated whether inhibition of the production of reactive oxygen species uncoupling NAD(P)H oxidase with apocynin, could prevent signs of experimental PE in rats. For this purpose, we determined the effect of apocynin on the number and the weight of the fetuses, mean blood pressure, proteinuria, urinary excretion

of sodium and potassium and the activity of the renal cortex enzymes CAT, SOD and GPx, in an experimental model of preeclampsia induced by treatment with L-NAME in rats of 13 days of gestation. Chronic treatment with L-NAME in pregnant rats increased MAP (+20 mmHg), produced proteinuria and reduced the weight of the fetuses. The inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats reduced the activity of the three antioxidant enzymes evaluated. Chronic treatment with apocynin, prevented the increase in blood pressure, proteinuria, volume reduction and decreased urinary excretion of sodium and potassium as well as the reduction of antioxidant enzyme activity induced by L-NAME in pregnant rats. These findings suggest that impaired renal function observed in the experimental PE is associated with the reduction of antioxidant activity which is prevented by apocynin treatment. Also indicate that these actions are mediated by increased production of reactive oxygen species, in consequence the therapeutic use of antioxidants as pharmacological strategy to prevent preeclampsia seems promising.

**Key words:** preeclampsia, apocynin, catalase, superoxide dismutase, glutathion peroxidase.

## Introducción

En la actualidad se desconoce con exactitud la etiología de la preeclampsia (PE), pero la evidencia de los últimos años apunta hacia nuevos mecanismos potenciales que posiblemente media la patogénesis de la hipertensión durante la PE. Aún cuando se han implicado factores genéticos, inmunológicos y ambientales, el enfoque reciente establece una clara relación entre la disfunción endotelial y la hipertensión inducida por el embarazo (Roberts y col., 2003; Granger y col., 2001). Se ha propuesto que el proceso fisiopatológico que subyace en la PE ocurre en dos estadios: el primero la reducción de la perfusión de la placenta y el segundo en los síndromes clínicos maternos (Roberts y col., 2003; Roberts y col., 2005). La isquemia/hipoxia de la placenta, a su vez, resulta en la liberación de una variedad de factores que ejercen efectos profundos sobre el flujo sanguíneo y la regulación de la presión arterial (Roberts y col., 2003; Roberts y col., 2005; Granger y col., 2001; Granger y col., 2002). Estos factores incluyen la liberación de un conjunto de moléculas como el receptor-1 soluble de VEGF (sFlt-1), el auto-anticuerpo del receptor AT<sub>1</sub> de la angiotensina (AT1-AA) y citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) el cual, a su vez, genera una disfunción endotelial generalizada en la madre (Roberts y col., 2003; Granger y col., 2002). Esta disfunción se manifiesta a través del incremento en la formación de factores circulantes como la endotelina, las especies reactivas de oxígeno (EROs), el tromboxano, el ácido 20-hidroxi-eicosatetraenóico (20-HETE), y un aumento de la sensibilidad vascular a la angiotensina II (ANG II) (Roberts y col., 2003; Granger y col., 2002). Más aún, la PE se asocia con una reducción de la formación de vasodilatadores como el óxido nítrico y la prostaciclina (Roberts y col., 2003; Granger y col., 2002). Todas estas alteraciones vasculares no solo llevan a

la hipertensión, sino a la disfunción de múltiples órganos, entre ellos el riñón (Roberts y col., 2003, Roberts y col., 2005, Granger y col., 2002).

El óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador liberado por las células endoteliales, inhibe la agregación plaquetaria y la adhesión al endotelio y, está involucrado en el control de la presión arterial (Lyll y Greer 1996). El NO es producido en la circulación fetoplacentaria, contribuyendo al control del tono vascular y atenuando las acciones de los vasoconstrictores (Myatt y col., 1992; Lyll y Greer, 1996). La NO sintasa de la vasculatura vellosa placentaria corresponde a la isoforma endotelial tipo III dependiente calcio-calmodulina (Myatt y col., 1992), y está presente en las venas y arterias umbilicales, arterias y venas coriónicas, y en el sinciociotrofoblasto. Debido a la fuerte evidencia que indica el papel primordial del NO y su desregulación en la PE, caracterizamos un modelo experimental que resulta de la inhibición crónica de la síntesis de NO mediante la administración de L-NAME a ratas preñadas (Camacho y col., 2011). En este modelo de PE, las ratas preñadas tratadas con L-NAME desarrollan hipertensión de manera dependiente de la dosis, así como potenciación de las respuestas presoras a la ANG II, la vasopresina y la noradrenalina (Molnar y Hertelendy, 1992), proteinuria y un incremento de la agregación plaquetaria, similar a los cambios que ocurren en la PE humana. También ocurre disfunción renal, vasoconstricción de las arterias renales, y una disminución en la tasa de filtración glomerular (TFG), alteraciones en la placenta, y trombosis intravascular, todos estos signos similares a la PE desarrollada en humanos (Pandhi y col., 2001).

Aún cuando se conoce parcialmente las generalidades acerca de este modelo experimental de PE, es elusiva la contribución relativa del estrés oxidativo y de la actividad de las enzimas antioxidantes renales en la PE inducida por inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico en ratas preñadas. Al respecto, se ha demostrado en células musculares lisas, en trofoblastos y placentas, que tanto la ANG II como los anticuerpos anti-AT<sub>1</sub> (AT1-AA) proveniente de la sangre de madres preeclámpticas fueron capaces de incrementar la producción de EROs, los componentes de la NAD(P)H oxidasa, p22, p47 y p67 y la activación de la NF- $\kappa$ B. Estos efectos fueron bloqueados por el losartán, un bloqueante del receptor AT<sub>1</sub>, por el difenil-eneiodonio (DPI) un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa y por la administración de un mimético de la SOD (Dechend y col., 2003), lo que sugiere la participación del sistema angiotensinergico y la producción de especies reactivas de oxígeno en la PE. Si ello es así, nos planteamos la posibilidad que la apocinina, un desacoplante de la NAD(P)H oxidasa, podría prevenir los efectos deletéreos observados en la preeclampsia experimental en rata.

**Animales y protocolos de experimentación**

como animales de experimentación se utilizaron ratas hembras primigestas, de la cepa Sprague-Dawley, de 12-13 semanas de edad, provenientes del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental de la UCV (Caracas), mantenidas bajo libre acceso al agua y a la comida (Ratarina<sup>®</sup>) hasta el momento del experimento. Después del apareamiento, la presencia del espermatozoide en el frotis vaginal marca el día 1 de la gestación. A partir del día 13 de la gestación, los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos. Los animales del grupo I recibieron una dosis de 50 mg/kg/día de N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina (L-NAME) administrada por vía intraperitoneal, durante 7 días. El grupo II recibió solo vehículo (solución fisiológica). El grupo III recibió apocinina (33 µg/Kg/día, i.p.) durante 7 días y el grupo IV recibió el tratamiento combinado de L-NAME+ apocinina durante 7 días. Todos los animales fueron pesados dos veces a la semana y se les determinó la presión arterial sistólica, diastólica y frecuencia cardiaca.

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

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

**Determinación de la presión arterial (pa) y de la frecuencia cardiaca (FC)**

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

**Cuantificación de la excreción urinaria de proteínas**

Se empleó el método colorimétrico basado en el método de Biuret, en el cual se determina la cantidad de proteínas presentes en la orina mediante la formación de un quelato coloreado, donde ocurre una reacción entre los iones cúprico y los enlaces peptídicos. El método se fundamenta en la

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

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

La actividad de la catalasa fue determinada empleando una modificación del método de Aebi (1984), que se basa en la disminución de la absorbancia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a su degradación enzimática y monitoreada a una longitud de onda de 240 nm, a 25°C. Brevemente, en una celda de cuarzo se colocaron 25 µL de homogenizado del tejido diluido 1.33 en amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 7,0), se adicionaron 725 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7,7 mM e inmediatamente se midió el cambio de absorbancia a 240 nm, a los 15 y 30 segundos. De acuerdo a Aebi, se utiliza la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula:  $k = (1/t) (2,3 \times \log A_1 / A_2)$ , donde t es el intervalo de tiempo medido (seg), A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> son las absorbancias del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tiempos t<sub>1</sub> y t<sub>2</sub>. Los resultados se expresaron como k/mg de proteína.

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

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

**Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)**

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

**Determinación las proteínas tisulares**

Las proteínas tisulares totales fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951) utilizando albúmina sérica de bovino como patrón. Los resultados fueron expresados como mg de proteínas/10 ml.

## Determinación del volumen urinario y de la excreción urinaria de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>

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

### Análisis estadístico

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

## Resultados

### Efecto de la apocinina sobre la morfometría fetal

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

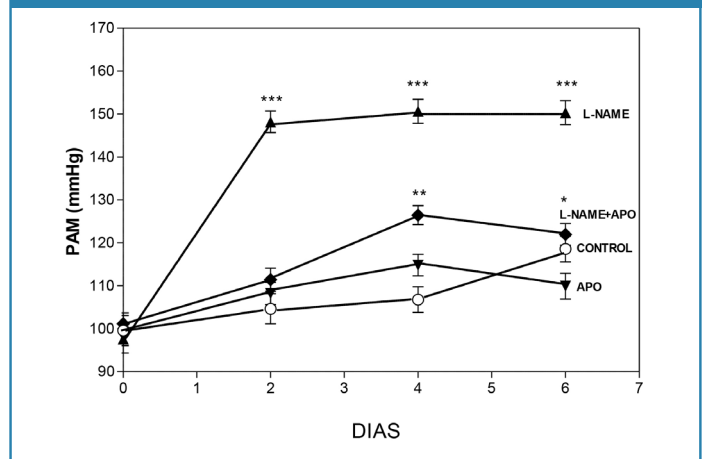
Efecto de la apocinina sobre los cambios en la presión arterial media y en la excreción urinaria de proteínas en ratas preñadas tratadas con L-NAME.

El tratamiento a ratas preñadas con L-NAME durante 7 días consecutivos, incrementó la presión arterial media cuando se compara con las ratas preñadas controles. Los valores promedio de la PAM fueron: ratas preñadas controles:  $107,41 \pm 3,2$  mmHg vs. L-NAME:  $149,7 \pm 3$  mmHg ( $p < 0,001$ ). El tratamiento de las ratas preñadas con apocinina ( $33 \mu\text{g/Kg/día}$ ), por sí mismo no alteró el curso temporal de la presión arterial media; sin embargo, previno parcialmente el incremento de la PAM inducida por la inhibición de la síntesis del óxido nítrico en las ratas preñadas (figura 1).

Por otra parte, al cuantificar el efecto de la apocinina sobre el incremento de las proteínas totales excretadas en orina durante 24 horas en ratas preñadas tratadas con L-NAME, se observó que el tratamiento con L-NAME produjo un incremento significativo de las proteínas totales urinarias y el tratamiento con apocinina no afectó los niveles basales de excreción urinaria de proteínas, pero previno el incremento de la excreción urinaria de proteínas inducido por el L-NAME (figura 2).

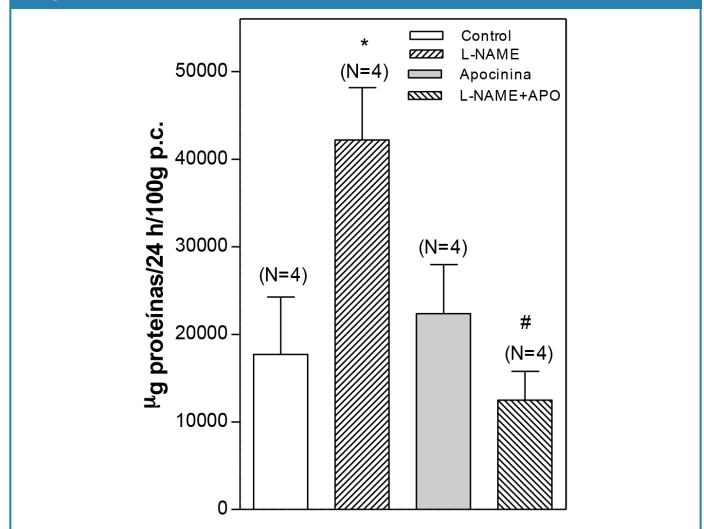
Efecto de la apocinina sobre el volumen urinario, y la excreción urinaria de sodio y potasio en ratas preñadas tratadas con L-NAME

Figura 1



Curso temporal del efecto de la apocinina sobre el incremento de la presión arterial inducido por el L-NAME en ratas preñadas. (□) Grupo Control (NaCl 0,9% i.p.), (▣) Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 50 mg/Kg/día, (▤) Apocinina: 33  $\mu\text{g/Kg/día}$  y (▥) L-NAME+APO. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de N= 4 por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con ratas control, APO y L-NAME+APO; \*\* $p < 0,01$  comparado con ratas tratadas con APO y \* $p < 0,05$  comparado con ratas tratadas con APO.

Figura 2

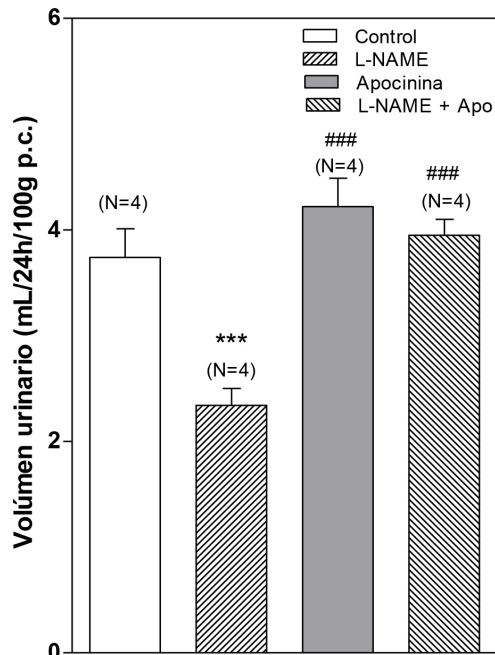


Efecto de la apocinina sobre la excreción urinaria de proteínas en ratas con preclampsia experimental. Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME (50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días) y apocinina (33  $\mu\text{g/Kg/día}$ ). Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con ratas preñadas control. # $p < 0,05$  comparado con ratas preñadas tratadas con L-NAME.

En la figura 3, se muestra el efecto de la apocinina, 33  $\mu\text{g/Kg/día}$  durante 7 días consecutivos, sobre el volumen urinario en ratas preñadas controles y tratadas durante 7 días con L-NAME. Como se observa, el tratamiento con L-NAME redujo significativamente el volumen urinario y el tratamiento con apocinina revirtió el efecto reductor del volumen urinario inducido por L-NAME.

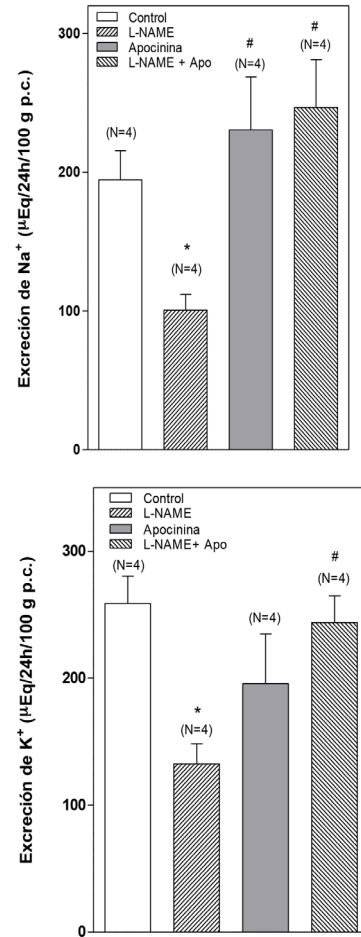
En relación a la excreción de electrolitos, el tratamiento con L-NAME redujo significativamente la excreción urinaria de sodio y potasio. La apocinina no alteró la excreción urinaria de sodio y potasio basal, pero logró prevenir la reducción de la excreción urinaria de sodio y potasio inducida por el L-NAME (figura 4).

Figura 3



Efecto de la apocinina sobre el volumen urinario en ratas con preeclampsia inducida por el tratamiento con L-NAME. Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME (50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días y apocinina 33 µg/Kg/día. Los valores representan la media ± EEM. \*\*\*p<0,001 comparado con el grupo control. ###p<0,001 comparado con el grupo tratado con L-NAME.

Figura 4



Efecto de la apocinina sobre la excreción urinaria de sodio y potasio en ratas con preeclampsia inducida por el tratamiento con L-NAME. Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME (50 mg/Kg/día i.p.), durante 7 días, apocinina (33 µg/Kg/día). Los valores representan la media ± EEM. \*p<0,05 comparado con ratas preñadas control. #p<0,05 comparado con ratas preñadas tratadas con L-NAME.

Figura 5

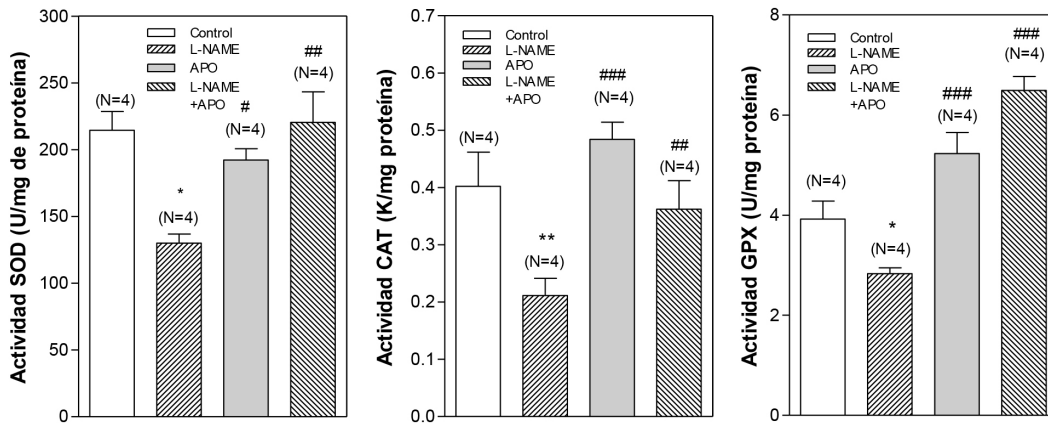


FIGURA 5. Efecto de la apocinina sobre la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) renales en ratas con preeclampsia inducida por el tratamiento con L-NAME. Control (NaCl 0.9% i.p.) y L-NAME (50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días, apocinina (33 µg/Kg/día). Los valores representan la media ± EEM. \*p<0,05 comparado con ratas preñadas control. \*\*p<0,01 comparado con ratas preñadas control. ###p<0,001 comparado con ratas preñadas tratadas con L-NAME. ##p<0,01 comparado con ratas preñadas tratadas con L-NAME. #p<0,05 comparado con ratas preñadas tratadas con L-NAME.

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

En la figura 5, se muestra el efecto de la administración de la apocinina a la dosis de 33 µg/Kg/día sobre la actividad de las enzimas antioxidantes del tejido cortical renal de ratas

preñadas controles y ratas preñadas tratadas con L-NAME. El tratamiento con L-NAME en las ratas preñadas induce a una reducción significativa de la actividad renal de las tres enzimas antioxidantes, catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. El tratamiento con apocinina previno la reducción de la actividad de las tres enzimas antioxidantes inducida por el tratamiento con L-NAME.

**TABLA I. Morfometría Fetal durante el tratamiento con apocinina**

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

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

## Discusión

Los resultados del presente trabajo están en concordancia con la evidencia acerca de un modelo experimental de PE que resulta de la inhibición crónica de la síntesis de NO mediante la administración de L-NAME a ratas preñadas y ratifican el papel primordial del NO y su desregulación en la PE (Camacho y col., 2011; Camacho e Israel, 2011). En efecto, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con L-NAME en las ratas preñadas disminuyó el peso y el crecimiento fetal, e incrementó la reabsorción fetal en forma significativa, signos que probablemente son debidos a la vasoconstricción y a la isquemia de la unidad feto-placentaria descrita en la preeclampsia. De manera que, los signos observados en este modelo por la inhibición de la producción de óxido nítrico en las ratas preñadas podría apoyar aún más su similitud a la preeclampsia desarrollada en humanos (Pandhi y col., 2001).

Se ha demostrado que en el embarazo con PE ocurre una disminución significativa de la protección antioxidante, siendo muchas las causas que podrían estar involucradas en el incremento del estrés oxidativo en la preeclampsia. Se ha postulado que el incremento del estrés oxidativo y la producción de anión superóxido en la preeclampsia (Biri y col., 2007) se asocia a una temprana placentación anormal con isquemia placentaria e hipoxia (Gilbert y col., 2008), a la presencia de anticuerpos anti-receptores AT<sub>1</sub> de ANG II (Xia y col., 2003), a alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos asociadas a la resistencia a la insulina con sobrepeso y obesidad (Joffe y col., 1998) y a la presencia de infecciones subclínicas en la vagina, el sistema urinario y la enfermedad periodontal (Herrera y col., 2007). Todas estas alteraciones conducen a una reacción inflamatoria intravascular generalizada y un estado de estrés oxidativo que produce disfunción endotelial que predispone a la mujer embarazada a desarrollar PE (Herrera y col., 2001). En estudios de la placenta de mujeres con PE comparada con la placenta normal, se demostró que las primeras presentaron un aumento de la peroxidación de lípidos mitocondriales y de la generación del anión superóxido,

lo que podría contribuir y formar parte importante como fuente de estrés oxidativo en la placenta (Wang y Walsh, 2001; Wang y Walsh, 1998). Debido a este desbalance oxidativo de origen placentario, se ha postulado que la hipoperfusión sanguínea mediada por la ANG II, la vasoconstricción sistémica y el estrés oxidativo placentario, son factores responsables de la disfunción endotelial vascular renal, y que contribuye con el desarrollo de la PE (Shah, 2005).

La PE se asocia con alteraciones funcionales a nivel renal que incluyen disminución del flujo plasmático renal (FPR) como consecuencia del incremento de la resistencia arteriolar aferente y/o reducción en el coeficiente de ultrafiltración. Esta reducción en el FPR, permite una disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG), y contribuye a la disminución del volumen plasmático, lo cual favorece a un incremento en la reabsorción tubular proximal acoplada al sodio. Todo ello lleva al incremento de la excreción de proteínas urinarias en preeclampsia, la cual resulta de alteración secundaria del tamaño y/o selectividad de la carga en el filtrado glomerular, que posiblemente incrementa la presión capilar, y con ello compromete la reabsorción tubular, generando proteinuria aún en rango nefrótico (Moran y col., 2003; Jeyabalan y Conrad, 2007). Nuestros resultados revelan la presencia de disfunción renal en la PE experimental inducida por la inhibición de la síntesis de NO ya que se observó que la administración crónica de L-NAME durante 7 días consecutivos, genera una prominente excreción urinaria de proteínas totales, asociada a una reducción significativa del volumen urinario y de la excreción urinaria de sodio y potasio.

Uno de los factores que podrían influir en el daño renal en la preeclampsia, es el estrés oxidativo local que resultaría, entre otras causas, por la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes renales. Nuestros resultados apuntan a esa dirección ya que la inhibición de la síntesis de NO que genera un modelo de PE experimental con endoteliosis glomerular (Camacho y col., 2011), estuvo asociada a la dismi-

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

La inactivación de las enzimas antioxidantes por las EROs o por la especies reactivas de nitrógeno como el peroxinitrito, puede deberse a la oxidación o a la nitración de residuos específicos que forman parte del centro catalítico de la enzima. Por ejemplo, la GPx contiene un aminoácido raro, la selenocisteína (Sec45), el cual es esencial para la actividad de la enzima y es más reactiva que los grupos tiol. En este contexto, se ha propuesto que la inactivación de la GPx por el peroxinitrito se debe a la modificación de la Sec45, la cual puede ocurrir a través de 2 vías: la nitración del selenio o bien la formación de un puente Se-S, entre la Sec45 y la Cys95, lo que daría como consecuencia la inactivación de la enzima (Asahi y col., 1997). Por otro lado, se ha observado que la inactivación de la SOD por peroxinitrito puede ocurrir a nivel de los residuos de tirosina independientes del sitio activo de la enzima. La modificación de los residuos de tirosina, incluye no solo la nitración de residuos críticos para la actividad catalítica, sino también la oxidación y la subsiguiente formación de residuos de ditirosina (McMillan-Crow y Thompson, 1999).

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

Ahora bien, si el incremento temprano del estrés oxidativo placentario, que cursa antes del inicio de los síntomas maternos, juega un papel fundamental en la disfunción endotelial generalizada y el daño renal, nos planteamos que el tratamiento temprano con antioxidantes o con inhibidores de la NAD(P)H oxidasa podría interrumpir el proceso de este síndrome. Nuestros resultados apoyan ésta posibilidad ya que demuestran que el tratamiento crónico con un compuesto que mimetiza a la SOD, el tempol (Camacho e Israel, 2011), o con un desacoplante del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa como la apocinina (presentes resultados), fueron capaces de reducir significativamente las alteraciones funcionales inducidas por el L-NAME. En efecto, estos compuestos fueron capaces de prevenir tanto las alteraciones de la morfometría fetal observadas (Camacho e Israel, 2011; presentes resultados) en este modelo experimental, así como la hipertensión y la proteinuria promovida por la inhibición de la síntesis de NO. Aún más, la inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno inducida por el L-NAME en ratas preñadas previno la reducción del volumen urinario y de la excreción urinaria de sodio y potasio presente en la PE experimental.

Lo más interesante de nuestros hallazgos es que el tempol (Camacho e Israel, 2011) y la apocinina fueron capaces de prevenir la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal inducida por el bloqueo de la óxido nítrico sintasa. El hecho que un reductor de los niveles del anión superóxido y un desacoplante de la enzima productora de dicho anión fueron capaces de prevenir los signos característicos de la preeclampsia experimental ratifican el papel determinante del estrés oxidativo en las manifestaciones disfuncionales generales y renales en este modelo experimental de la PE.

Aun cuando en el presente estudio no evaluamos el agonista responsable de la estimulación de la NAD(P)H oxidasa durante la PE y el posible mecanismo de acción de la prevención por apocinina, existe evidencia en la literatura de la posible mediación de la ANG II y/o del anticuerpo anti-receptor  $AT_1$  ( $AT_1$ -AA) en la fisiopatología de la PE (Dechend y col., 2003). Por lo tanto, aún cuando no pudimos determinar en el presente estudio la posible presencia de  $AT_1$ -AA en el plasma de las ratas preñadas tratadas con L-NAME, podríamos inferir que el efecto de la apocinina observado se podría deber a la interferencia del efecto de este anti-anticuerpo en la activación de la NAD(P)H oxidasa a través de la activación receptor  $AT_1$ . Queda por determinar en experimentos futuros la veracidad de esta aseveración.

En apoyo a nuestros hallazgos se encuentran los descritos por Hoffmann y col. (2008), quienes demostraron que el tempol es capaz de prevenir la hipertensión, la proteinuria y la función feto-placentaria en un modelo de preeclampsia en ratón, el BPH/5, el cual desarrolla de forma espontánea las características clínicas de la preeclampsia humana. Esto sugiere que la producción de especies reactivas de oxígeno

parece ejercer un efecto causal importante en la disfunción endotelial generalizada y del daño renal, y por ello el uso de terapéutico de los antioxidantes como tratamiento de la preeclampsia parece ser prometedor.

En conclusión, en la preeclampsia experimental inducida por la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico, la disfunción renal se asocia a una disminución de los mecanismos antioxidantes renales, lo que conduce a un incremento del estrés oxidativo. La producción de especies reactivas de oxígeno parece ejercer un efecto causal importante en la disfunción endotelial generalizada y del daño renal, y por ello el uso de terapéutico de los antioxidantes como tratamiento de la preeclampsia parece ser prometedor.

### Agradecimientos

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

### Referencias

1. Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126.
2. Asahi M, Fujii J, Taka T, Kuzuya T, Horis M, Shimonish Y, Taniguchi N. 1997. The oxidation of selenocysteine is involved in the inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide donor. *J Biol Chem* 272: 19152-19157.
3. Balal M, Karayaylah I, Paydaş S, Seyrek N, Canacankatan N, Kayrin L. 2003. Oxidative anti-oxidative system In peripartum acute renal failure and preeclampsia – eclampsia. *J Turk Soc Nephrol* 12 (3): 141-147.
4. Biri A, Bozkurt N, Gunaydina G, Korucuoglu U, Durakb IM, Kavutcu C. 2007. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in preeclampsia. *Intern J Gynecol Obst* 96: 196–207.
5. Blum J, Fridovich I. 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 240(2):500-508.
6. Camacho E, Silva JA, Matos MG, Garrido MR, Israel A. 2011. Actividad de las enzimas antioxidantes en el riñón de la rata con preeclampsia experimental. *Arch Ven Farmacol Ter* 30(3): 44-50.
7. Camacho E, Israel A. El tempol revierte las alteraciones renales inducidas en la preeclampsia experimental en la rata. *Rev Fac Far* 74(2): 14-26, 2011.
8. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Britti D, De Sarro A, Pierpaoli S, Caputi A, Masini E, Salvemini D. 2002. A rol for superoxide in gentamicin mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 450:67-76.
9. Dechend R, Viedt C, Muller D, Ugele B, Brandes R, Wallukat G, Park J, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V, Dietz R, Haller H, Kreuzer J, Luft FC. 2003. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation* 107:1632–1639.
10. Duque I, García-Escribano C, Rodríguez-Puyol M, Díez-Márquez M, López-Novoa J, Arribas I, Hernando L, Rodríguez-Puyol D. 1992. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 263:F466-F473.
11. Flohé L, Günzler WA. 1984. *Methods Enzymol.* Assays of glutathione peroxidase. *Display Settings* 105:114-21.
12. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Sydney R, Murphy, Joey P Granger. 2008. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H541–H550.
13. Granger J, Alexander B, Llinas M, Bennett W, Khalil R. 2001. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: Linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension* 38:718-722.
14. Granger J, Alexander B, Bennett W, Khalil R. 2002. Pathophysiology of pregnancy induced hypertension. *Microcirculation* 9:147-160.
15. Guidet B, Shan S. 1989. In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am J Physiol* 256:F158-F164.
16. Herrera JAG, Chaudhuri G, López-Jaramillo P. 2001. Is infection a major risk for preeclampsia? *Med Hypotheses* 57:393-397.
17. Herrera JA, Parra B, Herrera E, Botero JE, Arce RM, Contreras A, López-Jaramillo P. 2007. Periodontal disease severity related to high levels C-reactive protein in preeclampsia. *J Hypertens* 25:1459-1464.
18. Hoffmann DS, Weydert Ch J, Lazartigues E, Kutschke WJ, Kienzle MF, Leach JE, Sharma JA, Sharma EV, Davissson RL. 2008. Chronic tempol prevents hypertension, proteinuria, and poor fetoplacental outcomes in BPH/5 mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 51: 1058-1065.
19. Jeyabalan A, Conrad K. 2007. Renal function during normal pregnancy and preeclampsia. *Front Biosci* 12: 2425-2437.
20. Joffe GM, Esterlitz J, Levine R, Clemens J, Ewell M, Sibai B, Catalano P. 1998. The relationship between abnormal glucose tolerance and hypertensive disorders of pregnancy in healthy nulliparous women. Calcium for Preeclampsia Prevention. (CPEP) Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 179: 1032-1037.
21. Lowry, OH, NJ Rosbrough, AL Farr, RJ Randall. 1996. *J Biol Chem* 1951; 193:265.
22. Lyall F, Greer A. 1996. The vascular endothelium in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Rev Reprod* 1:107-116.
23. MacMillan-Crow LA, Thompson JA. 1999. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxyxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 366:82-88.
24. Martínez-Salgado C, Eleno N, Tavares P, Rodríguez-Barbero A, García-Criado J, Bolaños J, López-Novoa J. 2002. Involvement of reactive oxygen species on gentamicin-induced mesangial cell activation. *Kidney Int* 62:1682-1692.
25. Molnar M, Hertelendy F. 1992. N<sup>o</sup>-Nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, increases blood pressure in rats and reverses the pregnancy-induced refractoriness to vasopressor agents. *Am J Obstet Gynecol* 166:1560-1567.
26. Moran P, Baylis PH, Lindheimer MD, Davison JM. 2003. Glomerular ultrafiltration in normal and preeclamptic pregnancy. *J Am Soc Nephrol* 14(3):648-52.
27. Myatt L, Brewer A, Langdon G, Brockman D. 1992. Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol* 166: 224-230.
28. NIH Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Guide. 1996. 25: 1-111.



29. Oberley L, Spitz D. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 105:457-464.
30. Padmaja S, Squadrito G, Pryor W. 1998. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 349(1):1-6.
31. Pandhi P, Saha L, Malhotra S. 2001. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in pregnant rats as a model of pre-eclampsia. *Indian J Pharmacol* 133: 92-95.
32. Pesce M, Strande D. 1973. A New micromethod for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin Chem* 19:1265-1267.
33. Rister M, Baehner R. 1976. The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome C reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. *J Clin Invest* 58 (5):1174-1184.
34. Rivas-Cabañero L, López-Novoa J, Arévalo M. 1995. Effect of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester on nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Nephron* 1:203-207.
35. Rivas-Cabañero L, Rodríguez-López A, Martínez-Salgado C, Saura M, Lamas S, López-Novoa J. 1997. Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. *Exp Nephrol* 5:23-30.
36. Roberts J, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. 2003. Summary of NHLBI working group on research on hypertension during pregnancy. *Hypertension* 41:437-445.
37. Roberts J, Gammill H. 2005. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension* 46: 1243-1249.
38. Shah DM. 2005. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F614-F625.
39. Wang Y, Walsh SW. 1998. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta* 19: 581-586.
40. Wang Y, Walsh S. 2001. Increased Superoxide Generation is Associated with Decreased Superoxide Dismutase Activity and mRNA Expression in Placental Trophoblast Cells in Pre-eclampsia. *Placenta* (22)2-3:206-212.
41. Xia Y, Hong H, Sol B, Day M-C, Rodney KE. 2003. Maternal auto-antibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Inv* 10: 82-93.
42. Yang C, Du X, Han Y. 1995. Renal cortical mitochondria are the source of free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail* 17:21-26.

Esta Revista se publica bajo el auspicio del  
**Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico,**  
 UCV

Aumenta la visibilidad de tus investigaciones  
 Ingresa a [saber.ucv.ve](http://saber.ucv.ve)

