

Papel del Sistema renina angiotensina en la preeclampsia experimental en ratas

Role of renin angiotensin system in experimental preeclampsia in rats

ELSA CAMACHO, ANITA ISRAEL*

Resumen

La preeclampsia (PE) es un síndrome exclusivo de la gestación humana y responsable de una alta morbimortalidad perinatal, cuyas manifestaciones incluyen: hipertensión arterial, proteinuria y edema. El sistema renina angiotensina (SRA) ha sido uno de los sistemas involucrados en la patogénesis de la PE, sin embargo aun no se ha esclarecido completamente el mecanismo de su participación. Por ello, se cuantificaron algunos de los componentes del sistema renina angiotensina en la preeclampsia experimental, empleando un modelo de preeclampsia que resulta de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico mediante la administración de L-NAME a ratas preñadas. Los resultados demuestran que el tratamiento durante siete días con L-NAME incrementó la presión arterial media y produjo proteinuria, asociado a una disminución significativa de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina plasmática; adicionalmente produjo una reducción de los niveles de renina plasmática y de la aldosterona del líquido amniótico en las ratas preñadas tratadas con L-NAME, cuando se comparan con las ratas preñadas normotensas. Estos hallazgos sugieren que la preeclampsia experimental se caracteriza por la supresión de los componentes circulantes del sistema renina angiotensina, que podrían ser responsables del desbalance entre los sistemas vasoconstrictores y vasodilatadores observados en la preeclampsia, así como de algunos de los signos de la preeclampsia, similar a lo que ocurre en la mujer embarazada hipertensa.

Palabras clave: Preeclampsia, angiotensina II, aldosterona, enzima convertidora de angiotensina.

Abstract

Preeclampsia (PE) is a unique syndrome of human gestation and responsible for a high perinatal morbidity and mortality, whose manifestations include hypertension, proteinuria and edema. The renin angiotensin system (RAS) has been one of the systems involved in the pathogenesis of PE. Although alterations of the renin-angiotensin system contributes to the hypertension associated with pregnancy, the pathogenesis of this hypertension is not clear. Using an experimental model of preeclampsia resulting from the inhibition of nitric oxide synthesis by the administration of L-NAME to pregnant rats, we assessed some of the components of the renin-angiotensin in experimental preeclampsia. The results demonstrate that in pregnant rats, seven days treatment with L-NAME increased mean arterial pressure and produced proteinuria, and this was associated with a significant decrease of plasma angiotensin converting enzyme activity, plasma renin levels and amniotic aldosterone levels. These findings suggest that experimental preeclampsia is characterized by suppression of circulating renin-angiotensin system which could be responsible for imbalance between the vasoconstrictor and vasodilator systems observed in preeclampsia, as well as some of the signs of preeclampsia similar to that in hypertensive pregnant women.

Key words: Preeclampsia, angiotensin II, aldosterone, angiotensin converting enzyme.

Introducción

La preeclampsia (PE) es una enfermedad compleja, exclusiva de la gestación humana y responsable de una alta morbimortalidad perinatal. Por ello ha sido

denominada la enfermedad de las múltiples teorías, en la cual tanto factores medioambientales como genéticos se han asociado al desarrollo de la misma. La PE se caracteriza por hipertensión arterial, proteinuria y edema (Ito y col., 2002) y aparece habitualmente

* Laboratorio de Neuropeptidos. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Farmacia. Caracas, Venezuela.
Correspondencia: Santa Rosa de Lima, Sección Las Mesetas, Calle La Cima, Res Mara, N° 82. Caracas, Venezuela.
Tel: 58212-6052689. Email: astern88@gmail.com

después de las 20 semanas de gestación, presentándose con mayor frecuencia en el tercer trimestre y revertiéndose en el posparto. La PE afecta principalmente a primigestas (75%) y por lo general no ocurre en los embarazos siguientes.

Si bien la etiología de la PE permanece desconocida, en los últimos años se ha avanzado notablemente en el conocimiento de los distintos mecanismos fisiopatológicos que en ella intervienen. La génesis del proceso reside, probablemente, en una implantación anómala del trofoblasto placentario mediado por mecanismos inmunológicos y quizás genéticos. Esto provoca una hipoperfusión útero-placentaria que favorece la liberación de sustancias citotóxicas que lesionan difusamente al endotelio causando disfunción endotelial y vasoconstricción generalizada (riñón, cerebro, hígado, etc), así como activación de la cascada de la coagulación. Adicionalmente provoca una activación del sistema nervioso simpático y un desequilibrio entre la síntesis de sustancias vasodilatadoras (prostaciclina y óxido nítrico) y vasoconstrictoras (tromboxano A₂ y endotelina), desviándose el equilibrio hacia estas últimas (Seligman y col., 1994; Lyall y Greer, 1996; Silver y col., 1996; Dekker y Sibai, 1998; Clambers y col., 2001; Roberts y Cooper, 2001; Pacheco, 2003; Ariza y col., 2006).

El sistema renina-angiotensina (SRA) ha sido uno de los sistemas involucrados en la patogénesis de la preeclampsia (PE). Aunque las alteraciones del sistema renina-angiotensina contribuyen con la hipertensión asociada con el embarazo, la patogénesis de ésta hipertensión aún, no está clara. Numerosos hallazgos relacionan a la PE con el SRA (Nasir y col., 2010). Así, se ha demostrado una disminución significativa de la actividad de la renina plasmática, de la concentración de la angiotensina II (ANG II) y de la aldosterona plasmática en la mujer que desarrolla PE comparada con la gestante normotensa, lo cual conduce a una hemoconcentración y a la vasoconstricción (Shah, 2005). Herse y col. (2007), encontraron que la actividad de la renina plasmática era tres veces menor en pacientes con PE con respecto a las pacientes controles, lo que sugiere que en el embarazo normal existe un incremento en la actividad de la aldosterona puesto que incrementa la renina como sustrato, mientras que en la PE dicho sustrato está suprimido. En otros estudios en pacientes con PE se reportó una disminución de la angiotensina I-7, siendo éste último un potente vasodilatador perteneciente al SRA (Merrill y col., 2002). Mientras que las mujeres embarazadas normales muestran una disminución en la sensibilidad vascular a la ANG II, en la PE las mujeres exhiben un aumento en la reactividad del sistema vascular a la ANG II. Se ha sugerido que esto

se debe a la regulación "hacia arriba" de la población de receptores de angiotensina vasculares en la PE. En apoyo a esto, se ha evidenciado una regulación "hacia arriba" del receptor AT₁ en las plaquetas de mujeres con PE (Baker y col., 1992). Este fenómeno se ha tratado de explicar por el hecho que el receptor AT₁ es capaz de dimerizar o alternativamente sufrir una heterodimerización con el receptor de bradikina (AT₁-B₂) que contribuiría a la hipersensibilización durante la PE (Xia y col., 2003).

Aún no se ha establecido si los cambios observados en los componentes del SRA en la mujer que desarrolla PE están relacionados con factores que controlan la síntesis o degradación de la ANG II, o a otros factores. En relación a la síntesis de la ANG II la evidencia es controversial. Así, algunos investigadores reportan que la actividad de la enzima convertidora de angiotensina II (ECA) sérica en pacientes con PE es mayor que en las mujeres embarazadas normotensas (Sipes y col., 1989; Cugini y col., 1990; Jin y col., 1992), mientras que otros autores no observaron diferencias significativas en la actividad ECA entre estos grupos experimentales (Rasmussen y col., 1983). Contrario a estos hallazgos nosotros proponemos que si los niveles de ANG II y la concentración de renina plasmática están disminuidos en el tercer trimestre en la mujer embarazada con PE, la biosíntesis de la ANG II (actividad ECA) debería estar alterada en la misma dirección. En apoyo a esta hipótesis están los hallazgos de Israel y Peceño (2000), quienes cuantificaron la actividad de la ECA y la concentración de aldosterona en plasma de mujeres embarazadas con presión arterial normal o con PE, encontrando una reducción significativa tanto de la actividad de la ECA como de la concentración de aldosterona plasmática en las pacientes con PE al ser comparadas con las gestantes normotensas.

Para clarificar esta controversia relativa al SRA se cuantificaron tres de los componentes del SRA plasmático y del líquido amniótico: la actividad ECA plasmática, la concentración de aldosterona y los niveles de renina en un modelo experimental de preeclampsia que resulta de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico mediante la administración de L-NAME en ratas preñadas (Camacho y col., 2011).

Materiales y métodos

ANIMALES Y PROTOCOLOS EXPERIMENTALES DE INDUCCIÓN DE PE

Se utilizaron ratas hembras primigestas, de la cepa *Sprague-Dawley*, de 12 a 15 semanas de edad, provenientes del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental, UCV (Caracas, Venezuela), mantenidos

bajo libre acceso al agua y a la comida (Ratarina®) hasta el momento del experimento, con ciclos controlados de luz-oscuridad de 12 horas. Una vez verificada la etapa del ciclo estral de la rata virgen mediante frotis vaginal, se aparearon las ratas hembras con machos fértiles y al día siguiente del apareamiento, la presencia de un tapón vaginal en el frotis vaginal marcó el día I de la gestación.

A partir del día 13 de la gestación, los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos. Los animales del grupo I recibieron una dosis de 50 mg/kg/día de N^w-nitro-L-arginina (L-NAME) administrada por vía intraperitoneal durante 7 días. Al grupo II sólo se le administró vehículo (Solución fisiológica NaCl 0,9% a un volumen requisito de 0,1 mL por cada 100g de p.c.). Igualmente se incluyeron ratas no preñadas distribuidas aleatoriamente en dos grupos. Los animales del grupo III recibieron una dosis de 50 mg/kg/día de N^w-nitro-L-arginina (L-NAME) administrada por vía intraperitoneal durante 7 días y el grupo IV sólo se le administró vehículo (Solución fisiológica NaCl 0,9% a un volumen requisito de 0,1 mL por cada 100g de p.c.).

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

Al día 20 de la gestación, los grupos experimentales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales con acceso a agua en igual cantidad para todos los grupos. Se recolectaron muestras de orina por un período de 24 horas, para la determinación de las proteínas totales en orina. Inmediatamente después los animales fueron sacrificados por decapitación, se recolectaron muestras de sangre en tubos Eppendorf® heparinizados (20 µl/mL de sangre) para las determinaciones de la actividad de la ECA, de la concentración de la renina y de la aldosterona plasmática. Las muestras se centrifugaron a 10.000 r.p.m. por 10 min; se separó el plasma y se almacenó a -20°C hasta su utilización. Además, se recolectó el líquido amniótico en frío mediante el uso de una jeringa estéril, con precaución de no contaminar la misma con residuos de sangre, dichas muestras se congelaron a -20 °C hasta su posterior uso. Las muestras de líquido amniótico de cada animal se utilizaron para la determinación de la concentración de renina y aldosterona.

Los procedimientos empleados en los experimentos fueron sometidos al Comité de Bioética de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Todos los experimentos se

realizaron siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996).

DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL (PA) Y DE LA FRECUENCIA CARDÍACA (FC)

Para la determinación de la PA y FC se utilizó el método indirecto no invasivo mediante el empleo de un pletismógrafo digital de cola (Digital Pressure Meter LE 5000, LETICA y el Pressure Cylinder LE 5100, LETICA® Scientific Instruments, Barcelona, España). Para ello, las ratas fueron sometidas a un período de acostumbamiento durante tres días previos al experimento. Las ratas fueron colocadas en una estufa graduada a 42 °C durante 15 minutos, para producir una dilatación de los vasos sanguíneos periféricos. Inmediatamente después, el animal se colocó en un cepo para inmovilizarlo y realizar la determinación de los parámetros cardiovasculares. Los valores fueron expresados como presión arterial media (PAM) en milímetros de mercurio (mmHg), calculados mediante la fórmula $PAM = PAD + 1/3(PAS - PAD)$.

CUANTIFICACIÓN DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE PROTEÍNAS TOTALES

Se determinó mediante el método descrito por Pesce y Strande (1973). El método se fundamenta en la co-precipitación de proteínas totales de la muestra, en presencia del reactivo de rojo Ponceau y la adición del ácido tricloroacético. Previamente las muestras son centrifugadas para eliminar células tubulares y los oxalatos presentes que interfieren con el análisis. Brevemente, a 50 µl orina se le adicionaron 500 µl del reactivo de rojo Ponceau 40 g/L y ácido tricloroacético 300 g/L, a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó a 12.000 r.p.m., durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió mediante la adición de 1,0 mL de hidróxido de sodio (8 g/L) y la concentración de proteínas urinarias se cuantificó espectrofotométricamente a 560 nm.

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.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA II (ECA)

La determinación de la actividad de la ECA se realizó mediante el método radioenzimático descrito por Rohrbach (1978) y modificado por Israel y col. (1998), el cual consiste en la reacción enzimática de

un sustrato, el hipuril-His-Leu(1-¹⁴C)-glicine (HHL) (1,33 mM, 2,9 Ci/mol, New England Nuclear, Boston, MA), en presencia de la ECA contenida en la muestra de plasma, la cual pierde el grupo His-Leu transformándose cuantitativamente en un derivado radioactivo, el ácido hipúrico-¹⁴C. Brevemente, la muestra se incubó con el sustrato HHL durante 60 minutos a 37 °C, una vez finalizado este período se detuvo la reacción con ácido clorhídrico (0,1 N). El ácido hipúrico radiomarcado generado se separó por extracción con 1,5 mL de acetato de etilo (saturado con agua). Se transfirió la fase orgánica a un vial de centelleo y dejó evaporar la muestra en un horno a 80 °C durante la noche. Se añadió líquido de centelleo a los viales y se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo líquido. La actividad de la ECA se expresó como el producto formado, por hora, por mL de plasma (pmol/h/mL).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RENINA PLASMÁTICA

El método se basa en la cuantificación mediante radioinmunoensayo de la angiotensina I producida a partir del angiotensinógeno endógeno por acción de la renina plasmática, bajo condiciones que previenen la degradación de angiotensina I (presencia de inhibidores de peptidasas como el fluoruro de fenilmetil-sulfonil (PMSF)). El radioinmunoensayo se basa en la competencia entre la angiotensina I radiomarcada y la angiotensina I contenida en los estándares o en la muestra problema, por la unión a un anticuerpo específico. Brevemente, 500 µl de cada muestra se colocaron en los tubos refrigerados en hielo, se le adicionaron 10 µl de PMSF y 50 µl de Buffer fosfato pH 6, y se sometió a agitación. Se transfirieron 200 µl de la mezcla a un segundo grupo de tubos, los cuales se incubaron en un baño a 37°C por 90 minutos, tiempo después del cual se introdujeron en hielo como el primer grupo de tubos no incubados.

Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas, después se aspiró el contenido de cada tubo y se determinó la radioactividad mediante el uso de un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresaron en ng/mL de plasma.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ALDOSTERONA PLASMÁTICA

Para determinar la concentración plasmática se empleó el método de radioinmunoensayo de fase sólida: Aldosterone-Coat-A-Count® (Diagnostic Products, Los Ángeles, CA). Se utilizaron tubos recubiertos con anticuerpo y aldosterona marcada con ¹²⁵I. El método consiste en que la aldosterona de las muestras compete con la aldosterona radiomarcada por el

sitio de los anticuerpos, durante el período de incubación. Para esto se tomaron 200 µl de la muestra de plasma y se transfirieron en los tubos "cubiertos" a los que se les añadió 1 mL de aldosterona con ¹²⁵I para su posterior incubación a 37°C por tres horas. Luego se decantó el líquido dejando secar por 2 a 3 minutos para luego cuantificar la radioactividad mediante espectrofotometría de centelleo líquido.

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

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como la media más o menos el error estándar de la media (X ± E.E.M.). Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Un valor de p<0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

Resultados

EFFECTO DEL L-NAME SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL MEDIA Y EXCRECIÓN URINARIA DE PROTEÍNAS EN RATAS NO PREÑADAS (NP) Y EN RATAS PREÑADAS (P).

Como se muestra en la figura 1 (izquierda), el tratamiento de ratas preñadas (P) y de ratas no preñadas (NP) con L-NAME durante 7 días consecutivos produjo un incremento significativo de la presión arterial media, cuyos valores alcanzaron un valor máximo al día 20 de 151,8 ± 60 mmHg en las ratas no preñadas y de 154,3 ± 50 mmHg en las ratas preñadas. En ambos casos los incrementos fueron significativamente mayores comparados con los controles no tratados respectivos.

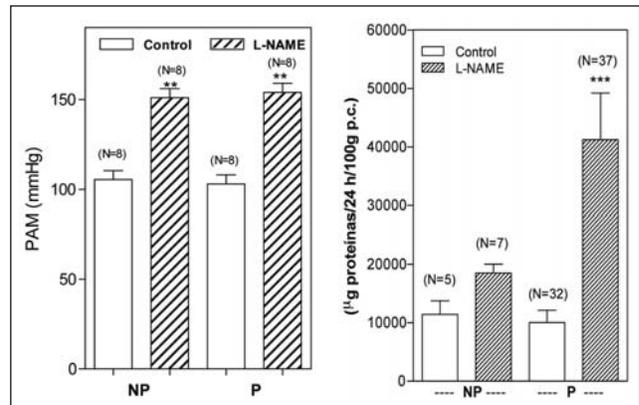


Figura 1. Efecto del L-NAME durante 7 días sobre la presión arterial media y la excreción urinaria de proteínas en ratas preñadas (P) y no preñadas (NP). Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster (50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días), NP: ratas no preñadas, y P: ratas preñadas. Los valores representan la media ± E.E.M. **p<0,001 y ***p<0,001 comparado con ratas controles.

En relación a la excreción urinaria de proteínas totales, se demuestra que el tratamiento con L-NAME incrementó significativamente en las ratas preñadas (310% de incremento). Sin embargo, en las ratas no preñadas (NP) este incremento fue de apenas un 62%, sin llegar a ser significativo (NP-Control: $11418,4 \pm 2321,3$ vs NP-L-NAME: $18514,29 \pm 1500$; P-Control: $10040,57 \pm 2132,6$ vs P-L-NAME: $41218,83 \pm 8000$, expresado en μg proteínas/ 24 h/ 100 g p.c.) (Figura 1, derecha).

EFFECTO DEL L-NAME SOBRE LOS NIVELES DE RENINA Y ALDOSTERONA PLASMÁTICA EN RATAS PREÑADAS Y NO PREÑADAS

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

Por otra parte, al evaluar el efecto del L-NAME como tratamiento crónico en ratas no preñadas sobre la concentración de aldosterona plasmática, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales tanto en las ratas no preñadas (Control NP: $136,83 \pm 6,84$ vs L-NAME NP: $142,50 \pm 6,38$ pg/ml), como en las ratas preñadas (Control P: $167,33 \pm 7,41$ vs L-NAME P: $162,0 \pm 5,5$ en pg/ml). Sin embargo, se encontró un incremento significativo ($p < 0,05$) en la concentración de la aldosterona plasmática basal en ratas preñadas controles comparadas con las ratas no preñadas controles (figura 2, derecha).

EFFECTO DEL L-NAME SOBRE ECA PLASMÁTICA EN RATAS PREÑADAS

El tratamiento con L-NAME a la dosis de 50 mg/Kg/día durante 7 días a las ratas preñadas redujo significativamente la actividad de la enzima convertidora de angiotensina plasmática cuando se compara con las

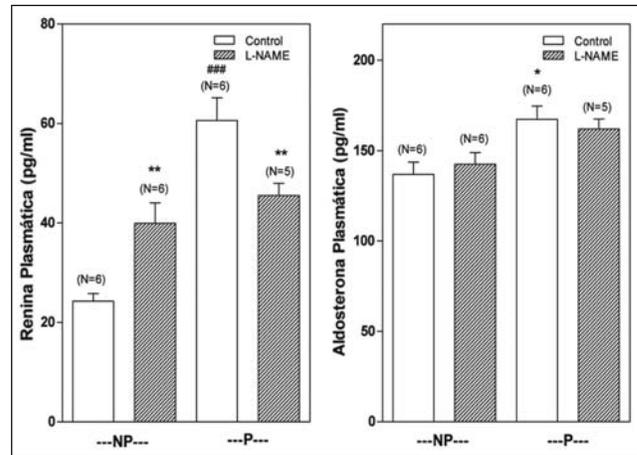


Figura 2. Renina y Aldosterona Plasmática en ratas no preñadas (NP) y en ratas preñadas (P) tratadas con L-NAME. Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p., durante 7 días. Los valores representan la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control, NP; ** $p < 0,01$ comparado con su grupo control y * $p < 0,001$ comparado con las ratas control NP.**

ratas preñadas controles (C: $66,40 \pm 5,7$ vs L-NAME: $20,75 \pm 3,14$ expresado en nmol/h/mg proteína, $p < 0,0001$) (figura 3). Esta reducción fue de un 65,64%.

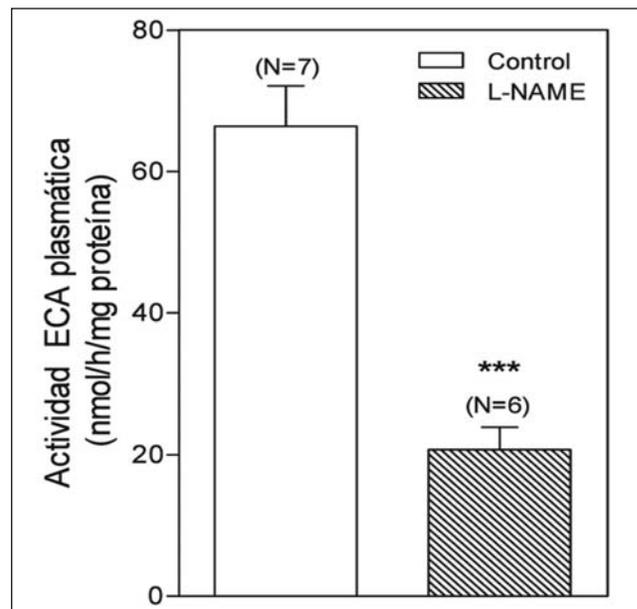


Figura 3. Actividad plasmática de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) en ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME. Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 días. Los valores representan la media \pm E.E.M. * $p < 0,0001$ comparado con ratas controles.**

EFFECTO DEL L-NAME SOBRE LOS NIVELES DE RENINA Y ALDOSTERONA EN EL LÍQUIDO AMNIOTICO EN RATAS PREÑADAS

Por otra parte, al cuantificar la concentración de renina en el líquido amniótico en los grupos experimentales, no se encontró diferencia estadísticamente

significativa entre las ratas preñadas controles y las ratas preñadas tratadas con L-NAME (C: $42,02 \pm 0,818$ vs L-NAME: $40,675 \pm 10,175$, en pg/mL) (figura 4, izquierda). Sin embargo, al determinar la concentración de aldosterona en el líquido amniótico se evidenció una reducción significativa del 41,44% ($p < 0,02$) en las ratas preñadas que recibieron tratamiento de L-NAME con respecto al grupo control (C: $157,0 \pm 13,74$ vs L-NAME: $92,10 \pm 29,07$, en pg/mL) (figura 4, derecha).

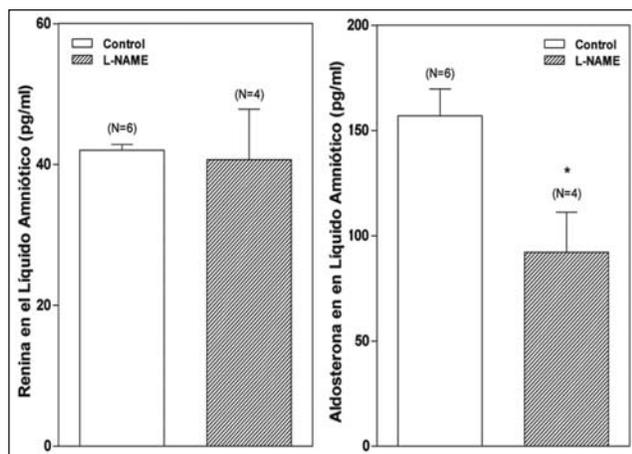


Figura 4. Renina y Aldosterona en el líquido Amniótico de ratas con Preeclampsia Experimental Inducida por la Administración de L-NAME. Control (NaCl 0,9% i.p.) y L-NAME: nitro-L-arginina metil éster, 50 mg/Kg/día i.p. durante 7 días. Los valores representan la media \pm E.E.M. * $p < 0,02$ con respecto al grupo control.

Discusión

La ANG II es una hormona circulante importante que participa en la regulación de la presión arterial y del balance hidromineral. La ANG II interactúa con receptores de membranas del tipo AT_1 y AT_2 , ubicados en múltiples tejidos del organismo, como lo son: el sistema nervioso central y periférico, las células musculares lisas, las glándulas suprarrenales, el riñón, y la placenta (Irani y Xia, 2011). Sin embargo, aún no se ha esclarecido el papel de la ANG II en la PE. Se sabe que la ANG II se produce localmente en la placenta por una quinasa, que es una serina proteasa similar a la quimotripsina, la cual se produce en las vellosidades del sincitiotrofoblasto y que no es una enzima convertidora de angiotensina (Taylor y col., 1990).

Se ha reportado que en la mujer con PE existe una mayor sensibilidad a la ANG II relativa a la mujer embarazada (Gant y col., 1973). Este aumento de la sensibilidad a la ANG II precede al desarrollo del incremento de la PA y podría reflejar mecanismos parcialmente responsables de la PE (Broughton-Pipkin y col., 1989; Wallenburg y col., 1986). Durante el embarazo normal, los niveles de la actividad de renina

plasmática, así como de la concentración de ANG II y de aldosterona plasmática se encuentran elevados (Tapia y col., 1972), mientras que la sensibilidad vascular a la ANG II se encuentra muy reducida, tan temprano como a las 14 semanas del embarazo (Gunther y col., 1980). Por otra parte, en la mujer que desarrolla PE se observa una reducción en la sensibilidad a la ANG II en etapas tempranas del embarazo, pero esta reducción se pierde después de la semana 22 de gestación y precede al desarrollo de la PE (Gant y col., 1973). Los niveles elevados de los componentes del SRA contribuyen a la retención de sodio resultando en la retención de agua, que explica el mecanismo de expansión de volumen durante el embarazo normal (Shah, 2005). Al mismo tiempo, se observa un aumento significativo en la sensibilidad vascular a la ANG II, la cual se asocia con un incremento de la población de receptores de ANG II en las plaquetas (Graves y col., 1992), cuya regulación es paralela a la de los receptores de ANG II vasculares.

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

Si los cambios observados en estos parámetros bioquímicos en la mujer que desarrolla PE están relacionados con factores que regulan la síntesis o la degradación de la ANG II, o a otros factores, es una interrogante por resolver. Se ha sugerido que la reducción de la sensibilidad a la ANG II en el embarazo normal se asocia a la expresión relativa de los subtipos de receptores, AT_1 y AT_2 ; así que, la ausencia de los cambios adaptativos de la expresión de los receptores de ANG II podría contribuir a la PE (Anguiano-Robledo y col., 2007). Se ha sugerido que durante el embarazo normal los monómeros del receptor AT_1 son inactivados por las especies reactivas de oxígeno (ERO) conduciendo a la reducción de la sensibilidad a la ANG II. Por el contrario, se ha reportado que en la PE los receptores AT_1 de la angiotensina forman heterodímeros con el receptor B2 de la bradikina, el cual es resistente a la acción inactivadora de las ERO y más bien se hace hiperactivo ante la ANG II (AbdAlla y col., 2006).

La causa de la existencia de supersensibilidad a la ANG II como compuesto vasoactivo en la mujer

con PE no se ha establecido hasta el presente. Existe considerable evidencia que en este tipo de pacientes se presenta una síntesis inadecuada de los vasodilatadores eicosanoides. Igualmente, se han propuesto mecanismos que implican la alteración de la síntesis y/o del metabolismo de otros compuestos vasoactivos. En relación al SRA, se sabe que la ECA representa una enzima clave en la regulación de la síntesis del vasoconstrictor ANG II; además esta enzima participa en la inactivación de las bradiquininas, de conocida actividad vasodilatadora. A su vez, se sabe que las bradiquininas regulan la producción de PGI1 y PGI2 (Crutchley, 1983). Es por ello que ha adquirido gran interés la medición de la actividad de la ECA en pacientes tanto con embarazo normal como en aquella que presentan PE, y de ésta manera investigar los posibles mecanismos responsables de la elevación gestacional de la presión arterial.

Los datos obtenidos de la literatura en relación a la variación de la actividad de la ECA en la PE son contradictorios. Algunos estudios reportan que los niveles séricos de actividad de la ECA en las pacientes con PE se encuentran elevados en comparación con las embarazadas normotensas (Sipes y col., 1989; Cugini y col., 1990; Jin y col., 1992), mientras otros no encuentran alteraciones en la actividad de dicha enzima circulante (Rasmussen y col., 1983). En oposición a estos resultados nosotros sostenemos que si los niveles plasmáticos de la ANG II y de la actividad renina se encuentran reducidos en el tercer trimestre en la mujer con PE, es plausible hipotetizar que la biosíntesis de la ANG II reflejada en la actividad de ECA, debería estar alterada en la misma dirección. Este concepto se apoya con hallazgos en humanos previos que reportan menores niveles de actividad de la renina plasmática, de la ANG II y la aldosterona en mujeres con hipertensión inducida por el embarazo al compararlas con sus contrapartes normotensas (Graves y col., 1992; Lubarsky y col., 1997; Israel y Peceño, 2000).

Nuestros presentes resultados ratifican y concuerdan con los reportados por Israel y Peceño (2000), ya que aún cuando el tratamiento con L-NAME en ratas no preñadas o preñadas induce un incremento de la presión arterial en similar magnitud, las alteraciones renales y en marcadores circulantes se vuelve específico de la hipertensión inducida por el embarazo en nuestro modelo experimental. Así, asociado al incremento similar de la PA y a la magnitud diferencial de la proteinuria que es superior en las ratas preñadas que las no preñadas, se demuestra que tanto la actividad de la ECA plasmática como los niveles de renina plasmática, se encuentran marcadamente reducidas en las ratas preñadas tratadas crónicamente con

L-NAME, cuando se comparan con las ratas preñadas normotensas, siendo este efecto específico para la condición de gravidez y opuesto al observado en la rata no preñada. Igualmente, se detectó una disminución de la concentración de aldosterona en el líquido amniótico. Estos hallazgos parecen indicar que la PE experimental se caracteriza bioquímicamente por la supresión de los componentes circulantes del SRA, que se refleja en una disminución de la actividad de la ECA y de la concentración plasmática de la renina y de la aldosterona del líquido amniótico. Aún más, en el modelo de preeclampsia inducido por la administración de marinobufagenina, un inhibidor endógeno de la Na/K ATPasa, se demuestra también la reducción de algunos componentes SRA circulantes como son la renina activa, la renina y la ANG II (Uddin y col., 2010), similar a lo que ocurre en la PE humana (Shah, 2005). Por ello, podemos establecer que en la PE experimental el sistema renina angiotensina circulante se encuentra regulado "hacia abajo".

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

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

la angiotensina II, tal y como se ha reportado en mujeres con hipertensión inducida por el embarazo.

La actividad disminuida de la actividad de la ECA plasmática, y la disminución de la concentración de renina en la PE, así como la reducción de la concentración de aldosterona en líquido amniótico, podrían estar relacionada con la falta de efecto terapéutico de los inhibidores de la ECA en el tratamiento de la PE (Lindheimer y Katz, 1981). Efectivamente, en contraste a su acción vasoconstrictora en la mayoría de los lechos vasculares, se sabe que la angiotensina II aumenta el flujo sanguíneo uterino en perros, conejos y monos preñados (Watson y col., 1986; Brenner y col., 1989). Se ha propuesto que la ANG II aumenta la síntesis de PGI₂ en el útero, y esto causa un aumento del flujo sanguíneo mediado por un incremento de las prostaglandinas. Es por ello que los inhibidores de la ECA disminuyen el flujo sanguíneo uterino y disminuyen la sobrevida fetal en animales preñados y pueden ser la causa de la mortalidad fetal en mujeres tratadas con éstas drogas durante la gestación (Israel y Peceño, 1998).

Un hallazgo interesante y no reportado hasta el presente lo constituye la reducción significativa de los niveles de aldosterona en el líquido amniótico proveniente de ratas preñadas tratadas con L-NAME cuando se compara con las preñadas no tratadas, mientras que la renina amniótica aún cuando fue detectable los niveles no estaban alterados. El papel del SRA en el líquido amniótico no ha sido establecido hasta el presente, pero podría ser uno de los componentes importantes de SRA que participa en el transporte de nutrientes y oxígeno entre la placenta y el feto, donde podría contribuir con el desarrollo de la PE al no permitir una adecuada oxigenación y circulación de nutrientes hacia el feto. Se piensa que la ANG II en el líquido amniótico podría derivar tanto de la orina fetal o ser producto de reacciones enzimáticas del saco amniótico. Este último dependería de la presencia de la renina, de la ECA y del angiotensinógeno local. Estos hallazgos de una reducción de la aldosterona del líquido amniótico en nuestro modelo experimental, podría tener un valor predictivo interesante. En efecto, aún cuando los niveles de aldosterona se han asociado poco con la PE, en la actualidad su cuantificación se ha utilizado como diagnóstico en complicaciones del Síndrome de Bartter, un desorden autosómico recesivo de hiperreninismo e hiperaldosteronismo, en el cual se detectan niveles elevados de aldosterona amniótica (Nakanishi y col., 2005). En relación a los valores reportados en nuestro estudio, encontramos que Siegel (1981) reportó valores similares a los nuestros de renina y aldosterona en el líquido amniótico en oveja preñada. Adicionalmente, Ca-

ragounis y col., (2000) determinaron que la rata *Sprague Dawley* normotensa no contiene renina activa en el líquido amniótico, mientras que en el líquido amniótico de la rata Ren-2 se detectaron niveles elevados de renina asociada a una reducción del peso fetal. Esto indica que la sobreproducción de renina podría jugar un papel en el crecimiento fetal y la programación prenatal de la hipertensión.

En conclusión, la PE experimental inducida por la inhibición crónica de la síntesis del óxido nítrico, se acompaña de una desregulación del SRA, hipertensión y proteinuria.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Banny Caraballo por su ayuda técnica en los experimentos. Este trabajo fue subvencionado por los Proyectos: Misión Ciencia, Subproyecto 7, ECCV-2007001585, PEII-20122000760, y por el CDCH-UCV proyecto CDCH AIA-06.8402.2012.

Referencias bibliográficas

- AbdAlla S, Abdel-Baset A, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. 2006. Mesangial AT1/B2 receptor heterodimers contribute to angiotensin II hyperresponsiveness in experimental hypertension. *J Mol Neurosci* 26(2-3): 185-192.
- Anguiano-Robledo L, Reyes-Melchor P, Bobadilla-Lugo R, Pérez-Álvarez V, López-Sánchez P. 2007. Renal angiotensin-II receptors expression changes in a model preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 26(2): 151-161.
- Ariza A, Bobadilla N, Halhali A. 2006. Acciones de la endotelina y de la angiotensina II en embarazos complicados con preeclampsia. *Rev de Invest Cient* 56(1): 48-56.
- Baker P, Broughton F, Symonds M. 1992. Comparative study of platelet angiotensin II binding and the angiotensin II sensitivity test as predictors of pregnancy-induced hypertension. *Clin Sci* 83: 89-95.
- Brenner M, Troy J, Ballerman B. 1989. Endothelium dependent vascular response mediators and mechanisms. *J Clin Invest* 84(5): 1373-1378.
- Broughton-Pipkin F, Morrison R, O'Brien P. 1989. Prostaglandin attenuates both pressor and adrenocortical response to angiotensin II in human pregnancy. *Clin Sci* 76: 529-534.
- 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 Venez de Farmacol Terap* 30(3): 44-50.
- Caragounis A, Koutsis K, Wlodek M, Wilkinson-Berka J, Di Nicolantonio R. 2000. First report of active renin in rat amniotic fluid. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 27(8): 631-633.
- Clambers J, Fusi L, Malik I, Haskard D, De Swiet M, Kooner J. 2001. Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia. *JAMA* 285(12): 1607-1612.
- Crutchley D, Ryan J, Ryan U, Fischer G, Paul SM. 1983. Effects of bradykinin its homologs on the metabolism of arachidonate by endothelial cell. *Adv Exp Med Biol* 156: 527-532.

- Cugini P, Letizia C, Di Palma L, Battisti P, Caserta D, Moscarini M, Scavo D. 1990. Serum angiotensin-converting enzyme activity in pre-eclamptic pregnancy: evidence for a relative hypermesorACEemia. *Enzyme* 43: 113-121.
- Dekker G, Sibai B. 1998. Etiology and pathogenesis of pre-eclampsia: Current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 179: 1359-1375.
- Gant N, Daley G, Chand S, Whalley P, MacDonald P. 1973. A prospective study of angiotensin II pressor responsiveness trout primigravid pregnancy. *J Clin Inst* 52: 2682-2690.
- Graves S, Moor T, Seely E. 1992. Increased platelet angiotensin II receptor number in pregnancy induced hypertension. *Hypertension* 20(85): 627-632.
- Gunther S, Gimbrone M, Alexander R. 1980. Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels. *Nature* 287 (5779): 230-232.
- Herse F, Dechend R, Harsem N, Wallukat G, Janke J, Fatmunnisa Qadri L, Hering L, Dominik N, Muller, Friedrich C, Luft A, Staff AC. 2007. Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in pre-eclampsia. *Hypertension* 49: 604-611.
- Irani R, Xia Y. 2011. Renin angiotensin signaling in normal pregnancy and preeclampsia. *Semin Nephro* 31(1): 47-58.
- Israel A, Peceño A. 1998. Actividad de la enzima convertidora de angiotensina en la hipertensión inducida por el embarazo. *Arch Ven Farmacol Terap* 1(17): 21-27.
- Israel A, Peceño A. 2000. Renin-angiotensin-aldosterone system in pregnancy-induced hipertensión. *J Hum Hypertens* 14 (1): S36-S39.
- Ito M, Itakura A, Ohno Y, Nomura M, Senga T, Nagasaka T, Mizutani S. Possible 2002. Activation of the renin-angiotensin system in the feto-placental unit in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(4): 1871-1878.
- Jin L, Hong-Yuan H, Ya-Nan Z. 1992. Serum angiotensin converting enzyme activity in pregnancy-induced hypertension. *Gynecol Obstet Invest* 33: 138-141.
- Lindheimer M, Katz A. 1981. Pathology of preeclampsia. *Annu Rev Med* 32: 273-289.
- Lubarsky S, Ahoka R, Friedman S, Sibai B. 1997. The effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on blood pressure and angiotensin II responsiveness in the pregnant rat. *Am J Obstet Gynecol* 176: 1069-1076.
- Lyll F, Greer A. 1996. The vascular endothelium in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Rev Reprod* 1: 107-116.
- Merrill D, Karoly M, Chen K, Ferrario C, Brosnihan KB. 2002. Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrinol* 18(3): 239-245.
- Nakanishi T, Suzumori N, Mizuno H, Suzuki K, Sato T, Tanemura M, Suzuki Y, Suzumori K. 2005. Elevated aldosterone in amniotic fluid and maternal blood has diagnostic potential in pregnancies complicated with a fetus of Bartter syndrome. *Fetal Diagn Ther* 20(6): 481-484.
- Nasir M, Agunanne E, Horvat D, Puschett J. 2010. Alteration in the renin angiotensin system in a rat model of human the preeclampsia. *Am J Nephrol* 31: 171-177.
- NIH Guide, Guide Laboratory animals, for the care and use of laboratory animals. Eight edition. 1996.
- Pacheco J. 2003. Disfunción endotelial en la preeclampsia. *Ann Fac Med Univ Nac Mayor San Marcos* 64(1): 43-54.
- Pesce M, Strande D. 1973. A New micromethod for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin Chem* 19(11): 1265-1267.
- Rasmussen A, Perderson E, Rømer F, Johannesen P, Kristensen S, Lauritsen J, Wohlert M. 1983. The influence of normotense pregnancy and preeclampsia on angiotensin converting enzyme. *Acta Obstet Gynecol* 62: 341-344.
- Roberts J, Cooper D. 2001. Pathogenesis and genetics of preeclampsia. *Lancet* 357: 53-56.
- Rohrbach M. 1978. (Glycine-1-¹⁴C)-Hippuryl-L-leucine: a substrate for the radiochemical assay of angiotensin converting enzyme. *Anal Biochem* 84: 272-276.
- Seligman S, Buyon J, Clancy R, Young B, Abramson S. 1994. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 171: 944-948.
- Shah D. 2005. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F614-F625.
- Siegel S. 1981. Amniotic fluid concentrations of renin and aldosterone during development in the fetal sheep. *Pediatr Res* 15(11): 1419-1421.
- Silver R, Kupferminc M, Russell T, Adler L, Mullen T, Caplan M. 1996. Evaluation of nitric oxide as a mediator of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 175: 1013-1017.
- Sipes S, Weiner C, Gelhaus T, Goodspeed J. 1989. The plasma renin angiotensin system in preeclampsia: Effects of magnesium sulfate. *Obstet Gynecol* 73: 934-937.
- Tapia H, Johnson C, Strong C. 1972. Renin-angiotensin system in normal and in hypertensive disease of pregnancy. *Lancet* 7782(300): 847-850.
- Taylor M, Varma M, Teng N, Roberts J. 1990. Woman with preeclampsia have higher plasma endotelin levels than normal pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 1675-1677.
- Uddin M, Agunanne Horvat D, Puschett J. 2010. Alterations in the renin angiotensin system in the rat model of human preeclampsia. *Am J Nephrol* 31: 171-177.
- Wallenburg H, Dekker G, Makovits J, Rotmans O. 1986. Low dose aspirin prevents pregnancy induced hypertension and pre-eclampsia in angiotensin sensitive primigravidae. *Lancet* 1(8471): 1-3.
- Watson M, Workman R, Herze W, Branch R, Oates J, Brash. 1986. Systemic synthesis of prostaglandin I₂ follows infusion of angiotensin II in dogs. *Eur J Pharmacol* 127(1-2): 9-16.
- Xia Y, Hong H, Sol B, Day M-C, Rodney K. 2003. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activates angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Inv* 10(2): 82-93.

Recibido: 3 de febrero 2014
Aceptado: 4 de abril de 2014