

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA



EFFECTO DEL GLUCONATO DE MAGNESIO SOBRE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y LA ACTIVIDAD Ca^{2+} -ATPasa DE FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS DE MUJERES SANAS

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por el Br. Víctor Manuel Lugo G., como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Reinaldo Marín.

Asesor: Dra. María Valentina Salas.

CARACAS, VENEZUELA

JUNIO - 2019

Resumen

La preeclampsia es una condición exclusiva del embarazo humano que se caracteriza por hipertensión y colapso funcional de los órganos maternos. Durante su desarrollo ocurren un conjunto de procesos que favorecen el deterioro oxidativo de las biomoléculas de diferentes tejidos, teniendo a la placenta como el origen y a las células sanguíneas como los vehículos de dicho daño molecular. Particularmente, las membranas plasmáticas de distintos tipos celulares son blanco de modificación oxidativa; alterándose la integridad y funcionalidad de los lípidos y proteínas que les conforman. El sulfato de magnesio (MgSO_4), compuesto de elección para combatir las convulsiones que se desarrollan en la eclampsia, presenta entre varios mecanismos de interacción con las células, actividad antioxidante. Sin embargo, esta sustancia solo puede suministrarse por vía intravenosa o muscular, generalmente durante emergencias hospitalarias. Por tanto, con el objetivo de desarrollar una terapia a nivel ambulatorio, de carácter preventivo y con menos riesgos que el tratamiento estándar de MgSO_4 , se ha pensado en el gluconato de magnesio (MgGl_2). Este suplemento oral de magnesio ha demostrado una actividad antioxidante *in vitro* superior a la del MgSO_4 . En el presente trabajo, se irradiaron con luz ultravioleta (UV) los fantasmas de glóbulos rojos de mujeres sanas, con el fin de inducir la peroxidación lipídica de estas membranas. Con este sistema *in vitro*, se evaluó la actividad antioxidante del MgGl_2 , así como su capacidad para restaurar membranas plasmáticas parcialmente oxidadas. Como sea que la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) sea particularmente sensible a las alteraciones por oxidación de los lípidos de las membranas, se evaluó la actividad de esta enzima bajo las distintas condiciones experimentalmente estudiadas. Se encontró que el MgGl_2 es capaz de proteger y revertir los daños inducidos por la irradiación UV en los niveles de peroxidación lipídica y la actividad Ca^{2+} -ATPasa de los fantasmas de glóbulos rojos de mujeres sanas.

Palabras clave: Ca^{2+} -ATPasa, Estrés Oxidativo, Gluconato de Magnesio, Peroxidación Lipídica, Preeclampsia.

Acta del Examen Público y Solemne del Trabajo Especial de Grado del Br. Victor Manuel Lugo García

Quienes suscribimos, miembros del Jurado Evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la ilustre Universidad Central de Venezuela, damos fe que examinamos el Trabajo Especial de Grado del Br. **Victor Manuel Lugo García** C.I. 27.098.305, Titulado: «**Efecto del Gluconato de Magnesio sobre los Niveles de Peroxidación Lipídica y la Actividad Ca²⁺-ATPasa de Fantasma de Glóbulos Rojos de Mujeres Sanas**», el cual es requisito parcial para optar al Título de Licenciado en Biología, Mención Biología Celular. Culminada la evaluación, consideramos que dicho trabajo cumple con los requerimientos exigidos en los reglamentos respectivos, por lo cual ha sido **APROBADO**, y calificado con veinte (20) puntos. Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, el 01 del mes de julio de 2019.

Dr. Reinaldo Marín
Tutor

Dra. María Valentina Salas
Asesor Académico



Dr. Antonio Gutiérrez
Jurado

Dra. María Carolina Pérez Gordones
Jurado

*Para Berlytz y Victor,
quienes aman como
solo unos padres
pueden hacerlo.*

Agradecimientos

Agradezco a mis padres: Berlytz García y Victor Lugo. Cuyo amor y apoyo han sido fundamentales durante mi vida.

A mi hermano, Manuel Lugo. Por mantenerme cuerdo y apoyarme a su manera particular.

A mi hermana, Angie Lugo. A mi cuñado, Juan Rangel. Y a mi sobrina, Rebeca Rangel, que desde su nacimiento nos ha llenado de una felicidad inmensurable.

A mis abuelos: Edith Mondragón, Santos García, Antonieta Arocha y Victor Lugo. Quienes me han apoyado de incontables maneras.

Al Dr. Reinaldo Marín, en quien he conocido la representación de un humano noble que, además, es un científico y maestro prodigioso.

A los integrantes del Laboratorio de Bioenergética Celular: Heicher Rangel, por darme el empujón hacia la vida en el IVIC; y a Deliana Rojas, por asistirme durante de mi entrenamiento.

A mis profesores, cuyo amor por la enseñanza, a pesar de la situación actual del país, han permitido mi preparación y la del resto de sus estudiantes.

A mis compañeros de clases: Aurora Barrios, Esthefany Souquett, María Navas, Miraidi Tuozzo, Nataly Pirela, Michelle Cuccilo y Ariadna Morales.

A las donantes y a las profesionales que extrajeron la sangre, quienes apartaron de su tiempo para ayudarme.

A todos ustedes, que me ayudaron de una forma u otra, muchísimas gracias.

Abreviaturas

BHT: butilhidroxitolueno.

Ca²⁺: calcio ionizado.

CaM: calmodulina.

Cat: catalasa.

CBBG: azul brillante de Coomassie G-250.

GPx: glutatión peroxidasa.

HELLP: Hemólisis, Enzimas Hepáticas Incrementadas y Bajo Conteo Plaquetario.

IP₃R: receptor de inositol trifosfato.

MDA: malondialdehído.

Mg²⁺: magnesio ionizado.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NOS: especies reactivas de nitrógeno.

Pi: fosfato inorgánico.

PMCA: Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

RS: especies reactivas.

RyR: receptor de rianodina.

SERCA: Ca²⁺-ATPasa de retículo endo o sarcoplasmático.

SOD: superóxido dismutasa.

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

UV: ultravioleta.

Índice General

Introducción.....	1
Preeclampsia y Eclampsia.....	1
Características Generales.....	1
Morbimortalidad.....	4
Fisiología y Fisiopatología Placentaria.....	5
Regulación Redox y Transporte de Ca^{2+}	10
Estrés Oxidativo y Peroxidación Lipídica.....	10
Homeóstasis de Ca^{2+}	12
Ca^{2+} -ATPasa de Membrana Plasmática.....	15
Proteínas Transportadoras de Ca^{2+} y Modificación Oxidativa.....	17
Ca^{2+} -ATPasa de Membrana Plasmática, Peroxidación Lipídica y Preeclampsia.....	21
Antecedentes.....	23
Sulfato de Magnesio.....	23
Gluconato de Magnesio.....	27
Objetivos.....	29
Objetivo General.....	29
Objetivos Específicos.....	29
Materiales y Métodos.....	30
Donantes y Recolección de Muestras de Sangre.....	30
Aislamiento de Paquete de Glóbulos Rojos.....	30
Preparación de Fantasmas de Glóbulos Rojos.....	30
Cuantificación de Proteínas.....	31
Irradiación de luz UV.....	31
Ensayo de Cuantificación de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico.....	32
Actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de Fantasmas de Glóbulos Rojos.....	33
Análisis Estadístico.....	34

Resultados.....	36
Efecto del tiempo de irradiación con luz UV sobre los niveles de peroxidación lipídica y la actividad de la Ca ²⁺ -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos.....	36
Efecto del tiempo de irradiación con luz UV sobre los niveles de peroxidación lipídica y actividad de la Ca ²⁺ -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos, en ausencia y presencia del antioxidante BHT.....	39
Efecto del tiempo de irradiación con luz UV sobre los niveles de peroxidación lipídica y actividad de la Ca ²⁺ -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos, en ausencia y presencia de MgGl ₂	43
Efecto de la preincubación con 4 mM MgGl ₂ durante 24 h sobre los niveles de peroxidación lipídica y actividad de la Ca ²⁺ -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV durante 45 min.....	48
Discusión.....	50
Conclusiones.....	58
Bibliografía.....	59
Anexos.....	71
Anexo A: Visión general de la estructura y el flujo de sangre placentario.....	71
Anexo B: Idealización de las Reacciones de Peroxidación Lipídica y Reacciones de Enzimas Antioxidantes.....	72
Anexo C: Consentimiento Válido.....	76

Índice de Figuras

Figura 1. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV de $\lambda= 254$ nm sobre los niveles de TBARS de fantasmas de glóbulos rojos.....	37
Figura 2. Valores de actividad Ca^{2+} -ATPasa en función de los niveles de peroxidación lipídica de fantasmas de glóbulos rojos.....	40
Figura 3. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV de $\lambda= 254$ nm sobre los niveles de TBARS de fantasmas de glóbulos rojos, en ausencia y presencia de 200 μM BHT.....	41
Figura 4. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV de $\lambda= 254$ nm sobre los niveles de TBARS de fantasmas de glóbulos rojos, en ausencia y presencia de 4 mM MgGl_2	44
Figura 5. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV de $\lambda= 254$ nm sobre los niveles de TBARS de fantasmas de glóbulos rojos, en ausencia y presencia de 200 μM BHT o 4 mM MgGl_2	46
Figura 6. Estructura molecular de la sal de gluconato de magnesio (MgGl_2).....	52

Índice de Tablas

Tabla I. Efecto de la irradiación con luz UV de $\lambda= 254$ nm durante 45 min sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos.....	38
Tabla II. Efecto protector de 200 μM BHT sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV de $\lambda= 254$ nm durante 45 min.....	42
Tabla III. Efecto protector de 4 mM MgCl_2 sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV de $\lambda= 254$ nm durante 45 min.....	45
Tabla IV. Efecto protector de 200 μM BHT o 4 mM MgCl_2 sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV de $\lambda= 254$ nm durante 45 min.....	47
Tabla V. TBARS y Actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV de $\lambda= 254$ nm durante 45 min y luego preincubados en presencia o ausencia de 4 mM MgCl_2 por 24 h.....	49

Introducción

Preeclampsia y Eclampsia

Características Generales

La preeclampsia se define como un síndrome en el que se desarrolla hipertensión en una gestante normotensa luego de 20 semanas de embarazo, concomitante con la aparición de proteinuria u otras manifestaciones de daño de algún órgano materno (Peres y col, 2018). Específicamente, su diagnóstico implica la detección de al menos dos síntomas, siendo obligatoriamente uno de estos, la hipertensión desarrollada luego de la semana 20 de embarazo en una gestante que, hasta la fecha, presentaba valores normales de presión arterial (Tranquilli y col, 2013). Tal hipertensión, si es moderada, se define como una presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg o una presión arterial diastólica ≥ 90 mmHg, con al menos dos mediciones con 4 h de diferencia entre sí y, si respectivamente, estos valores alcanzan o superan los 160 mmHg y 110 mmHg, se define como severa y las mediciones se realizan, en cambio, con 15 a 30 min de diferencia entre sí (Tranquilli y col, 2013; Roberts y col, 2013). El segundo de los signos definitorios de la preeclampsia comprende al menos una de las siguientes afecciones: proteinuria, identificada como una cantidad de proteína excretada en la orina ≥ 300 mg/24 h, una razón de proteína urinaria/creatinina $\geq 0,3$ o una concentración de proteína urinaria ≥ 30 mg/dL en al menos dos mediciones con 6 h de diferencia entre sí; trombocitopenia, definida como un recuento plaquetario < 100.000 células/ μ L; insuficiencia renal progresiva, establecida como una concentración de creatinina en el plasma $> 1,1$ mg/dL; disfunción hepática, determinada como un incremento de al menos el doble de la concentración normal de transaminasas en el plasma; edema pulmonar o aparición por primera vez de disturbios neurovisuales (Tranquilli y col, 2013).

En general, la peligrosidad de la preeclampsia se asocia principalmente a la gravedad de la hipertensión (Roberts y col, 2013). Clásicamente, una combinación de hipertensión moderada y proteinuria, define a la condición preecláptica como moderada (Peres y col, 2018). Mientras que, la hipertensión severa, acompañada o no con proteinuria, y concurrente con al menos un síntoma del resto de afecciones maternas, suele definir a la preeclampsia como severa (Peres y col, 2018). Sin embargo, la preeclampsia es un estado dinámico que tiende al deterioro progresivo de la gestante y tal clasificación solo sería cierta para el momento del diagnóstico (Tranquilli y col, 2013). De hecho, a nivel clínico no se recomienda el uso de estos términos rígidos que favorecen el descuido por parte de la atención médica para considerar la naturaleza multisistémica de esta condición (Tranquilli y col, 2013). Y, por tanto, su uso es recomendado únicamente para homogeneizar la literatura científica relacionada (Roberts y col, 2013).

La eclampsia, por su parte, representa la consecuencia del daño al tejido nervioso que ocurre durante la progresión de la preeclampsia (Peres y col, 2018). Se define como aquel estado preecláptico en el que se desarrollan abruptamente convulsiones o coma antes, durante o después del parto y que no puede ser atribuido a otra alteración neuronal que justifique dichas complicaciones (Sibai, 2005; Peres y col, 2018). Es entonces, el más raro y peligroso de los desórdenes hipertensivos del embarazo, pudiendo, incluso, producirse en gestantes que no presenten los síntomas comunes de la preeclampsia (Williams, 2011; Peres y col, 2018).

Ahora, los factores de riesgo materno asociados al desarrollo de preeclampsia o eclampsia durante la gestación, engloban: índice de masa corporal $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ o $< 20 \text{ kg/m}^2$ y edad ≥ 35 años o ≤ 20 años; primiparidad, intervalo entre embarazos ≥ 10 años y embarazos múltiples; hipertensión arterial y otras alteraciones preexistentes de tipo cardiovascular, respiratorio, renal, hepático, neural y sanguíneo; anemia; síndrome antifosfolípido, lupus eritematoso sistémico y

otros estados autoinmunes; infecciones del tracto urinario y septicemia; variaciones genéticas; historia personal o familiar de desórdenes hipertensivos del embarazo o diabetes mellitus tipo 1, tipo 2 o gestacional; e incluso, falta de educación formal y condiciones socioeconómicas deficientes (Duckitt y Harrington, 2005; Abalos y col, 2014; English y col, 2015; Umesawa y Kobashi, 2017; Peres y col, 2018).

Igualmente, las consecuencias a largo plazo del embarazo preecláptico o ecláptico para la exgestante sobreviviente, abarcan: disfunción endotelial, arterioesclerosis, trombosis venosa, hipertensión arterial, enfermedad vascular periférica, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca y derrame cerebral; problemas de memoria; insuficiencia renal; hipotiroidismo; diabetes mellitus tipo 2 y dislipidemia; así como artritis reumatoide y, posiblemente, otros estados autoinmunes (Williams, 2011; Amaral y col, 2015; Umesawa y Kobashi, 2017). Adicionalmente, la prole sobreviviente de un embarazo preecláptico o ecláptico se enfrenta a desenlaces que incluyen: trombocitopenia, neutropenia, displasia broncopulmonar y encefalopatía neonatal; al igual que reducción del tamaño y del peso al nacer, debido a restricción del crecimiento intrauterino y a trabajo de parto prematuro; que en conjunto, conllevan a estadías prolongadas en unidades de cuidados intensivos neonatales (Impey y col, 2001; Backes y col, 2011; Nomura y col, 2017). Del mismo modo, se encuentra predispuesta a padecer de patologías endocrinas, metabólicas y cardiovasculares durante la infancia y la adultez (Backes y col, 2011, Amaral y col, 2015), así como ver comprometido el desarrollo de su sistema cognitivo (Nomura y col, 2017).

En resumen, la preeclampsia y la eclampsia representan un peligro para la vida de la gestante y de su descendencia durante la gestación y, para los sobrevivientes, constituye un factor de riesgo para el desarrollo de condiciones patológicas más tarde en sus vidas (Umesawa y Kobashi, 2017).

Morbimortalidad

La preeclampsia y la eclampsia son condiciones hipertensivas y multisistémicas exclusivas del embarazo humano, son las más peligrosas de los desórdenes hipertensivos del embarazo, grupo también compuesto, entre otros fenómenos, por: hipertensión preexistente e hipertensión gestacional (von Dadelszen y col, 2016). Estos desórdenes hipertensivos causan el 18 % de las defunciones maternas en el mundo; con un estimado de 62.000 a 77.000 muertes al año (Abalos y col, 2013; Abalos y col, 2014). En Latinoamérica y el Caribe, son la razón principal de las muertes maternas; con un 25,7 % que, además, representa el mayor porcentaje de mortalidad materna del planeta (Khan y col, 2006). Asimismo, son mundialmente responsables de más de 500.000 muertes fetales al año (English y col, 2015).

La incidencia estimada globalmente de preeclampsia y eclampsia en la gestante, es, respectivamente, de 2,7 a 8,2 % y de 1 a 2 % (Abalos y col, 2013). En el continente Americano, esta incidencia se estima en 1,5 a 5,2 % para la preeclampsia y en 0,4 a 0,9 % para la eclampsia (Abalos y col, 2013). Al mismo tiempo, la probabilidad porcentual de un desenlace materno severo; ya sea, un evento cercano a la muerte o la propia muerte, es de 7,49 % para la preeclampsia y 66,78 % para la eclampsia (Abalos y col, 2014). Sumado a esto, la probabilidad porcentual de muerte fetal, neonatal y perinatal, asociada a la preeclampsia, es de 3,12 %, 2,71 % y 3,02 %, respectivamente, y asociada a la eclampsia, es de 3,92 %, 6,58 % y 4,91 %, respectivamente (Abalos y col, 2014).

Por lo antes expuesto, estos desórdenes hipertensivos representan un problema de salud pública en términos de morbimortalidad materna y de su descendencia (Umesawa y Kobashi, 2017). Los estudios epidemiológicos enfatizan aumentar la calidad y cantidad de los registros

nacionales de estas condiciones, con el fin de establecer parámetros de magnitud, distribución y consecuencias, más cercanos a la realidad (Abalos y col, 2014; Umesawa y Kobashi, 2017).

Fisiología y Fisiopatología Placentaria

Luego de la fertilización del óvulo por el espermatozoide, el cigoto resultante sufre una serie de eventos morfogénéticos que dan origen al blastocisto; una estructura intermedia de la embriogénesis, constituida por: una masa celular interna de progenitores del embrión propiamente dicho, los embrioblastos, situados en uno de los polos del blastocisto, su polo embrionario; una cavidad general interna llena de líquido, llamada blastocele; y el trofoectodermo, una masa de células externas que cubre al polo embrionario y delimita al blastocisto (Watson y Barcroft, 2001).

A nivel del polo embrionario y a partir del trofoectodermo, se forman dos capas de trofoblasto (Ji y col, 2013). La interna, llamada citotrofoblasto, se compone de células indiferenciadas y altamente proliferantes que, a su vez, dan origen a las células de la capa externa, dividida en trofoblasto vellosos y extraveloso (Ji y col, 2013). El trofoblasto vellosos se genera por fusión de las células mononucleadas del citotrofoblasto, estableciendo el sincitiotrofoblasto; una capa epitelial y multinucleada que, entre otras funciones, media el transporte de nutrientes y desechos entre las sangres materna y fetal (Ji y col, 2013). Paralelamente, se forman columnas de trofoblasto que entran en contacto con la pared interna del útero; el endometrio, dicha interacción, promueve la diferenciación del citotrofoblasto subyacente a trofoblasto extraveloso, un linaje celular con alta capacidad invasiva (Ji y col, 2013; Huppertz, 2018). De este modo, se genera el trofoblasto intersticial, el cual, penetra hasta el tercio interno de la capa intermedia del útero; el miometrio, permitiendo, así, que el embrión en desarrollo se ancle a la cavidad uterina (Ji y col, 2013; Huppertz, 2018). El resto del trofoblasto extraveloso, originado del trofoblasto intersticial,

se compone de: trofoblasto endovascular, que abre y dilata las arterias y venas uterinas, aumentando el flujo de sangre materna que atraviesa la interfase materno-fetal; trofoblasto endoglandular, que se une, degrada y reemplaza al epitelio de las glándulas uterinas, abriéndolas hacia el embrión y asegurando la nutrición histiotrófica antes de que se instaure la hemotrófica; y trofoblasto endolinfático, que induciría el drenaje de fluido extracelular por los vasos linfáticos (Weiss y col, 2016; He y col, 2017; Windsperger y col, 2017; Huppertz, 2018).

Producto de las interacciones del trofoblasto con el útero, se desarrolla la placenta; el órgano transitorio que constituye la interfase entre la madre y el feto y, del cual, este último es totalmente dependiente durante el embarazo (Burton y Fowden, 2015). Esta dependencia, se evidencia a través de las actividades placentarias que permiten el desarrollo intrauterino del feto y que luego son tomadas por los distintos órganos del neonato: transferencia de gases; regulación osmótica, homeóstasis ácido base y eliminación de desechos; absorción y metabolismo de nutrientes; síntesis y secreción de biomoléculas; filtrado de sustancias; recepción y transmisión de señales endocrinas; hematopoyesis; y protección inmunitaria (Benirschke y col, 2012). Debido a esto, la placenta es considerada como el sistema de soporte vital de las primeras etapas del crecimiento humano (Jensen y Chernyavsky, 2019).

En promedio, una placenta a término tiene forma discoide y las siguientes medidas: diámetro de 22 cm, grosor de 2,5 cm en su centro, área superficial de intercambio materno-fetal de casi 15 m² y 513 g de masa (Mayo, 2018). Se forma por dos caras, la materna, denominada placa decidual, y la fetal, llamada placa coriónica (Mayo, 2018). Dichas placas están soldadas entre sí por sus bordes y, el espacio entre ellas, llamado espacio intervelloso, está lleno de sangre materna, la cual, es suministrada y recogida por las arterias y venas uterinas, respectivamente (Benirschke y col, 2012; Jensen y Chernyavsky, 2019). Desde la placa coriónica hacia el espacio intervelloso,

se extienden las vellosidades coriónicas; proyecciones de vasos sanguíneos fetales cubiertos por citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto, que se bañan en sangre materna y se arreglan en formas arboloides (Benirschke y col, 2012). Los capilares de estas vellosidades, se conectan con el feto por medio del cordón umbilical; un conducto formado por una vena y dos arterias que se insertan en la región central de la placa coriónica (Benirschke y col, 2012; Jensen y Chernyavsky, 2019). En cambio, de la placa decidual, aparte de las aberturas de las arterias y venas uterinas, ocurren una serie de pilares irregulares, llamados tabiques placentarios, que emergen hacia el espacio intervelloso y, sin establecer contacto con la placa coriónica, bordean a las unidades placentarias conocidas como cotiledones (Benirschke y col, 2012). Así, uno de estos cotiledones, se compone, cuando menos, de un árbol de vellosidades coriónicas que se ramifica entre un par de tabiques placentarios y que se alinea con la abertura de una arteria uterina (Benirschke y col, 2012; Burton y Fowden, 2015). Por esto, los cotiledones se consideran como las unidades funcionales de la placenta, ya que representan los sitios principales de intercambio materno-fetal (Mayo, 2018). En el Anexo A se muestra una ilustración de la arquitectura y circulación sanguínea placentaria.

Los vasos que irrigan la sangre materna directamente al espacio intervelloso, están constituidos por las arterias espirales uterinas; un conjunto de unidades vasculares que nacen de las arterias radiales del miometrio y finalizan abriéndose en el endometrio, con la particularidad, de que a lo largo de su extensión por la musculatura uterina, se enroscan sobre sí mismas, lo cual, aumenta su resistencia vascular y disminuye el flujo de sangre materna a través de ellas (Zamir, 2018). Una variante del trofoblasto endovascular, llamada trofoblasto endoarterial, es capaz de cambiar la estructura de las arterias espirales uterinas y, por consiguiente, modificar el flujo de sangre materna que perfunde a la placenta durante el embarazo (Huppertz, 2018). En el inicio de la gestación, el trofoblasto endoarterial invade el lumen de dichas arterias y forma tapones que

detienen el flujo de sangre materna hacia el espacio intervelloso, generando un estado de baja presión parcial de oxígeno que es necesario en la embriogénesis y la organogénesis placentaria del primer trimestre de embarazo (Huppertz, 2018). Finalizando este primer trimestre, los tapones se desintegran y, el trofoblasto endoarterial, tras una segunda invasión; se une, degrada y reemplaza al endotelio de las arterias espirales uterinas, eliminando sus fibras elásticas y musculatura lisa, y resultando en la pérdida de su elasticidad y contractibilidad vascular, así como del control vasomotor materno sobre ellas (Raymond y Peterson, 2011; Benirschke y col, 2012; Huppertz, 2018). El efecto neto, es el aumento del diámetro arterial próximo al espacio intervelloso, generando aberturas en forma de embudo que aumenta el flujo de sangre materna y disminuye la velocidad y presión con la que esta sangre perfunde a la placenta; protegiendo la integridad de los árboles vellosos, evitando la compresión de los capilares fetales y favoreciendo el tránsito de sustancias entre la madre y el feto. (Raymond y Peterson, 2011; Benirschke y col, 2012; Huppertz, 2018; Jensen y Chernyavsky, 2019). Así, estas arterias son transformadas a un sistema de circulación sanguínea de alto flujo y baja resistencia, necesario en un embarazo exitoso (Raymond y Peterson, 2011).

Por contraste, una interacción inadecuada del trofoblasto con el útero; en la que no se completan correctamente procesos como el anclaje placentario o la transformación arterial, está asociada, a un espectro patológico que, en sus peores casos, genera desprendimiento de la placenta en los abortos espontáneos, o, por hipoperfusión uteroplacentaria, favorece el desarrollo del estado preeclámpsico concomitante con restricción del crecimiento intrauterino (Raymond y Peterson, 2011; Benirschke y col, 2012; Huppertz, 2018).

Específicamente, este subtipo de preeclampsia, que suele aparecer en conjunto con restricción del crecimiento intrauterino y se identifica antes de las 34 semanas de embarazo, se

denomina preeclampsia de comienzo temprano (eoPE, de su acrónimo en inglés *–early onset preeclampsia–*) (Raymond y Peterson, 2011; Huppertz, 2018). Se postula, que la incapacidad de remodelar eficientemente la vasculatura uterina durante el primer trimestre de embarazo, causa intermitencia en el flujo de sangre materna hacia el espacio intervelloso y daño oxidativo en las vellosidades coriónicas por lesión de isquemia reperusión (Raymond y Peterson, 2011; Staff y Redman, 2018). Esto, induce la secreción placentaria de factores proinflamatorios, antiangiogénicos y de otras moléculas citotóxicas hacia la circulación materna, que propagarían el daño placentario y, al inducir disfunción endotelial así como una respuesta inflamatoria sistémica, darían origen a las deficiencias funcionales que ocurren en los diferentes órganos maternos al progresar la preeclampsia (Raymond y Peterson, 2011; Staff y Redman, 2018). Por otro lado, la condición preecláptica identificada a partir de las 34 semanas de embarazo en adelante y separada de la reducción del crecimiento intrauterino, es llamada preeclampsia de identificación tardía (Raymond y Peterson, 2011). Con pronósticos más favorables para la madre y el feto, en este subtipo no se evidencian disfunciones marcadas de la vasculatura uterina materna (Staff y Redman, 2018). Aunque, se propone que sí existe un daño oxidativo del tejido placentario producto de otras perturbaciones celulares, que ocurrirían luego de los procesos de remodelación trofoblástica y, que en conjunto con una predisposición materna a alteraciones vasculares periféricas e inflamatorias, originarían las manifestaciones comunes de la preeclampsia, que en este caso, se detectan en embarazadas con mayores edades gestacionales (Raymond y Peterson, 2011; Staff y Redman, 2018).

Como se ha presentado, la etiopatogenia de la preeclampsia no se ha dilucidado con singularidad, en general, se atribuye a una combinación de factores genéticos, inmunes y ambientales (Raymond y Peterson, 2011) Actualmente, se considera que ambas formas de

preeclampsia se encuentran bajo el mismo espectro patológico, y, aunque los procesos que en cada caso la originan, difieren en mecanismo y temporalidad, ambos subtipos están relacionados con el desarrollo de daño oxidativo sistémico en la gestante (Staff y Redman, 2018). Competente a esta introducción, es que este daño oxidativo modifica la estructura y función de lípidos y proteínas de las membranas plasmáticas de células sanguíneas y tejidos periféricos, lo cual, constituye un modelo de alteración de la homeóstasis gestacional que, explicaría, en parte, las deficiencias funcionales vistas en la condición preecláptica, e incluso, revelarían un posible blanco terapéutico (Abad y col, 2012).

Regulación Redox y Transporte de Ca^{2+}

Estrés Oxidativo y Peroxidación Lipídica

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros, que resulta en disrupción de los procesos de señalización y control redox o en daño molecular (Sies, 2015). Por oxidantes, se hace referencia a sustancias capaces de oxidar a otras, ya sea: extrayéndoles electrones o átomos de hidrógeno o añadiéndoles átomos de oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 2015). A nivel celular, dichos oxidantes están constituidos por las especies reactivas (RS, por su abreviación en inglés), un conjunto de sustancias con la característica común de ser más reactivas que el átomo o molécula del cual se derivan, por ejemplo: las especies reactivas de oxígeno (ROS, por su abreviación en inglés), se componen de aquellas moléculas derivadas del dioxígeno (O_2) más reactivas que él mismo, incluyendo radicales, sustancias de existencia independiente con al menos un electrón desapareado, como el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), o sustancias que no son radicales, pero que se producen de reacciones de radicales o reaccionan para producirlos, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Halliwell y Gutteridge, 2015). Por su

parte, un antioxidante se define como cualquier sustancia que detiene, previene o remueve el daño oxidativo sobre una molécula objetivo (Halliwell y Gutteridge, 2015). *In vivo*, los antioxidantes están compuestos por: moléculas proteicas, como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (Cat), que constituyen el principal sistema de regulación de las concentraciones de las ROS; y no proteicos, conformados por sustancias de baja masa molecular, como el glutatión y las vitaminas C y E, que actúan sobre diversas RS (Halliwell y Gutteridge, 2015; Chiarello y col, 2018).

En general, las RS presentan roles fisiológicos como moléculas de señalización en procesos de diferenciación y proliferación celular o como agentes destructores de microbios detectados por el sistema inmune (Chiarello y col, 2018). En aerobios saludables, existe una producción basal de RS que daña a las biomoléculas que los constituyen, las cuales son reparadas o reemplazadas por los mismos organismos (Halliwell y Gutteridge, 2015). Cuando la generación de RS supera a la capacidad reguladora del sistema antioxidante o el sistema reparador no puede renovar a las sustancias oxidativamente dañadas, se produce el estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2015), lo cual desencadena procesos que ponen en peligro la salud celular, induciendo, incluso, eventos de muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 2015).

El daño mediado por las RS, llamado daño oxidativo, es capaz de afectar a cualquiera de las biomoléculas: ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos y hasta ácido úrico (Halliwell y Gutteridge, 2015). Específicamente, el daño a los lípidos se denomina peroxidación lipídica y se define como la deterioración oxidativa de los lípidos (Halliwell y Gutteridge, 2015). De estos, aquellos que presentan más de un doble enlace entre carbonos adyacentes (C=C), llamados lípidos poliinsaturados, son los blancos más sensibles al ataque de las RS, aunque, igualmente, los lípidos monoinsaturados y saturados pueden oxidarse (Halliwell y Gutteridge, 2015). En el Anexo B se

desarrollan las reacciones generales asociadas a la peroxidación lipídica y las reacciones catalizadas por las enzimas antioxidantes SOD, GPx y Cat. En esencia, este proceso de oxidación consta de la degradación electrónica de los lípidos que constituyen las membranas plasmáticas, las membranas de organelos o las lipoproteínas, afectando a las proteínas asociadas a estas estructuras y, por propagación de productos tóxicos, a los ácidos nucleicos (Halliwell y Gutteridge, 2015). También, dichas lesiones pueden potenciarse por descontrol en la actividad o expresión de enzimas como las lipoxigenasas o ciclooxigenasas, que normalmente oxidan a los lípidos en procesos de señalización y transducción celular, pero que en ciertos estados de estrés favorecerían el daño oxidativo celular (Ayala y col, 2014).

Homeóstasis de Ca^{2+}

El calcio es, evolutivamente, un mensajero de señales celulares ubicuo entre los organismos (Carafoli y Krebs, 2016). En los espacios extracelulares, su concentración varía entre 2,1 a 2,6 mM y se encuentra en tres formas: ionizado (Ca^{2+}), coordinado a compuestos orgánicos y unido a moléculas inorgánicas (Carafoli y Krebs, 2016). Intracelularmente, el contenido total de calcio también se encuentra en el rango mM y bajo las mismas tres formas que en el medio extracelular (Carafoli y Krebs, 2016). Sin embargo, bajo condiciones estables, la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) es ≈ 100 nM, mientras que la concentración de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) es $\approx 1,5$ mM; esto, establece una razón de $[\text{Ca}^{2+}]_e/[\text{Ca}^{2+}]_c \approx 10^4$ (Carafoli y Krebs, 2016). Tal gradiente, representa la fuerza motriz que impulsa el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ como un mecanismo de señalización, que, además, puede variar sus patrones de amplitud, velocidad o espaciotemporalidad, permitiendo a través de dichas variaciones, regular múltiples moléculas y cascadas de transducción y, de esta manera, mediar diferentes actividades celulares (Berridge y col, 2000).

La distribución transmembrana de Ca^{2+} , resulta del equilibrio entre los mecanismos que incorporan Ca^{2+} al citoplasma desde el espacio extracelular o desde los reservorios intracelulares, denominados mecanismos «on»; y aquellos que, por el contrario, expulsan este Ca^{2+} del citoplasma hacia el espacio extracelular o hacia los reservorios intracelulares, llamados mecanismos «off» (Berridge y col, 2000). Simultáneamente, interviene el sistema de amortiguación de las variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Berridge y col, 2000). Dicho sistema, se compone de moléculas que actúan como tampones de Ca^{2+} ; uniendo y secuestrando al Ca^{2+} que entra a los espacios intracelulares durante las reacciones on y liberándolo durante las reacciones off; modificando, así, la amplitud y duración de las señales de Ca^{2+} (Berridge y col, 2000). Finalmente, entre estos eventos, se activan los procesos sensibles a Ca^{2+} ; aquellos que traducen el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en una respuesta celular (Berridge y col, 2000).

Consecuentemente, cuando la señal de Ca^{2+} se mantiene en el citoplasma durante más tiempo del necesario para desarrollar la actividad celular, se genera la sobrecarga de Ca^{2+} ; un estado tóxico que produce deterioro y muerte celular (Cerella y col, 2010). En términos generales, los daños por sobrecarga de Ca^{2+} citoplasmático son diversos, implicando: alteración de los ensamblajes supramoleculares cuya conformación estructural es dependientes de Ca^{2+} ; degradación biomolecular inducida por la activación de lipoxigenasas, fosfolipasas, proteasas o DNAsas; sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y extenuación energética; y agotamiento del Ca^{2+} del retículo endoplasmático o sarcoplasmático, generando estrés en este organelo que, junto con el resto de lesiones celulares, induciría autofagia y activaría rutas apoptóticas o produciría muerte necrótica (Cerella y col, 2010).

Entonces, mientras las reacciones que incorporan Ca^{2+} al citoplasma se componen principalmente de las actividades de canales catiónicos selectivos y no selectivos para Ca^{2+} ; y el

sistema de amortiguación está conformado por proteínas que enlazan reversiblemente a este ión; las reacciones que expulsan Ca^{2+} fuera del citoplasma, en cambio, se constituyen de las actividades de uniportadores, intercambiadores y bombas de Ca^{2+} (Brini y Carafoli, 2011). Ciertamente, estos dos últimos tipos de proteínas transportadoras, localizadas en la membrana plasmática y las membranas de organelos intracelulares, son fundamentales para mantener el gradiente transmembrana de Ca^{2+} estable y, por lo tanto, preservar la homeóstasis y funcionalidad celular (Cerella y col, 2010). Entre estas, únicamente aquellas proteínas transportadoras que se ubican en la membrana plasmática, son capaces de reducir el contenido total de calcio intracelular y mantenerlo en una concentración constante por tiempos prolongados (Carafoli y Krebs, 2016). De interés, es la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA, por su abreviación en inglés), una bomba celular que, entre las proteínas que expulsan Ca^{2+} fuera del citoplasma, es la entidad con mayor afinidad por el ión, siendo vital en establecer la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en el rango nM requerido en reposo (Hidalgo y Donoso, 2008).

Ca^{2+} -ATPasa de Membrana Plasmática

La PMCA es una enzima perteneciente a la superfamilia de las ATPasas de tipo P; un conjunto de proteínas transmembrana que transportan iones o lípidos a través de las membranas biológicas, al catalizar la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) en adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) (Palmgren y Nissen, 2011). En general, este grupo de enzimas presentan una única subunidad catalítica que es transitoriamente fosforilada durante cada ciclo catalítico, a través de la transferencia del fosfato gamma del ATP a un residuo conservado de ácido aspártico, formando un fosfato de acilo de alta energía (Guerini, 1998; Palmgren y Nissen, 2011). Estequiométricamente, la PMCA expulsa del citoplasma al espacio extracelular 1 Ca^{2+} por cada ATP hidrolizado (Guerini, 1998). Entonces, su ciclo catalítico, descrito bajo el modelo común para

las ATPasas de tipo P, indica que la PMCA alterna su conformación entre dos estados: E_1 , que presenta sitios de unión iónica con alta afinidad para Ca^{2+} expuestos al citoplasma; y, E_2 , en el que estos mismos sitios de unión son de baja afinidad para Ca^{2+} y están expuestos al medio extracelular (Brini y Carafoli, 2009; Palmgren y Nissen, 2011). Resumidamente, la unión del Ca^{2+} citoplasmático a E_1 genera modificaciones estructurales que favorecen la fosforilación de la enzima y su conversión a la conformación de alta energía $E_1\sim PCa^{2+}$ (Brini y Carafoli, 2009). Esta energía es la fuerza motriz para los cambios conformacionales que resultan en la pérdida de afinidad por el Ca^{2+} y en la abertura de un canal por el cual se expulsa a este ión al medio extracelular, causando, así, la transición de la fosfoenzima de la conformación $E_1\sim P$ a la $E_2\sim P$ (Palmgren y Nissen, 2011). Luego, la desfosforilación y liberación del fosfato inducen movimientos estructurales que resultan en la conversión de la enzima al estado E_2 y, finalmente, de vuelta al estado E_1 (Palmgren y Nissen, 2011).

La PMCA es universalmente expresada en todas las células eucariotas, siendo el producto de una familia de genes (Bruce, 2018). En mamíferos, cuatro genes codifican para los cuatro productos primarios; las isoformas del 1 al 4 (Calì y col, 2017). Pero, a partir de los transcritos respectivos de cada gen; procesos de corte y empalme alternativos aumentan el número de isoformas a más de treinta, difiriendo en su distribución y abundancia entre tejidos y etapas del desarrollo (Calì y col, 2017). Estructuralmente, se predice que la PMCA está constituida por diez segmentos transmembrana, dos grandes lazos intracelulares y ambas colas amino y carboxiterminal dispuestas hacia el citoplasma (Brini y Carafoli, 2011).

La característica que distingue a la PMCA del resto de las ATPasas de tipo P, es el amplio abanico de moléculas y mecanismos de regulación a los que se ve sometida, producto de los numerosos sitios de interacción en su estructura (Lopreiato y col, 2014). De estos procesos, se

destaca su activación por calmodulina (CaM), la cual, es una proteína soluble enlazadora de Ca^{2+} que actúa como el sensor principal de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y, que al asociarse a la PMCA, aumenta la afinidad (K_m) por Ca^{2+} y la velocidad de reacción máxima ($V_{\text{máx}}$) de la enzima transmembrana (Calì y col, 2017). De hecho, en condiciones de no estimulación, la PMCA se encuentra autoinhibida, con un $K_m > 10 \mu\text{M}$ para Ca^{2+} que le tendría inactivada en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de reposo (Carafoli, 1992; Guerini, 1998). Sin embargo, la CaM, sensible a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de 10^{-7} M , al unirse a la cola carboxiterminal de la PMCA, induce cambios conformacionales en ella que resultan en un $K_m < 0,5 \mu\text{M}$ para Ca^{2+} que, en contraste, sí le permitiría a esta proteína transportadora regular finamente la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y mantenerla estable en el rango nM (Carafoli, 1992; Guerini, 1998; Chin y Means, 2000). Igualmente, otras proteínas activan a la PMCA, como la proteína quinasa A, que disminuye su K_m por Ca^{2+} y aumenta su $V_{\text{máx}}$, o la proteína quinasa C, que únicamente incrementa su $V_{\text{máx}}$ (Calì y col, 2017). Adicionalmente, los fosfolípidos ácidos como la fosfatidilserina o el fosfatidilinositol, también son capaces de estimular a la PMCA, al disminuir su K_m por Ca^{2+} (Lopreiato y col, 2014). En particular, esta bomba así como el resto de sistemas transportadores de Ca^{2+} , es sensible a cambios en su estructura y actividad por efectos oxidativos (Hidalgo y Donoso, 2008).

Proteínas Transportadoras de Ca^{2+} y Modificación Oxidativa

Las RS son capaces de interactuar con las proteínas encargadas de regular la actividad del Ca^{2+} citoplasmático, y, generalmente, los resultados de tal interacción comprenden el desarrollo de señales de Ca^{2+} por tiempos suficientes para producir periodos de sobrecarga de Ca^{2+} citoplasmático que amenacen la salud celular (Hidalgo y Donoso, 2008). Esto, suele producirse como consecuencia de un desbalance redox que estimula las reacciones on e inhibe las reacciones off (Hidalgo y Donoso, 2008).

La entrada de Ca^{2+} del medio extracelular al citoplasma se produce usualmente a través de distintos tipos de canales permeables a Ca^{2+} (Hidalgo y Donoso, 2008). Entre estos, se encuentran los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje; un conjunto de canales ubicados en la membrana plasmática de células excitables que aumentan su conductancia a Ca^{2+} en respuesta a la despolarización transmembrana que fisiológicamente ocurre en estas células (Hidalgo y Donoso, 2008). De estos, los canales dependientes de voltaje tipo L son los más estudiados en términos de oxidación de su estructura y variación de su actividad (Hidalgo y Donoso, 2008). Se postula que el tratamiento con agentes oxidantes amplifica las corrientes de dichos canales, debido a la oxidación de los grupos tiol de residuos de cisteína libres en su estructura (Hidalgo y Donoso, 2008; Görlach y col, 2015). Asimismo, a nivel de la membrana plasmática, otros canales permeables a Ca^{2+} , como los canales de Ca^{2+} operados por depósito, que se activan tras el vaciamiento del Ca^{2+} de los reservorios intracelulares; o los canales receptores de potencial transitorio, que abren sus poros a la entrada intracelular de cationes tras censar distintos tipos de variaciones energéticas; son estimulados por modificaciones oxidativas de su estructura o de la membrana plasmática en la que residen (Hidalgo y Donoso, 2008; Choi y col, 2014; Görlach y col, 2015). Igualmente, se predice que esta activación es debido a modificaciones redox de residuos de cisteína específicos para estos canales (Hidalgo y Donoso, 2008).

En cuanto a los canales que transportan Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares hacia el citoplasma, se destacan los ubicados en la membrana del retículo endo o sarcoplasmático: los receptores de inositol trifosfato (IP_3R , por su abreviación en inglés) en células no excitables y los receptores de rianodina (RyR , por su abreviación en inglés) en células excitables (Görlach y col, 2015).

Una de las vías de señalización más común entre las células, es la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato produciendo diacilglicerol e IP_3 (Hidalgo y Donoso, 2008). Este IP_3 difunde hacia el citoplasma y se une específicamente a los IP_3R del retículo endoplasmático (Hidalgo y Donoso, 2008). Producto de esta interacción, los IP_3R se abren y permiten el paso de corrientes de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático hacia el citoplasma a favor del gradiente electroquímico del catión (Hidalgo y Donoso, 2008). Dependiendo del tipo celular, esta ruta de señalización está asociada a distintos procesos y funciones (Hidalgo y Donoso, 2008). En general, el tratamiento con agentes oxidantes, entre los que se incluyen sustancias endógenas como las ROS, promueve el transporte de Ca^{2+} a través de los IP_3R (Hidalgo y Donoso, 2008; Görlach y col, 2015). Están sugeridos diversos mecanismos de interacción entre los agentes oxidantes y los IP_3R ; cambios conformacionales en la estructura de los canales o modificaciones redox directas sobre residuos de cisteína libres, aumentarían la sensibilidad de los IP_3R por el IP_3 y estimularía el transporte de Ca^{2+} (Hidalgo y Donoso, 2008; Görlach y col, 2015).

Por su parte, los RyR, involucrados en actividades como la contracción muscular o la secreción, presentan grupos tiol hiperreactivos en residuos de cisteína en su estructura, que hacen a este grupo de canales de Ca^{2+} altamente sensible a modificaciones redox tanto de su estructura como de su capacidad de transporte (Hidalgo y Donoso, 2008). De hecho, estas proteínas son consideradas sensores del estado redox celular (Hidalgo y Donoso, 2008). Ciertamente, desequilibrios a favor de las especies oxidadas en los sistemas de tampón redox celular, así como ataques directos de las RS sobre los grupos tiol de estos canales, por medio de mecanismos como la S-nitrosación, S-glutionilación o la formación de puentes disulfuro, se relaciona a un transporte amplificado de Ca^{2+} hacia el citoplasma (Hidalgo y Donoso, 2008; Görlach y col, 2015).

También localizada intracelularmente, aunque perteneciente al grupo de las proteínas transportadoras involucradas en las reacciones off, la Ca^{2+} -ATPasa de retículo endo o sarcoplasmático (SERCA, por su abreviación en inglés), es una enzima transmembrana que acopla la energía química liberada en la hidrólisis de 1 ATP al transporte vectorial desde el citoplasma hacia el retículo endo o sarcoplasmático de 2 Ca^{2+} durante cada ciclo catalítico (Tran y col, 2009). En comparación con la PMCA, la SERCA presenta mayor capacidad de transporte y menor afinidad por Ca^{2+} , siendo vital en la reintroducción de Ca^{2+} al retículo tras procesos de señalización mediados por Ca^{2+} (Hidalgo y Donoso, 2008). Estructuralmente, las distintas isoformas de esta bomba presentan entre 22 y 28 residuos de cisteína, cuyo estado redox es fundamental para mantener su actividad enzimática (Hidalgo y Donoso, 2008). Se señala que, a través de la oxidación de dichos residuos por parte de las ROS y las especies reactivas de nitrógeno (NOS, por su abreviación en inglés), la actividad de la SERCA se reduce; proponiéndose una disminución de la capacidad de la bomba para enlazar ATP como un posible mecanismo de inhibición (Hidalgo y Donoso, 2008; Görlach y col, 2015).

Antes de considerar los daños oxidativos sobre la PMCA, cabe resaltar la presencia del intercambiador $\text{Na}^+ \text{Ca}^{2+}$ (NCX) (Noble y Herchuelz, 2007). Esta es una proteína que, así como la PMCA, se encuentra en la membrana plasmática y expulsa Ca^{2+} del citoplasma hacia el medio extracelular (Noble y Herchuelz, 2007). A diferencia de la PMCA, este transporte en contra del gradiente electroquímico de Ca^{2+} no es acoplado a la hidrólisis de ATP, sino al transporte de Na^+ a favor de su gradiente electroquímico transmembrana (Noble y Herchuelz, 2007). En términos estequiométricos, el NCX intercambia 3 Na^+ desde el espacio extracelular al citoplasma por 1 Ca^{2+} que se transporta en sentido contrario (Guerini, 1998). Esta movilización iónica electrogénica y sensible al potencial transmembrana, presenta la mayor capacidad de expulsión de Ca^{2+} de las

proteínas involucradas en las reacciones off (Guerini, 1998). Además, puede invertir su dirección de intercambio iónico y contribuir a la entrada de Ca^{2+} al citoplasma bajo determinadas condiciones (Noble y Herchuelz, 2007). En cuanto a la modificación de su actividad por procesos oxidativos, se ha encontrado que el tratamiento de con agentes oxidantes, disminuye el flujo de Ca^{2+} dependiente de Na^+ en axones de calamar dializados (DiPolo y Beaugé, 2011).

Finalmente, la PMCA, así como el resto de proteínas transportadoras de Ca^{2+} , es sensible a la alteración de su actividad por modificación oxidativa (Hidalgo y Donoso, 2008). Semejantemente, se propone que las ROS y las NOS pueden inhibir a la PMCA tras atacar residuos de cisteína y tirosina, y entre los mecanismos que explican dicha inhibición, se postula que la disminución de su afinidad por el ATP, reduciría su capacidad de transporte por deficiencia energética; o la oxidación de la CaM, también sensible a modificaciones redox, incapacitaría la adecuada unión de esta proteína a la bomba y disminuiría su capacidad de estimulación (Hidalgo y Donoso, 2008; Görlach y col, 2015).

Ca^{2+} -ATPasa de Membrana Plasmática, Peroxidación Lipídica y Preeclampsia

Adicional al daño oxidativo directo, la PMCA es funcionalmente sensible a la degradación oxidativa de los lípidos de la membrana plasmática, proceso característico de la preeclampsia (Abad y col, 2012). Dicho fenómeno, es base fundamental para este trabajo, teniendo que en la gestante preecláptica y en comparación con la gestante normotensa:

- 1) La actividad Ca^{2+} -ATPasa se reduce en ambas membranas del sincitiotrofoblasto, la basal y la de la microvellosidad, sin variaciones en la expresión de la bomba pero concomitante con un incremento de los niveles de peroxidación lipídica de las membranas (Abad y col, 2014).

2) La actividad ATPásica y transporte activo de Ca^{2+} se reducen en un 50% en membranas aisladas o fantasmas y vesículas invertidas de glóbulos rojos, respectivamente (Teppa-Garrán y col, 2004). Además, dichas diferencias no están asociadas a una disminución en la expresión de la PMCA, ni a modificaciones aparentes de su estructura dado que no se encuentran variaciones en su masa molecular, ni a su estimulación por CaM, etanol o ambos compuestos (Oviedo y col, 2006). En contraste, estas alteraciones funcionales si son concurrentes con un aumento de la peroxidación lipídica de estas membranas (Oviedo y col, 2006). Ciertamente, estos glóbulos rojos afectados presentan mayor concentración de Ca^{2+} intracelular (Sowers y col, 1989).

Entonces, de acuerdo al modelo de propagación de daño oxidativo explicado anteriormente, en conjunto con las evidencias recién presentadas, se propone que en la preeclampsia, la peroxidación lipídica de los tejidos periféricos genera una disminución de la capacidad de remoción de Ca^{2+} citoplasmático por parte de la PMCA, generando un estado de sobrecarga de Ca^{2+} que en conjunto con los compuestos tóxicos producidos de las reacciones de peroxidación lipídica, ocurrirían lesiones celulares que, cuando menos, estarán asociadas al colapso funcional de los distintos órganos de la gestante preecláptica (Abad y col, 2012). Además, dada la naturaleza del daño oxidativo, se sugiere que el tratamiento con un antioxidante capaz de inhibir el aumento de los niveles de peroxidación lipídica, pudiera revertir las alteraciones funcionales de la PMCA y restablecer la homeóstasis de Ca^{2+} intracelular (Abad y col, 2012). En efecto, el Laboratorio de Bioenergética Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC, ha evaluado la capacidad antioxidante *in vitro* del sulfato de magnesio (MgSO_4), el agente anticonvulsionante de elección para las gestantes pre y eclápticas (Abad y col, 2012). Asimismo, recientemente se ha ensayado la capacidad antioxidante del gluconato de magnesio (MgGl_2), como una alternativa de consumo oral al intravenosa o intramuscularmente suministrado MgSO_4 .

Antecedentes

Sales de Mg²⁺ Antioxidantes

Sulfato de Magnesio

La sustancia de elección para inhibir las convulsiones desarrolladas en la eclampsia o prevenirlas en condiciones de preeclampsia severa, es el MgSO₄ (Chiarello y col, 2018). Este compuesto también actúa como agente tocolítico, vasodilatador e hipotensor de efecto leve, teniendo que su uso está asociado a una reducción de la incidencia de hemorragias intraventriculares y la mortalidad de recién nacidos provenientes de embarazos preeclámpticos (Abad y col, 2015).

El origen de las convulsiones en eclampsia no ha sido dilucidado (Wasseff, 2009). Una de las explicaciones sugiere que durante la preeclampsia se liberan moléculas que hiperexcitan al tejido nervioso, lo cual, causa una predisposición neuronal a sufrir descargas eléctricas espontáneas, necesarias para los ataques epilépticos (Wasseff, 2009). Por ejemplo, la neuroquinina B, un neuropéptido liberado por la placenta de manera exacerbada en la preeclampsia, es capaz de activar receptores excitatorios de glutamato, lo cual amplificaría la actividad de las neuronas afectadas (Wasseff, 2009). Además, la disfunción endotelial preeclámptica estimula la excreción de moléculas con efectos vasopresores, como las endotelinas, que favorecen el vasoespasmo y deterioro neural (Wasseff, 2009). A esto se le suma el rol de las citoquinas proinflamatorias también liberadas en exceso por la placenta durante la preeclampsia, como algunas interleuquinas o el factor de necrosis tumoral alfa, capaces de estimular la sobreexpresión de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), disminuir la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y alterar la integridad neuronal, entre otros mecanismos dañinos (Wasseff, 2009; Galic y col, 2012).

Posiblemente, una combinación de diversos grados de alteraciones excitatorias neurales y lesiones endoteliales, en conjunto con daños por hipoperfusión y edema cerebral, asociados a cambios hemodinámicos hipertensivos, causarían la aparición de convulsiones en la eclampsia (Wasseff, 2009; Cipolla y Kraig, 2011).

Igualmente, no existe un consenso sobre el mecanismo de acción para la actividad inhibitoria y profiláctica del MgSO_4 (Chiarello y col, 2018). Primeramente, el magnesio ionizado (Mg^{2+}) actúa como un agente vasodilatador, al inhibir distintos canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática del músculo liso vascular; como canales dependientes de voltaje, dependientes de receptor o de fuga (Altura y col, 1987). Netamente, esto reduce el flujo de Ca^{2+} al citoplasma y, por tanto, inhibe la actividad contráctil (Euser y Cipolla, 2009). Consecuentemente, se disminuyen las resistencias cerebro y periférica vascular y se mitiga la hipertensión (Euser y Cipolla, 2009). Este efecto también pudiese ocurrir en el endotelio cerebral, donde se ha reportado una reducción de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica tras el tratamiento con MgSO_4 (Euser y Cipolla, 2009). Al disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en el citoplasma endotelial, se inhibe su contracción y, así, la abertura de las uniones estrechas asociadas al citoesqueleto de actina (Euser y Cipolla, 2009). Esto limitaría el transporte paracelular de moléculas que estimularían el daño cerebral y las convulsiones (Euser y Cipolla, 2009). Finalmente, el Mg^{2+} es capaz de actuar como un antagonista de los receptores NMDA, lo cual insensibilizaría a la red neural de sufrir estallidos de impulsos nerviosos, como los ocurrentes en los ataques epilépticos (Euser y Cipolla, 2009).

Como sea el caso, la concentración de Mg^{2+} en la sangre materna y la fetal en embarazos normales, es de 0,75 y 0,83 mM, respectivamente (Chiarello y col, 2018). Sin embargo, estos valores cambian en preeclampsia a 0,66 mM en la sangre materna y 1,01 mM en la sangre fetal (Chiarello y col, 2018). Se sugiere que la acumulación de Mg^{2+} en la circulación fetal pudiera ser

el resultado de un metabolismo de magnesio alterado por el feto en esta condición materna (Chiarello y col, 2018). De hecho, déficit materno de Mg^{2+} es considerado un factor de riesgo para la patogénesis de la preeclampsia (Chiarello y col, 2018). Por tanto, mantener niveles maternos de Mg^{2+} en el rango fisiológico: 0,75 a 1,1 mM, pudiera ayudar a contrarrestar los efectos adversos vistos de esta condición (Chiarello y col, 2018).

Como mencionado anteriormente, se ha ensayado la actividad antioxidante del $MgSO_4$, como una opción a los mecanismos descritos, entre estos experimentos, destaca:

Abad (2005), evalúa la actividad ATPasa y el transporte activo de Ca^{2+} en fantasmas y vesículas invertidas de glóbulos rojos, respectivamente; los niveles de peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos; y la resistencia osmótica eritrocitaria; a partir de los glóbulos rojos de gestantes preeclámpticas en comparación con gestantes sin complicaciones. Encuentra menores actividades ATPasas y de transporte activo de Ca^{2+} en las membranas de glóbulos rojos aisladas de las gestantes preeclámpticas, al igual que una disminución de la resistencia osmótica eritrocitaria y un incremento en los niveles de peroxidación lipídica. Sin embargo, el tratamiento de los glóbulos rojos y sus fantasmas con $MgSO_4$, mitiga las diferencias entre las variables medidas. Asimismo, ensaya la actividad Ca^{2+} -ATPasa y los niveles de peroxidación lipídica de estas membranas tras ser irradiados durante 60 min con luz ultravioleta (UV) en presencia de $MgSO_4$; o en ausencia de este compuesto, pero tras ser incubados durante 24 h con él, luego de la irradiación con luz UV. Nuevamente, el $MgSO_4$ mitiga el daño causado, protegiendo a las membranas en un caso, y recuperando su estabilidad en el otro, de acuerdo a las variables medidas. En consecuencia, se postula que el $MgSO_4$ protege y estabiliza las membranas de glóbulos rojos de mujeres preeclámpticas en un grado tal, que recupera la funcionalidad de la PMCA al inhibir el daño oxidativo.

Esta capacidad antioxidante es luego caracterizada a través de simulaciones de dinámica molecular (Fernández y col, 2017). Análisis de sistemas integrados por $\cdot\text{OH}$, MgSO_4 y membranas lipídicas, encuentran que el Mg^{2+} se aproxima a los grupos fosfatos de las membranas y genera cambios fisicoquímicos en ellas: aumenta su grosor, disminuye su área y establece una alta resistencia a una compresión uniforme (Fernández y col, 2017). Es decir, aumenta la rigidez de las membranas y disminuye la probabilidad de que el $\cdot\text{OH}$ interactúe con algún H alílico de sus colas de ácidos grasos (Fernández y col, 2017). Además, el MgSO_4 también fungiría como secuestrador de ROS al interactuar con el $\cdot\text{OH}$ y estabilizarlo a través de la resonancia de su grupo SO_4^{2-} (Fernández y col, 2017).

El MgSO_4 usado en condiciones de preeclampsia severa y eclampsia es suministrado intravenosa o intramuscularmente (Lu y Nightingale, 2000). En general, un aumento en la concentración de Mg^{2+} en el plasma sanguíneo materno ($[\text{Mg}^{2+}]_p$), a valores entre 2 a 4 mM, es considerado como terapéutico para inhibir y prevenir las convulsiones (Lu y Nightingale, 2000). El envenenamiento por MgSO_4 es inusual cuando se suministra correctamente, aunque para valores de $[\text{Mg}^{2+}]_p$ entre 3,8 y 5 mM, ya se manifiestan síntomas transitorios y leves como: dolor de cabeza, visión borrosa, náusea, nistagmo, letargo y retención urinaria y fecal (Lu y Nightingale, 2000). En algunos casos, estas concentraciones también presentan pérdida del reflejo patelar (Lu y Nightingale, 2000). Luego, para $[\text{Mg}^{2+}]_p$ entre 5 a 6,5 mM, ocurre parálisis respiratoria (Lu y Nightingale, 2000). Mientras que la actividad cardíaca se altera a partir de $[\text{Mg}^{2+}]_p$ entre 5 a 6,5 mM, finalizando en paro cardiorrespiratorio para $[\text{Mg}^{2+}]_p > 12,5$ mM (Lu y Nightingale, 2000).

Considerando el peligro asociado a la administración del MgSO_4 , en especial durante emergencias hospitalarias, donde debe lidiarse con gestantes en estados críticos, padeciendo de ataques epilépticos o en riesgo de convulsiones que deben tratarse inmediatamente y, sumado, a

que esta sal no puede ser consumida por vía oral sin provocar diarrea, se plantea como vital buscar alternativas en otros compuestos de Mg^{2+} , que tengan efectos similares a los del $MgSO_4$.

Gluconato de Magnesio

El Laboratorio de Bioenergética Celular se ha dedicado no solo a caracterizar la capacidad antioxidante del $MgSO_4$, sino a buscar alternativas en otras sales de Mg^{2+} . A partir de esto, se ha encontrado el gluconato de magnesio ($MgC_{12}H_{22}O_{14}$, que en este trabajo se abrevia como $MgGl_2$); un suplemento oral de Mg^{2+} que se presenta como alternativa al $MgSO_4$ en términos de capacidad antioxidante. Entre las investigaciones realizadas, se destacan dos:

Rangel y col (2015), ensayan la actividad Ca^{2+} -ATPasa de las membranas basal y de la microvellosidad, aisladas de explantos placentarios de gestantes normotensas e incubados en atmósferas de 8 % O_2 o normoxia o 2 % O_2 o hipoxia en presencia o ausencia de 4 mM $MgGl_2$ durante 18 h a 37 °C. La actividad Ca^{2+} -ATPasa reducida en los explantos incubados en hipoxia en comparación con la actividad de los explantos incubados en normoxia, es recuperada a valores semejantes a los de la condición normóxica, tras el tratamiento con $MgGl_2$.

Ampueda-Carrero (2015), evalúa: la actividad Ca^{2+} -ATPasa y los niveles de peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos, y la resistencia osmótica eritrocitaria; usando glóbulos rojos provenientes de gestantes preeclámpticas y normotensas. Encuentra que la esperada diferencia de estos parámetros entre ambos grupos, es revertida a valores similares tras la incubación con 4 mM $MgGl_2$ por 24 h. La capacidad antioxidante demostrada por el $MgGl_2$ es semejante a la anteriormente ensayada para el $MgSO_4$; siendo igualmente capaz de revertir el daño oxidativo a los lípidos de membrana y recuperar la actividad Ca^{2+} -ATPasa tanto para las incubaciones de glóbulos rojos como para las de sus fantasmas.

En vista de lo presentado y para continuar ensayando la capacidad antioxidante del $MgCl_2$, se propone un modelo *in vitro* de peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos usando luz UV a diferentes tiempos en presencia de $MgCl_2$; o en ausencia de este, pero usado para incubaciones posteriores con las membranas para un determinado tiempo de irradiación. Evaluando en principio los niveles de peroxidación lipídica para, a partir de esto, ensayar la actividad Ca^{2+} -ATPasa de dichas membranas irradiadas por un tiempo determinado.

Objetivos

Objetivo General

Caracterizar el efecto del $MgCl_2$ sobre los niveles de peroxidación lipídica y la actividad Ca^{2+} -ATPasa en fantasmas de glóbulos rojos de mujeres sanas irradiados con luz UV.

Objetivos Específicos

Evaluar los niveles de peroxidación lipídica y la actividad Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos de mujeres sanas irradiados con luz UV en presencia de $MgCl_2$.

Estimar los niveles de peroxidación lipídica y la actividad Ca^{2+} -ATPasa en fantasmas de glóbulos rojos de mujeres sanas irradiados con luz UV tras incubar posteriormente con $MgCl_2$.

Materiales y Métodos

Donantes y Recolección de Muestras de Sangre

Las donantes de sangre se integraron de 11 mujeres no embarazadas y sin sospecha de estarlo, de 22 a 26 años de edad, libres de patologías agudas y crónicas, en fase menstrual sin sangrado vaginal, con al menos 5 meses sin consumo de anticonceptivos y con al menos 10 h de ayuno para el momento de la extracción de sangre. Dicha extracción se realizó por venopunción en alguno de los brazos de las donantes, en al menos una ocasión, extrayendo entre 15 a 20 mL de sangre por cada punción y vaciando la sangre extraída en tubos cónicos Falcon de 50 mL, a los que previamente se les agregó 300 μ L de heparina a 2 U/mL. Todas las donantes de sangre firmaron un consentimiento válido antes de participar en el estudio. En el Anexo C se muestra dicho consentimiento.

Aislamiento del Paquete de Glóbulos Rojos

La sangre heparinizada se lavó con solución salina isotónica 150 mM NaCl y 10 mM Tris-HCl ajustado a pH 7,5 a 0 °C, a una relación de 2 volúmenes de solución salina por 1 volumen de sangre, y luego se centrifugó a 12.000 x g en centrifuga de alta velocidad Avanti J-26 XP durante 3 min a 4 °C. Después, el plasma y la capa leucocítica se descartaron, mientras que la fracción de glóbulos rojos se lavó nuevamente con solución salina y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Dicho procedimiento se realizó un total de 3 veces.

Preparación de Fantasmas de Glóbulos Rojos

Los fantasmas de glóbulos rojos se prepararon por modificación del método osmótico de lisis eritrocitaria a baja temperatura (Heinz y Hoffman, 1965). El paquete de glóbulos rojos se

suspendió por 20 min bajo agitación constante en 9 volúmenes de solución hipotónica 0,1 mM EDTA y 17 mM Tris-HCl ajustado a pH 7,5 a 0 °C. Después, la suspensión se centrifugó a 48.000 x g durante 60 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se descartó y el sedimento se resuspendió nuevamente en solución hipotónica y se centrifugó a igual fuerza centrífuga y temperatura pero a menor tiempo. Repitiéndose las centrifugaciones a tiempos decrecientes hasta que el sedimento presentó un color crema libre de tonos rosados. Este sedimento, constituye a los fantasmas de glóbulos rojos, los cuales se guardaron a -20 °C hasta su uso.

Cuantificación de Proteínas

La determinación de la cantidad de proteínas en los fantasmas de glóbulos rojos se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para esto, se empleó el reactivo azul brillante de Coomassie G-250 (CBBG, por su abreviación en inglés, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Primeramente, 10 µL de las suspensiones de fantasmas descongelados se depositaron por cuadruplicado en tubos a los que se les añadió 790 µL de agua (H₂O) desionizada. Luego, se agregó a dichos tubos 200 µL del CBBG, se agitaron y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, del medio de reacción se sirvieron 200 µL en microplacas de 96 pozos para medir la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 595 nm en un lector Biotek µQuant. La curva patrón se elaboró usando 25, 50, 100, 200, 400, 600 y 800 µL de albúmina sérica bovina a 25 µg/mL.

Irradiación de luz UV

El tratamiento de inducción de peroxidación lipídica en los fantasmas de glóbulos rojos, se realizó por modificación del método de irradiación de luz UV monocromática sobre membranas plasmáticas (Kako y col, 1988). Para esto, 1 mL de la suspensión de fantasmas ajustados a una

concentración proteica de 0,9 a 1,1 mg/mL se sirvió en viales de vidrio de 40 x 25 mm, lo que resultó en un espesor de 6 mm para las suspensiones de fantasmas. Estos viales se colocaron en una cámara con hielo y en un ambiente oscuro, y se irradiaron a $\lambda = 254$ nm por 10, 15, 30, 45 o 60 min, con una lámpara de luz UV Mineralight, situada a unos 2 cm de los viales. Los fantasmas fueron irradiados en presencia o ausencia de 200 μ M butilhidroxitolueno (BHT) o 4 mM $MgCl_2$ bajo dos modalidades. En la primera, la irradiación de los fantasmas ocurrió en presencia de estos compuestos para los distintos tiempos ensayados. En la segunda, los fantasmas se irradiaron durante un único tiempo en ausencia de estos compuestos, para luego incubarse por 24 h en nevera y bajo agitación constante con $MgCl_2$.

Ensayo de Cuantificación de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico

La estimación de los niveles de peroxidación lipídica se realizó a través del ensayo de cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por su abreviación en inglés). En este ensayo se induce térmicamente y en condición ácida, la amplificación del daño oxidativo sufrido previamente por los lípidos que constituyen a los fantasmas de glóbulos rojos. Esto ocasiona la liberación de malondialdehído (MDA) a partir de los lípidos peroxidados. Tal MDA, forma un complejo de color rosado con el TBA bajo las condiciones del medio. Dicho complejo es cuantificable espectrofotométricamente y representa el grado de deterioro oxidativo de los fantasmas previo al inicio del ensayo (Feix y col, 1991).

Inicialmente, a tubos de microcentrífuga Eppendorf se les agregó: 250 μ L de las suspensiones individuales de fantasmas, con una concentración proteica de 0,9 a 1,1 mg/mL y lavadas 3 veces a 48.000 x g durante 20 min y 4 °C con PBS 150 mM NaCl y 10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 ajustado a pH 7,45 a 25 °C; 50 μ L de 250 mM BHT y 375 μ L de ácido

tricloroacético al 20 %. Los tubos se mantuvieron en hielo por 10 min. Luego, se centrifugaron a 16.000 x g en microcentrifugas Eppendorf 5415 C, 5414 o Spectrafuge 16M durante 10 min a temperatura ambiente. Del sobrenadante se tomaron 500 μL y se agregaron en tubos Pyrex cónicos a los que se les agregó 250 μL de TBA al 1,5 %. Después, los tubos se incubaron en baño de agua hirviente por 15 min. Transcurrido ese tiempo, se dejaron enfriar y, finalmente, se extrajeron 200 μL de los tubos y se sirvieron en microplacas de 96 pozos para determinar su absorbancia a $\lambda = 532 \text{ nm}$ en un lector Biotek μQuant , contra un blanco tratado de igual forma, pero que no contenía la preparación de fantasmas. La curva de calibración se preparó usando el 1,1,3,3-tetrametoxipropano como estándar. Los resultados se expresarán como nmoles de MDA/mg de proteína.

Actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de Fantasmas de Glóbulos Rojos

La actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos se estimó por modificación del ensayo de cuantificación espectrofotométrica del azul de molibdeno formado a partir del Pi liberado en dos medios de reacción enzimática (Marín y col, 1986). En uno de los medios, llamado medio I, el Pi liberado por la hidrólisis de ATP en presencia de Mg^{2+} y ausencia de Ca^{2+} y CaM, representa la actividad Mg^{2+} -ATPasa de las membranas. El valor de esta actividad se sustrae del valor de la actividad del medio II, en el que se añade las sustancias faltantes. La actividad resultante, así calculada, representa la actividad adenosín trifosfatasa de la Ca^{2+} -ATPasa estimulada por Ca^{2+} y CaM. Para iniciar dichas reacciones, las suspensiones de membranas, descongeladas y ajustadas a una concentración de proteínas de 0,4 a 0,8 mg/mL en 100 μL , se añadieron separadamente y por cuadruplicado a tubos que ya contenían 400 μL de alguno de los medios y habían sido incubados a 37 °C en baño María. En 500 μL , el medio I se compuso de: 50 mM Tris-HCl ajustado a pH 7,45 a 37 °C; 2 mM Tris-ATP, 3 mM MgCl_2 , 80 mM NaCl, 15 mM

KCl, 0,1 mM EGTA y 0,1 mM ouabaína. El medio II, por su parte, mantuvo la composición del medio I más 0,81 mM CaCl₂ y 0,1 μM CaM. Luego de 30 min se detuvo la reacción al añadirse a los tubos 300 μL de una solución fría en hielo compuesta por: 0,72 % dodecilsulfato sódico, 0,48 % ácido molíbdico y 2,86 % ácido ascórbico, los tubos se colocaron inmediatamente en hielo y se les agregó a los blancos que corrían en paralelo 100 μL de las suspensiones de fantasmas. Transcurrido 10 min se adicionó a los medios 200 μL de una solución estabilizadora que contuvo: 2,5 % arsenito de sodio, 2,5 % citrato de sodio y 2,5 % ácido acético y los tubos se recalentaron a 37 °C por 10 min en baño María. Por último, se sirvieron 200 μL del contenido de los tubos en microplacas de 96 pozos y se midió la absorbancia a $\lambda = 705$ nm en un lector Biotek μQuant. La actividad Ca²⁺-ATPasa se expresó como nmoles de Pi/mg de proteína·min de reacción.

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos de los datos presentados en este trabajo, se realizaron usando la prueba *t* de Student o la prueba de análisis de varianza. Todos los resultados se expresan como media ± error estándar (EE); siendo *n* el número de muestras ensayadas para cada experimento.

Resultados

Los resultados se presentarán bajo el siguiente esquema:

1. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV sobre los niveles de peroxidación lipídica y actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos.
2. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV sobre los niveles de peroxidación lipídica y actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos, en ausencia y presencia del antioxidante BHT.
3. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV sobre los niveles de peroxidación lipídica y actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos, en ausencia y presencia de MgCl_2 .
4. Efecto de la preincubación con 4 mM MgCl_2 durante 24 h sobre los niveles de peroxidación lipídica y actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV durante 45 min.

1. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV sobre los niveles de peroxidación lipídica y la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos

En la Figura 1 se muestran los niveles de peroxidación lipídica de fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV de $\lambda = 254$ nm durante 0, 10, 15, 30, 45 y 60 min. Para $t \geq 30$ min, el incremento en los productos finales de peroxidación lipídica es estadísticamente significativo con respecto al control. Este aumento de los niveles de peroxidación lipídica dependiente del tiempo de irradiación es similar al comportamiento previamente descrito para la irradiación con luz UV de fantasmas de glóbulos rojos de gestantes normotensas a tiempos similares y con la misma λ (Matteo y col, 1998; Abad, 2005). De hecho, los niveles de MDA para los tiempos de 45 y 60 min de irradiación, son semejantes a los reportados para los fantasmas de glóbulos rojos de gestantes preeclámpticas (Matteo y col, 1998; Abad, 2005; Ampueda-Carrero, 2015).

Concomitante al aumento de 2,5 veces de los niveles de peroxidación lipídica para los fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV por 45 min, la actividad Ca^{2+} -ATPasa de los fantasmas irradiados con luz UV durante este mismo tiempo, presentó una reducción de aproximadamente el 50 % con respecto a la actividad Ca^{2+} -ATPasa de los fantasmas no irradiados, como se muestra en la Tabla I. Es importante destacar que la magnitud y el porcentaje de disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos de gestantes normotensas irradiados con luz UV a tiempos similares y con la misma λ , son similares a lo reportado en la Tabla I (Matteo y col, 1998; Abad, 2005). En estos estudios se ha demostrado que existe una relación inversamente proporcional entre la actividad Ca^{2+} -ATPasa con los niveles de TBARS de los fantasmas de glóbulos rojos. En consecuencia, se decidió estudiar la relación entre la actividad Ca^{2+} -ATPasa y los niveles de TBARS en las preparaciones de esta investigación. Los resultados se presentan la Figura 2. Nótese como hay una relación inversamente proporcional

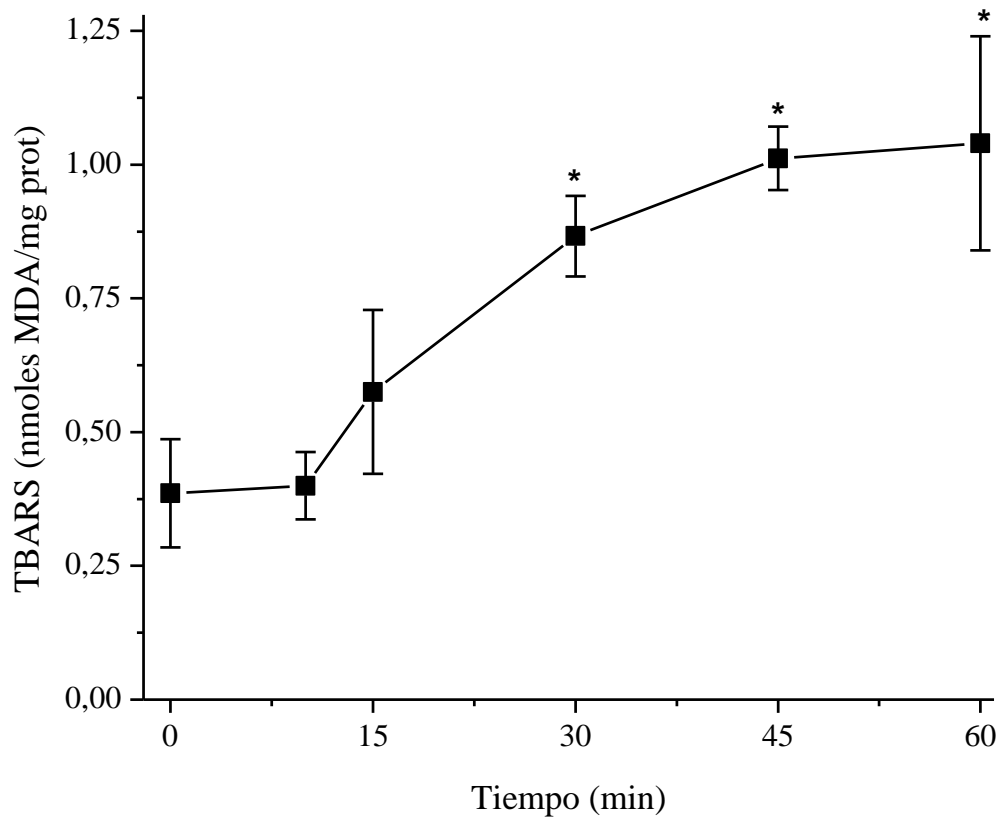


Figura 1. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV de $\lambda= 254$ nm sobre los niveles de TBARS de fantasmas de glóbulos rojos. Valores expresados como media \pm EE para n = 6.

* p < 0,05 vs t = 0

Tabla I. Efecto de la irradiación con luz UV de $\lambda= 254$ nm durante 45 min sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos.

Valores expresados como media \pm EE para $n = 7$. El valor de TBARS de las membranas no

Condición	Actividad Ca^{2+} -ATPasa (nmoles Pi/mg prot . min)
No Irradiado	20,40 \pm 1,72
45 min UV	10,60 \pm 1,33*

irradiadas es $0,39 \pm 0,10$ nmoles MDA/mg prot y de las membranas irradiadas con luz UV de $\lambda= 254$ nm durante 45 min es $1,01 \pm 0,06$ nmoles MDA/mg prot.

* $p < 0,001$ vs No Irradiado

entre la actividad Ca^{2+} -ATPasa con los niveles de TBARS de los fantasmas de glóbulos rojos, con un coeficiente de correlación de -0,94 y una varianza de 0,88; en concordancia con lo previamente reportado (Abad, 2005).

2. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV sobre los niveles de peroxidación lipídica y actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos, en ausencia y presencia del antioxidante BHT.

Con el fin de determinar el efecto de la presencia de un antioxidante conocido, como el BHT, sobre los niveles de TBARS inducidos por irradiación con luz UV, se irradiaron fantasmas de glóbulos rojos con luz UV durante 0, 10, 15, 30, 45 y 60 min, en ausencia y presencia de 200 μM BHT. Los resultados obtenidos se muestran la Figura 3. Nótese como la presencia de BHT fue capaz de bloquear la elevación de los niveles de peroxidación lipídica con la irradiación con luz UV. Estos resultados son similares a lo reportado para fantasmas de gestantes normotensas irradiados con luz UV a diferentes tiempos y con la misma λ , en presencia de BHT (Matteo y col, 1998; Abad, 2005).

Luego de evaluar la actividad antioxidante del BHT, se evaluó si el mismo protegía la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa, enzima particularmente sensible a los niveles de TBARS (Matteo y col, 1998; Abad, 2005). Para ello se irradiaron fantasmas de glóbulos rojos durante 45 min, tiempo en el cual hay niveles elevados de TBARS (Fig. 1), en presencia y ausencia de 200 μM BHT. Luego de la irradiación, se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos. Como se reporta en la Tabla II, en ausencia de BHT, la irradiación de los fantasmas con luz UV ocasiona una disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa, cercana a 50%. Este efecto no se observa en presencia de BHT. Resultados similares se obtuvieron para fantasmas de gestantes

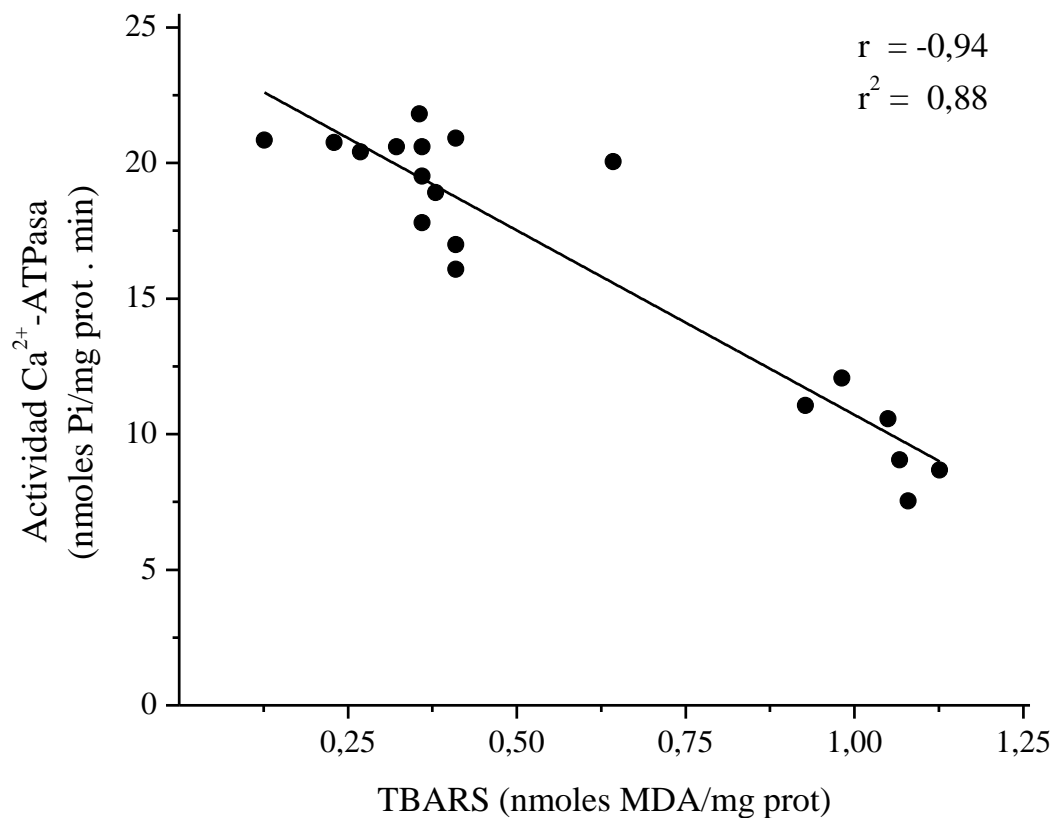


Figura 2. Valores de actividad Ca²⁺-ATPasa en función de los niveles de peroxidación lipídica de fantasmas de glóbulos rojos. Los valores presentados son los resultados obtenidos de preparaciones de membranas no irradiadas con luz UV, membranas irradiadas con luz UV durante 45 min en presencia o ausencia de MgGl₂ o BHT y membranas irradiadas con luz UV durante 45 min y posteriormente preincubadas o no con MgGl₂ por 24 h. Para todos los casos, la longitud de onda de la radiación UV empleada fue la misma ($\lambda = 254$ nm) y la concentración proteica para los ensayos de TBARS (0,9 a 1,1 mg/mL) y actividad Ca²⁺-ATPasa (0,4 a 0,8 mg/mL) se mantuvo dentro de los rangos indicados en Materiales y Métodos.

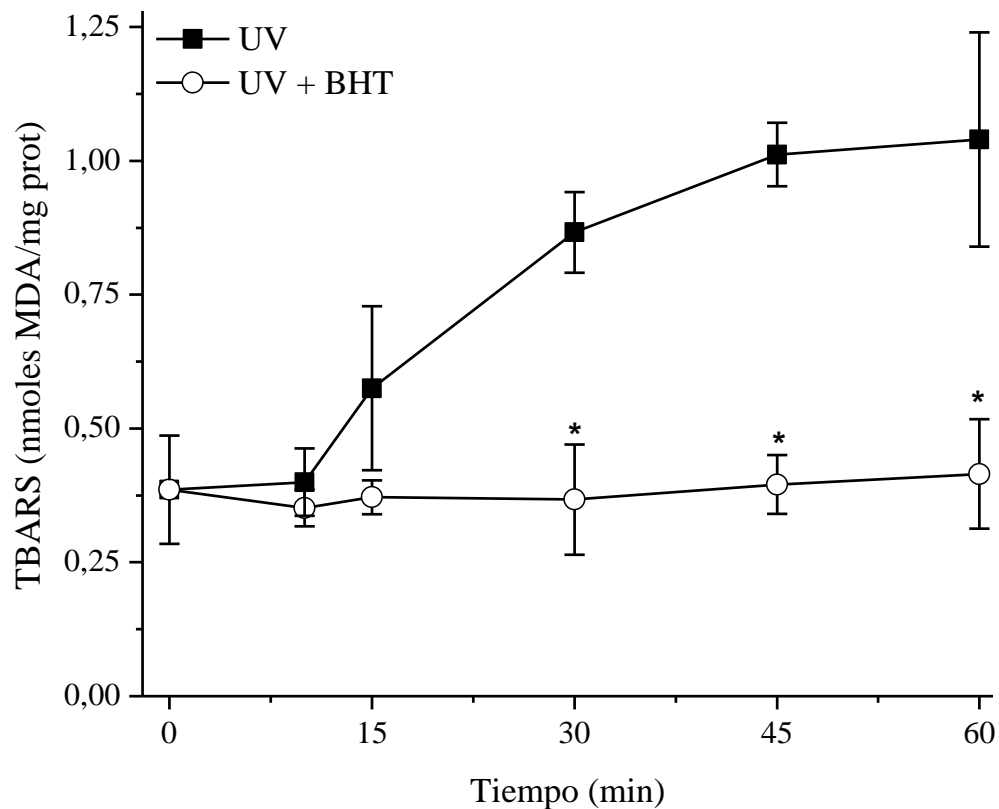


Figura 3. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV de $\lambda = 254$ nm sobre los niveles de TBARS de fantasmas de glóbulos rojos, en ausencia y presencia de $200 \mu\text{M}$ BHT. Valores expresados como media \pm EE para $n = 6$.

* $p < 0,05$ vs UV del mismo t

Tabla II. Efecto protector de 200 μ M BHT sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV de $\lambda = 254$ nm durante 45 min.

Valores expresados como media \pm EE para $n = 7$. El valor de TBARS de las membranas no

Condición	Actividad Ca^{2+}-ATPasa (nmol Pi/mg prot . min)
No Irradiado	20,40 \pm 1,72
45 min UV	10,60 \pm 1,33*
45 min UV + BHT	18,09 \pm 1,20

irradiadas es 0,39 \pm 0,10 nmoles MDA/mg prot y de las membranas irradiadas con luz UV de $\lambda = 254$ nm durante 45 min en presencia y ausencia de 200 μ M BHT es 0,40 \pm 0,05 nmoles MDA/mg prot y 1,01 \pm 0,06 nmoles MDA/mg prot, respectivamente.

* $p < 0,001$ vs No Irradiado y 45 min UV + BHT

normotensas irradiados a diferentes tiempos con la misma λ , donde la disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa por efecto de la irradiación con luz UV, es prevenida al incubarse los fantasmas con BHT durante la irradiación (Matteo y col, 1998; Abad, 2005).

3. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV sobre los niveles de peroxidación lipídica y actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos, en ausencia y presencia de MgGl_2 .

Con el objetivo de evaluar si el MgGl_2 presenta actividad antioxidante a nivel de los fantasmas de glóbulos rojos, se evaluaron los niveles de peroxidación lipídica tras 0, 10, 15, 30, 45 y 60 min de irradiación con luz UV de fantasmas de glóbulos rojos, en presencia y ausencia de 4 mM MgGl_2 . Como se aprecia en la Figura 4, la presencia de MgGl_2 impide el aumento de los niveles de TBARS durante la irradiación con luz UV, evidenciando que esta sal de magnesio posee actividad antioxidante.

Como se reporta en la Tabla III, la presencia de 4 mM MgGl_2 durante la irradiación de los fantasmas con luz UV por 45 min, evitó la caída de la actividad Ca^{2+} -ATPasa producida por la sola irradiación con la luz UV, manteniendo la actividad parecida a la de los fantasmas de glóbulos rojos no irradiados.

Para fines comparativos, en la Figura 5 y en la Tabla IV, se presenta un resumen de los datos obtenidos con las irradiaciones de los fantasmas de glóbulos rojos, en presencia de BHT o MgGl_2 . Nótese como el comportamiento de MgGl_2 fue muy similar al del BHT, evitando tanto la

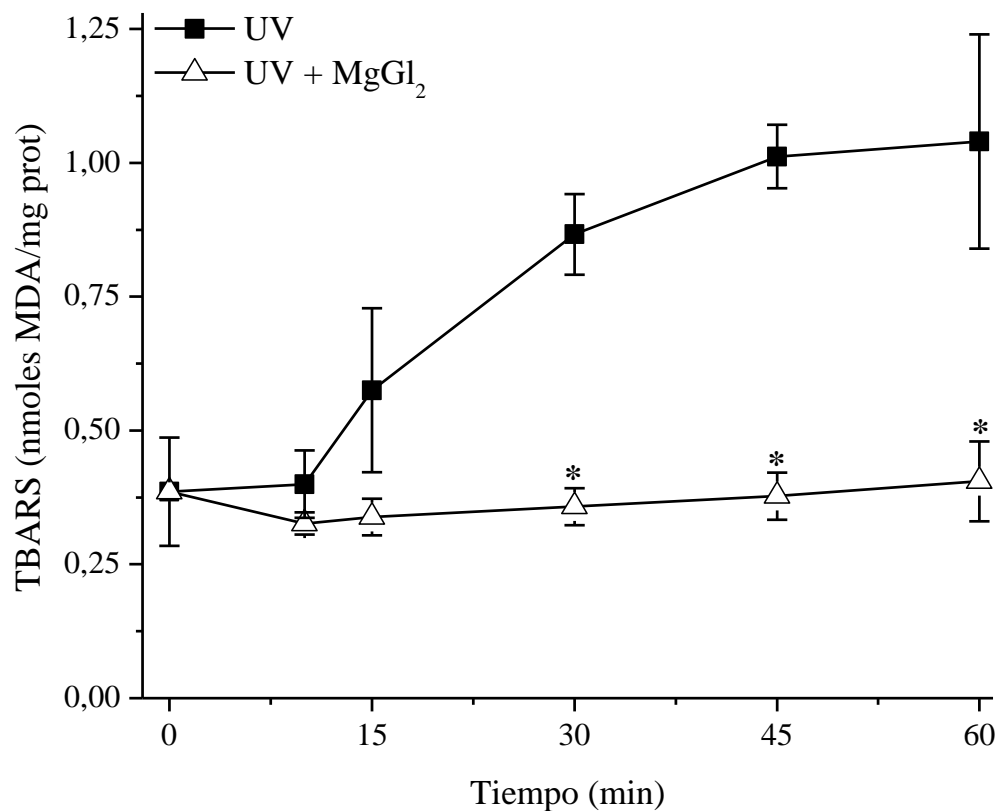


Figura 4. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV de $\lambda = 254$ nm sobre los niveles de TBARS de fantasmas de glóbulos rojos, en ausencia y presencia de 4 mM MgCl₂. Valores expresados como media \pm EE para n = 6.

* p < 0,05 vs UV del mismo t

Tabla III. Efecto protector de 4 mM MgGl₂ sobre la actividad de la Ca²⁺-ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV de $\lambda= 254$ nm durante 45 min.

Valores expresados como media \pm EE para n = 7. El valor de TBARS de las membranas no

Condición	Actividad Ca²⁺-ATPasa (nmol Pi/mg prot . min)
No Irradiado	20,40 \pm 1,72
45 min UV	10,60 \pm 1,33*
45 min UV + MgGl₂	17,63 \pm 1,11

irradiadas es 0,39 \pm 0,10 nmoles MDA/mg prot y de las membranas irradiadas con luz UV de $\lambda= 254$ nm durante 45 min en presencia y ausencia de 4 mM MgGl₂ es 0,38 \pm 0,04 nmoles MDA/mg prot y 1,01 \pm 0,06 nmoles MDA/mg prot, respectivamente.

* p < 0,001 vs No Irradiado y 45 min UV + MgGl₂

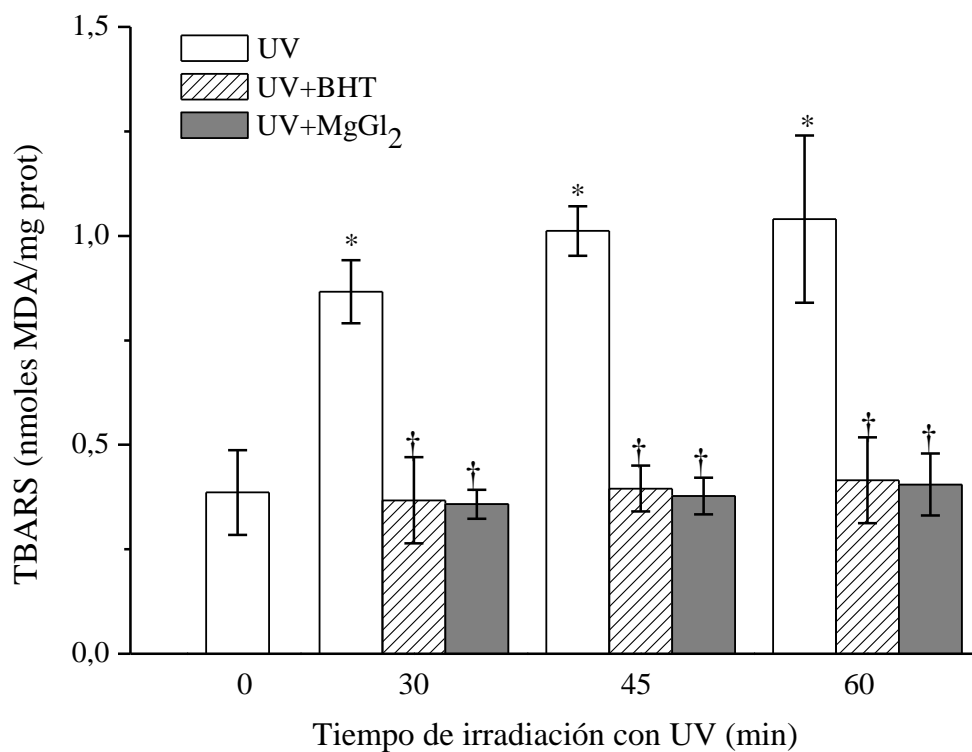


Figura 5. Efecto del tiempo de irradiación con luz UV de $\lambda = 254$ nm sobre los niveles de TBARS de fantasmas de glóbulos rojos, en ausencia y presencia de $200 \mu\text{M}$ BHT o 4 mM MgGl_2 . Valores expresados como media \pm EE para $n = 6$.

* $p < 0,05$ vs $t = 0$

† $p < 0,05$ vs UV del mismo t

Tabla IV. Efecto protector de 200 μ M BHT o 4 mM $MgCl_2$ sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV de $\lambda = 254$ nm durante 45 min.

Valores expresados como media \pm EE para n = 7.

Condición	Actividad Ca^{2+} -ATPasa (nmol Pi/mg prot . min)
No Irradiado	20,40 \pm 1,72
UV	10,60 \pm 1,33*
45 min UV + BHT	18,09 \pm 1,20
45 min UV + $MgCl_2$	17,63 \pm 1,11

* p < 0,001 vs No Irradiado, 45 min UV + BHT y 45 min UV + $MgCl_2$

elevación de la peroxidación lipídica como la disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de los fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV. Esta capacidad antioxidante del MgGl_2 es similar a la mostrada por la sal de magnesio utilizada para la preeclampsia, el MgSO_4 , al tratar a los fantasmas de glóbulos rojos de gestantes preeclámpticas con dicho compuesto, así como al incubarse durante la irradiación con luz UV de fantasmas de glóbulos rojos de gestantes normotensas (Abad, 2005).

4. Efecto de la preincubación con 4 mM MgGl_2 durante 24 h sobre los niveles de peroxidación lipídica y actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV durante 45 min.

Con el fin de evaluar si el tratamiento *in vitro* con MgGl_2 afecta los niveles de peroxidación lipídica y la actividad Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos previamente oxidados, se irradiaron fantasmas de glóbulos rojos durante 45 min con luz UV de $\lambda = 254$ nm y luego se incubaron con 4 mM MgGl_2 durante 24 h a 4°C. Estos fantasmas así tratados fueron utilizados para determinar los niveles de peroxidación lipídica y la actividad Ca^{2+} -ATPasa. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla V. Nótese que, de la misma manera como ya mostrado, la irradiación con luz UV de los fantasmas durante 45 min, eleva los niveles de peroxidación lipídica y de manera concomitante disminuye la actividad Ca^{2+} -ATPasa de los fantasmas. Por su parte, la preincubación de los fantasmas (irradiados previamente con luz UV durante 45 min) con MgGl_2 , es capaz de disminuir los niveles de peroxidación lipídica y, en consecuencia, aumentar la actividad Ca^{2+} -ATPasa de los fantasmas, llevándolos a valores parecidos a los obtenidos con fantasmas de glóbulos rojos no irradiados. Este efecto restaurador del tratamiento con MgGl_2 sobre los fantasmas de glóbulos rojos, es parecido al obtenido con preparaciones de similares de gestantes normotensas, con MgSO_4 (Abad, 2005).

Tabla V. TBARS y Actividad de la Ca²⁺-ATPasa de fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV de $\lambda= 254$ nm durante 45 min y luego preincubados en presencia o ausencia de 4 mM MgGl₂ por 24 h.

Condición	TBARS (nmoles MDA/mg prot)	Actividad Ca²⁺-ATPasa (nmol Pi/mg prot . min)
No Irradiado	0,31 ± 0,03	18,91 ± 1,93
45 min UV	1,07 ± 0,28*	9,04 ± 1,52*
45 min UV + 24 h MgGl₂	0,38 ± 0,05	17,79 ± 1,72

Valores expresados como media ± EE para n = 6.

* p < 0,05 vs No Irradiado y 45 min UV + 24 h MgGl₂.

Discusión

En el presente estudio, se utilizó el sistema de generación *in vitro* de la peroxidación lipídica de fantasmas de glóbulos rojos mediante su irradiación con luz UV a 254 nm. Con ello, se genera un aumento en los niveles de productos finales de peroxidación, semejante a lo encontrado para los fantasmas de gestantes preeclámpticas (Figs. 1, 3-5) (Matteo y col, 1998; Abad, 2005; Ampueda-Carrero, 2015). Y, como cabría esperar, en las preparaciones usadas en este trabajo, al igual que en los fantasmas de gestantes preeclámpticas, tal daño oxidativo de las membranas ocasiona una disminución de la actividad de su Ca^{2+} -ATPasa (Tabla I) (Matteo y col, 1998; Abad, 2005; Ampueda-Carrero, 2015). Con ello se indica que la funcionalidad de esta enzima, está directamente asociada al daño oxidativo que sufren las membranas (Fig. 2) (Matteo y col, 1998; Abad, 2005). Esta relación entre la peroxidación lipídica y la actividad Ca^{2+} -ATPasa se corroboró al realizar la irradiación con luz UV en presencia de un antioxidante conocido, el BHT, el cual impidió la elevación de la peroxidación lipídica (Fig. 3) y con ello evitó la disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa (Tabla II). En estas preparaciones de fantasmas de glóbulos rojos de mujeres sanas y no embarazadas, se demuestra que existe una relación inversamente proporcional entre la actividad Ca^{2+} -ATPasa y los niveles de peroxidación lipídica (TBARS) de dichos fantasmas (Fig. 2). En otras palabras, el estatus oxidativo de la membrana plasmática es clave para la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa.

Posteriormente, se evaluó la capacidad antioxidante del MgGl_2 en las preparaciones de fantasmas de glóbulos rojos. Para ello se utilizó 4 mM MgGl_2 durante las irradiaciones con luz UV y se evaluaron tanto los niveles de peroxidación lipídica como la actividad Ca^{2+} -ATPasa. Se encontró que esta sal de magnesio evita la elevación de los TBARS (Fig. 4) y con ello impide la disminución de la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa (Tabla III). Este comportamiento protector del

MgGl₂ es muy similar al del BHT (Fig. 5 y Tabla IV), en cuanto a su efecto antioxidante. Para poder explicar el efecto antioxidante del MgGl₂ es necesario examinar su estructura química. El MgGl₂ (Fig. 6) posee la siguiente fórmula química: MgC₁₂H₂₂O₁₄. Está formado por 1 Mg²⁺ y 2 aniones gluconato (2Gl⁻). Cada anión gluconato presenta cinco grupos -OH, así como un grupo carboxilo desprotonado (-COO⁻). En términos de su capacidad antioxidante, se ha sugerido que el MgGl₂ puede estabilizar directamente radicales como el [•]OH (Murthi y col, 2003). De acuerdo con estudios previos, donde se evaluó la capacidad de esta sal para secuestrar al [•]OH, se encontró que el MgGl₂ es capaz de neutralizar a este radical, inclusive con una capacidad superior a la del MgSO₄ (Mak y col, 2000; Murthi y col, 2003). De hecho, bajo las condiciones de irradiación con luz UV usadas, en la suspensión de fantasmas de glóbulos rojos se forman ROS capaces de iniciar el proceso de peroxidación lipídica (Abad y col, 2015). La neutralización directa de estas ROS, pudiera explicar la inhibición de los niveles de peroxidación lipídica encontrada cuando el MgGl₂ se incubaba con los fantasmas durante las irradiaciones con luz UV (Fig. 4). Se especula que esta actividad para neutralizar los radicales, pudiera ocurrir vía oxidación de sus grupos -OH, cediendo electrones en forma de H que estabilizarían a los radicales [•]OH, formándose H₂O.

Adicionalmente, en este trabajo, se encuentra que el MgGl₂ aparentemente tiene un efecto de estabilización o de reconstrucción de la estructura de la membrana oxidada del glóbulo rojo. Esto se logró a través de la incubación de fantasmas de glóbulos rojos previamente oxidados (irradiados durante 45 min con luz UV) con 4 mM MgGl₂ durante 24 h a 4°C. En estos fantasmas, la incubación con MgGl₂ revirtió tanto los niveles de peroxidación lipídica como la actividad Ca²⁺-ATPasa a valores similares a los obtenidos con fantasmas no irradiados (Tabla V).

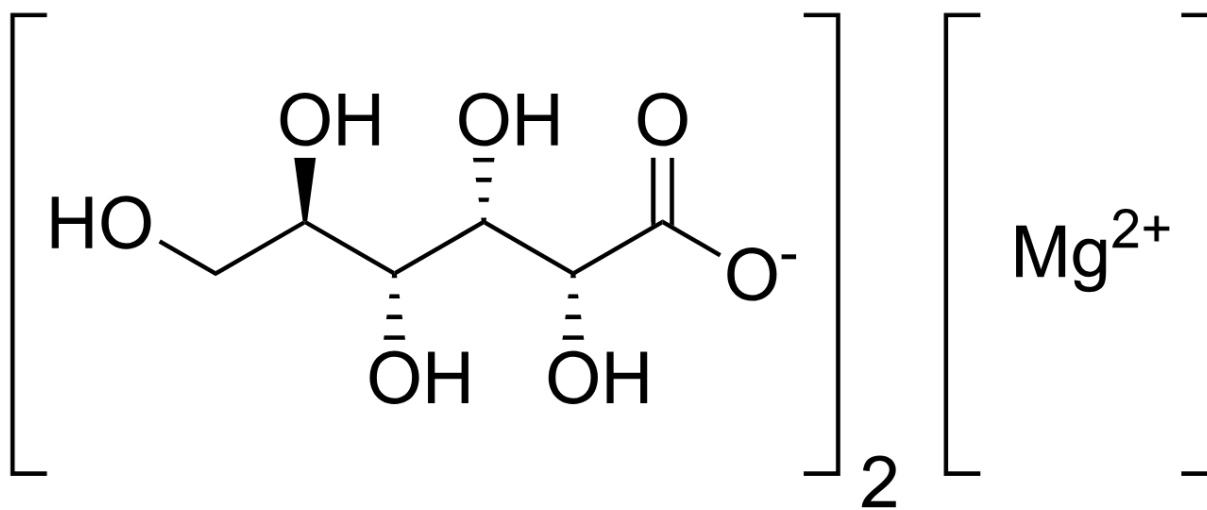


Figura 6. Estructura molecular de la sal de gluconato de magnesio (MgGl_2).

Imagen de dominio público.

Estos resultados muestran como el $MgGl_2$ es capaz de proteger a las membranas del daño oxidativo así como de revertir dicho daño sobre ellas, y con ello logra mantener la funcionalidad de la PMCA. Tal comportamiento está en concordancia con lo encontrado para la incubación de fantasmas de gestantes preeclámpticas con esta misma sal; revirtiendo los daños oxidativos sobre sus lípidos y restaurando la actividad Ca^{2+} -ATPasa a valores similares a los de las gestantes normotensas (Ampueda-Carrero, 2015).

La explicación del efecto restaurador del $MgGl_2$ necesariamente implica una estabilización de la membrana dañada por el estrés oxidativo o una reestructuración de la misma. El Mg^{2+} de esta sal pudiera aumentar al estabilidad de las membranas al interactuar con los grupos cargados negativamente en la periferia de estas (Murthi y col, 2003). La interacción entre el Mg^{2+} y las cargas negativas de los aniones expuestos en las membranas, reduce las fuerzas de repulsión de dichos grupos cargados entre sí, acercando efectivamente lípidos adyacentes (Tomov y col, 1988). Este proceso, disminuye el área por lípido de las membranas, aumentando su grosor así como el orden de los lípidos que le constituyen (Fernández y col, 2017). De esta manera, por este aumento de la rigidez de las membranas, se reduce la probabilidad de que radicales como el $\cdot OH$ interactúen con H alílicos cerca de la periferia (Fernández y col, 2017). Tal reorganización molecular, estabilizaría los hidroperóxidos formados durante la peroxidación, lo cual, explicaría la reversión de los daños lipídicos al incubar las membranas con $MgGl_2$ tras su irradiación con luz UV. Y recuperaría el funcionamiento específicamente de membranas dañadas por oxidación.

Debe tenerse en cuenta, que la continua fragmentación oxidativa de las membranas genera cambios en el grosor y la fluidez de esta, así como productos con efectos dañinos, como los lisofosfolípidos; fosfolípidos con una sola cola de ácidos grasos, que se producen durante las reacciones de peroxidación lipídica y son capaces de inhibir las actividades ATPasas al alterar el

microambiente lipídico (Marín y col, 1992; Tai y col, 2010; Van der Paal y col, 2016; Yusupov y col, 2017).

Los resultados del presente estudio tienen importancia para el estudio del estrés oxidativo durante la preeclampsia. La preeclampsia es una condición patológica del embarazo humano, la cual se caracteriza por daño oxidativo materno generalizado (Staff y Redman, 2018). Dado el rol sistémico de transporte gaseoso del glóbulo rojo, se ha planteado que su paso por la placenta preecláptica, origen de las disfunciones oxidativas, generaría la oxidación de su membrana plasmática y deterioro de su funcionalidad y, que al retornar a la circulación periférica, propagaría dicho daño al resto de órganos y estructuras maternas (Abad y col, 2012). Evidencia del daño sobre la membrana plasmática de estas células se encuentra en el incremento de los niveles de peroxidación lipídica de fantasmas de glóbulos rojos de las gestantes preeclápticas en comparación con los fantasmas de las gestantes normotensas (Matteo y col, 1998; Abad, 2005; Ampueda-Carrero, 2015). Acompañado, además, de una disminución de la actividad de sus enzimas antioxidantes; SOD, GPx y Cat, con respecto a gestantes normotensas (Haque y col, 2010). Ciertamente, para la gestante preecláptica, el continuo daño oxidativo de la membrana del glóbulo rojo pareciera causar la alteración funcional de su PMCA (Abad, 2005).

El conjunto de alteraciones físicas de las membranas e interacciones con productos de actividad inhibitoria, pudieran causar la disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa vista en la condición preecláptica (Matteo y col, 1998; Abad, 2005; Ampueda-Carrero, 2015). Los resultados aquí presentados, muestran que, al menos, *in vitro*, la protección y mitigación del daño oxidativo de las membranas debido al tratamiento con MgCl_2 , mantiene la actividad de la PMCA inalterada, presentando esta sal una actividad antioxidante igual a la presentada por el MgSO_4 bajo el mismo modelo de peroxidación inducida (Abad, 2005).

Por otro lado, el glóbulo rojo de las gestantes preeclámpticas presenta mayor $[Ca^{2+}]_c$ en comparación con el proveniente de gestantes normotensas (Sowers y col, 1989; Ray y col, 1999). Lo cual, se ha propuesto sea el resultado de la disminución de su actividad Ca^{2+} -ATPasa (Abad y col, 2012). Tal condición, está generalmente asociada a una disminución de su deformabilidad, a través de la formación de complejos proteicos que alteran la estabilidad de su andamio citoesquelético (Bogdanova y col, 2013). Esto, generaría un incremento de los niveles de hemólisis que, a su vez, contribuirían al daño de la microvasculatura de la gestante preeclámptica (Staff y Redman, 2018). De hecho, existe una complicación de la preeclampsia denominada síndrome HELLP (acrónimo en inglés de Hemólisis, Enzimas Hepáticas Incrementadas y Bajo Conteo Plaquetario) que se define por trombocitopenia, transaminasemia y hemólisis materna (Abad y col, 2012). Constituyendo, así, una ruta a través de la cual el daño oxidativo pudiera continuar propagándose por la circulación materna, ya que la hemólisis libera hemoglobina y Fe^{2+} , el cual cataliza reacciones de formación de ROS y deterioro lipídico (Abad y col, 2012). Por esto, cuidar la integridad mecánica del glóbulo rojo, es vital para controlar la progresión de la preeclampsia (Abad y col, 2012).

Como se ha mencionado, mantener niveles de Mg^{2+} en sangre bajo el rango fisiológico adecuado, es importante para contrarrestar parte de los daños intrínsecos de la preeclampsia, particularmente para prevenir las convulsiones e inhibirlas en el desarrollo de la eclampsia (Chiarello y col, 2018). En términos de capacidad antioxidante, el tratamiento de una sal de Mg^{2+} como el $MgSO_4$, y posiblemente como el $MgCl_2$, ayudaría a reducir la actividad de las ROS circulantes, protegiendo blancos periféricos. Además, su capacidad estabilizadora de membranas oxidadas, restauraría la funcionalidad de estas, así como de proteínas transmembrana sensibles al daño oxidativo, a la vez que reduce la formación de productos de peroxidación lipídica, tóxicos

para la salud celular. Como se ha estudiado previamente, el tratamiento parenteral de MgSO_4 en gestantes preeclámpticas, reduce los productos de oxidación medidos y restaura la actividad y transporte activo de Ca^{2+} de los fantasmas de glóbulos rojos (Abad, 2005). Particularmente, incrementos en los niveles de peroxidación lipídica concomitantes con disminución en la actividad Ca^{2+} -ATPasa, se ha encontrado no solo para fantasmas de glóbulos rojos de gestantes preeclámpticas, sino también para la membrana basal del sinciotrofoblasto placentario e incluso para fantasmas de glóbulos rojos de neonatos provenientes de embarazos preeclámpticos (Casart y col, 2001; Carreiras y col 2002). La recuperación de la funcionalidad de estas estructuras, pudiera probar fundamental para la salud materna y fetal. Por ejemplo, disminución del daño oxidativo placentario, reduciría la liberación de los factores citotóxicos que la placenta preeclámptica exacerbadamente libera a la circulación y que están asociados al desarrollo de las resistencias periféricas y daños estructurales (Staff y Redman, 2018). A su vez, dicha disminución del daño oxidativo, recuperaría la funcionalidad de la PMCA de las membranas del sinciotrofoblasto, que se han visto alteradas en condiciones de daño oxidativo por hipoxia y que contribuiría a disminuir los daños en las células placentarias por alteraciones en la $[\text{Ca}]_c$ (Chiarello y col, 2014). De hecho, la incubación *in vitro* con MgGl_2 de cultivos primarios de tejido placentario en condiciones de hipoxia, mitiga el daño oxidativo y protege la actividad Ca^{2+} -ATPasa de las membranas aisladas del sinciotrofoblasto, semejante a lo que ha encontrado en este estudio (Rangel y col, 2015).

Adicionalmente, si la PMCA de la membrana plasmática del músculo vascular se encuentra alterada, contribuiría al vasoespasmo general de la gestante preeclámptica por aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$; la recuperación de su actividad enzimática ayudaría al relajamiento vascular y a disminuir las resistencia cerebral, la cual está asociada al daño neural que desencadena en convulsiones (Euser y Cipolla, 2009). Es probable que el uso de una sal antioxidante de Mg^{2+} , reduciría la

pérdida de antioxidantes endógenos, como el glutatión. En este aspecto, a nivel *in vitro*, el MgGl_2 disminuye en mayor medida la pérdida de glutatión en células endoteliales a las que se les induce daño oxidativo, en comparación con el MgSO_4 (Mak y col, 2000).

A rasgos generales, esta investigación ha corroborado una actividad antioxidante del MgGl_2 que, como han mostrado otros estudios, puede ser superior a la mostrada por el MgSO_4 . Si a esto se le suma la facilidad del suministro por consumo oral por parte del MgGl_2 , entonces se solidificaría la idea de desarrollar una terapia anticonvulsionante de carácter preventivo usando esta sal. Por supuesto, se requiere de análisis más exhaustivos de su capacidad antioxidante e incluso anticonvulsionante, de manera que pueda sustituir satisfactoriamente al suministro por vía intravenosa o muscular del MgSO_4 en las gestantes preeclámpticas.

Conclusiones

En el presente estudio se evaluó la actividad antioxidante del $MgCl_2$ en fantasmas de glóbulos rojos de mujeres sanas no embarazadas. Específicamente, se demostró que 4 mM $MgCl_2$ es capaz de inhibir la formación de productos finales de peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos irradiados con luz UV de $\lambda = 254$ nm durante distintos tiempos de irradiación. Este efecto protector del $MgCl_2$ sobre la peroxidación lipídica tiene un impacto sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa, al prevenir su disminución por aumento de la peroxidación lipídica. Por otro lado, su efecto restaurador sobre la membrana plasmática oxidada, ofrece una posibilidad importante para el tratamiento de membranas dañadas por el estrés oxidativo, como las que se presentan en las gestantes preeclámpticas.

Bibliografía

Abad, C. 2005. Efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} y la peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos de gestantes preeclámpticas. Tesis de Doctorado. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Miranda, Venezuela.

Abad, C., Proverbio, T., Piñero, S., Botana, D., Chiarello, D.I., Marín, R., Proverbio, F. 2012. Preeclampsia, placenta, oxidative stress, and PMCA. *Hypertens. Pregnancy*. **31(4)**: 427-441.

Abad, C., Vallejos, C., De Gregorio, N., Díaz, P., Chiarello, D.I., Mendoza, M., Piñero, S., y col. 2014. Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase activities in basal and microvillous syncytiotrophoblast membranes from preeclamptic human term placenta. *Hypertens. Pregnancy*. **34(1)**: 65-79.

Abad, C., Vargas, F.R., Zoltan, T., Proverbio, T., Piñero, S., Proverbio, F., Marín R. 2015. Magnesium sulfate affords protection against oxidative damage during severe preeclampsia. *Placenta*. **36(2)**: 179-185.

Abalos, E., Cuesta, C., Carroli, G., Qureshi, Z., Widmer, M., Vogel, J.P., Souza, J.P., y col. 2014. Pre-eclampsia, eclampsia and adverse maternal and perinatal outcomes: a secondary analysis of the World Health Organization multicountry survey on maternal and newborn health. *BJOG*. **121(supl. 1)**: 14-24.

Abalos, E., Cuesta, C., Grosso, A.L., Chou, D., Say, L. 2013. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **170(1)**: 1-7.

Altura, B.M., Altura, B.T., Carella, A., Gebrewold, A., Murakawa, T., Nishio, A. 1987. Mg^{2+} - Ca^{2+} interaction in contractility of vascular smooth muscle: Mg^{2+} versus organic calcium channel blockers on myogenic tone and agonist-induced responsiveness of blood vessels. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65(4)**: 729-745.

Amaral, L.M., Cunningham Jr., M.W.; Cornelius, D.C., LaMarca, B. 2015. Preeclampsia: long-term consequences for vascular health. *Vasc. Health Risk Manag.* **11**: 403-415.

Ampueda-Carrero, C.P. 2015. Efecto del gluconato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} y niveles de peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos de pacientes con preeclampsia. Tesis de Maestría. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Miranda, Venezuela.

Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell Longev.* **360438**: 1-31.

Backes, C.H., Markham, K., Moorehead, P., Cordero, L., Nankervis, C.A., Giannone, P.J. 2011. Maternal preeclampsia and neonatal outcomes. *J. Pregnancy.* **214365**: 1-7.

Benirschke, K., Burton, G.J., Baergen, R.N. 2012. Pathology of the human placenta. Sexta Edición, Springer-Verlag, Berlín/Heidelberg, Alemania.

Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1(1)**: 11-21.

Bogdanova, A., Makhro A., Wang, J., Lipp, P., Kastner, L. 2013. Calcium in red blood cells-a perilous balance. *Int. J. Mol. Sci.* **14(5)**: 9848-9872.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72(1-2)**: 248-254.

Brini, M., Carafoli, E. 2009. Calcium pumps in health and disease. *Physiol. Rev.* **89(4)**: 1341-1378.

Brini, M., Carafoli, E. 2011. The plasma membrane Ca^{2+} ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3(2)**: 1-15.

Bruce, J.I.E. 2018. Metabolic regulation of the PMCA: role in cell death and survival. *Cell Calcium.* **69**: 28-36.

Burton, G.J., Fowden, A.L. 2015. The placenta: a multifaceted transient organ. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **370(1663)**: 1-8.

Calì, T., Brini, M., Carafoli, E. 2017. Regulation of cell calcium and role of plasma membrane calcium ATPases. Págs.: 259-296, en: Galluzzi, L. International review of cell and molecular biology. Volumen 332, Elsevier, Ámsterdam, Holanda.

Carafoli, E. 1992. The Ca^{2+} pump of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **267(4)**: 2115-2118.

Carafoli, E., Krebs, J. 2016. Why calcium? How calcium became the best communicator. *J. Biol. Chem.* **291(40)**: 20849-20857.

Carreiras, M.M., Proverbio, T., Proverbio, F., Marín, R. 2002. Preeclampsia and calcium-ATPase activity of red cell ghosts from neonatal and maternal blood. *Hypertens. Pregnancy.* **21(2)**: 97-107.

Casart, Y., Proverbio, T., Marín R., Proverbio F. 2001. Comparative study of the calcium adenosine triphosphatase of basal membranes of human placental trophoblasts from normotensive and preeclamptic pregnant women. *Gynecol Obstet Invest.* **51(1)**: 28-31.

Cerella, C., Diederich, M., Ghibelli, L. 2010. The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *Int. J. Cell Biol.* **546163**: 1-14.

Chiarello D.I., Marín, R., Proverbio, F., Coronado, P., Toledo, F., Salsoso, R., Gutiérrez J., Sobrevia, L. 2018. Mechanisms of the effect of magnesium salts in preeclampsia. *Placenta.* **69**: 134-139.

Chiarello, D.I., Abad, C., Rojas, D., Toledo, F., Vázquez, C.M., Mate, A., Sobrevia, L., y col. 2018. Oxidative stress: normal pregnancy versus preeclampsia. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **S0925-4439(18)30491-5**: 1-11.

Chiarello, D.I., Marín, R., Proverbio, F., Benzo, Z., Sandy, P., Botana, D., Abad, C. 2014. Effect of hypoxia on the calcium and magnesium content, lipid peroxidation level, and Ca²⁺-ATPase activity of syncytiotrophoblast plasma membranes from placental explants. *BioMed. Res. Int.* 1-9.

Chin, D., Means, A.R. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* **10(8)**: 322-328.

Choi, S.I., Yoo, S., Lim, J.Y., Hwang, S.W. 2014. Are sensory TRP channels biological alarms for lipid peroxidation? *Int. J. Mol. Sci.* **15(9)**: 16430-16457.

Cipolla, M.J., Kraig, R.P. 2011. Seizures in women with preeclampsia: mechanisms and management. *Fetal Matern. Med. Rev.* **22(2)**: 91-108.

D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., Scott, T. 2013. UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* **14(6)**: 12222-12248.

DiPolo, R., Beaugé, L. 2011. In dialyzed squid axons oxidative stress inhibits the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger by impairing the Ca^{2+}_i -regulatory site. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **301(3)**: 687-694.

Duckitt, K., Harrington, D. 2005. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ.* **330(565)**: 1-7.

Eigel, B.N., Gursahani, H., Hadley, R.W. 2004. ROS are required for rapid reactivation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in hypoxic reoxygenated guinea pig ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286(3)**: 955-963.

English, F.A., Kenny, L.C., McCarthy, F.P. 2015. Risk factors and effective management of preeclampsia. *Integr. Blood Press. Control.* **8**: 7-12.

Euser, A.G., Cipolla, M.J. 2009. Magnesium sulfate treatment for the prevention of eclampsia: a brief review. *Stroke.* **40(4)**: 1169-1175.

Feix, J.B., Bachowski, G.J., Girotti, A.W. 1991. Photodynamic action of merocyanine 540 on erythrocyte membranes: structural perturbation of lipid and protein constituents. *Biochim. Biophys. Acta.* **1075(1)**: 28-35.

Fernández, M., Marín, R., Proverbio, F., Chiarello, D.I., Ruetze, F. 2017. Magnesium sulfate against oxidative damage of membrane lipids: A theoretical model. *Int. J. Quantum. Chem.* **117(21)**: 1-13.

Galic, M.A., Riazi, K., Pittman, Q.J. 2012. Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol.* **33(1)**: 116-125.

Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., Krizanova, O. 2015. Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biol.* **6**: 260-271.

Guerini, D. 1998. The Ca²⁺ pumps and the Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Biometals.* **11(4)**: 319-330.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2015. Free radicals in biology and medicine. Quinta Edición, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra.

Haque, S.K., Siddiqui, M.U., Islam, N., Moin, S. 2010. Erythrocyte markers of oxidative stress in higher age-group preeclamptic and normal pregnant mothers. *Hypertens. Pregnancy.* **29(1)**: 69-81.

He, N., van Iperen, L., de Jong, D., Szuhai, K., Helmerhorst, F.M., van der Westerlaken, L.A.J., Chuva de Sousa, S.M.L. 2017. Human extravillous trophoblasts penetrate decidual veins and lymphatics before remodeling spiral arteries during early pregnancy. *PLoS ONE.* **12(1)**: 1-14.

Heinz, E., Hoffman, J.F. 1965. Phosphate incorporation and Na, K-ATPase activity in human red blood cell ghosts. *J. Cell. Compar. Physl.* **65(1)**: 31-43.

Hidalgo, C., Donoso, P. 2008. Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid. Redox Signal.* **10(7)**: 1275-1312.

Huppertz, B. 2018. Trophoblast invasion: remodelling of spiral arteries and beyond. Págs.: 47-62, en: Saito, S. Preeclampsia: basic, genomic and clinical. Única Edición, Springer Nature, Singapur, Singapur.

Impey, L., Greenwood, C., Sheil, O., MacQuillan, K., Reynolds, M., Redman, C. 2001. The relation between pre-eclampsia at term and neonatal encephalopathy. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* **85(3)**: 170-172.

Jensen, O.E., Chernyavsky, I.L. 2019. Blood flow and transport in the human placenta. *Annu. Rev. Fluid. Mech.* **51**: 25-47.

Ji, L., Brkić, J., Liu, M., Fu, G., Peng, C., Wang, Y.L. 2013. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol. Aspects Med.* **34(5)**: 981-1023.

Kako, K., Kato, M., Matsuoka, T., Mustapha, A. 1988. Depression of membrane-bound $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am. J. Physiol.-Cell Ph.* **254(2)**: 330-337.

Khan, K.S., Wojdyla, D., Say, L., Gülmezoglu, A.M., Van Look, P.F.A. 2006. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet.* **367(9516)**: 1066-1074.

Lopreiato, R., Giacomello, M., Carafoli, E. 2014. The plasma membrane calcium pump: new ways to look at an old enzyme. *J. Biol. Chem.* **289(15)**: 10261-10268.

Lu, J.F., Nightingale, C.H. 2000. Magnesium sulfate in eclampsia and pre-eclampsia: pharmacokinetic principles. *Clin. Pharmacokinet.* **38(4)**: 305-314.

Mak, I.T., Komarov, A.M., Kramer, J.H., Weglicki, W.B. 2000. Protective mechanisms of Mg-gluconate against oxidative endothelial cytotoxicity. *Cell Mol. Biol.* **46(8)**: 1337-1344.

Marín, R., Proverbio, T., Proverbio, F. 1986. Inside-out basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney proximal tubular cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **858(1)**: 195-201.

Marín, R., Rodríguez, A.J., Proverbio, T. 1992. Partial characterization of the inhibitory effect of lipid peroxidation on the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase of rat kidney cortex plasma membranes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24(3)**: 329-335.

Matteo, R., Proverbio, T., Córdova K., Proverbio, F., Marín, R. 1998. Preeclampsia, lipid peroxidation, and calcium adenosine triphosphatase activity of red blood cell ghosts. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **178(2)**: 402-408.

Mayo, R.P. 2018. Advances in human placental biomechanics. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **16**: 298-306.

Murthi, S.B., Wise, R.M., Weglicki, W.B., Komarov, A.M., Kramer, J.H. 2003. Mg-gluconate provides superior protection against postischemic dysfunction and oxidative injury compared to Mg-sulfate. *Mol. Cell Biochem.* **245(1-2)**: 141-148.

Neves-Petersen, M.T., Petersen, S., Gajula, G.P. 2012. UV light effects on proteins: from photochemistry to nanomedicine. Págs: 125-158, en: Saha, S. Molecular photochemistry - Various aspects. Primera Edición, InTech, Rijeka, Croacia.

Noble, D., Herchuelz, A. 2007. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in cell function. Conference on Na/Ca Exchange. *EMBO Rep.* **8(3)**: 228-232.

Nomura, Y., John, R.M., Janssen, A.B., Davey, C., Finik, J., Buthmann, J., Glover, V., y col. 2017. Neurodevelopmental consequences in offspring of mothers with preeclampsia during pregnancy: underlying biological mechanism via imprinting genes. *Arch. Gynecol. Obstet.* **295(6)**: 1319-1329.

Oviedo, N.J., Benaím, G., Cervino, V., Proverbio T., Proverbio, F., Marín R. 2006. The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase protein from red blood cells is not modified in preeclampsia. *Biochim. Biophys. Acta.* **1762(3)**: 381-385.

Palmgren, M.G., Nissen, P. 2011. P-Type ATPases. *Annu. Rev. Biophys.* **40**: 243-266.

Peres, G.M., Mariana, M., Cairrão, E. 2018. Pre-eclampsia and eclampsia: an update on the pharmacological treatment applied in Portugal. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **5(1)**: 1-13.

Rangel, H., Chiarello, D.I., Pinero, S., Botana, D., Abad, C., Marín, R., Proverbio, F. 2015. Gluconate magnesium on the activity of Ca^{2+} -ATPase syncytiotrophoblast membranes in human term placenta. *Placenta.* **36(4)**: 496.

Ray, J., Vasistha, K., Kaur, S., Majumdar, S., Sawhney, H. 1999. Calcium metabolism in pre-eclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **66(3)**: 245-250.

Raymond, D., Peterson, E. 2011. A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet. Gynecol. Surv.* **66(8)**: 497-506.

Roberts, J.M., August, P.A., Bakris, G., Barton, J.R., Bernstein, I.M., Druzin, M., Gaiser, R.R., y col. 2013. Hypertension in pregnancy report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on hypertension in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **122(5)**: 1122-1131.

Sibai, B.M. 2005. Diagnosis, prevention, and management of eclampsia. *Obstet. Anaesth. Digest.* **25(3)**: 121-122.

Sies, H. 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* **4**: 180-183.

Sowers, J.R., Zemel, M.B., Bronsteen, R.A., Zemel, P.C., Walsh, M.F., Standley, P.R., Sokol, R.J. 1989. Erythrocyte cation metabolism in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **161(2)**: 441-445.

Staff, A.C., Redman, C.W.G. 2018. The differences between early- and late-onset preeclampsia. Págs.: 157-172, en: Saito, S. Preeclampsia: basic, genomic and clinical. Única Edición, Springer Nature, Singapur, Singapur.

Tai, W.Y., Yang, Y.C., Lin, H.J., Huang, C.P., Cheng, Y.L., Chen, M.F., Yen, H.L. y col. 2010. Interplay between structure and fluidity of model lipid membranes under oxidative attack. *J. Phys. Chem. B.* **114(47)**: 15642-15649.

Teppa-Garrán, A., Proverbio, T., Marín, R., Proverbio, F. 2004. Lipid peroxidation and active calcium transport in inside–out vesicles of red blood cells from preeclamptic women. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36(5)**: 806-813.

Tomov, T.C., Tsoneva, I.C., Doncheva, J.C. 1988. Electrical stability of erythrocytes in the presence of divalent cations. *Biosci. Rep.* **8(5)**: 421-426.

Tran, K., Smith, N.P., Loiselle, D.S., Crampin, E.J. 2009. A thermodynamic model of the cardiac sarcoplasmic/endoplasmic Ca^{2+} (SERCA) pump. *Biophys. J.* **96(5)**: 2029-2042.

Tranquilli, A.L., Brown, M.A., Zeeman, G.G., Dekker, G., Sibai, B.M. 2013. The definition of severe and early-onset preeclampsia. Statements from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Pregnancy Hypertens.* **3(1)**: 44-47.

Umesawa, M., Kobashi, G. 2017. Epidemiology of hypertensive disorders in pregnancy: prevalence, risk factors, predictors and prognosis. *Hypertens. Res.* **40(3)**: 213-220.

Van der Paal, J., Neyst, E.C., Verlackt, C.C.W., Bogaerts, A. 2016. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. *Chem Sci.* **7(1)**: 489-498.

von Dadelszen, P., Ayres de Campos, D., Barivalala, W. 2016. Classification of the hypertensive disorders of pregnancy. Págs.: 33-61, en: Magee, L.A., von Dadelszen, P., Stones, W., Mathai, M. The FIGO textbook of pregnancy hypertension: an evidence-based guide to monitoring, prevention and management. Única Edición, GLOWM, Londres, Inglaterra.

Wasseff, S. 2009. Mechanisms of convulsions in eclampsia. *Med. Hypotheses.* **72(1)**: 49-51.

Watson, A.J., Barcroft, L.C. 2001. Regulation of blastocyst formation. *Front. Biosci.* **6**: 708-730.

Weiss, G., Sundl, M., Glasner, A., Huppertz, B., Moser, G. 2016. The trophoblast plug during early pregnancy: a deeper insight. *Histochem. Cell Biol.* **146(6)**: 749-756.

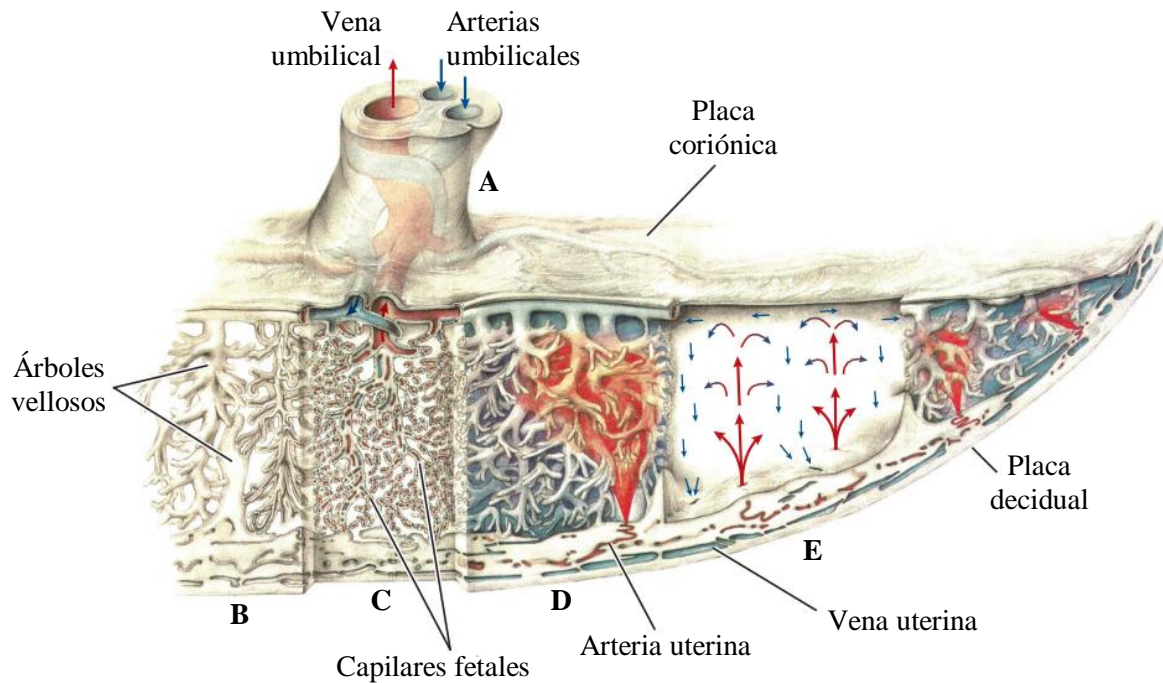
Williams, D. 2011. Long-term complications of preeclampsia. *Semin. Nephrol.* **31(1)**: 111-122.

Windsperger, K., Dekan, S., Pils, S., Golletz, C., Kunihs, V., Fiala, C., Kristiansen, G., y col. 2017. Extravillous trophoblast invasion of venous as well as lymphatic vessels is altered in idiopathic, recurrent, spontaneous abortions. *Hum. Reprod.* **32(6)**: 1208-1217.

Yusupov, M., Wende, K., Kupsch, S., Neyts, E.C., Reuter, S. Bogaerts, A. 2017. Effect of head group and lipid tail oxidation in the cell membrane revealed through integrated simulations and experiments. *Sci. Rep.* **7(5761)**: 1-14.

Zamir, M. 2018. Geometric and hemodynamic characterization of uterine spiral arteries: the concept of resistance reserve. **68**: 59-6.

Anexo A: Visión general de la estructura y el flujo de sangre placentario



A: cordón umbilical asociado a la placa coriónica. **B:** vellosidades coriónicas proyectadas hacia el espacio intervelloso. **C:** circulación sanguínea dentro de los capilares fetales de las vellosidades coriónicas. **D:** arteria uterina suministrando un chorro de sangre materna que baña a las vellosidades coriónicas. **E:** perfusión de sangre materna por las arterias uterinas, circulación en forma de fuente dentro del espacio intervelloso y salida a través de las venas uterinas.

Modificado de **Jensen, O.E., Chernyavsky, I.L.** 2019. Blood flow and transport in the human placenta. *Annu. Rev. Fluid. Mech.* **51:** 25-47.

Anexo B: Idealización de las Reacciones de Peroxidación Lipídica y Reacciones de Enzimas

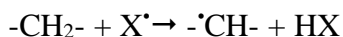
Antioxidantes

Reacciones de Peroxidación Lipídica

Para describir el proceso de peroxidación lipídica, se suelen agrupar las reacciones involucradas en tres etapas: iniciación, propagación y culminación.

Iniciación

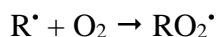
El proceso puede iniciarse con la adición de una RS (X^{\bullet} , en el ejemplo) a un lípido o, más probable, la extracción de un átomo de hidrógeno (H^{\bullet}) de un grupo metileno ($-CH_2-$), formando un radical de carbono ($^{\bullet}CH-$) en el lípido:



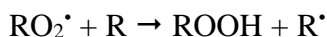
La presencia de un $C=C$ disminuye la energía del enlace carbono-hidrógeno ($C-H$) del hidrógeno alílico, especialmente, si hay $C=C$ a ambos lados del $C-H$. Por esto, los lípidos poliinsaturados son más sensibles al daño oxidativo que los lípidos monoinsaturados y saturados. Los $^{\bullet}CH-$ se pueden estabilizar por reordenamiento molecular de los $C=C$ del lípido, formando un dieno conjugado, una molécula con $C=C$ adyacentes. Esto, cambia la posición del $^{\bullet}CH-$ dentro de la estructura lipídica.

Propagación

Si dos $^{\bullet}CH-$ de lípidos adyacentes, colisionan, pueden enlazarse y entrecruzar a los lípidos. Aunque, bajo condiciones aerobias, el destino más probable es la adición de O_2 al $-CH-$ del lípido (ahora radical lipídico, R^{\bullet}) para formar el radical peroxilo (RO_2^{\bullet}):



Este RO_2^{\bullet} , a su vez, puede extraer un H^{\bullet} de algún lípido adyacente, convirtiéndose en un hidroperóxido lipídico (ROOH) y produciendo otro R^{\bullet} :



Si el RO_2^{\bullet} ataca a algún C=C dentro del mismo lípido, se genera, en cambio, un peróxido cíclico. En conjunto, estos productos se denominan peróxidos lipídicos.

Adicionalmente, los metales de transición (M_t) catalizan la ruptura del enlace entre los oxígenos (O-O) del ROOH, produciendo el radical alcoxilo (RO^{\bullet}):



Este RO^{\bullet} , de igual forma, puede oxidar a otros los lípidos y peróxidos lipídicos adyacentes o atacar a C=C en su propia estructura.

Entonces, el ataque de RO_2^{\bullet} y RO^{\bullet} a otras moléculas lipídicas adyacentes, que resulta en la producción de distintos R^{\bullet} y su subsecuente oxidación, representa la etapa de propagación de la peroxidación lipídica.

Culminación

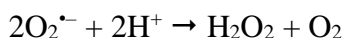
La continua oxidación y subsecuente fragmentación de las estructuras lipídicas, produce finalmente un grupo diverso de sustancias, como hidrocarburos y aldehídos. La entidad molecular de estos compuestos dependerá de la entidad lipídica oxidada y los sitios de su estructura que se vieron atacados durante la oxidación. En general, estas moléculas actúan sobre distintas actividades fisiológicas y presentan diversos grados de citotoxicidad.

Reacciones de Enzimas Antioxidantes

Entre las ROS, las entidades moleculares más clásicamente estudiadas, se componen de las especies intermedias de la reducción tetravalente del O_2 a H_2O , constituidas por: la reducción univalente del O_2 , llamada anión superóxido $O_2^{\bullet-}$; su reducción divalente, el H_2O_2 y su reducción trivalente, el $\bullet OH$. Siendo estas sustancias las responsables de muchos de los daños asociados a la toxicidad del O_2 . Ahora, a nivel celular, el sistema de regulación principal de las ROS, es el constituido por las enzimas antioxidantes. Dichas enzimas, están conformadas por diversas familias proteicas, de las que se destacan tres:

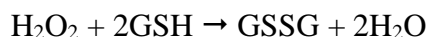
Superóxido Dismutasa (SOD)

Cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 . Existen varias formas de esta enzima dependientes de metales diferentes, como la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (CuZnSOD) o la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD). En general, catalizan la misma reacción neta:



Glutación Peroxidasa (GPx)

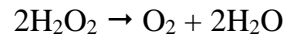
Esta enzima cataliza la oxidación del tripéptido glutatión desde su forma reducida monomérica (GSH) a su forma oxidada dimérica (GSSG) para reducir al H_2O_2 a H_2O :



Sumado a esto, el glutatión es, de hecho, una molécula con capacidad antioxidante directa, al interactuar y estabilizar diferentes RS por mecanismos no enzimáticos.

Catalasa (Cat)

Esta enzima también lidia con el H₂O₂ al descomponerlo por dismutación a O₂ y H₂O:



Modificado de **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.** 2015. Free radicals in biology and medicine.

Quinta Edición, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra.

Anexo C: Consentimiento Válido

Universidad Central de Venezuela

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

Efecto del Gluconato de Magnesio sobre los Niveles de Peroxidación Lipídica y la Actividad Ca^{2+} -ATPasa de Fantasma de Glóbulos Rojos de Mujeres Sanas

Yo, _____, C.I.: _____,
Nacionalidad: _____, Estado Civil: _____, Domiciliado en: _____, siendo mayor de 18 años, en uso pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio que más abajo indico, declaro mediante la presente:

1. Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla, por parte del Br. Victor Manuel Lugo, estudiante de pregrado de la escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, así como estudiante asistente del Laboratorio de Bioenergética Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, bajo la supervisión del Dr. Reinaldo Marín, de todos los aspectos relacionados al proyecto de investigación científica titulado «Efecto del Gluconato de Magnesio sobre los Niveles de Peroxidación Lipídica y la Actividad Ca^{2+} -ATPasa de Fantasma de Glóbulos Rojos de Mujeres Sanas».
2. Conocer bien el protocolo experimental expuesto por el estudiante, en el cual se establece que mi participación en el presente trabajo, consiste en donar, de manera voluntaria al Laboratorio de Bioenergética, una muestra de sangre venosa de 15 a 20 mL, obtenida por venopunción de alguno de mis brazos.
3. Que la sangre que acepto donar, así como la información que suministre durante la donación de dicha sangre al estudiante del Laboratorio de Bioenergética Celular, será utilizada única y exclusivamente para el proyecto de investigación científica antes mencionado.
4. Que se me ha garantizado total confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como de cualquier información relativa a mi persona a la que tengan acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.
5. Que los resultados obtenidos en el presente estudio sólo se utilizarán con fines académicos.
6. Que mi participación en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno para mi salud. Si bien la donación voluntaria de una pequeña muestra de sangre no representa ningún riesgo para la salud de una mujer sana, las personas asociadas a este proyecto se hacen responsables de eventos adversos sobre las donantes de sangre, que estén única y exclusivamente relacionados con la toma de muestra de sangre.
7. Que cualquier pregunta que yo tenga en relación con el estudio, o los resultados obtenidos, me será respondida oportunamente por parte de las personas asociadas a la investigación, con quienes me puedo comunicar por el teléfono local del Laboratorio de Bioenergética Celular: 0212-5041395.
8. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación, y que de considerarlo conveniente, puedo solicitar mi desincorporación del proyecto antes mencionado, sin que cause problema alguno.