

## Estrés Oxidativo

• **ANUNCIO DEL XX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE FARMACOLOGÍA.**

• **ARTÍCULOS DE REVISIÓN:**

Relación entre la suplementación de l-arginina y la ocurrencia de preeclampsia.  
Dr. Ramón Rodrigo y cols.

Relacion entre el perfil de ácido graso de membrana y la actividad de la (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPasa en pacientes con hipertension esencial.  
Dr. Ramón Rodrigo y cols.

Antioxidantes frente a estrés oxidativo inducido por hipoxia hipobárica en testículo y epidídimo.  
Dra. Andrea B. Zepeda y Dr. Jorge G. Farías.

Efeito antidepressivo e atividade serotoninérgica da curcumina em modelos de animais de depressão.  
Dr. Lúcio Fernandes Pires, Dr. Rivellison Mendes de Freitas e Dr. Adriano Carvalho Tupinambá Rodrigues.

• **ARTÍCULOS ORIGINALES:**

Determinación de biomarcadores de respuesta antioxidante en un modelo de isquemia-reperfusión en el corazón aislado de la rata

## Panel de Editores:

La Revista de Farmacología de Chile tiene un panel de editores conformado por connotados farmacólogos nacionales que son miembros de la Sociedad de Farmacología de Chile y académicos de las principales universidades chilenas.

## Comité Editorial:

Dr. Ramón Sotomayor-Zárate, **Editor en Jefe**  
Dr. Pablo Jara Picas, **Co-Editor**  
Dr. Hernán E. Lara  
Dra. Viviana Noriega  
Dr. Juan Carlos Prieto  
Dra. Jacqueline Sepúlveda  
Dr. Juan Pablo G. Huidobro-Toro

Dra. Katia Gysling  
Dra. Inés Ruiz  
Dr. Iván Saavedra S.  
Dr. Alfonso Paredes V.  
Dr. Rodrigo Castillo P.  
Dra. Gabriela Díaz-Véliz  
Dr. Patricio Iturriaga-Vásquez

## Evaluadores Asociados:

Dr. Hugo F. Miranda  
Dra. María Eugenia Letelier  
Dr. Frederick Ahumada  
Dr. Gonzalo Bustos O.  
Dr. Raúl Corrales V.  
Dr. Guillermo Díaz-Araya  
Dra. Verónica Donoso  
Dr. Mario Faúndez  
Dra. Jenny Fiedler  
Dr. Miguel Reyes-Parada  
Dr. Yedy Israel  
Dr. Ricardo Maccioni  
Dra. Verónica Kramer  
Dr. Sergio Lavandero  
Dr. Juan Diego Maya  
Dr. Antonio Morello

Dra. Myriam Orellana  
Dra. María Elena Quintanilla  
Dra. Teresa Pelissier S.  
Dr. Javier Puente  
Dr. Luis Quiñones  
Dr. Patricio Saéz-Briones  
Dra. Coralia Rivas  
Dr. Leonel Rojo  
Dra. Lutske Tampier  
Dra. Gladys Tapia  
Dra. M. Antonieta Valenzuela  
Dra. M. Araceli Valle  
Dr. Luis Videla  
Dr. Raúl Vinet  
Dr. Bruce K. Cassels  
Dr. Sergio Mora

## Revista de Farmacología de Chile

Derechos Reservados Sociedad de Farmacología de Chile  
ISSN 0718-8811 versión impresa  
ISSN 0718-882X versión digital

Todos los derechos reservados. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, almacenada en sistema alguno de tarjetas perforadas o transmitida por otro medio -electrónico, mecánico, fotocopiador, registrador, etcétera- sin permiso previo por escrito del comité editorial.



## **EDITORIAL**

**Ramón Sotomayor-Zárate**, Pharm.D., Ph.D  
Editor en Jefe

La Revista de Farmacología de Chile ha entrado en su sexto año de publicaciones periódicas, destacándose durante estos últimos dos años la publicación de 5 números con 21 manuscritos originales.

Esta nueva publicación está centrada en la temática del estrés oxidativo, un tema muy importante y desarrollado por connotados farmacólogos chilenos. Para este número se contó con la invaluable cooperación como editor asociado del Dr. Rodrigo Castillo, recibándose 4 manuscritos originales en el tema. Además, cabe destacar que en este número hemos publicado un manuscrito original recibido desde Brasil.

Esperamos seguir contando con la cooperación de nuestros socios en la elaboración de volúmenes temáticos e invitamos a investigadores nacionales e internacionales a enviarnos trabajos originales para su publicación. También invitamos a los alumnos de postgrado en farmacología para que nos envíen resúmenes e ideas sobre nuevas temáticas a publicar en los próximos volúmenes.

Para terminar solo me cabe señalar mi gratitud por el interés constante de varios socios de mantener la continuidad de nuestra revista y seguir editando nuevos números temáticos.

## **EDITORIAL: NUEVO ENFOQUE EN EL ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO**

**Rodrigo Castillo Peñaloza**, M.D., Ph.D.  
Editor Asociado

El concepto de estrés oxidativo se ha desarrollado a partir de conceptos semánticos e interpretativos muy distintos. En la década del 80, Helmut Sies, lo define como un fenómeno patológico y negativo para el organismo. Desde entonces, ha quedado claro que tanto las especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) no solamente son dañinas, sino que sirven como señales de comunicación intra e inter-celular en muchos eventos fisiológicos y fisiopatológicos. En términos más generales, el estrés oxidativo es un estado de desbalance que provoca un cambio decisivo en los patrones de expresión génica, generando las condiciones para su propia resolución. Es por esto que su bloqueo o barrido con supuestos antioxidantes (scavengers) no es eficaz, y la mayoría de los ensayos clínicos con suplementos antioxidantes han sido cuestionados.

Esta concepción matizada deja en claro que el estilo a veces más químico y puro del estrés oxidativo se ha entrelazado con el sentido más biológico. El estado redox celular, y específicamente la activación de factores de transcripción redox-sensibles, se está estudiando en diversos modelos como un elemento central de la homeostasis celular y orgánica. Por otra parte, la bienvenida de la medicina preventiva en la década de los 90, ha hecho emerger y desarrollar una serie de investigaciones más aplicadas que tratan de relacionar el inicio y progresión de las enfermedades con las huellas de este daño oxidativo, llamados biomarcadores de estrés oxidativo.

Estos biomarcadores de estrés oxidativo, definidos por el profesor Halliwell, como productos químicamente únicos y detectables, que aumenten o disminuyan durante los períodos de estrés oxidativo, que posean relativamente larga vida media, y que no estén influidos por otros procesos celulares, parecen ser de buena utilidad a quienes tratamos de abordar los eventos biológicos y algunas enfermedades desde este prisma.

En este volumen temático se incluyen 3 revisiones bibliográficas y 1 artículo original, todas contribuciones de Socios Activos de la SOFARCHI, acerca de algunos temas biomédicos relacionados con la ocurrencia de estrés oxidativo, como la Hipertensión Arterial Esencial y la Hipoxia Hipobárica.

Esperamos junto al Editor en Jefe, que el interés por nuestra Revista de Farmacología de Chile crezca y siga siendo una instancia comunicación entre nosotros.

**CONTENIDO**

## **Revista de Farmacología de Chile**

**AÑO 2013 VOLUMEN 6 NÚMERO 1**

**ANUNCIO DEL XX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE FARMACOLOGÍA:**

**SEGUNDO ANUNCIO**

Sociedad Cubana de Farmacología

**ARTÍCULOS DE REVISIÓN:**

**RELACIÓN ENTRE LA SUPLEMENTACIÓN DE L-ARGININA Y LA OCURRENCIA DE PREECLAMPSIA**

Ramón Rodrigo y cols.

**RELACION ENTRE EL PERFIL DE ACIDOS GRASOS DE MEMBRANA Y LA ACTIVIDAD DE LA (Na, K)-ATPasa EN PACIENTES CON HIPERTENSION ESENCIAL**

Ramón Rodrigo y cols.

**ANTIOXIDANTES FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR HIPOXIA HIPOBÁRICA EN TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO**

Andrea B. Zepeda y Jorge G. Farías

**EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ATIVIDADE SEROTONINÉRGICA DA CURCUMINA EM MODELOS DE ANIMAIS DE DEPRESSÃO**

Lúcio Fernandes Pires, Rivelilson Mendes de Freitas e Adriano Carvalho Tupinambá Rodrigues

**ARTÍCULOS ORIGINALES:**

**DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN UN MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN EL CORAZÓN AISLADO DE LA RATA**

Rodrigo Castillo y cols.



## ANUNCIO DEL XX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE FARMACOLOGÍA

### 20<sup>MO</sup> CONGRESO LATINOAMERICANO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

#### 5<sup>TO</sup> CONGRESO IBEROAMERICANO DE FARMACOLOGÍA

#### 5<sup>TO</sup> CONGRESO INTERNACIONAL Y

#### 11<sup>NO</sup> CONGRESO NACIONAL DE SOCIEDAD CUBANA DE FARMACOLOGÍA

*Sociedad Cubana de Farmacología*

En nombre de la Asociación Latinoamericana de Farmacología (ALF) y la Sociedad Cubana de Farmacología (SCF) le estamos invitando a participar en el 20<sup>mo</sup> Congreso Latinoamericano de Farmacología y Terapéutica, el 5<sup>to</sup> Congreso Iberoamericano de Farmacología, el 5<sup>to</sup> Congreso Internacional y el 11<sup>no</sup> Congreso Nacional de la Sociedad Cubana de Farmacología "LATINFARMA 2013", el cual tendrá lugar del 21 al 25 de Octubre del 2013, en el Palacio de la Convenciones de La Habana, en Cuba.

El Congreso analizará todos los temas relacionados con la farmacología, la terapéutica y ciencias relacionadas, con un énfasis particular en el desarrollo de nuevos medicamentos, optimización de los ya existentes y su uso racional. Dirigido a profesionales que desarrollan su actividad científica, en la investigación, la asistencia, y la docencia, en los diferentes campos de acción de la farmacología, dentro de estos; la Farmacología básica, experimental y clínica como sus pilares fundamentales, en función del desarrollo de los medicamentos, del monitoreo de su seguridad y eficacia, así como la enseñanza de esta importante disciplina, unido al impetuoso desarrollo alcanzado por la farmacoepidemiología, la inmunofarmacología, la fitoterapéutica, la farmacogenética, entre otras temáticas de interés a nivel internacional.

Diferentes Simposios y Talleres que combinan la Farmacología básica y aplicada con la terapéutica serán desarrollados, dentro de un Programa Científico que ha sido concebido con Conferencias Plenarias, Simposios, Talleres, Sesiones de Alerta Médica y de Carteles; modalidades todas incluidas en los diferentes Eventos de carácter internacional que se realizarán de forma simultánea, a saber: el 6to Taller de Farmacovigilancia, el

7<sup>mo</sup> Taller de Farmacoepidemiología, el 3<sup>er</sup> Simposio sobre Enseñanza de la Farmacología, el 3<sup>er</sup> Simposio de Actualización Terapéutica en Cáncer, 1<sup>to</sup> en Psiquiatría y 1<sup>to</sup> en Reproducción, el 2<sup>do</sup> Simposio de Farmacogenética y Reunión de la Sociedad Iberoamericana de Farmacogenética, el 2<sup>do</sup> Taller de Farmacoconomía, el 2<sup>do</sup> Taller de Investigación y Desarrollo de Productos Genéricos, el 2<sup>do</sup> Simposio sobre Daño Cerebral y Neuroprotección: Un Enfoque Básico y Clínico, el 2<sup>do</sup> Taller de Farmacología del Dolor, el 2<sup>do</sup> Taller de Métodos Alternativos (3Rs) en la Farmacología, la Toxicología y la Enseñanza, el 1<sup>er</sup> Simposio de Inmunofarmacología y Biotecnología, el 1er Simposio Latinoamericano de Epigenética, 2<sup>do</sup> Simposio de Farmacología de Productos Naturales, 2<sup>do</sup> Simposio de Cronobiofarmacología, 4<sup>to</sup> Simposio de Estrés Oxidativo en Estados de Salud y Enfermedad, 2<sup>do</sup> Simposio de Resistencia Antimicrobiana, 3<sup>er</sup> Simposio de Ensayos Clínicos y el 1<sup>er</sup> Simposio de Farmacología Básica.

Durante el evento se desarrollará simultáneamente una Feria Comercial Adjunta, que le invitamos a visitar y participar. La sede del Congreso, el Palacio de las Convenciones de La Habana, se encuentra situado en uno de los sitios más hermosos de ciudad y posee todas las facilidades para el exitoso desarrollo de eventos nacionales e internacionales.

Durante su estancia en Cuba lo exhortamos a planificar visitas para conocer muchos lugares interesantes no sólo en La Habana, sino en aquellas provincias cercanas a la capital de Cuba (Pinar del Río, Matanzas, Cienfuegos, y Villa Clara).

---

**Informaciones:** Dr. René Delgado Hernández, Presidente Congreso Presidente, Sociedad Cubana de Farmacología y de la Asociación Latinoamericana de Farmacología (ALF). Correo electrónico: [rdelgado@infomed.sld.cu](mailto:rdelgado@infomed.sld.cu)

Lo invitamos igualmente a descubrir y disfrutar de los tesoros geográficos, turísticos, históricos y culturales de la isla de Cuba y en particular, de la hermosa ciudad de La Habana, en una atmósfera única e interesante, creada por el impresionante desarrollo científico alcanzado por las ciencias farmacológicas y otras disciplinas biomédicas relacionadas en los países latinoamericanos y del mundo que nos visitan y muy especialmente por los adelantos de Cuba, donde las ciencias biomédicas forman parte de una opción determinante de futuro y desarrollo sostenible.

En Cuba, que hoy es capaz de mostrar ante el mundo un Sistema de Salud equitativo, donde se hace realidad la aspiración de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de Salud para Todos, Usted encontrará también la contagiosa hospitalidad, la alegría y la solidaridad del pueblo cubano, que lo recibirá como un entrañable amigo.

Esperamos poder saludarlo en La Habana, en Octubre del 2013..... durante LATINFARMA 2013!!.



**Dr. René Delgado Hernández**

Presidente del Congreso

Presidente de la Sociedad Cubana de Farmacología y de la Asociación Latinoamericana de Farmacología (ALF)

Email: [rdelgado@infomed.sld.cu](mailto:rdelgado@infomed.sld.cu)

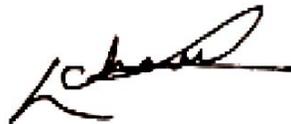


**Dr. Octavio Piñeros**

Vicepresidente del Congreso

Vicepresidente Asociación Latinoamericana de Farmacología (ALF)

Email: [pineroso@gmail.com](mailto:pineroso@gmail.com)



**Dr. Mario Landys Chovel Cuervo**

Vicepresidente

Comité Organizador y Científico

Email: [mlandys@finlay.edu.cu](mailto:mlandys@finlay.edu.cu)

[eventosfarmacologia@finlay.edu.cu](mailto:eventosfarmacologia@finlay.edu.cu)

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

# RELACIÓN ENTRE LA SUPLEMENTACIÓN DE L-ARGININA Y LA OCURRENCIA DE PREECLAMPSIA. (Relationship between L-arginine supplementation and the occurrence of preeclampsia)

Ramón Rodrigo<sup>1\*</sup>, Rodrigo Valenzuela<sup>1</sup>, Manuel Rubilar<sup>1</sup>, Fernanda Galleguillos<sup>1</sup>, Jaime González<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile*

### RESUMEN

La preeclampsia (PE) es un síndrome sistémico del embarazo que tiene una alta prevalencia y se asocia a una alta morbi-mortalidad tanto materna como fetal. Aunque la etiología de la PE aún es desconocida, el desarrollo del EO y la disfunción endotelial han sido implicados tanto en su patogenia como en el desarrollo de las manifestaciones clínicas de este síndrome. En la actualidad, no existe un tratamiento satisfactorio para prevenir el desarrollo de PE, salvo que seguir algunas medidas para evitar o reducir las complicaciones, siendo el parto prematuro, el único tratamiento con éxito en PE severa. Estudios recientes han dado algunas pistas sobre la importancia del óxido nítrico (NO) en la fisiopatología de la PE. Durante el embarazo, el NO es uno de los factores de relajación más importantes del miometrio y también juega un papel clave en el control del flujo sanguíneo útero-placentario. Se ha demostrado en distintos estudios que en la PE, la biodisponibilidad de NO se reduce en comparación con el embarazo normal. Se postula que esta alteración se debe a la disminución de la vida media del NO y no a un deterioro en la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). La deficiencia del sustrato y el aumento de especies reactivas de oxígeno podrían contribuir a la disminución en la biodisponibilidad de NO. En consecuencia, se han encontrado menores niveles plasmáticos de L-arginina en mujeres con PE que aquellos en el embarazo normal. El objetivo de este estudio, es proporcionar evidencia que apoye la importancia que tendría en el embarazo la suplementación temprana con L-arginina sobre la reducción de la aparición de PE.

**Palabras Claves:** Preeclampsia, Óxido nítrico, L-arginina

Publicado por la Sociedad de Farmacología de Chile

### INTRODUCCIÓN

La preeclampsia (PE) es un síndrome sistémico de elevada morbimortalidad materno-fetal (Roberts & Cooper 2001; Ronsmans y cols., 2006), que afecta alrededor del 5% de los embarazos (Rodgers et al 1998). Este síndrome se desarrolla en mujeres normotensas y se caracteriza por hipertensión arterial y proteinuria durante el embarazo, resolviéndose postparto (Davey y MacGillivray 1988). Está ampliamente aceptado que el origen de la enfermedad reside en la placenta (Redman 1991; Hou y cols. 2008).

Algunos factores de riesgo para esta enfermedad son mujeres primigestas, alto índice de masa corporal, entre otros (Trupin, 1996; Duckitt y Harrington, 2005). No existe un tratamiento satisfactorio para prevenir el desarrollo de

la enfermedad, excepto medidas para evitar o reducir las complicaciones (Afifi, 2003; Meher, 2005).

El evento central en el desarrollo de la PE es la deficiente invasión de las células del trofoblasto extraviloso (TEV) al endotelio de las arterias espiraladas del endometrio durante el primer trimestre del embarazo (Khong, 1986; Hubel, 1999). Al alterarse el proceso fisiológico de conversión de las arterias espiraladas desde vasos tortuosos de alta resistencia en vasos de alta conductancia y baja resistencia (Aquilina y cols., 1996; Merviel y cols., 2004), se generaría una reducción de la perfusión útero-placentaria, desarrollándose un estado de EO (EO) debido a eventos de isquemia-reperusión por los cambios en la actividad vasomotora materna (Burton y cols., 2004; Sibai y cols., 2005; Davidge 1998).

**Correspondencia a:** Dr. Ramón Rodrigo, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile Avenida Independencia 1027, Casilla 70058, Santiago 7, Chile. Teléfono: 56-2-29786126 Fax: 56-2-29786126. Correo Electrónico: [rodrigo@med.uchile.cl](mailto:rodrigo@med.uchile.cl)

Además se activan vías de apoptosis conduciendo a la expulsión aumentada de microvesículas de sincitiotrofoblasto a la circulación materna, las que han sido relacionadas directamente con el desarrollo del síndrome de respuesta inflamatoria materna (Rajmakers y cols., 2004; Holthe y cols., 2004).

La disfunción endotelial (DE) que se produciría en la PE tendría un papel importante en su mecanismo fisiopatológico. La mayoría de los atributos clínicos de PE, tales como hipertensión y proteinuria derivan de los cambios patológicos en el endotelio vascular materno e implica un papel del EO y la DE.

La PE consta de dos fases; 1) placentación anómala 2) disfunción endotelial generalizada. Sin embargo, menos de la mitad de los embarazos con preeclampsia tienen una placentación alterada. En consecuencia, han surgido nuevas hipótesis que postulan que la PE es una condición determinada por una exacerbada respuesta inflamatoria sistémica, ésta podría estar mediada por dos factores: 1) una placenta con mayor volumen asociado con una vasculatura más susceptible ("PE materna") y 2) una placentación alterada asociada a EO ("PE placentaria").

Existen varios mecanismos intrínsecos y extrínsecos que pueden alterar el proceso fisiológico de la placentación en la interface materno-fetal. Entre ellos, y en relación a la isquemia-reperfusión, está el aumento de la apoptosis del TEV. El aumento de la apoptosis está mediado, en parte, por una disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) y el aumento del EO y factores pro-inflamatorios. Además, la hipoxia genera un estado anti-angiogénico, mediado por un aumento local y sistémico de sFlt-1, receptor soluble del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que a su vez, reduce la biodisponibilidad de este último como también del factor de crecimiento placentario (PlGF), lo que resulta en un deterioro de la placentación.

A pesar del creciente conocimiento de la fisiopatología de la PE, aún no existen métodos de prevención efectivos. Varios estudios multicéntricos internacionales han demostrado la ineficacia del uso de vitaminas antioxidantes y de ácido acetilsalicílico en prevenir la PE. Estudios recientes han demostrado la importancia de NO en la protección del TEV contra los mecanismos pro-apoptóticos generados en la interface materno-fetal. Es importante explicar que el NO es sintetizado por la óxido nítrico sintasa (NOS). Este es una familia de enzimas, de las cuales la isoforma más importante en el embarazo es la endotelial (eNOS). La eNOS utiliza L-arginina como sustrato y tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactor para sintetizar NO. En condiciones patológicas, la biodisponibilidad de NO se ve disminuida debido al déficit de sustrato y el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que desplaza la síntesis de NO por la eNOS a la síntesis de radical anión

superóxido. De acuerdo con esto, ha habido varios estudios utilizando suplementos de L-arginina en el tratamiento de la PE, con resultados muy prometedores. Sin embargo, aún no existen conclusiones definitivas para su implementación del uso clínico de este agente y la función de la L-arginina en la prevención de la PE todavía debe ser investigada con mayores estudios.

Esta revisión se enfoca en el posible uso terapéutico de suplemento de L-arginina para la prevención de PE, en base a una mayor biodisponibilidad de NO, la cual se encuentra significativamente disminuida en esta enfermedad.

## FISIOPATOLOGÍA DE LA PREECLAMPSIA

### Estrés Oxidativo en embarazo normal:

El embarazo en sí es una condición que aumenta la susceptibilidad al EO, lo que conduce a un potencial daño por agentes oxidantes en los tejidos (Sies, 1991). Varios órganos en las mujeres embarazadas muestran un mayor consumo basal de oxígeno y cambios en el uso del sustrato energético. Al término del embarazo, la placenta humana es hemomonocorial, lo que significa que una sola capa de células de trofoblasto existe entre la sangre materna y la fetal, favoreciendo el intercambio de gases, nutrientes y productos metabólicos. A su vez, la liberación de oxígeno se ve favorecido por la menor presión parcial de oxígeno, lo que aumenta la producción de ácido láctico y reduce el pH dentro de las células de la placenta y de la circulación fetal. Así como la placenta hipóxica va madurando, se va desarrollando una mayor vascularización para crear un ambiente rico en oxígeno. Por otra parte, el aumento de la masa mitocondrial favorece la producción de ROS (Liochev & Fridovich, 1997).

La placenta también produce NO (Dotsch y cols., 2001), dando lugar a otra fuente local de radicales libres, contribuyendo también probablemente a la disfunción endotelial, como se expone más adelante. Finalmente, debido a que la placenta también es rica en macrófagos, la producción local de radicales libres, incluyendo especies de reactivas del cloro, también puede contribuir al desarrollo de EO (Myatt & Cui, 2004). Este punto de vista se basa en la capacidad de los macrófagos para expresar tanto la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Myatt y cols., 1993) y la NADPH oxidasa (Matsubara y cols., 2001); pero los estudios sobre la xantina oxidasa son de menor potencia. Por otro lado, los mecanismos de defensa antioxidantes contra el daño de ROS se potencian durante el embarazo. Así, se ha encontrado un aumento progresivo de eliminadores de ROS, tales como el glutatión y la bilirrubina, así como aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes en la placenta (Qanungo &

Mukherjea, 2000). Además, las actividades de la glutatión peroxidasa en eritrocitos y plaquetas, y de la superóxido dismutasa (SOD) extracelular también se ha encontrado aumentadas progresivamente durante toda la gestación hasta el tercer trimestre (Tamura y cols., 2001) lo que sugiere también que existe un aumento de la presencia de aniones superóxido durante el embarazo. De acuerdo con estas observaciones, la inducción de enzimas antioxidantes después de la exposición al EO está bien documentada (Bae y cols., 2004). Genes que codifican para estas enzimas están frecuentemente regulados de forma coordinada a través de los elementos de respuesta antioxidante (ARE) en sus regiones reguladoras de genes promotores (Lee & Johnson, 2004). Además, se ha informado que el factor de transcripción llamado nuclear factor erythroid-derived 2 related factor 2 (Nrf2) se une a estos sitios ARE, lo que lleva a la sobre regulación de genes río abajo que regulan una amplia gama de ARE impulsadas por los genes en varios tipos de células. Para compensar estos efectos, la peroxidación lipídica se vuelve más atenuada con el progreso de la gestación, protegiendo al feto de la toxicidad por ROS (Qanungo & Mukherjea, 2000). Los mecanismos de adaptación mejoran el sistema de defensa antioxidante materno que contrarrestan el efecto de las ROS a través de la inducción enzimática, así como a través de protectores no enzimáticos contra radicales libres y eliminadores de ellos o scavengers, pudiendo prevenir así la aparición de EO. Sin embargo, el embarazo es un estado en el que podría estar alterada esta adaptación y el equilibrio fácilmente podría inclinarse hacia un estado prooxidante. Así, el daño por EO ha sido implicado en la ruptura prematura de las membranas (Woods y cols., 2001) y se ha asociado con la restricción del crecimiento fetal intrauterino (Takagi y cols., 2004).

#### **Teorías Actuales de la PE:**

Hay varias hipótesis sobre la génesis de la PE, pero últimamente ha habido más consensos en que la PE es un síndrome, y por lo tanto tendría una etiología multifactorial. También hay acuerdo en que la PE tiene dos fases: La primera etapa de este modelo, cuyos cambios histológicos y moleculares se han descrito anteriormente, es la reducción del flujo sanguíneo materno hacia el espacio intervilloso. La segunda etapa de este modelo es la respuesta inflamatoria sistémica materna frente a la reducción de la perfusión placentaria (Roberts y cols., 1995). Esta perfusión anormal del espacio intervilloso puede conducir a la sobre producción de diferentes moléculas que finalmente afectan a la función endotelial y reducen la perfusión de órganos. La búsqueda de este factor ha llevado a la identificación de numerosas sustancias como candidatos a ser el "Factor X". Más recientemente, también existe un modelo integrado propuesto por Redman y cols., (2005), que asume que la placenta desempeña un papel central en la patogénesis de

la PE, pero que la placentación anormal es poco probable que sea la única causa de este síndrome (Roberts y cols., 1995). Sin embargo, es bien sabido que la placentación anormal no significa PE necesariamente, y es por lo tanto necesario encontrar una relación entre la enfermedad de la placenta y el síndrome materno.

#### **PRIMERA FASE: INSUFICIENCIA PLACENTARIA**

##### **Alteración de la placentación:**

El objetivo principal de la placentación es la transformación de las arterias espiraladas, ramas terminales de la arteria uterina, en vasos con alta capacitancia y baja resistencia. Para lograr este objetivo, el proceso requiere interacciones complejas entre varios tejidos en la interfaz materno-fetal.

Se acepta hoy que durante el embarazo temprano, la placentación normal se produce en un ambiente relativamente hipóxico (oxígeno <2%) que es esencial para el desarrollo aceptable, que a su vez impide la diferenciación del trofoblasto en un fenotipo invasivo (Caniggia y cols., 2000; Jauniaux y cols., 2003). El flujo sanguíneo intervilloso aumenta alrededor de las 10-12 semanas de gestación exponiendo al trofoblasto a una mayor tensión de oxígeno (pO<sub>2</sub>) resultando en un aumento de la actividad y niveles de las enzimas antioxidantes más importantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en los tejidos vellosos (Watson y cols., 1998). El factor inducible por hipoxia -1 (HIF-1), y concretamente la expresión de su subunidad  $\alpha$ -1, y el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 3 (TGF $\beta$ 3), un inhibidor de la diferenciación temprana del trofoblasto, median los efectos de baja tensión de oxígeno durante el primer trimestre de embarazo. La expresión de ambas moléculas es alta en el embarazo temprano y caen alrededor de la 10-12 semanas de gestación cuando se elevan los niveles placentarios de pO<sub>2</sub>, atribuidos a una desconexión de las arterias uterinas espiraladas (Caniggia y cols., 2000). Además, también hay evidencia de que la leptina, TGF $\beta$ 1 y PAI-2 están implicados en el proceso de la invasión fisiológica del trofoblasto (González y cols., 2000; Irving & Lala 1995; Kruihof y cols., 1995).

En el embarazo, la invasión endovascular progresiva del trofoblasto se produce progresivamente a partir de la decidua en el tercio inferior del miometrio entre la 12 y 20 semanas de gestación (Lyll y cols., 1995; Pijnenborg y cols., 1996; Zhou y cols., 1997). Estos cambios se caracterizan por la remodelación de las arterias espiraladas incluyendo la desintegración de la túnica media junto con la lámina elástica interna, y la sustitución del endotelio por células trofoblásticas extravillosarias que expresan un fenotipo endotelial. Los cambios implican la conversión de los estrechos tubos arteriales musculares en tubos flácidos

y más ancho que facilitan la perfusión placentaria sin obstáculos con el flujo de la sangre materna necesaria para un adecuado intercambio de moléculas clave entre las circulaciones materna y fetal. Como consecuencia de los anteriores cambios fisiológicos, la remodelación de las arterias espiraladas facilita el incremento del flujo sanguíneo utero placentario en diez veces.

Los estudios histológicos han demostrado que el proceso de remodelado vascular de la arteria espiralada es parcial en embarazos afectados por PE o restricción del crecimiento fetal (RCF) (Khong y cols., 1986). La invasión del trofoblasto extravelositario y la remodelación de las arterias espiraladas ocurren muy superficialmente o no en PE. Este proceso de invasión disfuncional y la sustitución de los resultados de la función endotelial generan vasos con alta resistencia al flujo en las arterias uterinas e hipoperfusión placentaria relativa en un período de tiempo en que los primeros síntomas de PE pueden aparecer.

Una de las explicaciones moleculares para una placentación anormal fue descrito por Cannigia y cols., (1999), el cual encontró que la expresión de TGF $\beta$ 3 se incrementaba en placentas humanas con PE en comparación con los controles emparejados por edad y que la inhibición del TGF $\beta$ 3 por anticuerpos restauró la capacidad invasiva de las células trofoblásticas en placentas con PE. Los autores especulan que si la tensión de oxígeno no aumenta, o el trofoblasto no detecta este aumento, la expresión de los dos factores sigue siendo alta, lo que resulta en la invasión trofoblástica superficial y el embarazo predispone a PE. En resumen, las mujeres con PE tiene una concentración de oxígeno más baja, y esto conduce a una alta concentración de HIF-1 $\alpha$  y TGF- $\beta$ 3 en el trofoblasto, inhibiendo así la diferenciación del trofoblasto. La endoglina, molécula que inhibe la activación de la NOS mediadas por TGB- $\beta$ 3, también se incrementa en los embarazos con PE (Venkatesha y cols., 2006). La iniciación de la apoptosis tiene dos vías conocidas: intrínsecas y extrínsecas. Ambas vías finalmente conducen a la activación de las caspasas, una familia de cisteína proteasas, que son las enzimas responsables de la apoptosis. El TEV invade las arterias espiraladas, donde sustituye el endotelio y la pared muscular. Estudios recientes sugieren que esta transformación de las arterias espiraladas está mediada por una apoptosis inducida por el TEV, a través de la activación de la ruta de Fas / FasL. Además, el desarrollo de la placenta requiere remodelación constante, que está mediada por la apoptosis. La respuesta inflamatoria de los embarazos normales se debe en parte a una liberación constante de microvesículas a la circulación materna mediada por la apoptosis de las células trofoblásticas. Hay pruebas de que la tasa de apoptosis es superior en los embarazos con PE que en las normales, lo que sugiere que una alteración en

el proceso de apoptosis jugaría un papel en la fisiopatología de la PE.

#### **Estrés Oxidativo:**

Aunque la etiología de la PE aún es desconocida, se ha propuesto que el aumento del estrés oxidativo (EO) es un componente básico de esta patología, y que podría proporcionar la conexión entre la placentación anormal y el síndrome materno (Roberts & Hubel 1999; Moretti y cols., 2004)

La placenta parece ser la principal fuente de ROS que inician los sucesos fisiopatológicos en PE (Serdar y cols., 2002), sin embargo los leucocitos y el endotelio materno también contribuyen en menor medida. El fracaso de la perfusión placentaria, explicado anteriormente, explica probablemente la ocurrencia de ciclos de isquemia-reperfusión que provocan EO debido a cambios en la actividad vasomotora vascular por influencias humorales y neurales maternas (Burton y Jauniaux 2004).

Otros mecanismos propuestos de producción de ROS en embarazos con PE es la activación de los neutrófilos maternos por la masiva expulsión de microvesículas de sincitiotrofoblasto debido al aumento de los mecanismos de apoptosis o aponecroticos localmente activados durante el paso de la sangre materna a través de la placenta (Rajmakers y cols., 2004). Así pues, los neutrófilos aislados de mujeres con PE sintetizan más superóxido que los de las mujeres embarazadas normotensas (Lee y cols., 2003). Consecutivamente, los neutrófilos activados pueden conducir a la activación del endotelio vascular, contribuyendo por lo tanto a la fisiopatología de la PE (Cadden y Walsh 2008). Se ha encontrado una directa relación entre niveles elevados de F2-isoprostanos urinario con un mayor riesgo de PE (Peter Stein y cols., 2008). Por otra parte, estudios recientes han sugerido que este desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes es el efecto de la enfermedad y no el factor causal (Kaur, 2008).

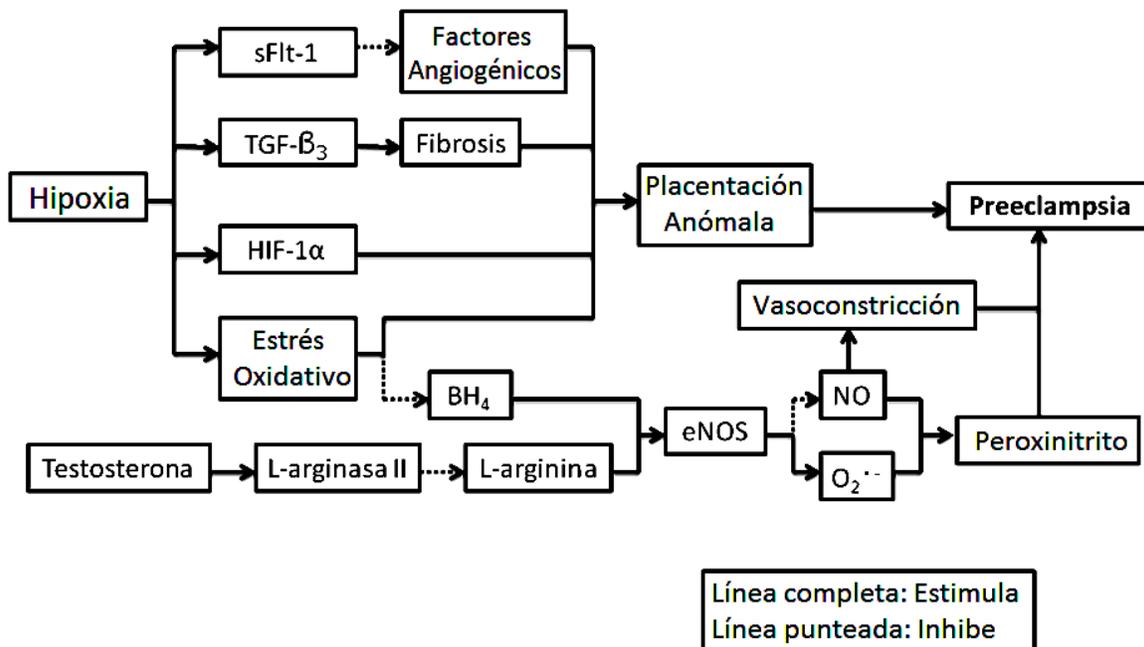
Como resultado de la activación de vías de apoptosis, se genera una mayor expulsión de microvesículas de sincitiotrofoblasto a la circulación materna. Estas partículas han sido directamente ligadas a la activación de los neutrófilos maternos, aunque los neutrófilos maternos también pueden ser activados localmente durante el paso de la sangre materna a través de la placenta (Lee y cols., 2003). En consecuencia, los neutrófilos aislados de mujeres con PE son capaces de sintetizar más superóxido que los de las mujeres embarazadas normotensas. A su vez, los neutrófilos activados pueden contribuir a la activación del endotelio vascular. Los leucocitos de la sangre materna en mujeres con preeclampsia se activan y apoyan la idea de que el EO es un factor que contribuye a la fisiopatología de la PE (Holthe y cols., 2004).

A pesar de la posibilidad de que la generación de EO de la placenta puede estar relacionada con la hipoxia debido a la perfusión uteroplacentaria reducida, la hipoxia por sí misma no es suficiente para dar cuenta de todas las características morfológicas descritas (Burton y cols., 1999). De hecho, un ciclo de isquemia-reperusión en el flujo sanguíneo uteroplacentario puede ser un factor más importante para establecer el EO placentario (Hung y cols., 2001). Como consecuencia, en mujeres con PE sea ha encontrado un aumento de la capacidad de la placenta, así como de otras células, para generar ROS (Many y cols., 2000). El EO en este contexto es una consecuencia de un desequilibrio entre la generación excesiva de ROS y reducción de la capacidad de las defensas antioxidantes.

El más común de los ROS es el anión superóxido. La xantina oxidasa y NADPH oxidasa se han identificado como los principales sistemas enzimáticos endoteliales formadores de anión superóxido, pero la contribución de la xantina oxidasa (XO) es generalmente menor (Poston & Rajmakers 2004). Sin embargo, la XO se expresa abundantemente en células de sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto, debido al hecho de que la isquemia-reperusión es un potente estímulo para la conversión de xantina deshidrogenasa

(Hassoun y cols., 1994). Además, la actividad de NADPH oxidasa, enzima constitutiva del trofoblasto de la placenta humana, es altamente estimulada en la PE (Matsubara y cols., 2001). Esta enzima consiste principalmente en 5 subunidades y se ha observado que en las placentas preeclápticas muestran incremento en la expresión de los componentes de las subunidades p22, p47, p67 y p74. Otras formas de NADPH oxidasa, también están implicadas en la fisiopatología de PE, tales como las presentes en los fagocitos (granulocitos neutrófilos y eosinófilos, monocitos y macrófagos) y células vasculares. Ha sido bien establecido que la NADPH oxidasa vascular juega un papel importante en el desarrollo de hipertensión (Touyz y cols., 2005) y por lo tanto es un blanco terapéutico para regular su actividad, la cual se puede inhibir mediante las vitaminas antioxidantes. Es de interés mencionar que bajo condiciones de EO, eNOS puede desacoplarse debido a la oxidación de BH<sub>4</sub>, su cofactor de acoplamiento que da cuenta de la dimerización de las sub-unidades de la enzima. En consecuencia, otra fuente de producción de anión superóxido se levantará, lo que explica la exacerbación de la lesión oxidativa. La Figura 1 muestra un resumen de la importancia del EO en la fisiopatología de la PE.

Figura 1.



Resumen de los mecanismos por los que el EO podría conducir al desarrollo de preeclampsia. sFlt-1, de tipo fms tirosina quinasa 1; HIF-1 $\alpha$ , factor-1 inducible por hipoxia; TGF- $\beta$ 3, factor de crecimiento transformante  $\beta$ 3; BH<sub>4</sub>, tetrahidrobiopterina; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; NO, óxido nítrico; PE, preeclampsia, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, anión superóxido.

## SEGUNDA FASE: EXPRESIÓN MATERNA

### Síndrome Materno:

Se ha postulado que la disfunción endotelial generalizada en PE está mediada por un factor desconocido generado por la placenta. Debido al hecho de que el equilibrio angiogénico / antiangiogénico podría verse afectada en PE, una considerable atención se ha centrado recientemente en los productos de genes relacionados con la angiogénesis, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento placentario (PIGF) y la tirosina soluble fms quinasa 1 (sFlt1). VEGF es un factor mitógeno específico de la célula endotelial que promueve la vascularización placentaria. Regula múltiples funciones de las células endoteliales incluyendo la mitogénesis, la permeabilidad, el tono vascular y la producción de moléculas vasoactivas (Zachary, 1998). Los efectos biológicos de la familia de receptores de VEGF están mediados por miembros de la subfamilia de clase III de receptores de tirosina quinasa: fms tirosina quinasa (Flt-1) y dominio de inserción de quinasa que contiene receptor (KDR) (Zachary & Glikli 2001). VEGF es abundante en el tejido placentario y en células de las membranas fetales y su expresión aumenta durante la gestación. Algunos estudios han reportado una disminución de este factor en la PE (Lyll y cols., 1997), mientras que en otros estudios, se ha visto que no se altera (Oh y cols., 2006) o un se presenta un aumento de expresión (Sgambati y cols., 2004). Recientemente, el aumento de los niveles circulantes de dos proteínas angiogénicas - soluble fms tirosina quinasa 1 (sFlt1) (Levine y cols., 2004) y su forma de splicing (sFlt1-14) (Sela y cols., 2008) las cuales se unen tanto a PIGF y VEGF, fueron sugeridas para predecir el desarrollo posterior de esta enfermedad. PIGF es otro miembro de la familia de VEGF que se produce predominantemente en la placenta. El sFlt1 es una proteína endógena secretada que captura las formas libres de VEGF y PIGF, evitando así que estas moléculas interaccionen con el receptor endógeno respectivo. Un mayor nivel de sFlt1 fue sugerido como un biomarcador para el posterior desarrollo de la PE (Maynard y cols., 2003). En PE, la síntesis de VEGF y PIGF libre se reduce, mientras que sFlt1 está aumentado en la placenta del segundo trimestre de embarazo (Ahmad & Ahmed 2004; Karumanchi & Bdoah 2004). Disminución de los niveles plasmáticos de VEGF se han asociado con una disminución de NO. Esto ha sido sugerido para representar un estímulo más a la formación del deterioro vascular endotelial (Tranquilli y cols., 2004).

Existe controversia entre las teorías inflamatorias versus oxidativa en el desarrollo de la PE. Aún no está claro el papel real que tendrían las citoquinas proinflamatorias en el daño primario sobre la placenta. Por otra parte, hay mucha evidencia que sugiere que la PE es un estado

oxidativo. Se ha observado que los biomarcadores de la peroxidación de lípidos están aumentados en mujeres con PE. El EO en PE también está relacionado con una disminución de antioxidantes, tales como vitamina C, E y  $\beta$ -carotenos, y una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, tales como glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (SOD). Estos hechos respaldan la hipótesis de que la hipoxia / isquemia de la placenta podría ser una fuente importante de ROS.

Por último, otro candidato que se ha estudiado son las microvesículas celulares, sub-celulares y moleculares generadas durante la apoptosis en la placenta. La tasa de apoptosis es mayor en PE. Estas micropartículas podrían generar una respuesta inflamatoria exacerbada. La figura 2 muestra un resumen de los posibles mecanismos que podrían explicar la ocurrencia del síndrome materno en PE.

### Disfunción Endotelial:

El endotelio participa en la modulación del tono vascular, el control de la hemostasia, la defensa del huésped y la inflamación, el transporte de nutrientes y la activación e inactivación de las hormonas vasoactivas. La disfunción endotelial se caracteriza por un cambio de las acciones del endotelio: vasodilatación reducida, un estado proinflamatorio y propiedades protrombóticas (Endemann y Schiffrin 2004; Luscher & Barton, 1997). La disfunción endotelial parece jugar un papel importante en el mecanismo fisiopatológico de la PE (Roberts y cols., 1998). Existen muchos factores que desempeñan un papel en el deterioro de la función celular endotelial en la PE dentro de los que se incluyen la isquemia placentaria, la toxicidad inducida por las lipoproteínas, ROS, efectos antiangiogénicos y de mala adaptación inmune, que dan como resultado la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias. Factores placentarios liberados a la circulación materna por una placenta anómala podrían conducir a una disfunción endotelial sistémica, y esto podría ser responsable de los aspectos clínicos del síndrome materno de la PE (Davison y cols., 2004).

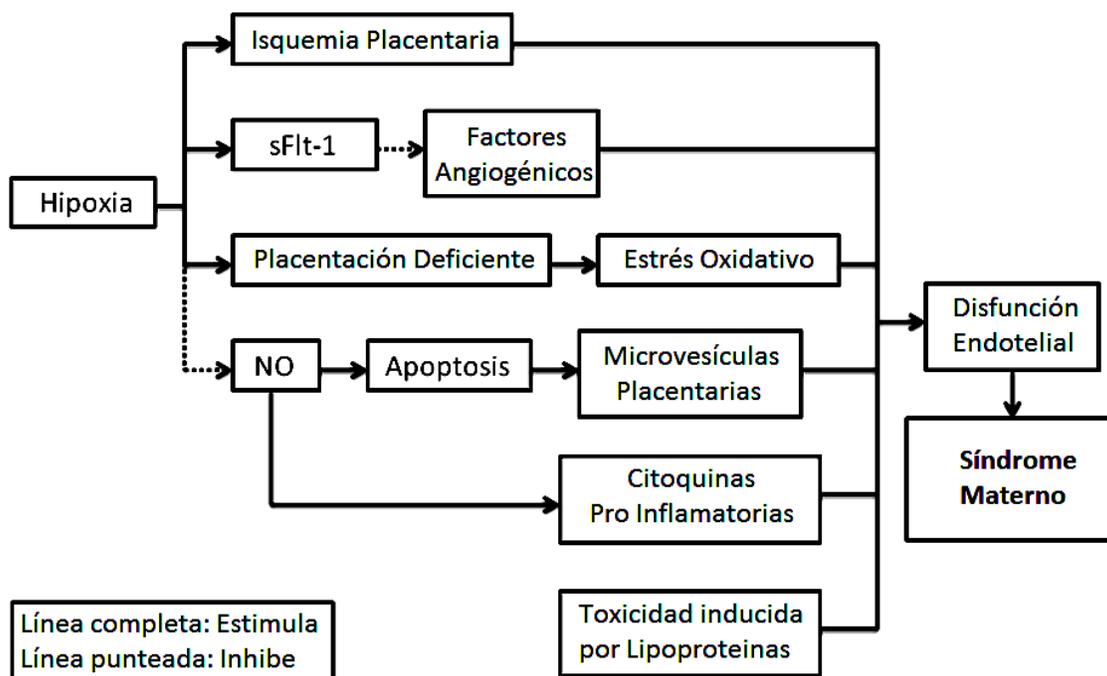
Hay evidencia de disfunción endotelial en PE, tales como los niveles altos de factor de von Willebrand (Bouchlariotou y cols., 2008; Nadar y cols., 2004), activador del plasminógeno tisular (TPA) y endotelial y del activador del plasminógeno placentario (PAI 1 y 2). En los embarazos normales, el cociente PAI 1/PAI 2 es bajo, debido a una alta masa placentaria. En PE, este cociente es alto, debido a una activación celular y una insuficiente masa placentaria (Brown, 2010; Reith y cols., 1993).

Varias sustancias vasoactivas que podrían estar alteradas debido a la disfunción endotelial se han medido. Entre ellos se encuentra la endotelina-1 (ET-1) y el tromboxano A2 (TXA2), que son potentes vasoconstrictores. Ambos se

encuentra en altos niveles en PE (Davison y cols., 2004). En la otra parte, una disminución de NO, un potente vasodilatador, también podrían estar involucrados en la patogénesis de la PE. Últimamente, un aumento de la dimetil-arginina asimétrica (ADMA), un inhibidor

competitivo de la eNOS, ha llamado la atención de muchos investigadores. La inactivación de dimetilarginina dimethylaminohydrolase (DDAH 1 y 2), enzima que metaboliza ADMA, es en parte responsable del aumento de ROS (Savvidou y cols., 2003).

Figura 2.



Síndrome Materno en Preeclampsia: Resumen de los mecanismos que podrían explicar el desarrollo del síndrome materno en preeclampsia.; sFlt1, fms-like tyrosina quinasa 1; NO, óxido nítrico

### Óxido Nítrico:

El óxido nítrico es un vasodilatador potente derivado del endotelio (Rees y cols., 1989) y un defecto en la síntesis de NO se ha documentado en embarazos con PE (Morris y cols., 1996). Durante el embarazo, el NO es uno de los factores de relajación más importantes del miometrio y también no es menos importante en el control del flujo de sangre entre el útero y placenta. Se sintetiza a través de una reacción catalizada por la NOS endotelial (eNOS) y juega un papel importante en la mantención de la homeostasis vascular. La disponibilidad del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) es relevante para la función de la enzima. En la placenta normal, las concentraciones adecuadas de L-arginina y de eNOS se orientan hacia la síntesis de NO.

Sin embargo, en PE, se han observado niveles menores que las concentraciones normales de L-arginina, provocados por una sobreexpresión de la arginasa II (Noris y cols., 2004) o por una alteración en la absorción de L-arginina por parte de los eritrocitos (da Costa y cols., 2004). En consecuencia, estas alteraciones pueden redirigir la eNOS hacia la síntesis de peroxinitrito. Además, la hipoxia placental, que se asocia con PE, no induce una regulación de la eNOS (Orange y cols., 2003). El inhibidor de eNOS N (omega)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) genera una respuesta vasoconstrictora, a través de la inhibición de la síntesis de NO. Curiosamente, esta respuesta es significativamente inferior en las mujeres con PE. Este hecho puede ser interpretado como una disminución del efecto del NO funcional en la circulación en PE, lo que demuestra que la vía del NO se ve afectada en el lecho vascular en estas mujeres (Bisseling y cols., 2004).

Administración de L-NAME en ratas preñadas genera PE, y los fetos presentan disfunción endotelial que desaparece después del nacimiento (Martínez-Orgado y cols., 2004). Debido a que la placenta carece de inervación autonómica, mediadores de producción local como el NO juega un papel importante en el mantenimiento del flujo sanguíneo placentario. Además, el NO regula la adhesión de leucocitos al endotelio vascular (Kubes y cols., 1991) e inhibe la proliferación de células musculares lisas y la agregación plaquetaria. Todas estas funciones podrían verse afectada por el consumo de NO por los aniones superóxido producidos durante el EO, disminuyendo así la biodisponibilidad de NO. En concordancia con esto fue el hallazgo de una disminución de la concentración de NO en el plasma (Var y cols., 2003) o líquido amniótico en mujeres con preeclampsia (Luscher & Barton 1997).

A pesar de los numerosos estudios dirigidos a examinar la producción de NO, la evaluación mediante el control de los niveles plasmáticos de los productos de degradación estables del NO, nitritos y nitratos (NOx), son normales tanto en el embarazo normal y PE. Por lo tanto, una elevación (Nobunaga, 1996), una disminución o ningún cambio (Choi y cols., 2002; Diejomaoh y cols., 2004) se han demostrado en los niveles de NOx. Esta controversia puede deberse en parte al efecto de posibles factores de confusión. En este sentido, se debe mencionar la importancia del control de la ingesta dietética de nitrato, que puede afectar dramáticamente el nivel en plasma y la excreción urinaria de NOx. Además, los niveles plasmáticos de NOx están influenciados por las fluctuaciones agudas de la reabsorción tubular renal (Conrad y cols., 1999). Los autores utilizaron una dieta reducida en NOx antes de analizar el plasma y los niveles urinarios de NOx y su segundo mensajero cGMP. A pesar del aumento en el plasma y orina del cGMP durante el embarazo humano normal, los niveles de NOx eran normales o reducidos, lo que sugiere que (Rodgers y cols., 1998) otra señal además del NO media el aumento de la producción de cGMP y vasodilatación materna durante el embarazo, o (Roberts & Cooper 2001) la medición de NOx en sangre no es una estimación fiable y hemodinámicamente relevante de NO. A su vez, en PE, la hipótesis de que efectivamente hay reducción de la producción de óxido nítrico no se demostró. Recientemente, demostró de que la disminución de la expresión y actividad de eNOS puede estar asociada con aumento de la permeabilidad endotelial en PE (Wang y cols., 2004). Estos autores sugirieron que la IL-8, que está aumentada por el EO (Scholz y cols., 2003), podría ser un agente candidato que media este efecto. La inhibición de la eNOS dio lugar a una mayor expresión de IL-8 la cual inducía una mayor permeabilidad en la monocapa endotelial en la preeclampsia en comparación con los embarazos normales, probablemente debido a una mayor susceptibilidad a las citoquinas proinflamatorias en PE, sin embargo, estos datos deben ser confirmados.

Por último, la modulación de isoformas de NOS por la endotelina (ET) -1, como se encuentra en PE, es sugerente de una relación funcional. Así, las células trofoblásticas en mujeres con PE muestran un incremento en la expresión de eNOS, mientras que la de la isoforma inducible (iNOS) que es la fuente principal de la síntesis de NO se reduce (Napolitano y cols., 2000).

Aunque el trofoblasto presenta actividad de la eNOS, es controversial si TEV expresa esta enzima. En el citotrofoblasto NO incrementa la expresión y actividad de metaloproteinasas de la matriz (Roberts & Cooper 2001; Trupin y cols., 1996), que desempeñan un papel fundamental en la implantación del embrión. Además, el NO también juega un papel importante en la migración trofoblástica y la motilidad, a través de angioproteínas (Ahmed y cols., 2009). Este efecto se potencia por las acciones del VEGF, tanto por su unión a su receptor Flt1 y por aumentar la expresión de cadherinas en el TEV (Oh y cols., 2006).

Se ha postulado que en la PE la disminución de la biodisponibilidad de NO no se debe a una disminución en la actividad o la expresión de eNOS, pero sí a una disminución de la actividad o de la vida media de NO, medido por la concentración de cGMP, su segundo mensajero (Aydin y cols., 2004; Var y cols., 2003). Una explicación interesante para la disminución de la actividad del NO se relaciona con el hecho de que la eNOS también sintetiza anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y que la tasa de producción de NO vs O<sub>2</sub><sup>-</sup> depende de la concentración intracelular de L-arginina y superóxido dismutasa (SOD), entre otros. La interacción entre el NO y O<sub>2</sub><sup>-</sup> genera peroxinitrito, un anión potente citotóxico que carece de propiedades angiogénicas. El peroxinitrito puede alterar las funciones celulares de muchas maneras y nitrar muchas proteínas, restos de tirosina en particular. Además, el peroxinitrito disminuye la biodisponibilidad de NO, ya que oxida BH<sub>4</sub>, cofactor de eNOS, lo que conduce a la degradación de la enzima (Szabo y cols., 2003). La reactividad vascular alterada que existe en la placenta con PE puede explicarse en parte por el efecto de peroxinitrito al inducir disfunción vascular a través de deficiencia selectiva de adrenoreceptores (Benkuski y cols., 1999). Se ha demostrado que el peroxinitrito también inactiva selectivamente el receptor de prostaciclina (Zou y cols., 1999) y disminuye la cantidad de prostaciclina sintasa a través de un mecanismo mediado por NF-κB (Cooke y Davidge 2002). Estos efectos del peroxinitrito contribuyen al desarrollo de la hipertensión arterial en PE. Además, el citotrofoblasto de mujeres con preeclampsia tiene una mayor producción de TXA<sub>2</sub>, causando con ello un desequilibrio de la producción de TXA<sub>2</sub> y prostaciclina (Ding y cols., 2002), lo que contribuye aún más a una presión arterial elevada. Varios estudios han demostrado que las mujeres con preeclampsia tienen mayores niveles

de peroxinitrito y nitrotirosina (un marcador de la actividad peroxinitrito) en la placenta. Está demostrado que en embarazos normales existe una mayor concentración de L-arginina en el feto, a pesar de la existencia de un gradiente de madre a feto, lo indica que existe un transporte activo de L-arginina para el feto. En PE, este gradiente está disminuido.

Suponiendo que la actividad y la expresión de la eNOS y del transportador catiónico de aminoácidos en la placenta están conservados, la eventual disminución de la concentración de L-arginina en PE podría ser atribuible a la mayor actividad de la arginasa II, enzima responsable de la degradación de L-arginina en ornitina y urea. Varios estudios han demostrado una mayor actividad de esta enzima en el trofoblasto de las placentas con PE en comparación con el de los embarazos normales. El mecanismo que explica el aumento de la arginasa II en PE es aún desconocido, pero se ha postulado que una elevación de los niveles de testosterona, como se observa en PE, podría desempeñar un importante papel (Lowe, 2000; Carlsen y cols., 2005)

En resumen, los cambios en las concentraciones de sustancias vasoactivas en PE podría entenderse como una consecuencia de la respuesta inflamatoria sistémica de esta enfermedad, mediada por una expulsión exagerada de células de sincitiotrofoblasto o la generación de ROS, lo que activa el endotelio y los leucocitos en la sangre.

## ROL DE LA SUPLEMENTACIÓN DE L-ARGININA

Muchas alternativas de prevención para el desarrollo de PE se han probado en los últimos 20 años, lamentablemente todas sin éxito. En relación con el uso de la aspirina, un reciente meta-análisis de Askie y cols., (2004) en 32.217 mujeres embarazadas (31 estudios) que recibieron aspirina para prevenir la PE, se encontró una reducción significativa de sólo 10% del global, y PE grave se observó una reducción del 10% en el pronóstico adverso del embarazo (Askie y cols., 2004). Sin embargo, a pesar de los resultados, recientemente dos grupos mostraron que la aspirina no es útil en la prevención de PE cuando se administra a grupos de riesgo (Yu y cols., 2003; Subtil y cols., 2003)

En cuanto a vitaminas antioxidantes, Chappell y cols., (1999) llevó a cabo un estudio en mujeres con alto riesgo de PE, demostrando que la utilidad de vitaminas antioxidantes administradas de forma precoz en el embarazo es para reducir el EO, y reducir así su efecto sobre la función endotelial. Recientemente, el uso de vitaminas antioxidantes en la prevención del PE ha sido cuestionado por los resultados de tres estudios

multicéntricos (Poston y cols., 2006; Spinnato y cols., 2007). Todas estas publicaciones indican que las vitaminas antioxidantes no sería útil en la prevención de PE y / o restricción del crecimiento fetal. Además, se ha informado de que las vitaminas antioxidantes pueden tener efectos no deseados en el feto y el recién nacido (Poston y cols., 2006).

Hay poca evidencia en cuanto a si la manipulación de la dieta en el embarazo puede prevenir la PE (Fraser, 1998). La L-arginina se considera un aminoácido semi-esencial porque bajo las crecientes demandas de la síntesis endógena no es suficiente para suministrar los requerimientos (Visek, 1986). Por otra parte, el embarazo ha sido descrito como un estado de deficiencia relativa de esta molécula debido a una mayor demanda para la síntesis de NO, para fortalecer aún más la vasodilatación adaptativa del embarazo y el aumento del uso de L-arginina por el feto (Conrad y cols., 1993). Por estas razones, es que se ha sugerido que la suplementación dietética con L-arginina puede prevenir el desarrollo de PE.

Actualmente, en la literatura hay estudios que sugieren que la L-arginina tendría efectos directos sobre la presión arterial en modelos animales, en los seres humanos normotensos, en seres humanos con hipertensión, las mujeres con PE y mujeres con embarazos saludables (Hishikawa y cols., 1992; Neri y cols., 1996). Cabe destacar, que se han realizado estudios donde se suplementa L-arginina encontrándose una mejora de la función endotelial en personas con aterosclerosis y enfermedad vascular periférica (Creager y cols., 1992; Bode-Boger y cols., 1998). La administración oral de L-arginina a mujeres con enfermedad cardiovascular no mostraron efectos secundarios adversos. En estos estudios, entre ellos uno realizado en mujeres embarazadas, Facchinetti y cols., (1996) y Neri y cols., (1996) se infundió L-arginina en mujeres con complicaciones como la RCF, y se observó una mejora en la actividad del miometrio.

Como se ha mencionado antes, la biodisponibilidad de NO, uno de los elementos clave en la fisiopatología de la PE, se encuentra disminuido. NO es un potente vasodilatador producido por el endotelio vascular, a través de la eNOS, que ocupa el aminoácido semi-esencial L-arginina como sustrato. Aproximadamente el 1% de la ingesta diaria de L-arginina se metaboliza a través de esta vía (Castillo y cols., 1995). NO difunde desde el endotelio a la capa subyacente de células de músculo liso, mediando la vasodilatación, y la inhibición de la agregación y la adhesión plaquetaria. Estos procesos son dependientes de monofosfato cíclico de guanilil (cGMP).

Hay varias formas posibles en que la L-arginina exógena puede aumentar la producción de NO. Algunos autores han demostrado menores niveles plasmáticos de L-arginina

en mujeres con PE (D'Aniello y cols., 2001). Teóricamente, la administración exógena de L-arginina podría compensar una escasez de sustrato endógeno. Otra posible forma de acción de la L-arginina exógena podría depender de la atenuación de la influencia inhibitoria de argininas metiladas en la actividad de NOS. Se demostró que en PE, los niveles plasmáticos de los inhibidores endógenos de la NOS, dimetilarigina tanto asimétrica (ADMA) como simétrica (SDMA), están elevados (Ellis y cols., 2001; Savvidou y cols., 2003). Se podría argumentar que un exceso de L-arginina podría restaurar la actividad de la NOS desplazando competitivamente del sitio activo de la enzima a los inhibidores endógenos (Cooke, 2000). Sin embargo, ni las concentraciones plasmáticas de L-arginina ni los niveles de argininas metiladas (ADMA SDMA +, L-NMMA) cambió significativamente en las mujeres tratadas con L-arginina. Aunque sea sólo una especulación, existe otra línea de explicación de los fenómenos observados y que pueden depender de la capacidad de L-arginina para inhibir la formación y / o acción de ROS dentro de la pared vascular, un fenómeno bien documentado en PE. L-arginina, como un sustrato para la NOS, no sólo puede aumentar la síntesis de NO, sino también prevenir la formación de ROS NOS-dependiente (Parra-Cordero y cols., 2011) y mejorar la biodisponibilidad de NO. Curiosamente, L-arginina también podría ser una scavenger (Davidge y cols., 1998) Si la acción antihipertensiva de L-arginina depende de dichos mecanismos será una hipótesis atractiva para ser probada. La Tabla 1 muestra un resumen de los principales mecanismos por los cuales la suplementación exógena de L-arginina puede ser beneficiosa para la prevención del PE.

Por último, haremos un reporte de las evidencias actuales que hay para suplementar L-arginina en mujeres embarazadas con PE. Existen pocos estudios sobre el uso de L-arginina como un método de prevención de PE. En 2004, se publicó un informe donde 70 mujeres con riesgo de desarrollar PE fueron suplementadas con L-arginina a partir del primer trimestre de embarazo. Los resultados mostraron una disminución en las resistencias vasculares de arterias uterinas y en la presión arterial media de las pacientes; también sólo una paciente desarrolló de inicio tardío PE (Germain y cols., 2004). Sin embargo, Staff y cols., (2004) demostraron que la administración oral de L-arginina no redujo la presión arterial diastólica en mujeres con PE con edad gestacional entre 28 a 36 semanas, pero este tratamiento podría ser clínicamente beneficioso para la madre o para el feto si se inicia temprano en el proceso de la enfermedad. Otro estudio realizado en mujeres con diagnóstico de PE, demostró que la infusión con L-arginina se asocia con una reducción de la presión sanguínea, con un aumento concomitante de L-citrulina (marcador sustituto de la producción de NO), tanto en mujeres con PE y en mujeres normotensas (Facchinetti y cols., 1999). Se obtuvieron resultados similares en un estudio doble ciego

randomizado en mujeres con PE y con una dieta baja en nitratos (Rytlewski y cols., 2005). Las mujeres que recibieron suplementación oral de L-arginina durante 3 semanas, mostraron una disminución en la presión sanguínea y un aumento de la excreción urinaria de nitrito / nitrato y L-citrulina. Curiosamente, sólo hay un estudio que evalúa la condición fetal y el resultado neonatal después de la suplementación oral con L-arginina, en las mujeres con un diagnóstico de PE. Este grupo de mujeres fue suplementado hasta el parto. Los autores demostraron que en el grupo suplementado hubo una normalización de la redistribución de la sangre fetal, y un aumento significativo del APGAR y la duración de la gestación, en comparación con el grupo que recibió placebo (Rytlewski y cols., 2006). Al mismo tiempo, otro estudio demostró que la suplementación con L-arginina sola en mujeres embarazadas con hipertensión crónica leve no afecta significativamente a la PA en general, pero se asocia con una menor necesidad de medicación antihipertensiva y una tendencia hacia menores complicaciones maternas y neonatales (Neri y cols., 2010).

Tabla 1.

<b>Mecanismos protectores de L-arginina</b>
Compensación por la falta de sustrato endógeno
Restauración de la actividad de la NOS desplazando competitivamente a los inhibidores endógenos
Prevención de formación de ROS dependientes de NOS
Barrido de ROS

Resumen de los mecanismos potenciales por los cuales L-arginina puede interferir con la secuencia de acontecimientos que conducen al desarrollo de preeclampsia. PE, preeclampsia; NOS, óxido nítrico sintasa; ROS, especies reactivas de oxígeno.

Recientemente, Vadillo-Ortega et al (Vadillo-Ortega y cols., 2011) realizaron un protocolo interesante de suplementación con L-arginina y vitaminas antioxidantes en un grupo de 228 mujeres embarazadas con alto riesgo de desarrollo de PE. Las mujeres fueron suplementadas con alimentos que contengan L-arginina más vitaminas antioxidantes, 222 mujeres solamente con vitaminas antioxidantes, y 222 mujeres recibieron placebo. Los resultados mostraron que la incidencia de PE se redujo significativamente en mujeres asignadas al azar a la L-arginina más vitaminas antioxidantes. Las vitaminas antioxidantes por sí solas no mostraron significancia estadística al compararlas con placebo. Por lo tanto, estos autores han propuesto que la suplementación durante el

embarazo con alimento medicinal que contiene L-arginina y vitaminas antioxidantes puede reducir la incidencia de PE en la población de alto riesgo de la condición.

La fase adecuada para la administración de suplementación con L-arginina debe tenerse en cuenta, como en la fase de EO que podría conducir a una mayor expresión de arginasa. Esto, a su vez, puede inducir el desacoplamiento de la NOS como fuente de superóxido en la vasculatura materna en la preeclampsia. En consecuencia, puede resultar más aumento de peroxinitrito y sus consecuencias deletéreas (Sankaralingam y cols., 2010).

Como se explicó anteriormente, y debido a la función de la L-arginina en el aumento de la biodisponibilidad de NO, es posible postular que el uso de la suplementación oral con este compuesto en el embarazo temprano puede reducir la aparición de PE, pero se necesitan estudios posteriores que aún no existen para tener conclusiones definitivas.

## CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

La PE es la complicación más importante de la gestación humana en todo el mundo y un importante contribuyente a la morbi-mortalidad tanto materna como fetal. Es una enfermedad de dos etapas. La primera etapa se refiere al relativo fracaso de la invasión del trofoblasto y la remodelación de las arterias espiraladas, lo que conduce a un suministro deficiente de sangre a la unidad fetoplacentaria, exponiéndola al EO. La segunda etapa se caracteriza por la disfunción endotelial materna, lo que conduce a los síntomas clínicamente reconocidos del síndrome, que incluyen hipertensión arterial, proteinuria, trombocitopenia y función hepática deteriorada. A pesar de los muchos trabajos y estudios en la última década, las causas que desencadenan PE son aún desconocidas y el valor predictivo de los factores de riesgo potenciales es pobre. El aumento de la evidencia sugiere que el EO placentario y sistémico juega un papel crucial en su desarrollo.

El óxido nítrico es un vasodilatador potente producido en el endotelio vascular sintetizado por la NOS a partir del aminoácido L-arginina. Durante el embarazo, el NO es uno de los factores de relajación más importantes del miometrio y en el control del flujo de sangre en el útero y la placenta. Se ha demostrado una disminución de la concentración de NO en PE, lo que se debería al consumo de NO por los aniones superóxido, disminuyendo así la biodisponibilidad de NO. Hay evidencia consistente en la literatura de que como L-arginina es el sustrato para la síntesis de NO, su mayor disponibilidad a través de la suplementación, en presencia de vitaminas antioxidantes,

prolonga la latencia para el desarrollo de PE en una mujer en una población de alto riesgo.

Con base en los argumentos fisiopatológicos y algunos ensayos clínicos terminados y en curso, es concebible que la suplementación oral con L-arginina en mujeres con riesgo de desarrollo de PE, puede aumentar la biodisponibilidad de NO y reducir así las consecuencias de su déficit, como el desarrollo de PE. Por lo tanto, con base a la evidencia anterior, es esencial lograr una mayor comprensión de los procesos fisiopatológicos subyacentes a la etiopatogenia como también a las manifestaciones clínicas de la PE, y a su vez determinar más claramente el rol y los mecanismos protectores que la L-arginina y otras terapias antioxidantes podrían tener en grupos de riesgo.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Afifi Y, Churchill D. (2003) Pharmacological treatment of hypertension in pregnancy. *Curr Pharm Des*; 9:1745-53
- Ahmad S, Ahmed A. (2004) Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res*; 95:884-91.
- Ahmed A, Fujisawa T, Niu XL, Ahmad S, Al-Ani B, Chudasama K, Abbas A, Pottluri R, Bhandari V, Findley CM, Lam GK, Huang J, Hewett PW, Cudmore M, Kontos CD. (2009) Angiotensin-2 confers Atheroprotection in apoE<sup>-/-</sup> mice by inhibiting LDL oxidation via nitric oxide. *Circ Res*; 104:1333-6
- Aquilina J, Harrington K. (1996) Pregnancy hypertension and uterine Doppler ultrasound. *Curr Opin Obstet Gynaecol*; 8: 435-40.
- Askie LM, Duley L, Henderson-Smart DJ, Stewart LA. (2007) Antiplatelets agents for prevention of pre-eclampsia: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet*; 369:1791-8.
- Aydin S, Benian A, Madazli R, Uludag S, Uzun H, Kaya S. (2004) Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 113: 21-25.
- Bae I, Fan S, Meng Q, Rih JK, Kim HJ, Kang HJ, et al. (2004) BRCA1 induces antioxidant gene expression and resistance to oxidative stress. *Cancer Res*; 64:7893-7909.
- Benkuski NA, Lewis SJ, Kooy NW. (1999) Peroxynitrite-mediated attenuation of alpha- and beta-adrenoreceptor against-induced vascular responses in vivo. *Eur J Pharmacol*; 364:151-158.
- Bisseling TM, Maria Roes E, Raijmakers MT, Steegers EA, Peters WH, Smits P. (2004) N-acetylcysteine restores nitric oxide-mediated effects in the fetoplacental circulation of preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol*; 191:328.
- Bode-Boger SM, Boger RH, Galland A, Tsikas D, Frolich JC. (1998) L-arginine-induced vasodilatation in healthy humans: pharmacokinetic pharmacodynamic relationship. *Br J Clin Pharmacol*; 46:489-97.
- Bouchlariotou S, Liakopoulos V, Dovas S, Giannopoulou M, Kiroopoulos T, Zargiannis S, et al. (2008) Nocturnal hypertension is associated with an exacerbation of the endothelial damage in preeclampsia. *Am J Nephrol*; 28:424-30

- Brown, NJ (2010) Therapeutic potential of plasminogen activator inhibitor-1 inhibitors. *Ther Adv Cardiovasc Dis*; 4:315-24.
- Burton GJ, Jauniaux E. (2004) Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.*;11:342-52.
- Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. (1999) Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol*;181:718.
- Cadden KA, Walsh SW. (2008) Neutrophils, but not lymphocytes or monocytes, infiltrate maternal systemic vasculature in women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*;27:396.
- Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. (1999) Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest*: 103:1641.
- Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. (2000) Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*;21:25-30.
- Carlsen SM, Romundstad P, Jacobsen G. (2005) Early second-trimester maternal hyperandrogenemia and subsequent preeclampsia: a prospective study. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 84: 117-21.
- Castillo L, Sánchez M, Vogt J, Chapman TE, DeRojas-Walker TC, Tannenbaum SR, et al. (1995) Plasma arginine, citrulline, and ornithine kinetics in adults, with observations on nitric oxide synthesis. *Am J Physiol*;268: 360.
- Chappell LC, Seed PT, Briley AL, Kelly FJ, Lee R, Hunt BJ. (1999) Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet*;354:810-6.
- Choi JW, Im MW, Pai SH. (2002) Nitric Oxide Production Increases during Normal Pregnancy and Decreases in Preeclampsia. *Ann Clin Lab Sci*;32:257.
- Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, et al. (1993) Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J*; 7:566-71
- Conrad KP, Kerchner LJ, Mosher MD. (1999) Plasma and 24-h NOx and cGMP during normal pregnancy and preeclampsia in women on a reduced NOx diet. *Am J Physiol Renal Physiol*; 277: 48-57.
- Cooke CL, Davidge ST. (2002) Peroxynitrite increases Inos through NF- $\kappa$ B and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282: 395- 402.
- Cooke JP. (2000) Does ADMA Cause Endothelial Dysfunction?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 20:2032.
- Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. (1992) L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*; 90:1248-53.
- D'Aniello G, Tolino A, Fisher G. (2001) Plasma L-arginine is markedly reduced in pregnant women affected by preeclampsia. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*;753:427-31.
- da Costa BP, Steibel JP, Antonello IC, Guimaraes JA, Poli de Figueiredo CE. (2004) L-Arginine erythrocyte transport in normal pregnant and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol*; 190:468-71.
- Davey D, MacGillivray I. (1988) The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*;158:892-898.
- Davidge S. (1998) Oxidative stress and altered endothelial cell function in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*;16:6573.
- Davison JM, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad KP, Karumanchi SA, Quaggin S et al. (2004) New Aspects in the Pathophysiology of Preeclampsia. *J Am Soc Nephrol*; 15:2440-2448
- Diejomaoh FM, Omu AE, Al-Busiri N, Taher S, Al-Othman S, Fatnikun T, Fernandes S. (2004) Nitric oxide production is not altered in preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet*; 269: 237-43.
- Ding ZQ, Rowe J, Ng B, Sinosich MJ, Gallery ED. (2002) Modulation of prostacyclin and thromboxane secretion by cytotrophoblasts from normal and pre-eclamptic human pregnancies. *Placenta*;23: 594-599.
- Dotsch J, Hogen N, Nyul Z, Hanze J, Knerr I, Kirschbaum M, et al.(2001) Increase of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 mRNA expression in human placenta during gestation *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*;97:163-7
- Duckitt K, Harrington D. (2005) Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*; 330:565
- Ellis J; Wennerholm UB; Bengtsson A; Lilja H; Pettersson A; Sultan B; Wennergren M; Hagberg H. (2001) Levels of dimethylarginines and cytokines in mild and severe preeclampsia. *Acta Obstet Gyn Scand*; 80:602-608.
- Endemann DH, Schiffrin EL. (2004) Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*; 15:1983-1992.
- Facchinetti F, Longo M, Piccinini F, Neri I, Volpe A. (1999) L-Arginine infusion reduces blood pressure in preeclamptic women through nitric oxide release. *J Soc Gynecol Investig*; 6:202-7.
- Facchinetti F, Neri I, Genazzani AR. (1996) L-arginine infusion reduces preterm uterine contractions. *J Perinat Med*; 24:383-5.
- Fraser, R. (1998) Pre-eclampsia and diet. In: Strain JJ, Caballero B, Sadler MJ, eds *The encyclopedia of human nutrition*. Academic Press; 1620-6.
- Germain AM, Valdés G, Romanik MC, Reyes MS. (2004) Evidence Supporting a Beneficial Role for Long-Term L-Arginine Supplementation in High-Risk Pregnancies. *Hypertension*; 44:1.
- González RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, Devoto L, Pellicer A, et al. (2000) Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab*; 85:4883-8.
- Hassoun PM, Yu FS, Shedd AL, Zulueta JJ, Thannickal VJ, Lanzillo JJ, Fanburg BL (2004) Regulation of endothelial cell xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase gene expression by oxygen tension. *Am J Physiol*;266:163-171
- Hishikawa K, Nakaki T, Tsuda M, Esumi H, Ohshima H, Suzuki H, et al. (1992) Effects of systemic L-arginine administration on hemodynamics and nitric oxide release in man. *Jpn Heart J*; 33:41-8.
- Holthe MR, Staff AC, Berge LN, Lyberg T. (2004) Leukocyte adhesion molecules and reactive oxygen species in preeclampsia. *Obstet Gynecol*; 103:913-22
- Hou HL, Wan XR, Xiang Y, Qi QW, Yang XY. (2008) Changes of clinical features in hydatidiform mole: analysis of 113 cases. *J Reprod Med*; 53: 629-633
- Hubel CA. (1999) Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med*; 222:222-35
- Hung, T. H., Skepper, J. N., and Burton, G. J. (2001) In vitro ischemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *Am J Pathol*; 159:1031.

- Irving JA, Lala PK (1995): Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration regulation by TGF-beta, IGF-II and IGFBP-1. *Exp Cell Res*; 217:419-27
- Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. (2003) Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancy. *Am J Pathol*; 162:115-125.
- Kaur G, Mishra S, Sehgal A, Prasad R. (2008) Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in pregnancy with preeclampsia. *Mol Cell Biochem*; 313:37-44.
- Karumanchi SA, Bdolah Y. (2004) Hypoxia and sFlt-1 in Preeclampsia: The "Chicken-and-Egg" Question. *Endocrinology*;145:4835.
- Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. (1986) Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol*; 93:1049-1059.
- Kruihof EK, Baker MS, Bunn C. (1995) Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood*; 86: 4007-4024
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. (1991) Nitric oxide: An endo- genous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88:4651-4655.
- Lee JM, Johnson JA (2004): An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol*; 37:139-143.
- Lee VM, Quinn PA, Jennings SC, Ng LL. (2003) Neutrophil activation and reactive oxygen species production in pre-eclampsia. *J Hypertens*; 21:395-402
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF et al. (2004) Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*; 350: 672.
- Liochev, SI, Fridovich I. (1997) How does superoxide dismutase protect against tumor necrosis factor: a hypothesis informed by effect of superoxide on "free" iron. *Free Radical Biol Med*;23:668-671.
- Lowe DT. (2000) Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. *Nitric Oxide*;4:441-58.
- Luscher TF, Barton M (1997): Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*; 20:3-10
- Lyall F, Greer IA, Boswell F, Young A, Macara LM, Jeffers MD. (1995) Expression of cell adhesion molecules in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth retardation. *Placenta*;16:579-87
- Lyall F, Yong A, Boswell F, Kingdom JCP, Greer IA. (1997) Placental expression of vascular endothelial growth factors in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia at delivery. *Placenta*; 18:269-276.
- Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM, Zhou Y. (2000) Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am J Pathol*; 156:321-331.
- Martinez-Orgado J, Gonzalez R, Alonso MJ, Salaices M. (2004) Impairment of fetal endothelium-dependent relaxation in a rat model of pre-eclampsia by chronic NO synthase inhibition. *J Soc Gynecol Invest*; 11:82-88.
- Matsubara S, Takizawa T, Takayama T, Izumi A, Watanabe T, Sato I. (2001) Immuno-electron microscopic localization of endothelial nitric oxide synthase in human placental terminal villous trophoblasts-normal and pre-eclamptic pregnancy. *Placenta*; 22:782.
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*; 111:649.
- Meher S, Duley L. (2005) Interventions for preventing pre-eclampsia and its consequences: generic protocol. *Cochrane Database Syst Rev*; 2:CD005301.
- Merviel P, Carbillon L, Challier JC, Rabreau M, Beauflis M, Uzan S. (2004) Pathophysiology of preeclampsia: links with implantation disorders. *Obstet Gynecol*; 115:134-147.
- Moretti M, Phillips M, Abouzeid A, Cataneo RN, Greenberg J. (2004) Increased breath markers of oxidative stress in normal pregnancy and in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:1184-90.
- Morris NH, Eaton BM, Dekker GA. (1996) Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and preeclampsia. *Br J Obstet Gynecol*; 103:4-15.
- Myatt L, Brockman DE, Eis AL, Pollock JS. (1993) Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta*; 14:487-495.
- Myatt L, Cui X. (2004) Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*; 122: 369-382.
- Nadar SK, Al Yemeni E, Blann AD, Lip GY. (2004) Thrombomodulin, von Willebrand factor and E-selectin as plasma markers of endothelial damage/dysfunction and activation in pregnancy induced hipertension. *Thromb Res*; 113:123-8
- Napolitano M, Miceli F, Calce A, Vacca A, Gulino A, Apa R, Lanzone A. (2000) Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2318-23
- Neri I, Mazza V, Galassi MC, Volpe A, Facchinetti F. (1996) Effects of L-arginine on utero-placental circulation in growth-retarded fetuses. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 75:208-12.
- Neri I, Monari F, Sgarbi L, Berardi A, Maselli G, Facchinetti F. (2010) L-arginine supplementation in women with chronic hypertension: impact on blood pressure and maternal and neonatal complications. *J Matern Fetal Neonatal Med*; 23:1456-60.
- Nobunaga T, Tokugawa Y, Hashimoto K, Kimura T, Matsuzaki N, Nitta Y et al. (1996) Plasma nitric oxide levels in pregnant patients with preeclampsia and essential hypertension. *Gynecol Obstet Invest*; 41:189-193.
- Noris M, Todeschini M, Cassis P, Pasta F, Cappellini A, Bonazzola S, et al. (2004) L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. *Hypertension*; 43:614-22.
- Oh MJ, Lee NW, Shin JH, Yeo, MK, Kim A, Kim IS, et al. (2006) Vascular endothelial growth factor expression is unaltered in placentae and myometrial resistance arteries from pre-eclampsia patients. *Acta Obstet Gynecol Scandinav*; 85:545-550.
- Orange SJ, Painter D, Horvath J, Yu B, Trent R, Hennessy A. (2003) Placental endothelial nitric oxide synthase localization and expression in normal human pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:376-81.
- Parra-Cordero M, Bosco C, González J, Gutiérrez R, Barja P, Rodrigo R. (2011) Immunohistochemical expression of von Willebrand factor in the preeclamptic placenta. *J Mol Histol*; 42: 459.
- Peter Stein T, Scholl TO, Schluter MD, Leskiw MJ, Chen X, Spur BW et al. (2008) Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. *Free Radic Res*; 42:841-8

- Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ, Shennan AH. (2006) Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet*; 367: 1145-1154
- Poston L, Rajmakers MT. (2004) Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome—a review. *Placenta*; 25: 72.
- Pijnenborg R, D'Hooghe T, Vercruyse L, Bamba C. (1996) Evaluation of trophoblast invasion in placental bed biopsies of the baboon, with immunohistochemical localisation of cytokeratin, fibronectin, and laminin. *J Med Primatol*; 25:275.
- Qanungo S, Mukherjea M. (2000) Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol Cell Biochem* 2000;215:11-9.
- Rajmakers MT, Dechend R, Poston L. (2004) Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension*; 44:374-80.
- Redman CW. (1991) Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 1991;12: 301-308.
- Redman CW, Sargent IL. (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592-4.
- Rees DD, Palmer RM, Moncada S. (1989) Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86:3375-3378.
- Reith A, Booth NA, Moore NR, Cruickshank DJ, Bennett B. (1993) Plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in normal pregnancies, pre-eclampsia and hydatidiform mole. *Br J Obstet Gynaecol*; 100:370–374.
- Roberts JM. (1998) Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*; 16:5-15.
- Roberts JM, Cooper DW. (2001) Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet*; 357: 53-56.
- Roberts JM, Hubel CA, Taylor, RN. (1995) Endothelial dysfunction yes, cytotoxicity no! *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:978-9.
- Roberts JM, Hubel CA. (1999) Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet*; 354:788-9.
- Rodgers GM, Taylor RN, Roberts JM. PE is associated with a serum factor cytotoxic to human endothelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1998;159:908-914.
- Ronsmans C, Graham WJ. (2006) Maternal Mortality: who, when, where, and why. *Lancet*; 368:1189-1200.
- Rytlewski K, Olszanecki R, Korbut R, Zdebski Z. (2005) Effects of prolonged oral supplementation with L-arginine on blood pressure and nitric oxide synthesis in pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest* 2005; 35:32-7.
- Rytlewski K, Olszanecki R, Lauterbach R, Grzyb A, Basta A. (2006) Effects of oral L-Arginine on the foetal condition and neonatal outcome in preeclampsia: a preliminary report. *Bas Clin Pharmacol & Toxicol*;99:146-52.
- Sankaralingam S, Xu H, Davidge ST. (2010) Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. *Cardiovasc Res*; 85:194-203.
- Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaidis KH. (2003) Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet*; 361:1511-7.
- Sela S, Itin A, Natanson-Yaron S, Greenfield C, Goldman- Wohl D. (2008) A novel human-specific soluble vascular endothelial growth factor receptor 1: cell-type-specific splicing and implications to vascular endothelial growth factor homeostasis and preeclampsia. *Circ Res*; 102:1566-4.
- Serdar Z, Gur E, Develioglu O, Colakogullari M, Dirican M. (2002) Placental and decidual lipid peroxidation and antioxidant defenses in preeclampsia. *Lipid peroxidation in preeclampsia. Pathophysiology*; 9:21-25
- Sgambati E, Marini M, Zappoli Thyron GD, Parretti E, Mello G, Orlando C, et al. (2004) VEGF expression in the placenta from pregnancies complicated by hypertensive disorders. *BJOG*;111: 564-570.
- Scholz H, Yndestad A, Damás JK, Waehre T, Tonstad S, Aukrust P, et al. (2003) 8-isoprostane increases expression of interleukin-8 in human macrophages through activation of mitogen-activated protein kinases. *Cardiovasc Res*;59: 945-54.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. (2005) Pre-eclampsia. *Lancet*; 365:785-99.
- Sies, H. (1991) Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr*; 69:965-8.
- Spinnato JA 2nd, Freire S, Pinto e Silva JL, Rudge MV, Martins-Costa S, Koch MA, et al. (2007) Antioxidant therapy to prevent preeclampsia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*; 110:1311-8.
- Staff AC, Berge L, Haugen G, Lorentzen B, Mikkelsen B, Henriksen T. (2004) Dietary supplementation with L-arginine or placebo in women with pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 83:103-7.
- Subtil D, Goeusse P, Houfflin-Debarge V, Puech F, Lequien P, Breart G, et al. (2003) Randomised comparison of uterine artery Doppler and aspirin (100 mg) with placebo in nulliparous women: the Essai Régional Aspirine Mère-Enfant study (Part 2). *BJOG*; 110:485.
- Szabo I, Vizer M, Ertl T. (2003) Fetal betamethasone treatment and neonatal outcome in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*; 189: 1812– 1813.
- Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, et al. (2004) Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Arch*; 444:49-55.
- Tamura T, Olin KL, Goldenberg RL, Johnston KE, Dubard MB, Keen CL. (2001) Plasma extracellular superoxide dismutase activity in healthy pregnant women is not influenced by zinc supplementation. *Biol Trace Elem Res*; 80:107-13.
- Touyz RM, Yao G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. (2005) p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells: role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 25:512-8.
- Tranquilli AL, Bezzeccheri V, Giannubilo SR, Scagnoli C, Mazzanti L. (2004) Amniotic vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) in women with subsequent preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 113:17-20.
- Trupin LS, Simon LP, Eskenazi B. (1996) Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology*; 7:240–44.
- Vadillo-Ortega F, Perichart-Perera O, Espino S, Avila-Vergara MA, Ibarra I, Ahued R, et al. (2011) Effect of supplementation during pregnancy with L-arginine and antioxidant vitamins in medical food on preeclampsia in high risk population: randomised controlled trial. *BMJ*; 342: 2901.
- Var A, Yildirim Y, Onur E, Kuscu NK, Uyanik BS, Goktalay K et al. (2003) Endothelial Dysfunction in Preeclampsia: Increased Homocysteine and Decreased Nitric Oxide Levels. *Gynecol Obstet Invest*; 56:221-224.

- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., and Kim, Y. M. (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Med*; 12:642.
- Visek WJ. (1986) Arginine needs, physiological state and usual diets: a reevaluation. *J Nutr*; 116:36-46.
- Wang Y, Gu Y, Zhang Y, Lewis DF. (2004) Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia in endothelial cells from preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*; 190:817-24.
- Watson AL, Skepper JN, Jauniaux E, Burton GJ. (1998) Changes in concentration, localization and activity of catalase within the human placenta during early gestation. *Placenta*; 19:27-34.
- Woods JR, Plessinger MA, Miller RK. (2001) Vitamins C and E: missing links in preventing preterm premature rupture of membranes? *Am J Obstet Gynecol*; 185:5-10.
- Yu CK, Papageorgiou AT, Parra M, Palma Dias R, Nicolaides KH, et al. (2003) Medicine Foundation Second Trimester Screening Group. Randomized controlled trial using low-dose aspirin in the prevention of preeclampsia in women with abnormal uterine artery Doppler at 23 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 22:233-9
- Zachary I. (1998) Vascular endothelial growth factor. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1169-74
- Zachary I, Glik G. (2001) Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiov Res*;49: 568.
- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M et al. (1997) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest*;99:2139-51



ARTÍCULO DE REVISIÓN

RELACION ENTRE EL PERFIL DE ACIDOS GRASOS DE MEMBRANA Y LA ACTIVIDAD DE LA (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPasa EN PACIENTES CON HIPERTENSION ESENCIAL.

(Relationship between fatty acids profile of membrane and activity of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in patients with essential hypertension)

Ramón Rodrigo<sup>1\*</sup>, Rodrigo Valenzuela<sup>1</sup>, Felipe Maira<sup>1</sup>, Felipe Briones<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

RESUMEN

La hipertensión arterial es la enfermedad cardiovascular más común en todo el mundo, afectando a más del 20% de los adultos entre 40 y 65 años y casi al 50% de mayores de 65 años. Su etiología comprende múltiples factores, tales como factores hereditarios, ambientales, dietéticos, entre otros. El estrés oxidativo ha sido estudiado durante el último tiempo como un factor que juega un papel clave en la fisiopatología de la hipertensión esencial y en los cambios en la composición de ácidos grasos y fluidez de la membrana celular. Probablemente, la liperoxidación modifique el microambiente lipídico que circunda a la (Na + K)-ATPasa en la membrana y su función se vea afectada. La liperoxidación ataca principalmente a los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), los cuales le dan mayor fluidez a la membrana plasmática. Así, las modificaciones en el perfil de ácidos grasos de membrana se traducirá en efectos sobre la actividad de la (Na,K)-ATPasa, lo que concuerda con los hallazgos comunicados en pacientes hipertensos. El objetivo de este estudio fue realizar una revisión acerca de la relación entre la actividad de la bomba (Na,K)-ATPasa (PA) y el perfil de ácidos grasos en la membrana plasmática y su fluidez, en pacientes con hipertensión arterial esencial, además de sugerir alternativas terapéuticas para prevenir el desarrollo de esta patología enfocados en el estrés oxidativo.

**Palabras Claves:** Estrés oxidativo, (Na, K)-ATPasa, Hipertensión esencial, Fluidez de membrana

Publicado por la Sociedad de Farmacología de Chile

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial es un factor de riesgo mayor para el desarrollo y progresión de la enfermedad cardiovascular y falla renal (Briones AM. 2010, Cottone S. 2008). Tanto la disfunción endotelial, como procesos inflamatorios y de remodelación vascular están involucrados en la patogenia de la hipertensión resultando en alteraciones estructurales y funcionales en los vasos sanguíneos (Schulz E. 2008). Dentro de este contexto, el estrés oxidativo es un evento central (Ceriello A. 2008). El papel de las especies reactivas de oxígeno (EROs) en la disfunción vascular y en el desarrollo de hipertensión ha sido ampliamente estudiado y se han propuesto numerosos mecanismos (Sedeek M. 2009, Paravicini TM. 2006, Touyz RM. 2005). Sin embargo todo el proceso mediante el cual se produce este trastorno aún no se ha dilucidado completamente.

Las EROs producen daño oxidativo a los lípidos de membrana, a través de la liperoxidación principalmente de ácidos grasos poliinsaturados, provocando una pérdida de funciones celulares vitales a través de la inactivación de las enzimas de la membrana, como la (Na,K)-ATPasa y de las proteínas citoplasmáticas. La peroxidación lipídica genera cambios en el patrón de ácidos grasos de la membrana plasmática, y por ende altera también su fluidez (Cazzola R. 2004). La actividad de la (Na,K)-ATPasa depende de su estrecha interacción con fosfolípidos, sobre todo si son ricos en ácidos grasos insaturados, ya que son más vulnerables al daño oxidativo de las EROs (Rodrigo R. 2006). La inhibición de la (Na,K)-ATPasa desencadena un aumento de la entrada de Ca<sup>2+</sup> y con ello aumenta el tono miogénico y la contractilidad arterial en células musculares lisas de la pared vascular (Grover AK. 2003).

**Correspondencia a:** Dr. Ramón Rodrigo, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile Avenida Independencia 1027, Casilla 70058, Santiago 7, Chile. Teléfono: 56-2-29786126 Fax: 56-2-29786126. Correo Electrónico: [rrodrigo@med.uchile.cl](mailto:rrodrigo@med.uchile.cl)

Esto resulta en un aumento en la resistencia vascular periférica, hecho que caracteriza a la hipertensión (Hamilton BP. 2006). El objetivo de esta revisión es realizar una revisión acerca de la relación entre la actividad de la bomba (Na,K)-ATPasa y el perfil de ácidos grasos en la membrana plasmática y su fluidez, en pacientes con hipertensión arterial esencial, además de sugerir alternativas terapéuticas enfocadas en el estrés oxidativo, para prevenir el desarrollo de esta patología.

### **ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPERTENSIÓN**

El estrés oxidativo ocurre cuando hay un desbalance entre la generación de EROs y los sistemas de defensa antioxidantes, sobrepasando finalmente la capacidad de estos últimos. El estrés oxidativo podría generarse por la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, así como también por un aumento en la producción de EROs (Puddu P. 2008, Touyz RM. 2004). La producción anormalmente alta de anión superóxido observada en pacientes hipertensos causa una reducción en la biodisponibilidad vascular de óxido nítrico (NO), el más importante vasodilatador endógeno, causando así vasoconstricción. (Channon KM. 2002) Además, se ha documentado que en el contexto de estrés oxidativo se produce un aumento del tono vascular renal, aumento de la sensibilidad a los vasoconstrictores, y alteraciones en la vasodilatación endotelial dependiente, eventos que se relacionan con la aparición de hipertensión. Se ha detectado un aumento de F2-isoprostanos, lo que indicaría que la lipoperoxidación coexistiría con las alteraciones vasculares que derivarían en un alza de la presión arterial. También se han reportado aumentos en los niveles plasmáticos de angiotensina II y endotelina I, ambos vasoconstrictores potentes, tras la estimulación de células endoteliales con radicales libres como el anión superóxido (Gomez-Almillo C. 2003).

Adicionalmente, los efectos de EROs sobre las membranas biológicas resultan en una variedad de modificaciones funcionales debido a la interacción directa con la maquinaria molecular de la célula y/o modificaciones oxidativas del medioambiente de las macromoléculas biológicas (Tsuda K. 2010, Stark G. 2005). La lipoperoxidación de la membrana de los eritrocitos genera cambios en su composición lipídica como consecuencia del estrés oxidativo, alterando con ello la fluidez de la membrana plasmática (Kalous M. 1996, Cazzola R. 2004). Esta alteración de la fluidez a su vez puede modular la actividad de las enzimas unidas a la membrana, como la bomba (Na,K)-ATPasa. (Vajreswari A. 2002, Kato M. 2002, Tsuda K. 2005). De acuerdo a esto, una disminución en la actividad de la bomba (Na,K)-ATPasa ha sido encontrada en pacientes hipertensos comparados con sujetos

normotensos (Rodrigo R. 2007). Sin embargo, los cambios en el perfil de los ácidos grasos de la membrana plasmática y su relación con las alteraciones en la actividad de la bomba (Na,K)-ATPasa en pacientes hipertensos no ha sido estudiada en mayor profundidad.

### **FLUIDEZ DE MEMBRANA Y COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS DE MEMBRANA**

La fluidez de la membrana plasmática está determinada por diversos factores: presencia de colesterol, temperatura, propiedades fisicoquímicas de los ácidos grasos que la componen como el grado de saturación de sus enlaces y el largo de sus cadenas (Subczynski W. 2000). De todo lo mencionado anteriormente destaca la importancia de las propiedades físico-químicas de los ácidos grasos sobre la fluidez de las membranas.

Existen diversos métodos para estimar directa e indirectamente la fluidez de membrana a través de la composición lipídica. Dentro de ellos está la cuantificación de los niveles plasmáticos de F2-isoprostano reconocido como un biomarcador confiable de la lipoperoxidación in vivo (Pradelles P. 1985). La medición del Punto Medio de Fusión (PMF) también es un método para determinar la fluidez de membrana (Holman RT. 1989). Otro parámetro a medir es el Índice de Dobles Enlaces (IDE) cuyo valor se correlaciona positivamente con la fluidez de la membrana. Finalmente, también se puede cuantificar la relación entre ácidos grasos Insaturados/ Saturados (I/S), que se mide entre el porcentaje total de ácidos grasos insaturados (AGPI + AGMI) dividido por el porcentaje de ácidos grasos saturados (AGS).

Como ya se comentó, se ha demostrado que en pacientes con hipertensión hay aumento en la producción de los radicales libres, generando con ello un estado de estrés oxidativo. Los radicales libres atacan a los ácidos grasos de membrana produciendo lipoperoxidación que consiste en un proceso de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), disminuyendo el grado de insaturación, resultando en una mayor rigidez de membrana, afectando con ello el microambiente que rodea a la (Na,K)-ATPasa.

Por lo tanto, debido a que la fluidez de las membranas biológicas está determinada principalmente por la composición de sus lípidos (Uyuklu M. 2007), se debería esperar una menor fluidez en pacientes hipertensos. Esta afirmación, basada en un aumento de AGPI por sobre los AGMI y AGS, está respaldada por un estudio reciente que señala que la fluidez de la membrana plasmática de eritrocitos de pacientes con hipertensión esencial es menor que la de sujetos normotensos (Tsuda K. 2012).

Previamente, hemos encontrado que la fluidez de membrana, evaluada a través del patrón de ácidos grasos, es un determinante importante de la actividad de (Na, K)-ATPasa en los eritrocitos. Por lo tanto, la fluidez puede ser un enlace entre esta actividad de la enzima y el perfil de ácidos grasos de la membrana plasmática (Rodrigo R. 2007).

### COMPOSICIÓN LIPÍDICA Y ACTIVIDAD DE LA (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) ATPasa

Se han estudiado pacientes con hipertensión arterial esencial para demostrar el aumento de la lipoperoxidación y la disminución del potencial antioxidante (Uyuklu M. 2007). El aumento de EROs es capaz de alterar la composición de los ácidos grasos de membrana, especialmente a través del ataque de los ácidos grasos poliinsaturados, que son muy vulnerables a la lipoperoxidación. Esto a su vez resulta en un aumento de ácidos grasos saturados (AGS) en mayor proporción que monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI). Este cambio en el perfil de ácidos grasos de membrana se espera que produzca alteraciones de la fluidez de la membrana plasmática. Sin embargo, no hay estudios que muestren asociación entre los diferentes subgrupos de los ácidos grasos de la membrana plasmática y la actividad de la (Na, K)-ATPasa.

Se podría asumir que los cambios en el perfil de ácidos grasos y de fluidez conducen a la modulación de (Na, K)-ATPasa, en relación con el grado de saturación alcanzado. Estudios realizados confirman este punto de vista, ya que la actividad de la bomba (Na, K)-ATPasa se correlacionó positivamente con IDE (mayor fluidez) y negativamente con PMF (menor fluidez). Estudios previos han sugerido que la reducción de la actividad de la bomba (Na, K)-ATPasa observada en los pacientes hipertensos se debe, al menos en parte, a la pérdida de la interacción óptima con componentes lipídicos de membrana (Tsuda K. 2010). Puesto que la fluidez de la membrana modula a la bomba (Na, K)-ATPasa, resulta razonable suponer que la lipoperoxidación daría lugar a una disminución tanto de la fluidez de la membrana como de la actividad de la bomba (Na, K)-ATPasa. Considerando que el cambio del perfil de ácidos grasos de la membrana del eritrocito se espera que ocurra también en otros tipos de celulares (Elizonso A. 2007, Felton CV. 2004) y además la ubicuidad de la bomba (Na, K)-ATPasa en las células de mamíferos y su función en la pared vascular, podría sugerirse su contribución al desarrollo de la hipertensión. Se ha sugerido que la reducción de actividad de la (Na, K)-ATPasa y una elevación de la lipoperoxidación puede subyacer a uno de los aspectos fisiopatológicos relacionados con el estado de prehipertensión (Malfatti 2012).

La integridad funcional de las células musculares lisas de la pared vascular (CMLV) es esencial para un buen rendimiento de la vasculatura. Se puede modificar el diámetro de la luz, que permite a los vasos sanguíneos para mantener una presión arterial adecuada (Tsuda K. 2012). Cabe señalar sobre la menor actividad en la bomba (Na, K)-ATPasa en las CMLV, que se sabe que aumenta la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de Na<sup>+</sup> / Ca<sup>2+</sup> tipo intercambiador 1 (NCX1). Por consiguiente, un aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico contribuiría en una mayor contracción miofibrilar, lo que explica la elevación de la resistencia vascular y la presión sanguínea (Uydu HA. 2012).

Sin embargo, otros efectos que pueden influir en la modulación de la actividad de la bomba (Na, K)-ATPasa, debido a la lipoperoxidación aumentada y/o la oxidación de proteínas, no se debe descartar. Por ejemplo, una inhibición directa de la bomba (Na, K)-ATPasa por el peroxinitrito se ha descrito en la membrana plasmática de células del hígado (Malfatti 2012). Sin embargo, los estudios de la relación entre el perfil de composición de los lípidos de los eritrocitos y CMLV se debe realizar para confirmar este punto de vista.

### POSIBLES ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

Con el fin de contrarrestar los efectos del estrés oxidativo, las vitaminas antioxidantes C y E, aparecen como posibles alternativas terapéuticas para el manejo de la hipertensión (Plantinga Y. 2007, Rodrigo R. 2007, Schyvens CG. 2007). Ha sido demostrado que la acción antioxidante de  $\alpha$ -tocoferol resulta en su oxidación al radical tóxico  $\alpha$ -tocoferoxilo. El ácido ascórbico en compartimientos acuosos puede reciclar  $\alpha$ -tocoferol en membranas reduciendo el radical  $\alpha$ -tocoferoxilo a  $\alpha$ -tocoferol (Rodrigo R. 2010). En efecto, se ha demostrado la capacidad del ácido ascórbico para reciclar  $\alpha$ -tocoferol en bicapas lipídicas (Niki E. 1995) y en eritrocitos (May JM. 1998), por lo tanto puede potenciar las propiedades antioxidantes al aumentar la biodisponibilidad de vitamina E. Por otro lado, vitaminas C y E no sólo se comportan como barreos de EROs, sino que también pueden inducir el down-regulation de la enzima NADPH oxidasa y el up-regulation de eNOS (Ulker S. 2003, Attia DM. 2001). El estado antioxidante reforzado por la suplementación de vitaminas C y E (Rodrigo R. 2009, Sladkova M. 2007, Tsuda K. 1997, Kocak-Toker N. 2005, Ruperez FJ. 2008, Rodrigo R. 2007) podría resultar en una disminución de la lipoperoxidación (Abdollahzad H. 2009) y, por lo tanto, en cambios en el perfil de ácidos grasos de membrana, en su fluidez, y en la actividad de la bomba (Na,K)-ATPasa. Además, la seguridad de su consumo a través de una amplia gama de entradas (Herrera E. 2009), hace de estas vitaminas excelentes

candidatos para mejorar las defensas antioxidantes en pacientes hipertensos (Evans ZP. 2009, Evans ZP. 2008).

De acuerdo con este punto de vista, los intentos por llegar a efectos antihipertensivos se han realizado también con otros antioxidantes. Así, por ejemplo, en un estudio doble ciego, controlado con placebo, la administración de suplementos con N-acetilcisteína más L-arginina causó una reducción de la presión arterial sistólica y diastólica, en pacientes con diabetes tipo 2 e hipertensión (Martina V. 2008), un efecto probablemente atribuible al aumento de la bioactividad del óxido nítrico, potente vasodilatador. Por el contrario, a pesar de los efectos prometedores de los estudios experimentales que muestran los efectos beneficiosos de los polifenoles en la salud cardiovascular, los estudios sobre sus efectos antihipertensivos en los seres humanos no son concluyentes y se necesitan más ensayos. En resumen, revisando los estudios y trabajos publicados en la literatura científica actual, se sugiere que la suplementación con vitaminas C y E reduce la lipoperoxidación, lo que provoca un aumento de la fluidez de la membrana de los eritrocitos, lo que ejerce una modulación positiva de (Na, K)-ATPasa, contribuyendo así a reducir la presión arterial en pacientes con hipertensión esencial (Begg DP. 2010, Krug S. 2008, Herrera EA. 2010, Mori TA. 2009, Egert S. 2009, Redon J. 2003).

## BIBLIOGRAFÍA:

- Abdollahzad H, Eghtesadi S, Nourmohammadi I, Khadem-Ansari M, Nejad-Gashti H, Esmailzadeh A (2009) Effect of vitamin C supplementation on oxidative stress and lipid profiles in hemodialysis patients. *Int J Vitam Nutr Res.* 79, 281-287.
- Attia DM, Verhagen AM, Stroes ES, et al. (2001) Vitamin E alleviates renal injury, but not hypertension, during chronic nitric oxide synthase inhibition in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:2585-2593
- Begg DP, Sinclair AJ, Stahl LA, Garg ML, Jois M, Weisinger RS (2010) Dietary protein level interacts with omega-3 polyunsaturated fatty acid deficiency to induce hypertension. *Am J Hypertens.* 23, 125-128. Epublication 5 Nov 2009.
- Briones AM, Touyz RM (2010) Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep.* 12, 135-142.
- Cazzola R, Rondanelli M, Russo-Volpe S, Ferrari E, Cestaro B (2004) Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *J Lipid Res* 45:1846-1851
- Ceriello A (2008) Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care.* 31, S181-184.
- Channon KM & Guzik TJ (2002) Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol.* 53, 515-524
- Cottone S, Lorito MC, Riccobene R, Nardi E, Mulè G, Buscemi S, Geraci C, Guarneri M, Arseno R, Cerasola G (2008) Oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic renal failure. *J Nephrol.* 21, 175-179.
- Egert S, Bosy-Westphal A, Seiberl J, Kürbitz C, Settler U, Plachta-Danielzik S, Wagner AE, Frank J, Schrezenmeir J, Rimbach G, Wolfram S, Müller MJ (2009) Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr.* 102, 1065-1074.
- Elizondo A, Araya J, Rodrigo R, Poniachik J, Signorini C, Sgherri C, Comporti M, Videla LA (2007) Docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid levels in liver and erythrocyte phospholipids from obese non-alcoholic fatty liver disease patients. *Obesity* 15:24-31
- Evans ZP, Mandavilli BS, Ellett JD, Rodwell D, Fariss MW, Fiorini RN, Schnellmann RG, Schmidt MG, Chavin K (2009) Vitamin E succinate enhances steatotic liver energy status and prevents oxidative damage following ischemia/reperfusion. *Transplant Proc.*; 41: 4094-4098.
- Evans ZP, Ellett JD, Fariss MW, Schnellmann RG, Schmidt MG, Chavin K. (2008) Vitamin E succinate reduces ischemia/reperfusion injury in steatotic livers. *Transplant Proc.* 40: 3327-3329.
- Felton CV, Stevenson JC, Godsland IF (2004) Erythrocyte-derived measures of membrane lipid composition in healthy men: associations with arachidonic acid at low to moderate not high insulin sensitivity. *Metabolism* 53:571-577
- Gomez-Alamillo C, Juncos LA, Cases A, Haas JA, and Romero JC. (2003) Interactions between vasoconstrictors and vasodilators in regulating hemodynamics of distinct vascular beds. *Hypertension.*42: 831-836.
- Grover AK, Samson SE, Robinson S, Kwan CY (2003) Effects of peroxynitrite on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump in pig coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C294-C301
- Herrera E, Jiménez R, Aruoma OI, Hercberg S, Sánchez-García I, Fraga C (2009) Aspects of antioxidant foods and supplements in health and disease. *Nutr Rev.* 67, S140-144.
- Herrera EA, Verkerk MM, Derks JB, Giussani DA (2010) Antioxidant treatment alters peripheral vascular dysfunction induced by postnatal glucocorticoid therapy in rats. *PLoS One.* Feb 5, E9250.
- Hamilton BP, Blaustein MP (2006) Molecular mechanisms linking sodium to hypertension: report of a symposium. *J Investig Med* 54:86-94
- Holman RT, Johnson SB, Kokmen E (1989) Deficiencies of polyunsaturated fatty acids and replacement by nonessential fatty acids in plasma lipids in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 4720-4724.
- Kalous M, Drahotka Z (1996). The role of mitochondria in aging. *Physiol Res.* 45:351-359.
- Kato M, Hayashi R, Tsuda T, Taniguchi K (2002) High pressure-induced changes of biological membrane. Study on the membrane-bound Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase as a model system. *Eur J Biochem.* 269, 110-118.
- Kocak-Toker N, Giris M, Tulubas F, Uysal M, Aykac-Toker G (2005) Peroxynitrite induced decrease in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity is restored by taurine. *World J Gastroenterol* 11:3554-3557.
- Krug S, Zhang Y, Mori TA, Croft KD, Vickers JJ, Langton LK, Whitworth JA (2008) N-Acetylcysteine prevents but does not reverse dexamethasone-induced hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35, 979-981.
- Malfatti et al.(2012) Decreased Erythrocyte Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Activity and Increased Plasma TBARS in Prehypertensive Patients. *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 348246

- Martina V et al.(2008) Long-term N-acetylcysteine and L-arginine administration reduces endothelial activation and systolic blood pressure in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*.31:940-4.
- Mori TA, Burke V, Puddey I, Irish A, Cowpland CA, Beilin L, Dogra G, Watts GF (2009) The effects of [omega]3 fatty acids and coenzyme Q10 on blood pressure and heart rate in chronic kidney disease: a randomized controlled trial. *J Hypertens*. 27, 1863-1872.
- Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. (1995) Interaction among vitamin C, vitamin E, and  $\beta$ -carotene. *Am. J. Clin. Nutr*.62:1322S-1326S.
- May JM, Qu ZC, Mendiratta S (1998) Protection and recycling of  $\alpha$ -tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophys*. 349:281-289.
- Paravicini TM, Touyz RM (2006) Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*. 71, 247-258.. *Redox Signal*. 7, 1302-1314
- Plantinga Y, Ghiadoni L, Magagna A, Giannarelli C, Franzoni F, Taddei S, Salvetti A (2007) Supplementation with vitamins C and E improves arterial stiffness and endothelial function in essential hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 20, 392-397.
- Pradelles P, Grassi J, Maclouf J. (1985) Enzyme immunoassays of eicosanoids using AchE as label: An alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem*. 57,1170-1173.
- Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Rosati M, Muscari A (2008) The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Press*.17, 70-77.
- Redon J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Saez GT (2003) Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* 41, 1096-1101.
- Rodrigo R. Hypertension. In: Rodrigo R, editor.(2009b) *Oxidative Stress and Antioxidants: Their role in Human Disease*. New York, Nova Publishers. pp. 25-62.
- Rodrigo R, Guichard C, Charles R (2007) Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundam Clin Pharmacol*. 21, 111-127.
- Rodrigo R, Castillo R (2006) Pathophysiological mechanisms of renal damage by alcohol consumption: involvement of oxidative stress. In: Yoshida R (ed) *Trends in Alcohol Abuse and Alcoholism Research*. Nova Publishers
- Rodrigo R, Bächler JP, Araya J, Prat H, Passalacqua W (2007) Relationship between (Na,K)-ATPase activity, lipid peroxidation and fatty acid profile in erythrocytes of hypertensive and normotensive subjects. *Mol Cell Biochem*. 303, 73-81. Epublication 5 Apr 2007.
- Rodrigo R, Miranda A. Vitamin C: Nutritional Role, Supplementation in Pathophysiological States & Side Effects. Nova Publishers, New York, 2010.
- Rupérez FJ, García-Martínez D, Baena B, Maeso N, Cifuentes A, Barbas C, Herrera E (2008) Evolution of oxidative stress parameters and response to oral vitamins E and C in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Pharmacol*. 60, 871-878.
- Schuyvens CG, Andrews MC, Tam R, Mori TA, Croft KD, McKenzie KU, Whitworth JA, Zhang Y (2007) Antioxidant vitamins and adrenocorticotrophic hormone -induced hypertension in rats. *Clin Exp Hypertens*. 29, 465-478.
- Sedeek M, Hébert RL, Kennedy CR, Burns KD, Touyz RM (2009) Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 18, 122-127.
- Sládková M, Kojsová S, Jendeková L, Pechánová O (2007) Chronic and acute effects of different antihypertensive drugs on femoral artery relaxation of L-NAME hypertensive rats. *Physiol. Res* 56, S85-S91.
- Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T (2008) Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 10, 1115-1126.
- Stark G (2005) Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membr Biol*. 205, 1-16
- Subczynski WK, Wisniewska A. (2000) Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions. *Acta Biochimica Polonia* Vol. 47 No. 613-625.
- Touyz RM (2004): Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 44, 248-252.
- Touyz RM (2005) Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid*
- Tsuda K, Nishio I, Masuyama Y (1997) The role of sodium-potassium adenosine triphosphatase in the regulation of membrane fluidity of erythrocytes in spontaneously hypertensive rats: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens*. 10, 1411-1414.
- Tsuda K.(2012) Associations between High-Sensitivity C-Reactive Protein and Membrane Fluidity of Red Blood Cells in Hypertensive Elderly Men: An Electron Spin Resonance Study. *Int J Hypertens*. 292803.
- Tsuda K (2010) Oxidative stress and membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: an electron spin resonance investigation. *Int Heart J*. 51, 121-124.
- Tsuda K & Nishio I (2005) An association between plasma asymmetric dimethylarginine and membrane fluidity of erythrocytes in hypertensive and normotensive men: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens*. 18, 1243-1248.
- Ulker S, McKeown P, Bayraktutan U (2003) Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension*. 41:534-539.
- Uydu HA, Yildirmis S, Orem et al. (2012) The Effects of Atorvastatin Therapy on Rheological Characteristics of Erythrocyte Membrane, Serum Lipid Profile and Oxidative Status in Patients with Dyslipidemia. *J Membrane Biol* 245:697-705
- Uyuklu M, Meiselman HJ, Baskurt O.Effect of decreased plasma cholesterol by atorvastatin treatment on erythrocyte mechanical properties. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 36 (2007) 25-33 25
- Vajreswari A, Rupalatha M, Rao PS (2002) Effect of altered dietary n-6-to-n-3 fatty acid ratio on erythrocyte lipid composition and membrane-bound enzymes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 48, 365-370.
- Zamaria N. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. *Reprod Nutr Dev*. 2004 May-Jun;44(3):273-82



## ARTÍCULO DE REVISIÓN

# ANTIOXIDANTES FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR HIPOXIA HIPOBÁRICA EN TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO.

(Antioxidants against oxidative stress induced by hypobaric hypoxia in testis and epididymis)

Andrea B. Zepeda y Jorge G. Farías

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, Ciencias y Administración, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile.  
Programa de Doctorado en Ciencias mención Biología Celular y Molecular Aplicada, Universidad de La Frontera.

### RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species) como los radicales de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por largo tiempo han sido reconocidos como derivados no deseables de la generación oxidativa de ATP en la mitocondria. Recientemente, ROS ha sido destacado por actuar como una molécula importante de señalización en una variedad de condiciones fisiológicas y patofisiológicas como un microambiente hipóxico. Para responder adecuadamente a hipoxia, se requiere de una rápida maquinaria de respuesta que puede ser fuertemente controlada entre un amplio rango de baja tensión de oxígeno. Además es necesario mantener el balance entre los sistemas pro-oxidantes y antioxidantes, es así que frente a un estado prolongado de hipoxia se perdería este equilibrio generando un aumento en las ROS, especialmente en órganos tan susceptibles como el testículo y el epidídimo. Por esta razón el objetivo consiste en dar a conocer los efectos de sustancias que presentan actividad antioxidante y que podrían activar los mecanismos moleculares antioxidantes que son deprimidos frente a un estado de hipoxia hipobárica.

**Palabras Claves:** ROS, Melatonina, Ascorbato, Berries.

Publicado por la Sociedad de Farmacología de Chile

### INTRODUCCIÓN

La hipoxia se define como la condición de baja presión de oxígeno o bajo contenido de oxígeno en el medioambiente, organismo o tejido, que puede resultar de una presión de oxígeno atmosférica baja (hipoxia hipobárica), bajo contenido de oxígeno en medioambientes acuáticos, o, en el caso de organismos o tejidos, a la disminución del intercambio del oxígeno molecular ( $O_2$ ) con el medioambiente o a la disminución del suplemento del  $O_2$  por el lecho vascular (Reyes y col., 2012).

Se sabe que la vida celular en la tierra está adaptada a los ambientes hipóxicos desde muchos años antes de que surgieran los organismos dependientes de oxígeno (Wayne, 1985). Los procesos que requieren de oxígeno como aceptor final de electrones han sido seleccionados por la evolución como un mecanismo altamente eficiente

para los procesos oxidativo en las células. Estos procesos inevitablemente producen especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden conducir a la formación de especies reactivas de nitrógeno (NRS). Tanto ROS como NRS pueden modificar las biomoléculas y afectar los lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos (D'Autreaux y Toledano, 2007). Las especies reactivas de oxígeno se caracterizan por ser altamente reactivas y por su capacidad oxidativa, genera que junto a los radicales libres produzcan un daño total que afecta los principales componentes celulares y tejidos (Blokhina y col., 2003; Radak y col., 1997). Ha sido reportado el uso de antioxidantes en concentraciones farmacológicas para reducir los efectos de la hipoxia hipobárica intermitente por estrés oxidativo (Vargas y col., 2011, Farías y col., 2010).

**Correspondencia a:** Dr. Jorge G. Farías, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, Ciencias y Administración, Universidad de La Frontera, Chile. Teléfono: 56-45-325472/592189, Fax: 56-45-325053, Correo Electrónico: [jorge.farias@ufrontera.cl](mailto:jorge.farias@ufrontera.cl)

La melatonina es un antioxidante altamente efectivo, donde su mecanismo de acción consiste en atrapar los radicales e inhibe la producción de óxido nítrico (Gitto y col., 2011; Serel y col., 2004) tal como otros antioxidantes como las vitaminas E y C (Kücükakin y col., 2009). Por esta razón es de gran importancia conocer los aportes entregados por sustancias con propiedades antioxidantes frente al estrés oxidativo producido en testículos y epidídimos bajo una condición de hipoxia hipobárica.

## HIPOXIA

Hipoxia se define como el umbral donde la concentración de oxígeno es limitante para los procesos celulares normales, esto es debido a que el oxígeno es un factor esencial requerido para procesos metabólicos incluyendo la producción de ATP (energía). El inadecuado suplemento de oxígeno, denominado hipoxia, cambiaría el estado metabólico, así bien como también muchas otras funciones importantes en células afectadas (Nilsson, 2006), gatillando una serie de respuestas fisiológicas (Cummins y Taylor, 2005). Se debe tener en cuenta que la atmósfera consiste de 20,9% (normoxia) de oxígeno, pero las células en tejidos normalmente experimentan concentraciones mucho más bajas, típicamente alrededor del 5%. En este aspecto, el 3-5% de oxígeno aún representa un medio ambiente apropiado para las células aunque estén cercanas a un rango hipóxico. En este estado, el oxígeno aún no es limitante para la célula, pero disminuir más los niveles de oxígeno gatillarían las respuestas inducidas por hipoxia (Nilsson, 2006).

La hipoxia es un prototipo considerablemente bien estudiado y un paradigma de respuestas que involucran al organismo en su conjunto y pueden tener consecuencias diferentes en la salud y en la enfermedad (Caramelo y col., 2006). Es así como el nivel de oxígeno es completamente monitoreado por mecanismos intracelulares y constituye un factor complicado en muchos estados de enfermedades modernas, tales como infarto al corazón, cáncer, retinopatía diabética y artritis reumatoide debido a que promueve la formación patológica de vasos sanguíneos (Nilsson, 2006), también existe hipoxia transitoria durante el ejercicio, en sepsis o en tejidos traumatizados e hipoxia crónica en la altura o en zonas tisulares menos oxigenadas, como por ejemplo la médula renal (Caramelo y col., 2006). El principal efecto de la hipoxia en el sistema metabólico consiste en una depresión general del metabolismo, especialmente en las vías de producción del ATP dependiente de  $O_2$  y, adicionalmente, en las vías implicadas en el consumo de ATP (Wu, 2002; Richards, 2009).

Estudios realizados en ratas bajo hipoxia hipobárica crónica (HHC) e hipoxia hipobárica intermitente (HHI) han demostrado que estas condiciones generan cambios en la

morfología testicular, además de pérdida de células espermatogénicas en todos los estados del ciclo espermatogénico (Zepeda y col., 2012b); mientras que la hipoxia intermitente induce una serie de respuestas celulares, moleculares, y patofisiológicas que resultan en adaptación y sobrevivencia o injuria y muerte celular, esto es debido a que conduce a estrés oxidativo e induce peroxidación lipídica, aumento en la producción de proteínas de respuesta al estrés, y apoptosis neuronal (Douglas y col., 2010). La exposición a hipoxia también puede inducir modificaciones en los niveles de especies reactivas de oxígeno en el organismo. Aunque en hipoxia disminuye la actividad de la cadena transportadora de electrones, la cual es la principal fuente de ROS, algunos estudios indican un aumento de estos peligrosos agentes oxidativos (Chandel y col., 2000; Bickler y Buck, 2007).

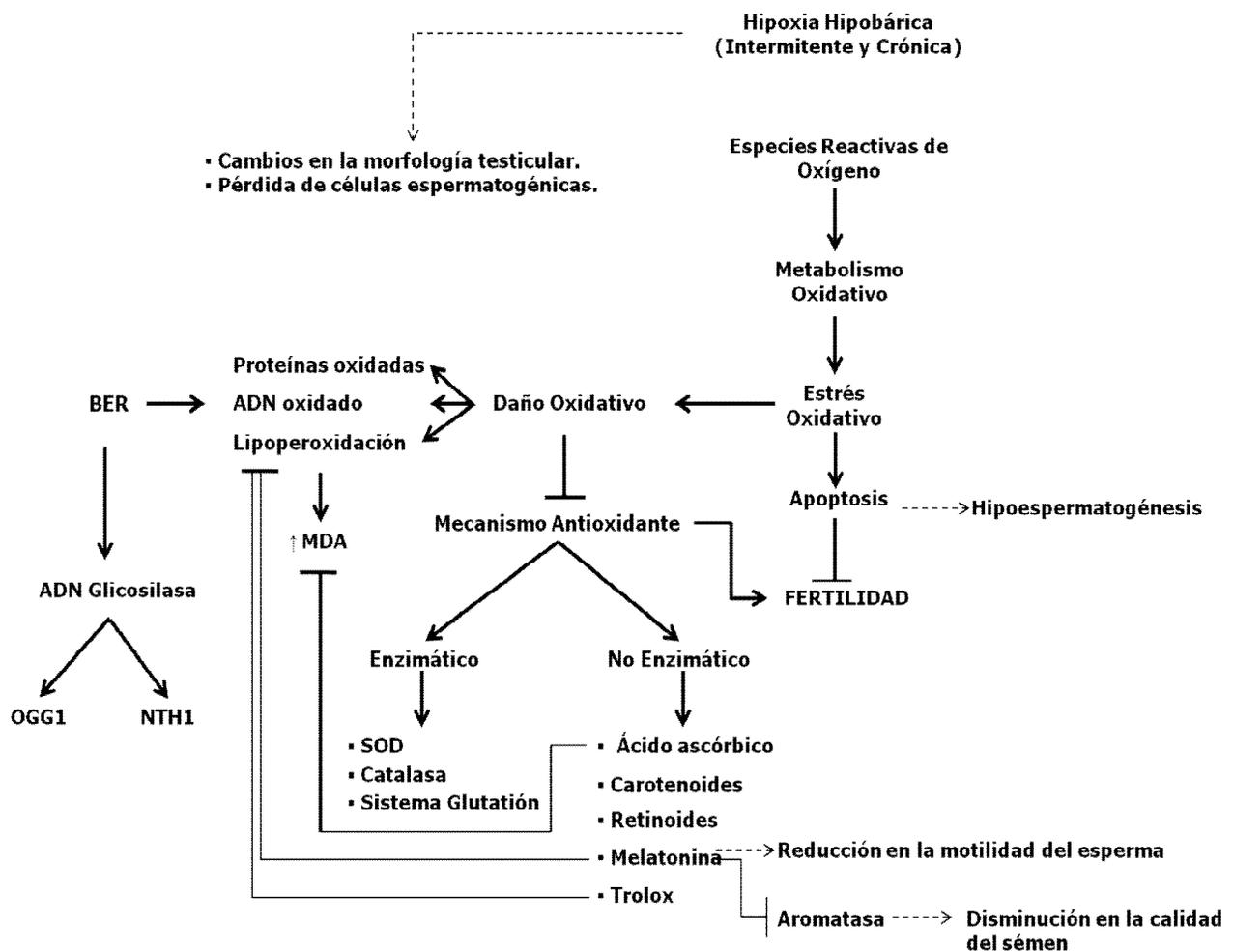
## GENERACIÓN Y SIGNIFICANCIA BIOLÓGICA DE ROS

El estrés oxidativo ha sido definido como un desequilibrio entre fuerzas pro-oxidantes y antioxidantes en el cuerpo. Los pro-oxidantes incluyen radicales de oxígeno o especies reactivas de oxígeno, los cuales pueden ser citotóxicos debido a su capacidad para alterar los componentes celulares y su función (Walsh y col., 2009). Cada átomo de oxígeno contiene dos electrones inapareados en su capa externa. El oxígeno molecular,  $O_2$ , es caracterizado como diradical, una propiedad que dicta que la reducción completa de oxígeno a agua como un evento terminal en la cadena transportadora de electrones requiere de cuatro electrones. La donación secuencial de electrones al oxígeno durante este proceso puede generar ROS como intermediario, y la "fuga de electrones" puede también contribuir a la formación de ROS. La donación de un único electrón al  $O_2$  resulta en la formación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). La donación de un segundo electrón produce peróxido, el cual luego experimenta una protonación para producir peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La donación de un tercer electrón, como ocurre en la reacción de Fenton ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$ ), resulta en la producción del altamente reactivo radical hidroxil ( $\cdot OH$ ). Finalmente, la donación de un cuarto electrón produce agua. El oxígeno Singlet ( $^1O_2$ ), una forma reactiva de oxígeno molecular de muy corta vida, en donde los electrones externos son elevados a un estado de energía muy alto, puede ser formado por una variedad de mecanismos, incluyendo la reacción Haber-Weiss ( $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow \cdot OH + OH^- + ^1O_2$ ). Tanto el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) cumplen un papel modulador importante en la actividad de HIF-1. Este papel se ejerce de dos maneras distintas. En un caso, la enzima NADPH oxidasa ( $O_2 \rightarrow O_2^{\cdot-}$ ) es la responsable de la producción de ROS, que en condiciones de normoxia inducen la degradación de HIF-1 $\alpha$ . Una segunda situación señala que la producción de ROS en la mitocondria (cyt c1

→  $O_2^- \rightarrow H_2O_2$ ) en condiciones de hipoxia induce la estabilización de HIF-1 $\alpha$  (Caramelo y col., 2006), comprobándose a través de la inhibición genética y farmacológica del transporte de electrones impidiendo la formación de ROS, consecuentemente dañando la inducción de HIF por hipoxia, sugiriendo que el ROS producido por la mitocondria altera la forma de la curva de respuesta de las prolin hidrogenasas (PHD). Además el efecto de la oxidación de Fe(II), ROS tal como  $O_2^-$  o  $H_2O_2$  podría positivamente modular la regulación transcripcional de HIF-1 $\alpha$  y aumentar la cantidad de su proteína (Brüne y

Zhou, 2007). Es posible que la hipoxia conduzca a un aumento de ROS desde diferentes fuentes, como NADPH oxidasa, transporte mitocondrial de electrones, xantina oxidasa y eNOS, aún así es necesario identificar las fuentes de  $H_2O_2$  en hipoxia y permitir unir esta fuente directamente con la estabilización de HIF-1 $\alpha$  (Irwin y col., 2009). Los niveles moderados de ROS, especialmente de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, han mostrado activar cascadas de señales que median respuestas de distintos factores (Bonello y col., 2007).

Figura 1.



Modelo que estudia el efecto de la exposición a hipoxia hipobárica en epidídimo y testículo. Las líneas punteadas indican cambios celulares; las flechas indican la inducción de las reacciones; y las líneas con barra final indican la inhibición de las reacciones. BER: Reparación por Escisión de Bases; OGG1: 8-oxoguanina-ADN glicosilasa 1; NTH1: endonucleasa 1; MDA: malonaldehído; SOD: superóxido dismutasa (Zepeda y col., 2012b).

Las especies reactivas de oxígeno son generadas como resultado de respiración mitocondrial normal, pero también durante la fase de reperfusión de daño en tejido hipóxico, como la exposición a alturas superiores a los 3.000 msnm, y en asociación con infección e inflamación, generando variadas respuestas fisiológicas (Walsh y col., 2009; Farias et al., 2005a), dentro de las cuales se encuentran las observadas en diversos estudios donde se ha demostrado la existencia de un metabolismo oxidativo en epidídimo de ratas expuestas a hipoxia hipobárica debido al aumento en la expresión de enzimas reguladoras de ROS. Este aumento en la producción de ROS induce un aumento en la apoptosis de células germinales, conduciendo a un estado de hipo-espermatogénesis que podría estar afectando la fertilidad masculina (Zepeda y col., 2012b). También se sabe que ROS participa en la regulación de la proliferación vascular, migración, apoptosis, modificación de la matriz extracelular, y actividad pro-coagulante, además de participar en la angiogénesis a través de la regulación del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  encargado de inducir la transcripción de VEGF (Bonello y col., 2007). De este modo, en presencia de una variedad de moléculas y especies reactivas que son normalmente producidas en sistemas biológicos aeróbicos, se inducen mecanismos endógenos de protección contra la agresión oxidativa, dentro de los cuales se encuentran los mecanismos enzimáticos tales como la dismutasa superóxido, catalasa y el sistema del glutatión, así como mecanismos no enzimáticos, donde se consideran moléculas con propiedades antioxidantes tal como el ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides y retinoides (vitamina A), entre otros (Figura 1) (Zepeda y col., 2012b; Mathews y col., 2004).

## **SUSTANCIAS CON PROPIEDADES ANTIOXIDANTES**

Los glóbulos rojos requieren de un sistema antioxidante robusto para enfrentar la gran carga oxidativa encontrada durante el tránsito circulatorio, especialmente durante los procesos de estrés fisiológico (Balagopalakrishna y col., 1996). La limitada disponibilidad de oxígeno molecular genera la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y NRS) en los tejidos (Droque, 2002). Es así que una sostenida exposición a hipoxia activaría la cascada de ROS que excede la capacidad antioxidante (Kemp y col., 2008), razón por la cual es importante conocer el beneficio del consumo o tratamiento con sustancias con propiedades antioxidantes. Esto se vuelve más importante al saber que los antioxidantes arrestan los procesos de lipoperoxidación y sus efectos, y previene la oxidación debido a la inactivación de los radicales libres o ROS (Gilgun-Sherki y col., 2002)

## **SUPLEMENTACIÓN CON MELATONINA**

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es un aminoácido que contiene sulfuro y es indispensable para la síntesis de proteínas en todas las especies animales (Li y col., 2007), y es el principal producto secretado de la glándula pineal en todos los mamíferos, incluyendo humanos; sin embargo, la melatonina también es producida en otros órganos (Okutan y col., 2004).

La capacidad de la melatonina de contrarrestar la formación de ROS es debido a que se caracteriza por ser una sustancia capaz de cruzar las barreras morfológicas y fisiológicas de los tejidos, células y compartimentos sub-celulares debido a sus propiedades físicas y químicas (Costa y col., 1995; Tomás-Zapico y col., 2005). En consecuencia, la también llamada "hormona de la oscuridad" y mensajero del fotoperiodo también es conocida por exhibir una fuerte actividad antioxidante directa e indirecta, dentro de la cual está la captación de ROS directamente, y por otro lado la estimulación de la expresión de genes y la actividad de algunas enzimas que pueden activar antioxidantes enzimáticos (Kücükakin y col., 2009). Esto demuestra que la remoción quirúrgica de la glándula pineal exacerba el daño tisular causado por los radicales libres (Reiter y col., 2001). A pesar de que la melatonina ejerce un efecto protector contra la lipoperoxidación bajo estrés oxidativo, se ha demostrado que induce una marcada reducción de la motilidad espermática (Serel y col., 2004; Oosthuizen y col., 1986), además de no prevenir la reducción en la concentración del espermatozoide bajo una condición de isquemia/reperfusión (Kurcer y col., 2010). El efecto protector de la melatonina sobre el daño oxidativo bajo una condición de HHI es órgano-dependiente y no tiene efecto protector en el daño producido en testículos y epidídimo (Farias y col., 2012).

## **TRATAMIENTO CON EXTRACTOS DE BLUEBERRIES**

Los berries son una conocida fuente de antioxidantes al contener fitoquímicos, factores no enzimáticos presentes en las plantas que presentan un amplio beneficio para la salud (Giampieri y col., 2012; Bland, 1996). Dentro de las diferentes especies, hay un grupo clasificado como blueberries, los cuales poseen un color oscuro debido a que sus pigmentos de más importancia corresponden a las antocianinas y polifenoles que presentan actividad antioxidante (Kong y col., 2003). Los fitoquímicos han demostrado ser inhibidores poderosos de lipoperoxidación comparada a otros antioxidantes (Duthie y col., 2006), donde el efecto protector de los polifenoles contra el daño oxidativo parece ser a través del sistema glutatión (Figura 1) (Moskaug y col., 2005). Los extractos de blueberry

presentan un efecto protector contra el estrés oxidativo inducido por hipoxia hipobárica al recuperar la actividad de la glutatión reductasa y de la superóxido dismutasa (Zepeda y col., 2012a).

## TRATAMIENTO CON ASCORBATO

El ácido ascórbico (AA) o vitamina C es un antioxidante no enzimático hidrosoluble capaz de reaccionar con radicales libres en el medio acuoso, ROS y especies reactivas de nitrógeno (NRS), y tiene el potencial de proteger tanto los componentes citosólicos como membranales de células con daño oxidativo (Devi y col., 2007). En estos procesos, el ácido ascórbico es reducido a ácido dehidroascórbico a través de un intermediario llamado radical ascorbil. La deficiencia en ácido ascórbico se caracteriza por un aumento del estrés oxidativo y daño tisular (Barja y col., 1994; Maeda y col., 2000). Cabe destacar que el ácido ascórbico realza la biodisponibilidad del hierro no hemo, conduciendo a un mayor almacenaje del hierro en el cuerpo (Podmore y col., 1998).

Como se ha descrito previamente, la exposición a hipoxia hipobárica induce daño oxidativo, disminuye la actividad de la glutatión reductasa, reducida espermatogénesis acompañada de un aumento en la vascularización y ROS en los testículos. Estos cambios vasculares son inducidos vía ROS a través de la inhibición del dominio de las proteínas proil hidroxilasas (PHD). Esta actividad se ha visto restaurada frente al suplemento con ácido ascórbico lo que ha facilitado la búsqueda de nuevas estrategias para la administración de antioxidantes que prevengan los efectos generados por HH (Farias y col., 2012; Farias y col., 2010). De este modo es que se ha demostrado que ratas tratadas con dosis de 10 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal y que han sido expuestas a HHI, tienen la capacidad de disminuir el estrés oxidativo en testículos y epidídimo, conduciendo a una disminución en la lipoperoxidación y estableciendo un recuento de esperma epididimal a niveles similares de los observados en condición de normoxia, lo cual puede ser explicado en parte por la preservación de la actividad de la glutatión reductasa en estos órganos (Farias y col., 2010).

## CONCLUSIÓN

En esta revisión queda de manifiesto los claros efectos adversos producidos frente a la exposición de hipoxia. Cabe destacar que los efectos observados frente a una condición de hipoxia producida por la presión atmosférica o una condición de hipoxia producida por una enfermedad han demostrado gatillar los mismos daños morfológicos y fisiológicos en testículos y epidídimo, lo que puede afectar directamente la fertilidad masculina.

Por esta razón, es de importancia no sólo tener en conocimiento los mecanismos antioxidantes que rodean la posibilidad de un tratamiento a estos efectos, sino que reconocer las sustancias que contengan en ellos alguna molécula con capacidad antioxidante, de manera de facilitar la incorporación de éstos a través de medicamentos o alimentos que permitan prevenir estos acontecimientos.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Balogopalakrishna C., Manoharan P. T., Abugo O. O., Rifkind J. M. (1996) Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions. *Biochemistry*. 35,6393-6398.
- Barja G., Lopez-Torres M., Perez-Campo R., Rojas C., Cadenas S., Prat J., Pamplona R. (1994) Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. *Free Radic. Biol. Med.* 17, 105-115.
- Bickler P. E., Buck L. T. (2007) Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: Life with variable oxygen availability. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 145-170.
- Bland J. S. (1996) Phytonutrition, phytotherapy, and phytopharmacology. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 2(6), 73-76.
- Bonello S., Zähringer C., BelAiba R. S., Djordjevic T., Hess J., Michiels C., Kietzmann T., Görlach A. (2007) Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 755-761.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91, 179-194.
- Bristow R. G., Hill R. P. (2008) Hypoxia and metabolism: Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat. Rev. Cancer.* 8: 180-192.
- Brüne B., Zhou J. (2007) Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. *Cardiovasc. Res.* 75, 275-282.
- Caramelo C., Peña J. J., Castilla A., Justo S., De Solís A. J., Neria F., Peñate S., González-Pacheco F. R. (2006) Respuesta a la hipoxia: Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. *Medicina.* 66, 155-164.
- Chandel N. S., McClintock D. S., Feliciano C. E., Wood T. M., Melendez J. A., Rodriguez A. M., Schumacker P. T. (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1a during hypoxia. *J. Biol. Chem.* 275, 25130-25138.
- Costa E. J., Lopes R. H., Lamy-Freund M.T. (1995) Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J. Pineal Res.* 19, 123-126.
- Cummins E. P., Taylor C. T. (2005) Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch.* 450, 363-371.
- D'Autréaux B., Toledano M. B. (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8(10), 813-824.
- Devi S. A., Vani R., Subramanyam M. V., Reddy S. S., Jeevaratnam K. (2007) Intermittent hypobaric hypoxia-induced oxidative stress in rat erythrocytes: protective effects of vitamin E, vitamin C, and carnitine. *Cell Biochem. Funct.* 25(2), 221-231.
- Douglas R. M., Ryu J., Kanaan A., Del Carmen Rivero M., Dugan L. L., Haddad G. G., Ali S.S. (2010) Neuronal death during combined intermittent hypoxia/hypercapnia is due to mitochondrial dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C1594-602.

- Droge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.
- Duthie S. J., Jenkinson A. M., Crozier A., Mullen W., Pirie L., Kyle J., Yap L. S., Christen P., Duthie G. G. (2006) The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers, *Eur. J. Nutr.* 45(2), 113-122.
- Farias J. G., Bustos-Obregon E., Orellana R., Bucarey J. L., Quiroz E., Reyes J. (2005a) Effects of chronic hypobaric hypoxia on testis histology and round spermatid oxidative metabolism. *Andrologia.* 37, 47-52.
- Farias J. G., Puebla M., Acevedo A., Tapia P., Gutiérrez E., Zepeda A., Juantok C., Calaf G., Reyes J. (2010) Oxidative Stress in Testis and Epididymis Under Intermittent Hypobaric Hypoxia in Rats: Protective Role of Antioxidant Supplementation. *J. Androl.* 31(3), 314-321.
- Farias J. G., Zepeda A. B., Calaf G. (2012) Melatonin protects heart, lung and kidneys from oxidative stress under intermittent hypobaric hypoxia in rats. *Biol. Res.* 45, 81-85.
- Giampieri F., Tulipani S., Alvarez-Suarez J. M., Quiles J. L., Mezzetti B., Battino M. (2012) The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition.* 28(1), 9-19.
- Gilgun-Sherki Y., Rosenbaum Z., Melamed E., Offen D. (2002) Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol. Rev.* 54(2), 271-284.
- Gitto E., Aversa S., Reiter R. J., Barberi I., Pellegrin S. (2011) Update on the use of melatonin in pediatrics. *J. Pineal Res.* 50, 21-28.
- Irwin D. C., McCord J. M., Nozik-Grayck E., Beckly G., Foreman B., Sullivan T., White M., Crossno J. Jr., Bailey D., Flores S. C., Majka S., Klemm D., van Patot M. C. (2009) A potential role for reactive oxygen species and the HIF-1 $\alpha$ -VEGF pathway in hypoxia-induced pulmonary vascular leak. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 55-61.
- Kemp M., Go Y. M., Jones D. P. (2008) Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Rad. Biol. Med.* 44, 921-937.
- Kong J. M., Chia L. S., Goh N. K., Chia T. F., Brouillard R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry.* 64(5), 923-933.
- Kücükakin B., Gögenur I., Reiter R. J., Rosenberg J. (2009) Oxidative Stress in Relation to Surgery: Is There a Role for the Antioxidant Melatonin?. *J. Surg. Res.* 152, 338-347.
- Kurcer Z., Hekimoglu A., Aral F., Baba F., Sahna E. (2010) Effect of melatonin on epididymal sperm quality after testicular ischemia/reperfusion in rats. *Fertil. Steril.* 93, 1545-1549.
- Li P., Yin Y. L., Li D., Woo Kim S., Wu G. (2007) Amino acids and immune function. *Br. J. Nutr.* 98, 237-252.
- Maeda N., Hagihara H., Nakata Y., Hiller S., Wilder J., Reddick R. (2000) Aortic wall damage in mice unable to synthesize ascorbic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 841-846.
- Mathews C. K., VanHolde K. E., Ahern K. G. (2004) *Biochemistry.* Pearson Addison Wesley, Spain, p. 1335.
- Moskang J. O., Carlsen H., Myhrstad M. C., Blomhoff R. (2005) Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(1), 277S-283S.
- Nilsson I. (2006) Hypoxia, PDGF and VEGF in vascular development. Uppsala, Suecia: Universidad Uppsala.
- Okutan H., Savas C., Delibas N. (2004) The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion. *Interact. CardioVasc. Thorac. Surg.* 3, 519-522.
- Oosthuizen J. M., Bornman M. S., Schulenburg G. W. (1986) Melatonin impairs sperm motility - a novel finding. *S. Afr. Med. J.* 70, 566.
- Podmore I. D., Griffiths H. R., Herbert K. E., Mistry N., Mistry P., Lunec J. (1998) Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature (Lond.)* 392, 559.
- Radak Z., Asano K., Lee K. C., Ohno H., Nakamura A., Nakamoto H., Goto S. (1997) High altitude training increases reactive carbonyl derivatives but not lipid peroxidation in skeletal muscle of rats. *Free Radic. Biol. Med.* 22(6), 1109-1114.
- Reiter R. J., Tan D., Manchester L. C., Qi W. (2001) Biochemical Reactivity of Melatonin with Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Cell Biochem. Biophys.* 34, 237-256.
- Reyes J. G., Farias J. G., Henriquez-Olavarrieta S., Madrid E., Parraga M., Zepeda A. B., Moreno R. D. (2012) The Hypoxic Testicle: Physiology and Pathophysiology. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 929285. doi:10.1155/2012/929285
- Richards J. G. (2009) Metabolic and molecular responses of fish to hypoxia, in: Richards J. G., Farrell A. P., Brauner C. J. (Eds.), *Fish Physiology*, Academic Press, 27, 443-485.
- Serel T. A., Özgüner F., Soyupek S. (2004) Prevention of shock wave-induced renal oxidative stress by melatonin: an experimental study. *Urol. Res.* 32, 69-71.
- Tomás-Zapico C., Coto-Montes A. (2005) A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J. Pineal Res.* 39, 99-104.
- Vargas A., Bustos-Obregón E., Hartley R. (2011) Effects of hypoxia on epididymal sperm parameters and protective role of ibuprofen and melatonin. *Biol. Res.* 44, 161-167.
- Walsh B. K., Brooks T. M., Grenier B. M. (2009) Oxygen therapy in the neonatal care environment. *Respir. Care.* 54(9), 1193-1202.
- Wayne R. (1985) *Chemistry of Atmospheres*, Oxford Science Publication, Clarendon Press, Oxford, UK.
- Wu R. S. S. (2002) Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 35-45.
- Zepeda A. B., Aguayo L. G., Fuentealba J., Figueroa C., Acevedo A., Salgado P., Calaf G. M., Farias J. (2012a) Blueberry extracts protect testis from hypobaric hypoxia induced oxidative stress in rats. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2012:975870. doi: 10.1155/2012/975870.
- Zepeda A. B., Figueroa C. A., Calaf G. M., Farias J. G. (2012b) Male reproductive system and antioxidants in oxidative stress induced by hypobaric hypoxia. *Andrologia.* doi: 10.1111/and.12039. [Epub ahead of print]

ARTIGO DE REVISÃO/ARTÍCULO DE REVISIÓN

EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ATIVIDADE SEROTONINÉRGICA DA CURCUMINA EM MODELOS DE ANIMAIS DE DEPRESSÃO.

(Actividad serotoninérgica y antidepresivos de la curcumina en modelos animales de depresión)

Lúcio Fernandes Pires<sup>1,2</sup>, Rivelilson Mendes de Freitas<sup>1,\*</sup> e Adriano Carvalho Tupinambá Rodrigues<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Piauí.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Especializada – CCS – UFPI.

RESUMO/RESUMEN

A curcumina, composto obtido a partir da raiz da *Curcuma longa*, tem sido foco de um crescente número de estudos clínicos, epidemiológicos e experimentais. Dentre os últimos, os estudos dirigidos sobre as suas propriedades psicofarmacológicas e notadamente aos seus efeitos antidepressivos têm merecido especial atenção. **Objetivo:** Neste trabalho, fez-se uma revisão crítica e compreensiva sobre a literatura disponível acerca das repercussões da curcumina sobre o sistema serotoninérgico, correlacionando-as com os efeitos antidepressivos que produzem em modelos animais de depressão. **Métodos:** A busca primária dos trabalhos revisados foi feita por meio da base de dados PubMed, utilizando as seguintes palavras-chaves: curcumina; *Curcuma longa*; teste do nado forçado; depressão; serotonina; receptores serotoninérgicos e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Referências bibliográficas adicionais, segundo sua relevância, foram trazidas à atenção dos autores por meio dos artigos encontrados pelo método anteriormente descrito. Apenas estudos experimentais foram incluídos na revisão. **Resultados e conclusões:** A hipótese reforçada após revisão foi de que um dos mecanismos que justificam o efeito antidepressivo da curcumina é a provável ação sobre o sistema serotoninérgico, havendo evidências, inclusive, da interferência desse composto sobre receptores serotoninérgicos como 5-HT<sub>1A</sub> pré e pós-sinápticos, 5-HT<sub>2C</sub> e 5-HT<sub>7</sub>, bem como de suas repercussões sobre diversos componentes nas cascatas bioquímicas ativadas em neurônios serotoninérgicos.

La curcumina, el compuesto obtenido de la raíz de *Curcuma longa*, ha sido el foco de un creciente número de clínicas, epidemiológicas y experimentales. Entre estos últimos, los estudios se centra en sus propiedades psicofarmacológicas y en particular sus efectos antidepresivos han recibido una atención especial. **Objetivo:** En este trabajo, se convirtió en una revisión crítica y exhaustiva de la literatura disponible sobre los efectos de la curcumina sobre el sistema serotoninérgico, lo correlaciona con los efectos antidepresivos que producen en modelos animales de depresión. **Métodos:** La búsqueda principal se hizo de los estudios revisados por la base de datos PubMed usando las siguientes palabras clave: curcumina, *Curcuma longa*, prueba de natación forzada, la depresión, la serotonina, los receptores de serotonina y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Referencias adicionales, de acuerdo a su pertinencia, fueron traídos a la atención de los autores de los artículos encontrados por el método descrito anteriormente. Sólo los ensayos se incluyeron en la revisión. **Conclusiones:** La hipótesis se vio reforzada después de la revisión que uno de los mecanismos que justifican el efecto antidepresivo de la curcumina es la probable acción sobre el sistema serotoninérgico, con pruebas, incluyendo la interferencia de este compuesto sobre los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> pre y post - sináptica 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>7</sub>, así como sus efectos sobre diversos componentes en las cascadas bioquímicas activados en las neuronas serotoninérgicas.

**Palavras Chave:** *Curcuma longa*, curcumina, serotonina, depressão, modelos animais.

**Palabras Claves:** *Curcuma longa*, cúrcuma, la serotonina, la depresión, los modelos animales.

Publicado por la Sociedad de Farmacología de Chile

Correspondência para/Correspondencia a: Dr. Rivelilson Mendes de Freitas, Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí - UFPI. Telefone: 86-81182379. E-mail [rivelilson@pq.cnpq.br](mailto:rivelilson@pq.cnpq.br)

## INTRODUÇÃO

A 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, conhecida como curcumina, é um polifenol amarelado presente nas raízes de *Curcuma longa*, amplamente usado na culinária e na medicina tradicional das culturas chinesa e indiana. Além de sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, hipoglicemiante e anti-trombogênica, sua lipossolubilidade confere capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e exercer efeitos neuroprotetores, cognitivos, bem como sobre os transtornos de ansiedade e distúrbios do humor (1-25).

Seu potencial antidepressivo, particularmente, pode se dever à inibição da monoaminoxidase (MAO), bem como à atividade sobre os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (16,19,20,23,24,26). Dentre estes, os efeitos da curcumina sobre o sistema serotoninérgico são foco desta revisão.

## EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA CURCUMINA EM MODELOS DE ANIMAIS DE DEPRESSÃO

As evidências mais elementares das propriedades antidepressivas da curcumina derivam da observação de que roedores tratados com curcumina e posteriormente submetidos aos testes do nado forçado (TNF) ou de suspensão pela cauda (TSC) apresentam menor tempo de imobilidade (TI) quando comparados a controles.

Xu e colaboradores (2005), por exemplo, observaram que a administração via oral (v.o.) de curcumina durante 14 dias, nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg/dia, reduziu significativamente o TI de ratos submetidos ao TNF, com efeito comparável ao da imipramina a 10 mg/kg por via intraperitoneal (24). Similarmente, Yu e colaboradores (2002) constataram que após 14 dias de tratamento com *C. longa* nas doses de 140, 280 ou 560 mg/kg/dia por via oral, camundongos apresentaram redução significativa e dose-dependente do TI no TSC e TNF, com efeito superior ao tratamento com fluoxetina a 20 mg/kg por via oral (22).

Além do efeito anti-imobilidade com tratamentos prolongados, outros estudos sinalizam que o pré-tratamento agudo com curcumina ou *C. longa* produz efeitos similares. No estudo de Xu e colaboradores (2005), por exemplo, camundongos tratados com as doses de 2,5, 5 ou 10 mg/kg de curcumina (v.o.), antes de serem submetidos ao TNF, apresentaram redução significativa do tempo de imobilidade quando comparados aos tratados apenas com veículo. O mesmo foi observado em animais submetidos à TSC e previamente tratados com curcumina com as doses de 5 e 10mg/kg (v.o.). Em ambos os testes, as

respostas foram comparáveis ao de grupo pré-tratado com imipramina 10 mg/kg i.p. (24). Similarmente, Wang e colaboradores (2008) revelaram que camundongos que receberam curcumina por via oral nas doses de 5 e 10 mg/kg, 45 minutos antes do TNF, tiveram significativa redução do tempo de imobilidade quando comparados aos animais tratados apenas com veículo (21).

Nesses estudos, a demonstração da não interferência da curcumina sobre o padrão típico de deambulação, *rearings* e *groomings* apresentados pelos roedores em testes de campo aberto (TCA) sugere que o efeito anti-imobilidade da curcumina não deve ser interpretado apenas como um efeito sobre o sistema locomotor dos animais (19, 22, 23, 25).

Geralmente, esses estudos também sugerem uma curva dose dependente para a relação entre as doses de curcumina administradas e o efeito anti-imobilidade observado no TSC e no TNF (21, 23, 24). Todavia, pelo menos um estudo levanta a possibilidade de uma janela terapêutica para o efeito antidepressivo dessa substância. Xia e colaboradores (2007) trataram camundongos com *C. longa* nas doses de 25, 50 ou 100 mg/kg/dia durante 21 dias e, 1 hora após a última dose, submetem-nos ao TNF. Embora as três doses de *C. longa* tenham reduzido significativamente o TI, este efeito foi máximo com 50 mg/kg. Embora com estatística não significativa, a relação dose-resposta observada para o efeito anti-imobilidade da *C. longa* assume, nesse estudo, a forma de um gráfico em U invertido. O efeito anti-imobilidade obtido com *C. longa* a dose de 50 mg/kg foi superior ao de fluoxetina ou amitriptilina, ambas na dose de 10 mg/kg (25).

Ação antidepressiva da curcumina também foi demonstrada em ratos submetidos à bulbectomia olfatória (32-34). Ao administrarem curcumina durante 14 dias a ratos bulbectomizados nas doses de 5 e 10 mg/kg, Xu e colaboradores (2005) constataram uma atenuação da hiperatividade esperada para esses animais. Enquanto ratos bulbectomizados e tratados com veículo exibiram os previsíveis incrementos nos escores de deambulação, *rearings* e *peepings*, os bulbectomizados e tratados com curcumina tiveram estes efeitos reduzidos de maneira dose-dependente. Os resultados foram comparáveis aos observados em animais bulbectomizados e tratados com imipramina (controle positivo). Além disso, curcumina também minimizou significativamente o comprometimento da aprendizagem nos bulbectomizados submetidos ao TEP em comparação aos bulbectomizados tratados com veículo (24).

Em outro estudo, a capacidade da curcumina de reverter os prejuízos à aprendizagem produzidos, em um segundo modelo de depressão cronicamente induzida, foi

investigada. Os ratos foram expostos a variados estímulos estressores e paralelamente tratados com placebo, curcumina (2.5, 5 ou 10 mg/kg/dia, v.o.) ou imipramina 10 mg/kg. Ao serem submetidos a teste de fuga-evitação, no qual um estímulo neutro antecipava um choque elétrico, o número de repetições necessárias até que se condicionasse a migração dos animais entre os dois compartimentos da caixa em que se encontravam foram significativamente menor para os animais tratados com curcumina e imipramina (16).

Finalmente, foi verificado um declínio do apetite por sacarose, induzido por estímulo estressor diário ao longo de quatro semanas, sendo este revertido pelo posterior tratamento com curcumina. Ainda que submetidos a estresse crônico na forma de *chronic unpredictable mild stress* (CUMS), grupos de ratos posteriormente tratados com curcumina tiveram recuperação do apetite por sacarose, em contraste aos submetidos ao CUMS, sem tratamento com curcumina. Este, no entanto, não alterou a ingestão de sacarose nos controles não estressados, sugerindo que o efeito da curcumina não é em si mesmo apetitivo, mas atenuador do equivalente depressivo que representa a inibição dos mecanismos de recompensa (27).

Tomados em conjunto, esses estudos nos fornecem robusta evidência de que a curcumina apresenta significativo efeito antidepressivo sobre diferentes modelos de animais de depressão, com resposta comparável a antidepressivos comumente usados na psiquiatria clínica.

#### **EFEITOS DA CURCUMINA SOBRE O SISTEMA SEROTONINÉRGICO**

Embora as evidências mais preliminares de que a curcumina exerça seus efeitos antidepressivos pela via serotoninérgica se encontrem no fato de que, assim como os antidepressivos serotoninérgicos, esta substância promove redução no TI de animais submetidos a testes de estresse agudo (35-37), evidências mais diretas da participação deste mecanismo de ação também estão disponíveis na literatura.

No estudo de Kulkarni e colaboradores (2008), camundongos tratados com 20 a 80 mg/kg de curcumina, 60 minutos antes de submetidos ao TNF, não apenas apresentaram TI significativamente menor que os tratados apenas com veículo, mas também concentrações cerebrais de serotonina significativamente superiores às do grupo controle. Relação crescente foi evidenciada não apenas entre as doses de curcumina e o efeito anti-imobilidade, mas também entre as doses do fármaco e as concentrações de serotonina nos cérebros dos animais

(23). Corroborando a existência de paralelismo entre o efeito anti-imobilidade da curcumina e as concentrações cerebrais de serotonina, o estudo de Xia e colaboradores (2007), no qual o efeito anti-imobilidade do extrato de *C.longa* foi maior na dose de 50 mg/kg, também evidenciou que a mais eficaz restauração dos níveis cerebrais de serotonina foram encontradas nos animais estressados e tratados com esta dose da solução, em contraste àqueles estressados e tratados com o extrato a 25 ou 100 mg/kg (25).

Uma segunda linha de evidência amparando a hipótese serotoninérgica pode ser visualizada no preferencial efeito potencializador da curcumina sobre antidepressivos serotoninérgicos, em comparação aos mais noradrenérgicos. Quando venlafaxina ou fluoxetina foram combinadas com curcumina, observou-se uma significativa potencialização do efeito anti-imobilidade no TNF, em comparação ao efeito da curcumina ou de cada um dos antidepressivos *per se*. Todavia, esta potencialização não ocorreu quando da associação de curcumina com a desipramina ou imipramina. Ainda, a despeito de fluoxetina e venlafaxina não terem produzido, *per se*, mudanças significativas nos níveis monoaminérgicos cerebrais nos animais submetidos ao teste do nado forçado, a associação de cada fármaco com curcumina aumentou significativamente os níveis cerebrais de serotonina, tanto em comparação aos veículos, quanto em comparação àqueles tratados apenas com curcumina ou com cada antidepressivo isoladamente. No mesmo estudo, enquanto o tratamento isolado com curcumina aumentou os níveis cerebrais de serotonina de maneira significativa e dose-dependente, não se observou efeito significativo sobre níveis noradrenérgicos com qualquer dosagem de curcumina (23).

A hipótese de mediação serotoninérgica para os efeitos da curcumina em modelos crônicos de depressão também encontra amparo na literatura. Baixas concentrações de serotonina no hipocampo e córtex frontal de ratos bulbectomizados foram restauradas em níveis semelhantes ou superiores aos de controles não bulbectomizados após a administração de curcumina durante 14 dias. Além disso, embora a BO tenha reduzido os níveis globais de norepinefrina nos cérebros dos animais examinados, o tratamento com curcumina não mostrou efeito compensatório expressivo sobre as concentrações deste neurotransmissor. A despeito da tendência à elevação dos níveis noradrenérgicos com doses crescentes de curcumina, esse efeito foi relativamente pequeno quando comparado ao grande déficit noradrenérgico resultante da BO. Somente a curcumina na dose de 10 mg/kg elevou significativamente esses níveis no córtex frontal nos bulbectomizados, quando comparados aos bulbectomizados tratados com veículo. Entretanto, o mesmo não ocorreu com os níveis noradrenérgicos

hipocampais, mesmo com as maiores doses de curcumina (24). Tais observações sugerem não se poder descartar que a curcumina também atue sobre o sistema noradrenérgico para produzir seus efeitos em ratos bulbectomizados. Todavia, o limitado aumento das concentrações de noradrenalina, a restrição desse efeito a dosagens mais elevadas de curcumina e o fato de ser menos difundido entre as estruturas cerebrais participantes da neurobiologia da depressão também sugerem que o sistema noradrenérgico esteja menos profundamente envolvido do que o serotoninérgico nas propriedades antidepressivas da curcumina.

Uma última linha de evidência sobre a mediação serotoninérgica dos efeitos antidepressivos da curcumina deriva da observação de que, enquanto a administração isolada de p-clorofenilalanina (PCPA) 100 mg/kg, antagonista da triptofano-hidroxilase, por 4 dias, não afetou o TI de camundongos submetidos ao TNF, sua administração prévia à de curcumina 10mg/kg v.o. ou fluoxetina 30mg/kg i.p. inibiu o efeito anti-imobilidade de ambas, sugerindo-se que a ação antidepressiva da curcumina depende da atividade da triptofano-hidroxilase e de adequadas concentrações prévias de serotonina, similarmente ao que acontece com a fluoxetina (21). Reforço adicional a essa hipótese provém da observação de que, enquanto a PCPA previne completamente o efeito anti-imobilidade de antidepressivos tipicamente serotoninérgicos, aquela substância bloqueia apenas parcialmente o efeito anti-depressivo de drogas com atividade noradrenérgica, como a imipramina e a desipramina (21,38).

## EFEITOS DA CURCUMINA SOBRE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS

### 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos

Localizados nos núcleos da rafe, esses receptores controlam a liberação de serotonina. Estão fortemente envolvidos na fisiopatologia da depressão, mostrando-se supra-regulados e hipersensibilizados nessa condição (39). Há evidências de reversão dessa alteração em animais estressados experimentalmente e tratados com curcumina com a dose de 30 mg/kg por via oral (27). Hipoteticamente, essa infra-regulação seria consequência das concentrações inter-sinápticas aumentadas de serotonina, promovidas pela curcumina, e à ligação da própria serotonina a esse receptor.

### 5-HT<sub>1A</sub> pós sinápticos

Localizados principalmente no córtex frontal e hipocampo, também estão envolvidos na neurobiologia da depressão (39). A ação agonista da curcumina sobre estes receptores é sugerida pela demonstração de que doses isoladamente subefetivas desse fármaco e de 8-OH-DPAT (um agonista

seletivo 5-HT<sub>1A</sub> pós-sináptico), quando administradas em associação, reduzem sinérgica e significativamente o TI de camundongos submetidos ao TNF (40, 21). Paralelamente, em comparação ao tratamento com curcumina isoladamente, a administração de p-MPPI (um antagonista seletivo 5-HT<sub>1A</sub>) previamente à curcumina 10mg/kg reduziu significativamente o TI de camundongos submetidos ao TNF (21).

### 5-HT<sub>1B</sub>

Esses receptores, freqüentemente presentes em vias dopaminérgicas, como córtex frontal e gânglios basais (39), também são citados como envolvidos em comportamentos agressivos e ansiosos em roedores (41,42), e a ação da curcumina sobre eles também tem sido testada.

Um estudo recente demonstrou que o tratamento prévio com isamoltane, um antagonista 5HT<sub>1B</sub>, bloqueou significativamente o efeito anti-mobilidade da curcumina 10 mg/kg v.o. sobre o teste do nado forçado, ao se comparar grupos em que se administrou curcumina 10 mg/kg v.o. e controles. Além disso, dose subefetiva de anpirtoline (0.25 mg/kg i.p.), agonista 5-HT<sub>1B</sub>, produziu significativo efeito sinérgico anti-imobilidade ao ser combinado com dose subefetiva de curcumina 2,5 mg/kg v.o. (21). Isso sugere que o efeito anti-depressivo da curcumina pode ser também em parte justificado pela ação agonista sobre esse receptor.

Note-se que essa ação ocorre provavelmente sobre os receptores 5-HT<sub>1B</sub> pós-sinápticos, pois se tem informado que o agonismo pré-sináptico diminui o fluxo serotoninérgico, levando a sintomas depressivos, especulando-se que eles estejam hipersensibilizados na depressão (43-46). Por seu turno, quando estimulados pela serotonina, os receptores 5-HT<sub>1B</sub> pós-sinápticos facilitam a liberação de dopamina, exercendo efeito antidepressivo, agindo na via mesolímbica e córtex pré-frontal (47-51).

### 5-HT<sub>2</sub>

Tem-se investigado a ação da curcumina sobre receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>. Ativados, estes inibem a liberação de serotonina, dopamina e noradrenalina, estando up-regulados na depressão, principalmente no córtex frontal de vítimas de suicídio (52-54). Observou-se que a administração prévia de ritanserina a 4 mg/kg i.p., um antagonista 5-HT<sub>2A/2C</sub>, potencializou significativamente o efeito anti-imobilidade de curcumina 2,5 mg/kg v.o.. Entretanto, pré-tratamento com ketanserina 5 mg/kg i.p., um antagonista mais seletivo para o 5-HT<sub>2A</sub> do que para o 5-HT<sub>2C</sub>, não potencializou o efeito anti-imobilidade da curcumina, sugerindo-se que a atividade serotoninérgica da curcumina envolva mais significativamente o antagonismo 5-HT<sub>2C</sub> que o 5-HT<sub>2A</sub>. Adicionalmente, o agonismo seletivo 5-HT<sub>2A</sub> pelo R(-)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropane (DOI) não alterou a ação anti-imobilidade da curcumina, reforçando a

hipótese de que os 5-HT<sub>2A</sub> não estejam envolvidos de modo relevante em sua atividade antidepressiva (21).

### 5-HT<sub>7</sub>

Além da infra-regulação desses receptores em neurônios glutamatérgicos ativadores dos núcleos da rafe após tratamento antidepressivo (55), evidenciou-se que os antagonistas com alta afinidade por tais receptores reduzem o TI em camundongos submetidos ao TNF ou TSC (56). Adicionalmente, a associação de doses subefetivas desses antagonistas com antidepressivos serotoninérgicos aumenta os níveis extracelulares de serotonina no SNC, também produzindo efeito anti-imobilidade (57).

A ação da curcumina sobre os 5-HT<sub>7</sub> seria justificada pela inibição da expressão do mRNA desse receptor. Enquanto em ratos submetidos ao CUMS observa-se aumento significativo da expressão do mRNA dos receptores 5-HT<sub>7</sub> no hipocampo e hipotálamo, os submetidos ao CUMS tratados com curcumina 30 mg/kg tiveram significativa redução da expressão do mRNA deste receptor em ambas as estruturas cerebrais mencionadas (27).

### INFLUÊNCIA DA CURCUMINA SOBRE CASCATAS BIOQUÍMICAS INTRACELULARES EM NEURÔNIOS SEROTONINÉRGICOS

O aumento das concentrações serotoninérgicas extracelulares devido ao tratamento com antidepressivos serotoninérgicos e, provavelmente, também com curcumina, pode aumentar níveis previamente baixos de BDNF em modelos animais de depressão, ao ativarem subtipos de receptores metabotrópicos acoplados à adenilato-ciclase (26,58). Quando ativados, estes iniciam uma cascata que excita a proteína G estimuladora (Gs). Esta age sobre a AC, que, por sua vez induz a conversão do ATP em AMPc. O aumento do AMPc no citosol ativa a proteína kinase A (PKA), que estimula a fosforilação da *cAMP response element binding protein* (CREB) em pCREB (CREB fosforilada), que, por sua vez, aciona o gene alvo do BDNF no hipocampo e outras regiões límbicas, promovendo efeito antidepressivo e neuroprotetor (16,59-61).

Uma das evidências de que a curcumina age por meio da estimulação da expressão do BDNF deve-se ao aumento da relação pCREB/CREB. Xu e colaboradores (2006) demonstraram ocorrer um aumento significativo na relação pCREB/CREB em ratos estressados tratados com curcumina. Isso pode ocorrer devido ao incremento na concentração pCREB, não se modificando significativamente a expressão da CREB no hipocampo e córtex frontal, após estresse crônico ou após a administração de imipramina ou curcumina. Em contraste ao observado em ratos estressados e tratados com veículo,

constatou-se um aumento significativo na pCREB/CREB, tanto no hipocampo quanto no córtex frontal dos ratos estressados e tratados com curcumina (16).

Demonstrou-se, todavia, aumento da expressão da CREB no hipocampo, hipotálamo e córtex de ratos estressados tratados com curcumina. Embora isso colaborasse com um menor aumento na razão pCREB/CREB, esse resultado não pode ser interpretado como marcador da menor expressão de BDNF sem que a ele esteja associada a uma redução nos valores absolutos de pCREB. Além disso, verificou-se que a redução da atividade da AC no hipocampo e córtex, previamente induzida por estresse, era revertida pelo tratamento com curcumina. Comparado aos animais submetidos ao CUMS tratados com veículo, observou-se dramático aumento na atividade da AC no hipocampo e córtex dos estressados tratados com curcumina nas doses de 15 e 30 mg/kg. Observação similar foi verificada com AMPc: enquanto o CUMS reduziu significativamente no hipocampo e córtex, o tratamento com curcumina atenuou essa redução. Em comparação a ratos estressados e tratados com veículo, significativa atenuação sobre a redução dos níveis corticais de AMPc já foi observada com a dose de 15 mg/Kg de curcumina, porém só se tornando significativo no hipocampo a partir da dose de 30 mg/Kg (27).

Adicionalmente, demonstrou-se interferência da curcumina sobre a expressão do mRNA relacionado ao subtipo 2 de AC (AC<sub>2</sub>). Enquanto uma significativa redução na expressão do mRNA da AC<sub>2</sub> foi observada no hipocampo dos ratos submetidos ao CUMS, o pós-tratamento com curcumina aumentou significativamente sua expressão. Observou-se, também, que o CUMS aumenta significativamente a expressão do mRNA dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>7</sub> no hipocampo, 5-HT<sub>1A</sub> no córtex e 5-HT<sub>1A/1B/7</sub> no hipotálamo. Curcumina na dose de 30 mg/kg, contrariamente, atenuou significativamente o aumento da expressão do mRNA dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>7</sub> no hipocampo e hipotálamo, em contraste ao que ocorre em ratos submetidos ao CUMS e tratados com veículo. Além disso, o tratamento com curcumina na dose de 15 mg/kg reduziu significativamente a expressão do mRNA do receptor 5-HT<sub>1B</sub> (27). Devido ao fato de a estimulação de 5-HT<sub>1A/1B</sub> inibir a atividade da AC via proteína G inibitória (Gi), ao agir reduzindo a expressão do mRNA relacionado aos receptores 5-HT<sub>1A/1B</sub>, a curcumina inibiria a ativação desta proteína Gi, conseqüentemente liberando a cascata de ativação da AC e cAMP, implicando aumento nos níveis de BDNF e exercendo efeitos antidepressivos e neuroprotetores.

Embora as já comentadas alterações moleculares resultantes da atividade serotoninérgica aumentarem a expressão do BDNF, a serotonina pode também levar ao efeito final contrário, caso o balanço de sua atividade

predomine em cascatas que ativam o fosfatidil-inositol. Enquanto que receptores 5-HT<sub>2A</sub>/5-HT<sub>2B</sub>/5-HT<sub>2C</sub> acoplam-se a proteínas Gq, que estimulam a via inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), os 5-HT<sub>1</sub>/5-HT<sub>4</sub>/5-HT<sub>6</sub>/5-HT<sub>7</sub> sinalizam estimulando ou inibindo a AC devido seu acoplamento a proteínas Gs ou Gi. Estudos reportam que o agonismo serotoninérgico sobre receptores 5-HT<sub>2C</sub>, os quais a curcumina infra-regula, parece estar envolvido na ativação da PLC, que estimula o IP3 e DAG. Estes agiriam como segundos mensageiros, ativando a proteína quinase C (PKC), que por sua vez inibe a cascata da AC e, por fim, a produção do BDNF (61-79). Isto justifica, pelo menos em parte, o fato de a curcumina apresentar como um dos mecanismos antidepressivos o antagonismo 5-HT<sub>2C</sub>, promovendo neuroproteção (21).

Alterações na via enzimática da AC também ocorrem devido à curcumina antagonizar os receptores 5-HT<sub>7</sub>, conhecidos por aumentarem a atividade da AC quando estimulados, e reduzirem-na quando antagonizados. Entretanto, confirmou-se que a curcumina diminui a expressão deste receptor, mas, paradoxalmente, resulta num aumento final na atividade da AC e nos níveis de AMPc, aumentando o BDNF em ratos cronicamente estressados. Isso é provavelmente explicado pelo fato de os 5-HT<sub>7</sub> não serem o único tipo receptor que controla a atividade desses fatores, e nem o único que medeia os efeitos da curcumina. Como citado, a curcumina também teria efeito final de diminuir a atividade serotoninérgica 5-HT<sub>2C</sub>, liberando a cascata da AC, que, hipoteticamente, acentua-se sobre as alterações moleculares resultantes do antagonismo dos receptores 5-HT<sub>7</sub> (27). Porém, mesmo com esta explicação, uma maior quantidade de estudos seria necessária para explicar essa discrepância.

Além disso, o balanço positivo quanto à produção de BDNF provocado pelo tratamento com curcumina em modelos animais de depressão não se restringe somente à ação sobre o sistema serotoninérgico. Esse composto também tem a propriedade de equilibrar o funcionamento do eixo HPA. Sabe-se que em ratos cronicamente estressados, o *feedback* inibitório desse eixo está comprometido, o que leva a uma maior produção de corticosteróides, resultando numa inibição da expressão de BDNF. Todavia, por regular esse eixo, a curcumina também diminui a exacerbada produção de corticosteróides, prevenindo, portanto, os decréscimos nos níveis de BDNF nos ratos estressados (16,26).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

São amplos os efeitos da curcumina em modelos de estresse em animais, mesmo se considerando somente sua interferência sobre o sistema serotoninérgico. Em adição aos subtipos de receptores, vias bioquímicas e produtos

finais relacionados à sua ação sobre o sistema serotoninérgico, estudos também demonstram a ação desse composto sobre o sistema dopaminérgico, não descrita neste estudo. Até o momento, ainda não foi completamente esclarecido se a curcumina exerce seus efeitos de modo indireto, devido inibição da MAO, ou se há alguma ação direta dessa substância sobre os receptores e/ou moléculas transportadoras do sistema serotoninérgico.

## REFERÊNCIAS/BIBLIOGRAFIA:

1. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003;23:363-398.
2. Sreejayan R, Rao MN. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J Pharm Pharmacol*. 1994 Dec;46(12):1013-6.
3. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Med*. 1991 Feb;57(1):1-7.
4. Brouet I, Ohshima H. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Jan 17;206(2):533-40.
5. Dikshit M, Rastogi L, Shukla R, Srimal RC. Prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin & quinidine in the cat heart. *Indian J Med Res*. 1995 Jan;101:31-5.
6. Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong O, Apisariyakul A, Dunn FW. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett*. 1997 Jun 24;116(2):197-203.
7. Kiso Y, Suzuki Y, Watanabe N, Ohshima Y, Hikino H. Antihepatotoxic principles of Curcuma longa rhizomes. *Planta Med*. 1983 Nov;49(3):185-7.
8. Rao CV, Rivenson A, Simi B, Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res*. 1995 Jan 15;55(2):259-66.
9. Srinivasan M. Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject. *Indian J Med Sci*. 1972 Apr;26(4):269-70.
10. Babu PS, Srinivasan K. Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally induced diabetes in albino rat. *Mol Cell Biochem*. 1995 Nov 8;152(1):13-21.
11. Arun N, Nalini N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum Nutr*. 2002 Winter;57(1):41-52.
12. Srivastava R, Dikshit M, Srimal RC, Dhawan BN. Antithrombotic effect of curcumin. *Thromb Res*. 1985 Nov 1;40(3):413-7.
13. Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada MJ. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta fibrils in vitro. *Neurosci Res*. 2004;75:742-50.
14. Mishra S, Palanivelu K. The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease: an overview. *Ann Indian Acad Neurol*. 2008 Jan;11(1):13-9.
15. Kim DS, Park SY, Kim JY. Curcuminoids from Curcuma longa L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from Aβ (1-42) insult. *Neurosci Lett* 2001; 303: 57-61.

16. Xu Y, Ku B, Tie L, Yao H, Jiang W, Ma X, Li X. Curcumin reverses the effects of chronic stress on behavior, the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB. *Brain Res* 2006; 1122: 56-64.
17. Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kayed R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM. Curcumin inhibits formation of amyloid oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem*. 2005 Feb 18;280(7):5892-901.
18. Ahmed T, Gilani AH. Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009 Feb;91(4):554-9.
19. Xu Y, Ku BS, Yao HY, Lin YH, Ma X, Zhang YH, Li XJ. The effects of curcumin on depressive-like behaviors in mice. *Eur J Pharmacol*. 2005 Jul 25;518(1):40-6.
20. Bhutani MK, Bishnoi M, Kulkarni SK. Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009 Mar;92(1):39-43.
21. Wang R, Xu Y, Wu HL, Li YB, Li YH, Guo JB, Li XJ. The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT1 and 5-HT2 receptors. *Eur J Pharmacol*. 2008 Jan 6;578(1):43-50.
22. Yu ZF, Kong LD, Chen Y. Antidepressant activity of aqueous extracts of *Curcuma longa* in mice. *J Ethnopharmacol*. 2002 Nov;83(1-2):161-5.
23. Kulkarni SK, Bhutani MK, Bishnoi M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Dec;201(3):435-42.
24. Xu Y, Ku BS, Yao HY, Lin YH, Ma X, Zhang YH, Li XJ. Antidepressant effects of curcumin in the forced swim test and olfactory bulbectomy models of depression in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005 Sep;82(1):200-6.
25. Xia X, Cheng G, Pan Y, Xia ZH, Kong LD. Behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects of the ethanolic extract from *Curcuma longa* L. in the mouse forced swimming test. *J Ethnopharmacol*. 2007 Mar 21;110(2):356-63.
26. Xu Y, Ku B, Cui L, Li X, Barish PA, Foster TC, Ogle WO. Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. *Brain Res*. 2007 Aug 8;1162:9-18.
27. Li YC, Wang FM, Pan Y, Qiang LQ, Cheng G, Zhang WY, Kong LD. Antidepressant-like effects of curcumin on serotonergic receptor-coupled AC-cAMP pathway in chronic unpredictable mild stress of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Apr 30;33(3):435-49.
28. Tiffany PB, Mollenauer S, Plotnik R, White M. Olfactory bulbectomy: emotional behavior and defense responses in the rat. *Physiol Behav*. 1979 Feb;22(2):311-7.
29. Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Pol J Pharmacol Pharm*. 1984 Sep-Oct;36(5):561-9.
30. Jesberger JA, Richardson JS. Brain output dysregulation induced by olfactory bulbectomy: an approximation in the rat of major depressive disorder in humans? *Int J Neurosci*. 1988 Feb;38(3-4):241-65.
31. Grecksch G, Zhou D, Franke C, Schröder U, Sabel B, Becker A, Huether G. Influence of olfactory bulbectomy and subsequent imipramine treatment on 5-hydroxytryptaminergic presynapses in the rat frontal cortex: behavioural correlates. *Br J Pharmacol*. 1997 Dec;122(8):1725-31.
32. Cairncross KD, Cox B, Forster C, Wren AF. Olfactory projection systems, drugs and behaviour: a review. *Psychoneuroendocrinology*. 1979 Jul;4(3):253-72.
33. Leonard BE, Tuite M. Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat. *Int Rev Neurobiol*. 1981;22:251-86.
34. van Riezen H, Leonard BE. Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol Ther*. 1990;47(1):21-34.
35. Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4-5):547-69.
36. Ripoll N, David DJ, Dailly E, Hascoët M, Bourin M. Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test. *Behav Brain Res*. 2003 Aug 14;143(2):193-200.
37. Bourin M, Chenu F, Ripoll N, David DJ. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. *Behav Brain Res*. 2005 Nov 7;164(2):266-9.
38. Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, Lucki I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999 Nov;147(2):162-7.
39. Filip M, Bader M. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep*. 2009 Sep-Oct;61(5):761-77.
40. Luscombe GP, Martin KF, Hutchins LJ, Gosden J, Heal DJ. Mediation of the antidepressant-like effect of 8-OH-DPAT in mice by postsynaptic 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol*. 1993 Mar;108(3):669-77.
41. Saudou F, Amara DA, Dierich A, LeMour M, Ramboz S, Segu L, Buhot MC, Hen R. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. *Science*. 1994 Sep 23;265(5180):1875-8.
42. Olivier B, Mos J. Serenics, serotonin and aggression. *Prog Clin Biol Res*. 1990;361:203-30.
43. Knobelmann DA, Hen R, Lucki I. Genetic regulation of extracellular serotonin by 5-hydroxytryptamine1A and 5-hydroxytryptamine1B autoreceptors in different brain regions of the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Sep;298(3):1083-91.
44. Maswood S, Truitt W, Hotema M, Caldarola-Pastuszka M, Uphouse L. Estrous cycle modulation of extracellular serotonin in mediobasal hypothalamus: role of the serotonin transporter and terminal autoreceptors. *Brain Res* 1999 Jun 12;831(1-2):146-54.
45. Malagie I, David DJ, Jolliet P, Hen R, Bourin M, Gardier AM. Improved efficacy of fluoxetine in increasing hippocampal 5-hydroxytryptamine outflow in 5-HT1B receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol*. 2002 May 17;443(1-3):99-104.
46. Malagie I, Trillat AC, Bourin M, Jacquot C, Hen R, Gardier AM. 5-HT1B autoreceptors limit the effects of selective serotonin re-uptake inhibitors in mouse hippocampus and frontal cortex. *J Neurochem*. 2001 Feb;76(3):865-71.
47. Ase AR, Reader TA, Hen R, Descarries L. Regionally selective changes in neurotransmitter receptors in the brain of the 5-HT1B knockout mouse. *J Chem Neuroanat*. 2008 Jul;35(4):356-63.
48. Benloucif S, Keegan MJ, Galloway MP. Serotonin facilitated dopamine release in vivo: pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, 265,373-377.
49. Fink KB, Göthert M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Rev*, 2007, 59, 360-417.

50. Hallbus M, Magnusson T, Magnusson O: Influence of 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptors on dopamine release in the guinea pig nucleus accumbens: a microdialysis study. *Neurosci Lett*. 1997; 225, 57-60.
51. Nestler EJ, Carlezon WA Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 2006;59:1151-9.
52. Celada P, Puig M, Amargós-Bosch M, Adell A, Artigas F. The therapeutic role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci*. 2004 Jul;29(4):252-65.
53. Landén M, Thase ME. A Model to Explain the Therapeutic Effects of Serotonin Reuptake Inhibitors: The Role of 5-HT<sub>2</sub> Receptors. *Psychopharmacol Bull*. 2006;39(1):147-66.
54. Mann JJ. Role of the Serotonergic System in the Pathogenesis of Major Depression and Suicidal Behavior. *Neuropsychopharmacology*. 1999 Aug;21(2 Suppl):99S-105S.
55. Mullins UL, Gianutsos G, Eison AS. Effects of Antidepressants on 5-HT<sub>7</sub> receptor regulation in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacology*. 1999 Sep;21(3):352-67.
56. Guscott M, Bristow LJ, Hadingham K, Rosahl TW, Beer MS, Stanton JA, Bromidge F, Owens AP, Huscroft I, and Myers J. Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT<sub>7</sub> receptor suggest therapeutic potential in depression. *Neuropharmacology* 2005 Mar;48(4):492-502.
57. Bonaventure P, Kelly L, Aluisio L, Shelton J, Lord B, Galici R, Miller K, Atack J, Lovenberg TW, Dugovic C. Selective blockade of 5-hydroxytryptamine 5-HT<sub>7</sub> receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321:690-8.
58. Szapacs ME, Mathews TA, Tessarollo L, Ernest LW, Mamounas LA, Andrews AM. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. *J Neurosci Methods*. 2004 Dec 30;140(1-2):81-92.
59. Duman RS. A role for CREB and BDNF in the actions of antidepressants. *Biol. Psychiatry* 1996 39, 558-559.
60. Thome J, Sakai N, Shin KH, Steffen C, Zahang YJ, Impey S, Storm D, Duman RS. cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. *J Neurosci*. 2000 Jun 1;20(11):4030-6.
61. Dwivedi Y, Pandey GN. Adenylate cyclase-cyclicAMP signaling in mood disorders: Role of the crucial phosphorylating enzyme protein kinase. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008 Feb;4(1):161-76.
62. Conn PJ, Sanders-Bush E. Central serotonin receptors: effector systems, physiological role and regulation. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;92(3):267-77.
63. Loric S, Launay JM, Colus JF, Maroteaux L. New mouse 5-HT<sub>2</sub>-like receptor expression in brain, heart and intestine. *FEBS Lett*. 1992 Nov 9;312(2-3):203-7.
64. Deakin JF. 5HT<sub>2</sub> receptors, depression and anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 1988 Apr;29(4):819-20.
65. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*. 1994 Jun;46(2):157-203.
66. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002 Apr;71(4):533-54.
67. Peroutka SJ. 5-hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular, biochemical and physiological characterization. *Trends Neurosci*. 1988 Nov;11(11):496-500.
68. Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E, Emeson RB. Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature*. 1997 May 15;387(6630):303-8.
69. Ike J, Canton H, Sanders-Bush E. Developmental switch in the hippocampal serotonin receptor linked to phosphoinositide hydrolysis. *Brain Res*. 1995 Apr 24;678(1-2):49-54.
70. Berridge MJ (1987) Inositol trisphosphate and diacylglycerol, two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:159-93.
71. Pandey SC, Davis JM, Pandey GN. Phosphoinositide System-Linked Serotonin Receptor Subtypes and Their Pharmacological Properties and Clinical Correlates. *J Psychiatry Neurosci*. 1995 May;20(3):215-25.
72. Berridge MJ, Irvine RF: Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984;312:315-321.
73. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984;308:693-698.
74. Jakobs KH, Bauer S, Watanabe Y. Modulation of adenylate cyclase of human platelets by phorbol ester. Impairment of the hormone-sensitive inhibitory pathway. *Eur J Biochem*. 1985 Sep 2;151(2):425-30.
75. Kassis S, Zaremba T, Patel J, Fishman PH. Phorbol esters and betaadrenergic agonists mediate desensitization of adenylate cyclase in rat glioma C6 cells by distinct mechanisms. *J Biol Chem*. 1985 Jul 25;260(15):8911-7.
76. Katada T, Gilman AG, Watanabe Y, Bauer S, Jacobs KH. Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. *Eur J Biochem*. 1985 Sep 2;151(2):431-7.
77. Mukhopadhyay AK, Schumacher M. Inhibition of hCG-stimulated adenylate cyclase in purified mouse Leydig cells by the phorbol ester PMA. *FEBS Lett* 1985 Jul 22 187(1): 56-60.
78. Martinowich K, Lu B. Interaction between BDNF and Serotonin: Role in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Jan;33(1):73-83.
79. Cryan JF, Lucki I. Antidepressant-like behavior effects mediated by 5-hydroxytryptamine (2C) receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2000 Dec; 295(3), 1120-1126.

ARTÍCULO ORIGINAL

**DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN UN MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN EL CORAZÓN AISLADO DE LA RATA.**

(Biomarkers determination of antioxidant response in a model of ischemia-reperfusion in the isolated heart of rat)

**Rodrigo L. Castillo<sup>1,\*</sup>, Pedro Álvarez<sup>1</sup>, Gina Sánchez<sup>1</sup>**

*Laboratorio de Fisiopatología Cardíaca, Programa de Fisiopatología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.*

RESUMEN

El infarto agudo de miocardio es una patología prevalente y de alta mortalidad en el mundo. Para evitar la necrosis del miocardio se utilizan técnicas de revascularización, las cuales pueden llevar a un daño secundario al incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO). En este trabajo se estudió el efecto de la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 sobre biomarcadores de estrés oxidativo utilizando un modelo de corazón aislado en ratas. Se usaron dos dosis de omega-3 (DHA (docosahexaenoico): EPA (eicosapentaenoico)=1.2:1) grupo 1 (D1:0,3g/kg/d) (n=8) y grupo 2 (D2:0,6 g/kg/d) (n=8). Ambos grupos fueron sometidos a periodos de isquemia (30min) e isquemia-reperusión (30min/120min). Se determinó el tamaño de infarto, lipoperoxidación (TBARS) y relación glutatión reducido/oxidado (GSH-/GSSG) en tejido cardíaco.

El tamaño de infarto fue 33.2% y 47.5% menor en G1 y G2, con respecto a corazones controles, además de 39.3% y 74.4.5% menor incremento niveles de TBARS, para ambas dosis respectivamente, al final de la reperusión ( $p < 0.01$ ).

Al final de la reperusión, la relación GSH/GSSG en D1 y D2 fue 28% y 77% mayor con respecto a los valores basales obtenidos, respectivamente ( $P < 0.05$ ).

Estos resultados permiten postular que el efecto cardioprotector de la suplementación con omega-3 se debería a un reforzamiento del sistema de defensa antioxidante y a una menor lipoperoxidación en el corazón de la rata.

**Palabras claves:** Estrés oxidativo, isquemia-reperusión, omega 3, tamaño de infarto

Publicado por la Sociedad de Farmacología de Chile

INTRODUCCIÓN

La cardiopatía isquémica secundaria a un infarto agudo de miocardio (IAM) es uno de los problemas de salud de más alta prevalencia en el mundo, y es una causa importante de morbilidad y mortalidad. En Chile, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte, siendo la enfermedad isquémica del corazón una de las más prevalentes con una tasa de un 43,1 por cada 100.000 habitantes (1). En vista de esto, uno de los principales esfuerzos de investigación en medicina cardiovascular ha sido el desarrollo de enfoques para salvar el músculo cardíaco en riesgo de necrosis en pacientes con IAM. Durante las últimas décadas, la revascularización aguda con fármacos trombolíticos o procedimientos intervencionistas se ha convertido en el tratamiento

estándar para los pacientes con IAM. Sin embargo, a pesar de que la reperusión oportuna del tejido isquémico es esencial para la recuperación miocárdica, también puede resultar en una forma indirecta de daño.

Considerable evidencia atribuye a las ERO, producidas ya sea por el propio miocardio o por la infiltración de células inflamatorias, como un evento temprano en este proceso. Una vez producidas, las ERO pueden conducir a daño celular a través de una serie de vías incluyendo el daño directo a las membranas y las proteínas o daño indirecto a través de la activación de vías pro-apoptóticas. Diversas estrategias de cardioprotección se han desarrollado debido a la investigación de los mecanismos de daño por isquemia-reperusión (IR).

**Correspondencia a:** Dr. Rodrigo Castillo Peñaloza, ICBM-Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Avda. Independencia 1027, 8389100 Independencia, Santiago, Chile. Teléfono: 56-2-9786067, Fax 56-2-7353510, Correo Electrónico: [rodrigouch@gmail.com](mailto:rodrigouch@gmail.com)

El preconditionamiento isquémico cardíaco fue descrito por primera vez en 1986 en el cual perros sometidos a episodios intermitentes de IR miocárdica (5/5 min) previa a la inducción de un infarto (40 min isquemia), mostraron un menor tamaño de necrosis con respecto a perros sólo sometidos a la isquemia global (2). Desde esos años se conoce que estos episodios breves de isquemia del miocardio inician una cascada de eventos bioquímicos en el cardiomiocito que protegen durante las siguientes lesiones isquémicas. Esta respuesta se asocia con una atenuación notable de la muerte celular ya sea por necrosis o apoptosis, lo que sugiere que la muerte celular isquémica puede ser un evento regulado (3). Similar al preconditionamiento clásico, diversos agentes farmacológicos pueden inducir cardioprotección contra los efectos de la isquemia miocárdica aguda (4).

La evidencia clínica y epidemiológica de los efectos cardioprotectores del aceite de pescado, la evidencia experimental específica del preconditionamiento miocárdico y los efectos sobre la función del corazón, sugieren que los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 pueden proporcionar cardioprotección que podría equivalente al preconditionamiento isquémico o preconditionamiento farmacológico. Los ácidos grasos omega-3 son selectivamente incorporados en las membranas de los cardiomiocitos a partir de la dieta de una manera dosis-dependiente (5). Se conoce que este efecto se puede determinar midiendo la relación de los ácidos omega-3 eicosapentaenoico (EPA)/docosahexaenoico (DHA) tanto en células periféricas (eritrocitos) y en tejido miocárdico durante un consumo crónico de al menos 20 semanas (6). Los efectos de este consumo regular pueden disminuir la frecuencia cardíaca, reducir el consumo de oxígeno del miocardio, y aumentar la reserva coronaria (7). Estas propiedades contribuyen al preconditionamiento con similares efectos de resistencia al daño isquémico del miocardio, además de mejorar la recuperación post-isquémica. Estos efectos también se pueden demostrar en corazones aislados, ya que permiten evaluar de forma independiente los efectos de los omega-3 sobre los parámetros hemodinámicos.

El objetivo es determinar el efecto cardioprotector de la administración crónica de omega -3 sobre corazones infartados de ratas y su relación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo con respecto al manejo de los animales y las medidas de anestesia y sacrificio fueron aprobados por el Comité de Ética sobre Investigación en Animales, de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Chile (Protocolo CBA# 0433 FMUCH).

### 1. Etapa de suplementación con omega-3

Ratas Wistar, de aproximadamente  $180 \pm 20$  g, recibieron diariamente una dieta estándar (8) y omega-3 en dos dosis (D1: 0.3g/Kg/día y D2: 0.6g/Kg/día), proporción de DHA/EPA 1.2/1 (cápsulas aportadas por Laboratorio Recalcine<sup>®</sup>) vía sonda oro-gástrica (una dosis diaria matinal, al momento de registrar el peso y consumo de fluido) por un periodo de 8 semanas. Durante este periodo fueron colocadas en jaulas aclimatadas a 24° con un ciclo luz/oscuridad de 12 h. Día por medio se midió el consumo de líquido y la ganancia de peso. Una vez cumplido el período de suplementación, las ratas fueron utilizadas para los estudios de registro cardíaco ex vivo.

### 2. Cirugía y montaje en el sistema de perfusión.

*2.1) Cirugía:* Posterior a la administración de pentobarbital 50 mg/kg i.p., Se procedió al procedimiento quirúrgico:

Por medio de una incisión medio esternal de la piel del animal, se separó el pectoral mayor y el pectoral menor del lado izquierdo, dejando en descubierto la pared torácica izquierda. Se accedió al tórax con una incisión paralela a las costillas en el 3er o 4to espacio intercostal izquierdo. Una vez abierto el tórax se insertó un separador quirúrgico para exponer el corazón. Se procedió a extraer el corazón de la rata, con la precaución de no romper en ningún sitio el tejido aórtico, además de no tocar jamás el corazón. Este procedimiento demora aproximadamente 2-3 minutos. Por lo tanto el animal permanece anestesiado.

*2.2) Montaje en el sistema de perfusión Langendorff:*

Rápidamente se canula el corazón y se monta en el sistema de perfusión Langendorff a través de la aorta, fijando en posición con clamp. La perfusión se debe comenzar con un flujo menor a 5 mL/min (37° C, 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) con una solución Krebs (nM: NaCl, 118,0; KCl, 4,5; CaCl<sub>2</sub>, 2,6; MgCl<sub>2</sub>, 1,2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0; NaHCO<sub>3</sub>, 25,0; glucosa, 11,1). Se sacan los pulmones y se identifican las salidas de las arterias provenientes del cayado aórtico. Una vez que el corazón comienza nuevamente a latir, se comienza lentamente a subir el flujo hasta llegar a los 10mL/min (presión de perfusión coronaria debe estar sobre los 50 mmHg y menor a 90mmHg). Luego, se realiza una pequeña incisión en la aurícula izquierda a través de la cual se inserta un balón hecho de papel alusa (de aproximadamente 500uL), este balón atravesará la válvula mitral para llegar finalmente hasta el ventrículo izquierdo. Luego se conecta este balón a una jeringa conectada al sistema de transducción de presión, agregando un volumen pequeño, de manera que se logre divisar en la pantalla las primeras señales de presión de los latidos. Luego, se insertan electrodos, ambos paralelos al ápex del ventrículo izquierdo. Una vez que todo está preparado, se comienza con una estimulación de 10Volts, durante 1mseg, con una frecuencia que arroje un valor de 250±50 latidos por

minuto. Una vez que se comienza a notar una frecuencia estable, el valor de la presión ventricular diastólica final (precarga) se ajusta a un valor de 5-7 mmHg, inyectando líquido con la jeringa. Este procedimiento dura aproximadamente 10-15 minutos. En la Fig.1A se muestra un esquema del sistema de Langendorff.

### 3. Grupos de estudio.

Se establecieron al azar 6 grupos de ratas a intervenir, (8 por grupo), de acuerdo al cálculo del tamaño muestral que se indicará posteriormente. A todos se les realizará la extracción del corazón.

3.1) *Grupo 1. (Control):* Corazones perfundidos con solución estándar de Krebs. (Una vez montado en el sistema de perfusión). Posterior al periodo de estabilización de 10-15 min.

3.2) *Grupos 2. (Grupo isquemia-reperfusión, IR):* Corazones sometidos a isquemia global por 30 minutos y perfusión con krebs por 120 min.

3.3) *Grupo 3. (Control Omega-3, D1):* Ratas pre-tratadas 8 semanas con omega-3 (D1:0.3 g/Kg/día). Sometidas a estabilización de registro por 15 min.

3.4) *Grupo 4 (Control Omega-3, D2):* Ratas pre-tratadas 8 semanas con omega-3 (D2:0.6 g/Kg/día). Sometidas a estabilización de registro por 15 min.

3.5) *Grupo 5. (Grupo Omega-3 + IR D1):* Ratas pre-tratadas con omega-3 (D1:0.3 mg/Kg/día cuyos corazones serán sometidos a isquemia global por 30 min y perfusión con solución de Krebs por 120 min.

3.6) *Grupo 6. (Grupo omega-3 + IR D2):* Ratas pre-tratadas con omega-3 (D1:0.3 mg/Kg/día cuyos corazones serán sometidos a isquemia global por 30 min y perfusión con solución de Krebs por 120 min. En la figura 1B se muestra un esquema del protocolo de IR.

### 4. Obtención de muestras bioquímicas.

Una vez realizadas las maniobras de perfusión se utilizarán los corazones para determinar el tamaño del infarto en el grupo control, omega D1 y D2, sometidos a IR, respectivamente (n=3) y análisis de parámetros de estrés oxidativo en 5 de ratas dentro del mismo protocolo.

La eliminación del material biológico para desecho, se realizará de acuerdo a las normas aprobadas para cada Laboratorio, por la Unidad de Bioseguridad. (Bolsas de

basura dobles, almacenadas en congelador a -20°C y eliminadas en forma diaria en el contenedor de bioseguridad).

### 5. Medición de la función ventricular.

Se registraron de forma continua y una vez montados en el sistema de perfusión, los siguientes parámetros funcionales: a) presión de perfusión coronaria (PPC); b) presión ventricular desarrollada (PVD); c) presión ventricular de fin de diástole (PVFD); d) la primera derivada del máximo peak positivo y negativo de la presión del ventrículo izquierdo (+dP/dtmax, -dP/dtmin)

### 6. Determinación del tamaño de infarto.

El tamaño de infarto se determinará por perfusión del tejido isquémico con 15 mL de cloruro de trifetil-tetrazolio al 1% (Sigma Chemical), en buffer fosfato ajustado a pH 7.4 por 15 min a 37°C. Posteriormente el corazón es seccionado en 5 o 6 cortes transversales, mantenidos por 12 horas en formaldehído al 10% y luego colocadas en una placa de vidrio para el montaje. Los cortes son aplastados en una placa transparente. Finalmente se toma una fotografía digital de cada corte, realizando análisis volumétrico con el programa ImageJ. Este consiste en la determinación del área total e infartada por planimetría.

### 7. Cálculo del tamaño muestral.

El número de animales se encuentra justificado por la necesidad de obtener resultados estadísticamente válidos. El cálculo se realizó tomando en cuenta una reducción estimada en 30% del tamaño del infarto en ratas en las cuales se realiza el modelo de corazón aislado en condiciones de IR y pre-tratadas con omega-3 en la dosis menor comparados con los que no son tratados, en las mismas condiciones experimentales (grupo 2 vs grupo 5), sin intervenciones durante la perfusión. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = 2 \times \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \times \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Esto arroja un n=7.79 ratas por grupo (8). Siendo la intervención realizada en 6 grupos, esto da un número total aproximado de 48 ratas.

Figura 1

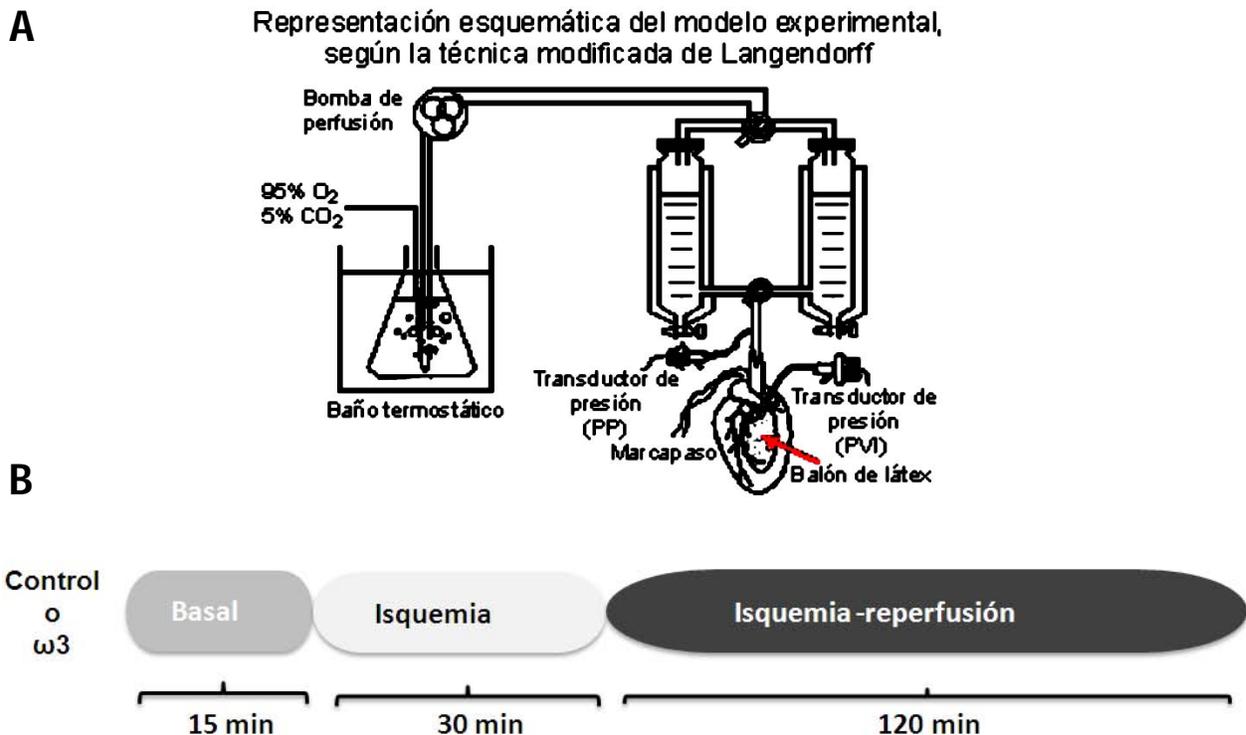


Figura 1. Panel A muestra el esquema del sistema de perfusión. Panel B muestra la representación esquemática del protocolo de investigación.

## 8. Determinaciones Bioquímicas.

8.1) *Biomarcadores de estado antioxidante en corazón de rata:* El estado redox intracelular se determinó por la medición de la relación GSH/ GSSG en homogenizado de corazón de rata llamada también índice tiólico. Esta medición se realizó mediante la detección de fluorescencia, de acuerdo a la reacción del orto-ftalaldehído a pH 8 con GSH y a pH 12 con GSSG (9).

8.2) *Determinación de lipoperoxidación en corazón de rata:* Las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARs) se determinaron como un producto de la oxidación lipídica. Junto con otros lipoperoxidos, se cuantificaron, utilizando como estándar tertrametoxipropano (TMP) y detectando la reacción colorimétrica del UV visible a 532 nm (10).

## 9. Análisis Estadístico.

Los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar (S.D.) o mediana (rango intercuartílico)

dependiendo si distribuyen o no normal. Con respecto a las comparaciones, se establecerán con t de student o test de wilcoxon, dependiendo también de la distribución. El análisis de los datos se realizará en el programa STATA 10.0 y las diferencias serán consideradas estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS.

### 1. Gravimetría, tamaño de infarto y parámetros hemodinámicos.

Las ratas de los grupos control, omega 3 D1 y D2, no muestran diferencias significativas en la ganancia de peso, consumo de fluido y consumo energético, al final de las 8 semanas de suplementación. Tampoco existen diferencias en los niveles séricos de colesterol total (ver Tabla 1). La suplementación con ácidos omega 3 se asocia a una reducción del tamaño de infarto en 33.2 y 47.5%, en los grupos que recibieron la D1 y D2, respectivamente ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).

La medición de variables hemodinámicas muestra que en condiciones basales, no existen diferencias significativas en los parámetros de PPC, PVD, PVFD y (+dP/dtmax, -dP/dtmin) (Fig. 3). Los corazones controles muestran una reducción de un 15, 30 y 33% en los valores de PVFD y los peaks de las derivadas de las presiones ventricular desarrollada, al final de la reperfusión (IR). Sin embargo, la administración de omega 3 muestra un 25.4 y 43.2% mayores valores de PPC, además de 26.7 y 15% mayores valores de PVD, cuando comparamos omega D1 y D2 con respecto a los valores controles, respectivamente ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3A-C).

## 2. Efecto de los omega 3 en los parámetros de estrés oxidativo.

La lipoperoxidación cardíaca, evidenciada por los niveles de TBARS en los grupos D1 y D2 fueron un 185 y 325% mayores en las muestras basales de las ratas suplementadas con omega 3 por 8 semana con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). Con respecto a cada grupo, los niveles de TBARS al final de la reperfusión fueron 60.7 y 25.5% mayores con respecto al grupo control en el grupo D1 ( $p < 0.05$ ). El grupo D2 no muestra diferencias estadísticamente significativas (Fig. 4A).

Con respecto a los valores de glutatión (GSH), la relación GSH/GSSG fue un 28 y 77% mayor en los grupos D1 y D2, al final de la reperfusión, comparado con los valores basales ( $p < 0.05$ ). Además, la relación GSH/GSSG fue menor en los controles y el grupo D1, en 33 y 21%, comparados con los valores basales, respectivamente ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4B). El grupo D2 no muestra diferencias significativas.

Tabla 1

Caracterización de los animales suplementados al final del protocolo.

Grupos	Control	Omega 3 D1	Omega 3 D2
Peso corporal, (g)	276.9 ± 10	272.5 ± 11	276.9 ± 13
Consumo fluido (mL/día/100 g PC)	9.9 ± 1.4	9.2 ± 1.6	8.97 ± 1.3
Consumo energético (kcal/día/ 100 g PC)	20.8 ± 2.5	21.6 ± 1.4	21.1 ± 2.1

PC, Peso corporal; omega 3; D1, dosis 1 (0.3g/kg/día); D2, dosis 2 (0,6 g/kg/día).

Variables son expresadas como promedio ± S.D.

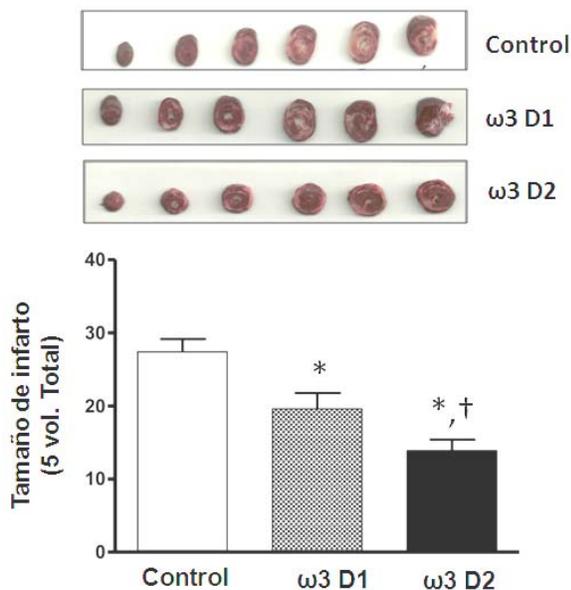
## DISCUSIÓN

El daño por IR ocurre posterior a la restauración de la sangre del miocardio siguiente a un periodo crítico de la oclusión coronaria (11). De hecho, la IR es un problema clínico asociado con procedimientos tales como la trombólisis, la angioplastia y la cirugía de bypass coronario, que se utilizan comúnmente para restablecer el flujo sanguíneo y reducir al mínimo el daño al corazón debido a la isquemia miocárdica grave. En el caso de la "lesión letal por reperfusión". El término se refiere específicamente a la muerte celular asociada a la isquemia transitoria que puede prevenirse con intervenciones aplicadas en el momento de la reperfusión (12). Lesión por IR incluye una serie de eventos: (1) arritmias de reperfusión, (2) daño microvascular, (3) disfunción mecánica reversible o atontamiento miocárdico y (4) muerte celular, lo que puede ocurrir ya sea juntos o por separado.

Hay dos hipótesis principales que se han propuesto para explicar la patogénesis de la lesión por IR, la ocurrencia de estrés oxidativo y la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  (13). Ambos mecanismos son más propensos a estar relacionados entre sí, pero no se sabe si operan simultáneamente o uno precede al otro. El estrés oxidativo, que se asocia generalmente con aumento de la formación de ERO, modifica los fosfolípidos y proteínas, que conducen a la peroxidación de lípidos y la oxidación de grupos tiol; estos cambios alteran la permeabilidad y configuración de la membrana, además de producir una modificación funcional de las diversas proteínas celulares (14). El estrés oxidativo también puede resultar en defectos celulares, incluyendo una depresión de las actividades de las bombas  $Ca^{2+}$  y  $Na^+/K^+$ -ATPasa en la membrana celular, cambios que conducen a una disminución de flujo de salida de  $Ca^{2+}$  y un aumento del flujo de entrada (15).

Estas alteraciones se reducen notablemente previa administración de antioxidantes como miméticos de la CAT y SOD (16). Por otro lado, un aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  durante la isquemia induce la conversión de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa y la generación de radicales superóxido (17). Con respecto a esto último, el Alopurinol, un inhibidor de la xantina oxidasa, ha demostrado ser beneficiosa en proteger al miocardio del daño por isquemia-reperfusión (18). El IAM es un modelo clínico de estrés oxidativo, en donde las ERO son los promotores principales del daño miocárdico durante la IR. El infarto se inicia generalmente por isquemia miocárdica debido a oclusión de una arteria coronaria y la duración de esta determina por una parte el tamaño de infarto, la magnitud de la respuesta inflamatoria y el incremento en la producción de ERO.

Figura 2

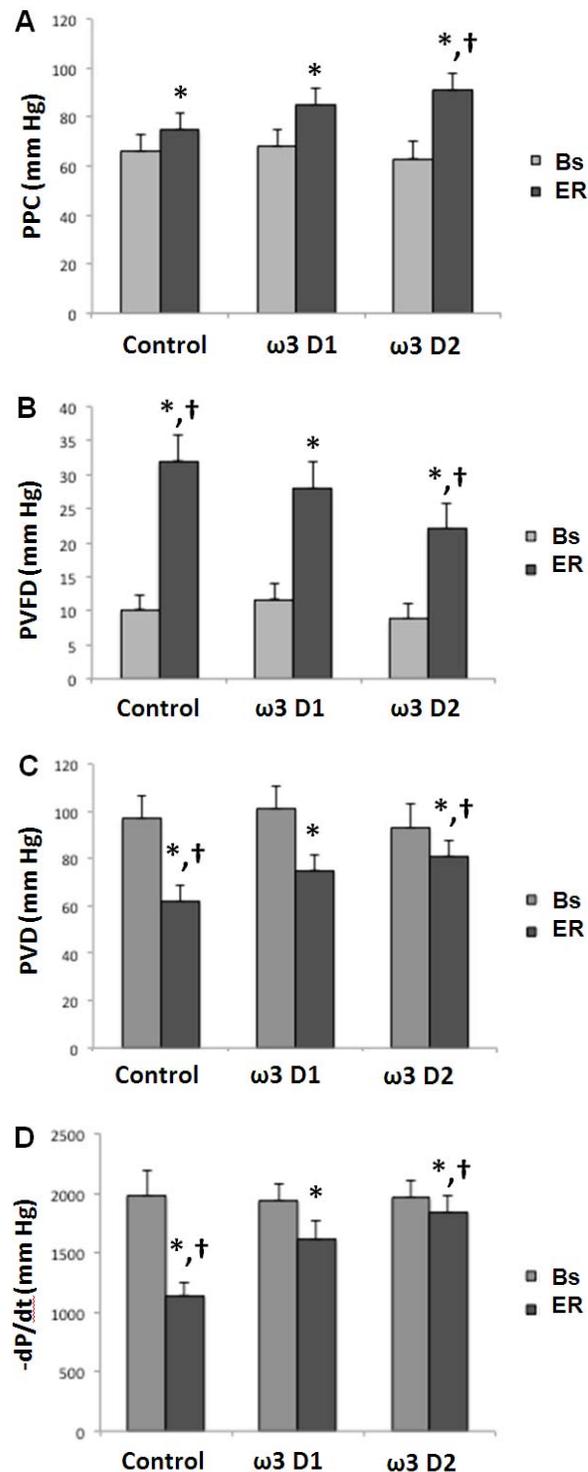


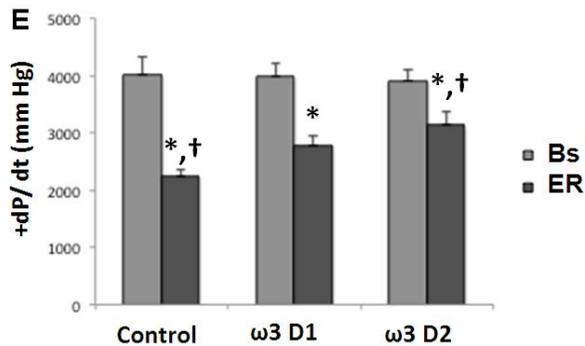
Tamaño de infarto en las ratas suplementadas con ω3 D1(0,3 g/ kg/día) y D2 (0,6 g/kg/día) durante 8 semanas. Los valores se expresan como media + SD de volumen ventricular total. \* p<0.05 vs Control; † p<0.05 ω3 vs D1.

Sin embargo, es durante la reperfusión y principalmente los primeros minutos donde se produce el mayor incremento en la generación de estas especies. Los neutrófilos son la principal fuente de ERO durante la reperfusión. Las células endoteliales y cardiomiocitos también puede generar EROS. Existen fuentes enzimáticas y no enzimáticas para la generación de ERO, dentro de las primeras se encuentran la enzima xantina oxidasa de las células endoteliales, las reacciones de transporte de electrones mitocondrial en los cardiomiocitos y la NADPH oxidasa en los leucocitos (19). Además, el estrés oxidativo contribuye a la oxidación de la tetrahidrobiopterina, un factor de acoplamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). En consecuencia, eNOS desacoplada produce aniones superóxido en vez de óxido nítrico (20).

Es de interés hacer notar que los pacientes sometidos a angioplastia coronaria primaria debido a un infarto con supradesnivel del segmento ST, presentan un aumento de la concentración de F2-isoprostanos en el seno coronario, lo que proporciona una evidencia directa de mayor estrés oxidativo in vivo en el tejido miocárdico durante la reperfusión (21). Por otra parte, Se ha reportado que, en ratones transgénicos en los que la SOD está sobre expresada, el tamaño del infarto se reduce marcadamente (22). Por lo tanto, se debe esperar que el reforzamiento del sistema de defensa antioxidante contrarreste el efecto de las ERO lo que traduciría en un efecto cardioprotector durante la reperfusión miocárdica.

Figura 3





**E** Medición de la función ventricular en las ratas suplementadas con ω3 D1 (0,3 g /kg/ día) y D2 (0,6 g/kg/día) y el control (sin ω3), en basal y final de la reperusión (120 min). Los valores se expresan como media + SD. Diferencias significativas: p<0.05 vs Control; † p<0.05 vs PUFA D1. Abreviaturas: presión de perfusión coronaria (PPC); presión ventricular desarrollada (PVD); presión ventricular de fin de diástole (PVFD); la primera derivada del máximo peak positivo y negativo de la presión del ventrículo izquierdo (+dP/dtmax, -dP/dtmin).

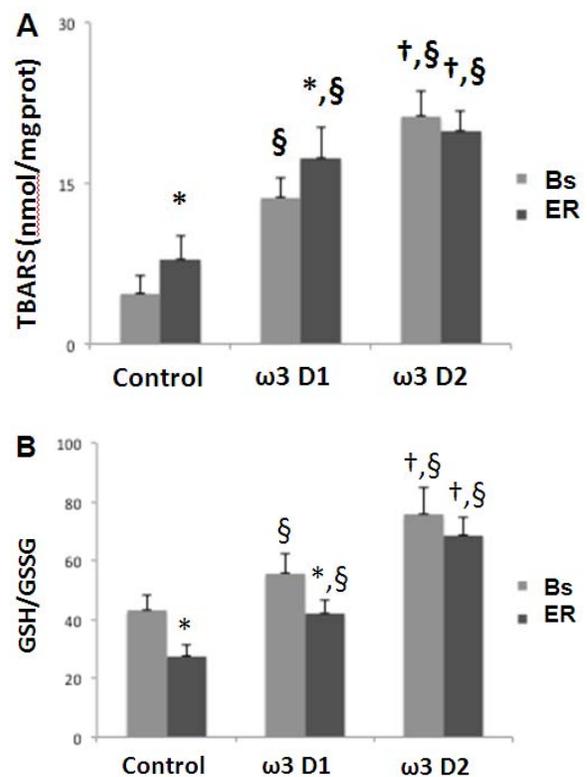
Al analizar los datos obtenidos, se observa una reducción del tamaño de infarto en las ratas suplementadas con omega-3 (DHA:EPA=1.2/1), que fue dosis dependiente. Estos efectos se asocian a una potenciación de algunos mecanismos antioxidantes de tipo no enzimático (índice tiólico, como GSH).

En el caso de los efectos cardioprotectores asociados a la suplementación crónica de ácidos grasos poliinsaturados omega 3, estos se pueden dividir en directos y mediados. Con respecto a los efectos directos, estos se generarían por la incorporación en la membrana celular, principalmente del DHA, donde destaca principalmente la competencia con el ácido araquidónico, el cual es un precursor de vías pro-inflamatorias, por lo tanto, al disminuir la presencia de este en la membrana se estaría disminuyendo directamente la actividad inflamatoria, lo que contribuirá a un menor daño secundario al proceso de IR. Ejemplo de esto es la menor activación de factores transcripcionales pro-inflamatorios, en modelos de suplementación crónica, como el factor nuclear kappaB (23, 24). Respecto a las vías indirectas, los omega-3 se asocian a un aumento en la transcripción de enzimas antioxidantes, que derivan en la síntesis de GSH (25). Esto concuerda con los datos obtenidos en otro trabajo del grupo en prensa (datos no mostrados), en el cual la actividad de SOD, y CAT fueron mayores en las ratas suplementadas con omega-3 respecto del control, con ambas dosis.

Respecto al glutatión, se sabe que es uno de los principales mecanismos antioxidantes a nivel citoplasmático. En los resultados obtenidos se evidencia el aumento de la relación GSH/GSSG lo que denota un aumento de la

actividad antioxidante asociado posiblemente a uno de los efectos indirectos del omega-3 (Fig. 4B). Respecto a los niveles de lipoperoxidación, en la condición basal (posterior a la suplementación), se muestran mayores niveles de lipoperoxidación probablemente por un efecto asociado a una incorporación en la membrana miocárdica, lo que hace más susceptible a fenómenos de oxidación. En cambio en los grupos D1 y D2 al final del protocolo (isquemia + reperusión) los niveles de lipoperoxidación fueron menores asociados posiblemente al efecto protector que inducen en el miocardio posterior a su incorporación gatillados por procesos de IR (26) (Fig. 4A). Se conocen que algunos mediadores lipídicos derivados de la vía no enzimática de oxidación en membrana (J3 isoprostanos) pueden activar algunos factores transcripcionales citosólicos como el factor Nrf2 (Nuclear related erythroid factor-2), que mediaría la síntesis de algunos factores antioxidantes. (27).

Figura 4



Lipoperoxidación (A) y la relación GSH / GSSG (B) en las ratas suplementadas con D1 PUFA (0,3 g / kg / d) y D2 (0,6 g / kg / d) y el control (sin PUFA), en estado basal y final de la reperusión (120 min). Los valores se expresan como promedio ± SD. Diferencias Significativas: \* p <0,05 vs basal; † p <0,05 vs D1 AGPI; § Control vs.

## PERSPECTIVAS

Según los resultados obtenidos la ingesta crónica de omega-3 se podrían asociar a un efecto cardioprotector que disminuiría el daño causado por IR, sin embargo el o los mecanismos moleculares no están dilucidados. Lo importante es resaltar que estos compuestos a las dosis sugeridas, durante un consumo crónico, tienen una serie de efectos pleiotrópicos que puede tener elevada repercusión clínica, tanto en prevención cardiovascular como en otras enfermedades crónicas no transmisibles.

## AGRADECIMIENTOS:

Esta investigación ha sido financiada por Proyecto FONDECYT de iniciación N° 11110426. Se agradece la colaboración de los técnicos Diego Soto Humeres, Guillermo Arce y Rodrigo Duran, de los Laboratorios de Fisiopatología Renal y Cardíaca, respectivamente.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Indicadores básicos de Salud Chile 2011 ([http://deis.minsal.cl/deis/indicadores/Folleto\\_IBS\\_2011.pdf](http://deis.minsal.cl/deis/indicadores/Folleto_IBS_2011.pdf)).
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124-1136.
- Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF (2007) Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol. Rev.* 59, 418-458.
- Rodrigo R, Cereceda M, Castillo R, Asenjo R, Zamorano J, Araya J, Castillo-Koch R, Espinoza J, Larrain E (2008) Prevention of atrial fibrillation following cardiac surgery: basis for a novel therapeutic strategy based on non-hypoxic myocardial preconditioning. *Pharmacol. Ther.* 118, 104-127.
- Keenan AH, Pedersen TL, Fillaus K, Larson MK, Shearer GC, Newman JW (2012) Basal omega-3 fatty acid status affects fatty acid and oxylipin responses to high-dose n3-HUFA in healthy volunteers. *J Lipid Res.* 53, 1662-1669.
- Harris WS, Von Schacky C (2004) The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease?. *Prev Med.* 39, 212-220.
- Leifert WR, Jahangiri A, McMurchie EJ (2000) Membrane fluidity changes are associated with the antiarrhythmic effects of docosahexaenoic acid in adult rat cardiomyocytes. *J Nutr. Biochem.* 11, 38-44.
- Araya J, Rodrigo R, Orellana M, Rivera G. (2001) Red wine raises plasma HDL and preserves long-chain polyunsaturated fatty acids in rat kidney and erythrocytes. *Br J Nutr.* 86, 189-195.
- Hissin PJ, Hilf R. (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 74, 214-226.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95, 351-358.
- Dhalla, NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino, N (2000) Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 47, 446-456.
- Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Piper HM. Lethal reperfusion injury in acute myocardial infarction: facts and unresolved issues. *Cardiovasc Res.* 83, 165-168.
- Talukder, MA, Zweier, JL, Periasamy, M (2009) Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovasc. Res.* 84, 345-352.
- Hool, LC. (2009) The L-type Ca(2+) channel as a potential mediator of pathology during alterations in cellular redox state. *Heart Lung Circ.* 18, 3-10.
- Dong, Z, Saikumar, P, Weinberg, JM, Venkatachalam, MA (2006) Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol* 1, 405-434.
- Maddika, S, Elimban, V, Chapman, D, 12 NS (2009) Role of oxidative stress in ischemiareperfusion-induced alterations in myofibrillar ATPase activities and gene expression in the heart. *Can J Physiol Pharmacol.* 87,120-129.
- Sasaki, M, Joh, T (2007) Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents. *J Clin. Biochem. Nutr.* 40, 1-12.
- Kang, S.M, Lim, S, Song, H, Chang, W, Lee, S, Bae, S.M., Chung JH, Lee H, Kim HG, Yoon DH, Kim TW, Jang Y, Sung JM, Chung NS, Hwang KC. (2006) Allopurinol modulates reactive oxygen species generation and Ca2+ overload in ischemia-reperfused heart and hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 535, 212-219.
- Duilio, C, Ambrosio, G, Kuppusamy, P, DiPaula, A, Becker, LC, Zweier, JL (2001) Neutrophils are primary source of O2 radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H2649-H2657.
- Dai Y, Cui J, Cun Y, Shi A. (2012) Tetrahydrobiopterin ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury by coupling with eNOS in mice. *J Surg Res.* 176, e65-e71.
- Iuliano, L, Praticò, D, Greco, C, Mangieri, E, Scibilia, G, FitzGerald, GA, Violi F. (2001) Angioplasty increases coronary sinus F2-isoprostane formation: evidence for in vivo oxidative stress during PTCA. *J Am Coll Cardiol.* 37, 76-80.
- Wang, P, Chen, H, Qin, H, Sankarapandi, S, Becher, MW, Wong, PC, Zweier, JL. (1998) Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 4556-4560.
- Castillo R, Rodrigo R, Perez F, Cereceda M, Asenjo R, Zamorano J, Navarrete R, Villalabeitia E, Sanz J, Baeza C, Aguayo R. (2011) Antioxidant therapy reduces oxidative and inflammatory tissue damage in patients subjected to cardiac surgery with extracorporeal circulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 108, 256-262.
- Ji A, Diao H, Wang X, Yang R, Zhang J, Luo W, Cao R, Cao Z, Wang F, Cai T. (2012) n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation and dopaminergic injury in rats. *Neurotoxicology.* 33, 780-788.
- Jahangiri A, Leifert WR, Kind KL, McMurchie EJ. (2006) Dietary fish oil alters cardiomyocyte Ca2+ dynamics and antioxidant status. *Free Radic Biol Med.* 40,1592-1602.

26. Rodrigo R, Prieto JC, Castillo R. (2013) Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins c and e plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications. *Clinical Science* 124, 1-15.
27. Carnes CA, Janssen PM, Ruehr ML, Nakayama H, Nakayama T, Haase H, Bauer JA, Chung MK, Fearon IM, Gillinov AM, Hamlin RL, Van Wagoner DR. (2007) Atrial glutathione content, calcium current, and contractility. *J Biol Chem.* 282, 28063-28673.