



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN MITOCONDRIAS DE
PLACENTA HUMANA CON PREECLAMPSIA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGA**

PRESENTA

AMIRA GARNICA VERGARA

ASESOR DE TESIS:

D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

MORELIA, MICHOACÁN, SEPTIEMBRE DEL 2010



TESIS APOYADA POR COECYT 2010

UMSNH PROYECTO 2.16

“La única persona que no se equivoca, es la que nunca hace nada”

Anónimo

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Rosa María Vergara García y Rafael Garnica Gómez.

Porque son la base de lo que soy, de lo que he logrado y cada paso que doy en mi vida es por ustedes y para ustedes. Gracias por hacer de mí una persona con sueños. Los amo mucho.

A MIS HERMANOS

Rafael y Luis.

Porque todas las experiencias y aprendizajes que vivimos juntos, por su apoyo incondicional y cariño.

A NOVO

Con mucho amor para ti, porque me has brindado amor y apoyo incondicional, porque has sido mi fortaleza y motivación en cada paso. Por hacer nuestros sueños realidad y por compartir tu vida a mi lado y hacerme feliz. Por todo lo que estamos viviendo y lo que viene. Te amo mucho y eres parte de mí.

A MIS ABUELITOS

Matilde y Antonio

Con mucho cariño por todo su apoyo y motivación, son un ejemplo a seguir por todos sus logros. Los amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al D.C. Alfredo Saavedra Molina por el apoyo, el conocimiento y los consejos brindados como asesor durante la realización de este trabajo. Y por la amistad brindada durante mi estancia en el laboratorio.

A la Q.F.B. Mónica Clemente Guerrero por su apoyo y ayuda en todo momento y sobretodo por su amistad.

A mis sinodales:

D.C. Elizabeth Calderón Cortés
D.C. Salvador Manzo Ávalos
D.C. Daniel Godínez
D.C. Christian Cortés Rojo

Gracias por las sugerencias en la realización de este trabajo.

Al Hospital General “Dr. Miguel Silva” de Morelia, Mich., por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo. Especialmente al Dr. Adolfo Leyva López por su ayuda y apoyo.

A mis compañeros del laboratorio de Bioquímica, Mirella, Anita, Ruth, Lore, Omar, Melchor, Toño, Tavo, Iván y Edgar por los buenos momentos llenos de alegría y por su amistad, especialmente a Mirella, Anita y Omar, por su valiosa ayuda y consejos, por su apoyo y motivación en este trabajo.

A mi familia por todo lo que han hecho por mí y a mis sobrinitos Natzul y Ámbar por ser una razón de alegría en nuestra vida.

Con mucho cariño gracias a mi tío Pablo, por todo el apoyo brindado, por ser mi amigo, mi tío y un gran ser humano.

A **Novo**, gracias mi amor por todo, por cada momento de motivación, apoyo y cariño.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	iv
RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La placenta	1
1.1.1 Anatomía de la placenta	1
1.1.2 Componentes de la placenta	2
1.2 Preeclampsia	4
1.3 Clasificación de la preeclampsia/eclampsia	4
1.4 Epidemiología	5
1.5 Etiopatogenia	6
1.6 La mitocondria	7
1.6.1 La cadena transportadora de electrones	10
1.7 Estrés oxidativo y nitrosativo y su relación con la preeclampsia	12
1.7.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)	13
1.7.1.1 Radical superóxido	13
1.7.1.2 Peróxido de hidrógeno	14
1.7.1.3 Radical hidroxilo	15
1.7.2 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)	15
1.7.2.1 Óxido nítrico	15
1.7.2.2 Peroxinitrito	17
1.7.2.3 Relación de óxido nítrico y la preeclampsia	17
1.7.3 Daño a biomoléculas por ERO y ERN	18
1.7.3.1 Daño a lípidos	18
1.7.3.2 Daño a proteínas	20
1.7.3.3 Daño de los ácidos nucleicos	20
1.8 Aconitasa	21
2. JUSTIFICACIÓN	24

3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos específicos	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. Reactivos	25
5.2 Material biológico	25
5.3 Aislamiento y purificación de las mitocondrias de placenta	25
5.4 Determinación de la proteína mitocondrial	26
5.5 Determinación del consumo de oxígeno	26
5.6 Determinación de la lipoperoxidación	27
5.7 Determinación del óxido nítrico	28
5.8 Determinación de la actividad de la aconitasa	29
5.9 Análisis estadístico	29
6. RESULTADOS	30
6.1 Signos y síntomas de pacientes normales y con preclampsia	30
6.2 Niveles del consumo de oxígeno	30
6.3 Niveles de lipoperoxidación	34
6.4 Niveles del óxido nítrico	37
6.5 Actividad de la aconitasa	38
7. DISCUSIÓN	39
8. CONCLUSIÓN	42
9. LITERATURA CITADA	43
9.1 Citas de figuras	50

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.- Placenta humana	2
Figura 2.- Vellosidades de la placenta humana	3
Figura 3.- Estructura mitocondrial	8
Figura 4.- Ultraestructura de células humanas de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto	9
Figura 5.- Cadena transportadora de electrones	11
Figura 6.- Generación de ERO en mitocondria	14
Figura 7.- Reacción catalizada por la NOS	16
Figura 8.- Esquema de la lipoperoxidación	19
Figura 9.- Reacción de la aconitasa	21
Figura 10.- Estructura de la aconitasa	22
Figura 11.- Inactivación de la aconitasa mitocondrial de corazón de cerdo por el peroxinitrito	23
Figura 12.- Diagrama de la formación del aducto MDA-TBA	27
Figura 13.- Determinación indirecta del óxido nítrico	28
Figura 14.- Consumo de oxígeno de mitocondrias de citotrofoblasto de placenta humana de pacientes normales.	31
Figura 15.- Consumo de oxígeno de mitocondrias de sincitiotrofoblasto de placenta humana de pacientes normales	32
Figura 16.- Consumo de oxígeno de mitocondrias de citotrofoblasto de placenta humana de pacientes con preeclampsia	33
Figura 17.- Consumo de oxígeno de mitocondrias de sincitiotrofoblasto de placenta humana de pacientes con preeclampsia	33
Figura 18.- Niveles de lipoperoxidación en mitocondrias de citotrofoblasto de placenta humana	35
Figura 19.- Niveles de lipoperoxidación en mitocondrias de sincitiotrofoblasto de placenta humana	36
Figura 20.- Niveles de óxido nítrico en mitocondrias de placenta humana	37
Figura 21.- Actividad de la aconitasa en mitocondrias de placenta humana	38
Tabla 1.- Principales causas de muerte materna en México	5
Tabla 2.- Signos de pacientes normales y con preeclampsia	30
Tabla 3.- Cocientes respiratorios de mitocondrias de placenta humana	34

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
C-H	Unión carbono-hidrógeno
CO₂	Dióxido de carbono
CR	Cociente respiratorio
CT	Citotrofoblasto
CTE	Cadena transportadora de electrones
Cu²⁺	Ión cúprico
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FADH	Dinucleótido de adenina y flavina reducido
Fe²⁺	Ión ferroso
Feα	Fierro lábil
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GSSG/GSH	Glutación oxidado/Glutación reducido
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
L\cdot	Radical lipídico
LOO\cdot	Peróxido lipídico
LOOH	Hidroperóxido
M	Mitocondria
m	Mitocondria
MDA	Malondialdehído
mmHg	Milímetros de mercurio
N	Núcleo
NADH	Dinucleótido de nicotinamina y adenina reducido
NED	N-1-naftiletildiamina
NO\cdot	Óxido nítrico
NO₂⁻	Nitritos
NO₃⁻	Nitratos
NOS	Óxido nítrico sintasa
O₂	Oxígeno
O₂⁻	Anión superóxido
OH\cdot	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO⁻	Peroxinitrito
Pi	Fosfato inorgánico
rpm	Revoluciones por minuto
ST	Sincitiotrofoblasto
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
UMSNH	Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
$\Delta\psi$	Potencial transmembranal

RESUMEN

La preeclampsia es un síndrome del embarazo caracterizado por la hipertensión, proteinuria y edema y es una de las principales causas de muerte materna en México y en **Michoacán**. Estudios recientes sugieren que la preeclampsia está relacionada con la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), siendo la mitocondria fuente y blanco de dichas especies, provocando daños en la cadena transportadora de electrones y biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En el tejido placentario se han reportado diferentes tipos celulares, los cuales presentan diferentes tipos de mitocondrias. Con el objeto de evaluar los niveles de estrés oxidativo y nitrosativo en cada tipo mitocondrial durante la preeclampsia, en el presente trabajo se realizaron determinaciones del consumo de oxígeno, lipoperoxidación, niveles de óxido nítrico y actividad de la aconitasa como marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias provenientes de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto de placentas humanas de pacientes normales y con preeclampsia procedentes del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva”. Los resultados obtenidos en los niveles de consumo de oxígeno mostraron cocientes respiratorios bajos, en mitocondrias de citotrofoblasto 0.653174 ± 0.49656 nmoles/mg de proteína y en mitocondrias de sincitiotrofoblasto 1.424657 ± 0.13548 nmoles/mg de proteína, mientras que en mitocondrias provenientes de ambos tipos mitocondriales de placentas de pacientes con preeclampsia, se observó un aumento en la cantidad de oxígeno, respecto al tiempo. Los niveles de lipoperoxidación mostraron un aumento en tratamientos con Fe^{2+} ($1.52096197 \pm 0.44022169$ nmoles/mg de proteína) en mitocondrias de citotrofoblasto preecláptico y (1.09773607 ± 0.2557617 nmoles/mg de proteína) en mitocondrias de sincitiotrofoblasto preecláptico. Los niveles de óxido nítrico (NO^{\cdot}) mostraron incremento (3.4075 ± 0.14720309 μ moles/mg de proteína) en mitocondrias de sincitiotrofoblasto preecláptico. La actividad de la aconitasa mostró un incremento ($0.004133333 \pm 8.81917\text{E-}05$ mmoles *cis*-aconitato/mg de proteína) en mitocondrias de citotrofoblasto preecláptico y (0.005 ± 0.00026458 mmoles *cis*-aconitato/mg de proteína) en mitocondrias de sincitiotrofoblasto preecláptico. Estos resultados sugieren que la formación de ERO y el aumento en el NO^{\cdot} podría favorecer un estado de estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de pacientes con preeclampsia, el cual presenta aparente diferencia en los distintos tipos de mitocondrias de la placenta.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La placenta

La placenta es un órgano muy especializado y característico de los mamíferos superiores. La placenta humana desempeña funciones inmunológicas, nutritivas y endocrinas esenciales para el desarrollo del embarazo. Regula activamente todos los intercambios que se producen entre los compartimentos materno y fetal, desempeñando funciones similares a las que en el adulto realizan órganos especializados como el pulmón, el intestino, el riñón o el hígado (Aliaga, 2005).

El oxígeno, agua y nutrientes esenciales para el desarrollo fetal pasan a través de ella desde la circulación materna. Simultáneamente y en sentido opuesto, la placenta exporta los productos del catabolismo fetal, excepto aquellos que pasan al líquido amniótico.

Para llevar a cabo todas las funciones mencionadas con eficacia, se requiere un desarrollo gradual, tanto de la circulación fetal como de la materna, que satisfaga la demanda creciente de nutrientes ocasionada por el crecimiento fetal y su metabolismo (Bajo y col., 2007).

1.1.1 Anatomía de la placenta

La placenta madura es un órgano con forma discoidal que tiene un diámetro aproximado de 15 a 20 cm, con un espesor de 1.5 a 2.5 cm y un peso medio de 500 g, que se extiende sobre una cuarta parte de la cavidad uterina (Cunningham y col., 1996).

La placenta presenta dos caras: una materna y otra fetal (Fig. 1). Por la cara materna se une al útero. Si se examina después del parto, esta cara tiene un color rojizo y un aspecto sangrante, y en ella se comprueba la existencia de un número variable (10-38) de áreas convexas un poco elevadas que se denominan “lóbulos placentarios” o “cotiledones”. Estos lóbulos están separados de manera incompleta por surcos de profundidad variable que se denominan “tabiques placentarios” o “septos”. La cara fetal, orientada hacia la cavidad amniótica, está tapizada por el amnios, una membrana delgada y lisa que permite reconocer los vasos sanguíneos que la recorren y que son continuación de los vasos del cordón umbilical, el cual se inserta en dicha cara. Al final del embarazo, el cordón umbilical tiene una longitud media de 50 cm y un diámetro entre 1 y 1.5 cm. Contiene dos arterias y una vena que

poseen musculatura propia y se encuentran rodeadas por un tejido mesenquimatoso denominado “gelatina de Wharton”. La cubierta del cordón umbilical está formada por el amnios, que junto con la gelatina de Wharton protegen la circulación sanguínea por los vasos del cordón (Bajo y col., 2007).

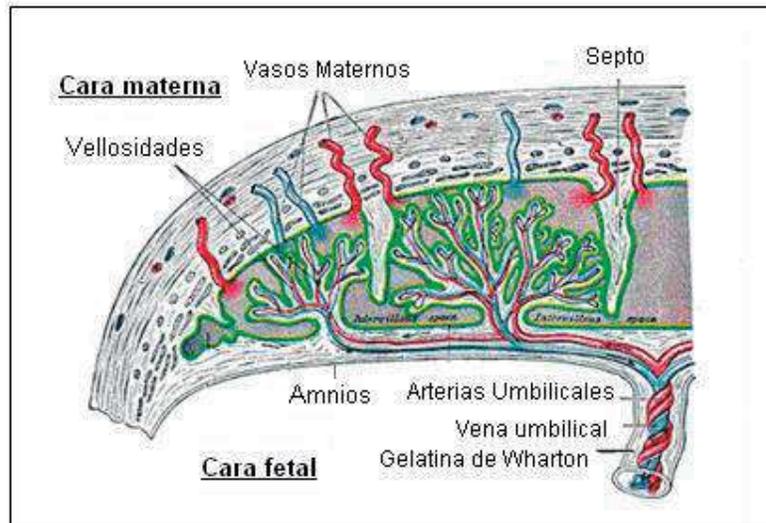


Figura 1.- Placenta humana. Corte transversal de la placenta [1].

1.1.2 Componentes de la placenta

La placenta presenta varios componentes:

- **Porción materna**

Consiste de la mucosa uterina, que en cada ciclo menstrual se prepara por la acción de una serie de hormonas ováricas (foliculina y progesterona) para la anidación. Esta proliferación del endometrio afecta a los vasos, al epitelio, al corion y a las glándulas (Pacheco, 1999).

- **Porción fetal**

Contiene enzimas con actividad proteolítica, capaces de lisar la parte del epitelio en la que tiene que implantarse el óvulo, y gracias a ello, iniciar la relación materno-fetal (Merkis y col., 2005). Está formada por dos partes, una capa celular interna llamada citotrofoblasto y una capa celular externa denominada sincitiotrofoblasto (Fig. 2). El sincitiotrofoblasto es la capa periférica que recubre las velloidades; está formado por células multinucleadas, de núcleos pequeños, densos, con citoplasma granular, denso y anfófilo, con algunas vacuolas lipídicas. No presenta mitosis. El sincitiotrofoblasto está totalmente en contacto directo con la

sangre materna en el espacio intervelloso y tiene funciones endocrinas (formación de gonadotropina). El citotrofolasto tiene moléculas antigénicas, de modo que debe estar a una distancia segura de la sangre materna (Gallego, 2007). Está constituido por células de núcleos relativamente grandes, vesiculosos, y citoplasma claro, de límites definidos; presenta actividad mitótica. Las sustancias pasan desde la madre al feto, desde la sangre materna hasta el espacio intravelloso; ahí se cruzan las dos capas de citotrofolasto, algún tejido conectivo fetal y finalmente la pared capilar fetal. Al ir avanzando el embarazo, disminuye el citotrofolasto, aunque persiste hasta el final de la gestación. El estroma de las vellosidades maduras contiene abundantes vasos, vecinos al trofolasto, donde forma la barrera de intercambio con la sangre materna (Pacheco, 1999).

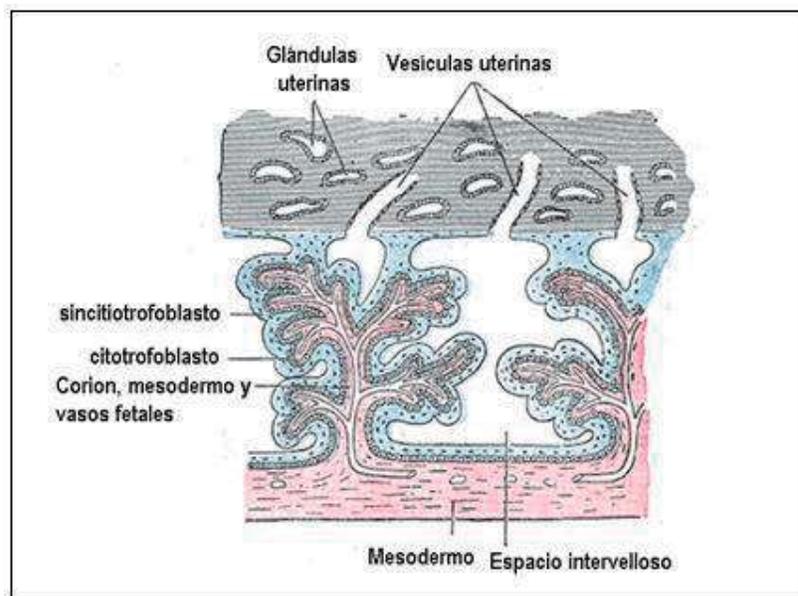


Figura 2.- Vellosidades de la placenta humana. Diagrama de las vellosidades coriónicas secundarias de la placenta [2].

Las vellosidades de la placenta forman cotiledones, los cuales están constituidos de un recubrimiento de sincitio, una capa celular de Langhans y tejido conjuntivo donde se ramifican los vasos. Los cotiledones están divididos por tabiques deciduales, que separan los espacios intervelloso en grandes compartimientos, los cuales están irrigados por arterias espirales (Bajo y col., 2007).

Para protección del feto, durante el desarrollo embrionario se forman varias membranas, tales como el amnios, que es la capa de la membrana fetal que va a envolver

totalmente al embrión y feto, y el corion que es la capa más externa que envuelve al área embrionaria y va a ser la base sobre la que se forme la placenta (Abad 1999).

La irrigación sanguínea dentro de las membranas fetales y el paso de nutrientes y productos gaseosos, es llevado a cabo por los vasos feto-placentarios, que son ramas de las arterias umbilicales que convergen para formar la vena umbilical (Bajo y col., 2007).

Existen riesgos de presentar alteraciones durante el embarazo, entre los que se incluyen el aborto, restricción del crecimiento intrauterino, diabetes gestacional, la preeclampsia (PE) y la eclampsia, entre otros (Agarwal y col., 2005).

1.2 Preeclampsia

La preeclampsia es un síndrome clínico caracterizado por el aumento de la presión arterial sistólica/presión arterial diastólica ($>140/90$ mmHg) después de la semana 20 de gestación, combinado con proteinuria (>300 mg/dL) y edema en las extremidades (Halewa y col., 1997).

Aunque el signo más notorio de la enfermedad es una elevada presión arterial, puede desembocar en una eclampsia y provocar daño al endotelio, riñones e hígado materno. El único tratamiento es la inducción del parto, una cesárea o aborto, aunque la preeclampsia puede permanecer hasta seis semanas posparto. Es la complicación del embarazo más común y peligrosa, por lo que debe diagnosticarse y tratarse rápidamente, ya que en casos severos ponen en peligro la vida del feto y de la madre (Secretaría de Salud, 2000).

La preeclampsia está asociada con la invasión deficiente del trofoblasto hacia las arterias espirales, lo que resulta en una disminución del calibre de estas arterias e isquemia placentaria. Esto causa daño endotelial vascular debido a la liberación de diversos mediadores que dañan las células del endotelio vascular en toda la madre, lo que conduce a la hipoxia en los órganos predispuestos (pulmones, hígado, riñones) (Widschwendter y col., 1998).

1.3 Clasificación de la preeclampsia/eclampsia

De acuerdo a los signos y síntomas, se han propuesto dos tipos de preeclampsia: la preeclampsia leve y la preeclampsia severa (Secretaría de Salud, 2000).

La **preeclampsia leve** se caracteriza por presión arterial de 140/90mmHg, edema en cara y manos, alteración de la función hepática y visual y proteinuria.

La **preeclampsia severa** se caracteriza por presión arterial mayor a 160/90 mmHg, oliguria menor de 400ml/24h, trastornos mentales, dolores epigástricos, edema pulmonar o cianosis, aumento de peso de más de 2 kg en una semana, alteraciones visuales, cefaleas intensas y persistentes y elevación de las enzimas hepáticas o trombocitopenia.

La **eclampsia** es la evolución de la preeclampsia donde la magnitud de la vasoconstricción y el alza tensional provocan una encefalopatía hipertensiva, capaz de producir convulsiones en ausencia de una patología neurológica previa (Peralta-Pradero y col., 2004).

1.4 Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen anualmente más de 166 mil muertes por preeclampsia. Su incidencia es del 5 al 10% de los embarazos, pero la mortalidad es de 5 a 9 veces mayor en los países en vías de desarrollo (OMS, 2005). En México es la primera causa de muerte materna (Tabla 1) (Peralta-Pradero y col., 2004).

En **Michoacán**, las principales causas de muerte materna están asociadas a hemorragias obstétricas y a la preeclampsia-eclampsia. En el **2008**, se registraron 40 defunciones en mujeres embarazadas o durante el parto o el puerperio; el grupo de edad más frecuente fue el de 25 a 29 años (Secretaría de Salud de Michoacán, 2009).

Causas	2004	2005
Enfermedad hipertensiva del embarazo	29.46 %	25.93 %
Hemorragia del embarazo, parto y puerperio	25.50 %	24.48 %
Aborto	7.10 %	7.49 %
Sepsis y otras infecciones puerperales	3.47 %	2.42 %

Tabla 1.- Principales causas de muerte materna en México. Incidencia nacional de las principales causas de muerte materna en México, durante los años 2004 y 2005 (Díaz, 2006).

1.5 Etiopatogenia

Son numerosos los factores de riesgo que predisponen a la preeclampsia; estos incluyen preeclampsia previa, embarazos múltiples, hipertensión crónica, diabetes mellitus, nuliparidad, obesidad y enfermedades del riñón. El vasoespasmo es considerado el cambio central patológico de la preeclampsia y se sugiere que este proceso es llevado por un desbalance entre prostaciclina y tromboxano, los cuales son metabolitos biológicamente activos del ácido araquidónico (Mutter y Karumanchi, 2007).

Varios mecanismos fisiopatológicos se han implicado en el desarrollo de la preeclampsia. Estos mecanismos incluyen: disfunción endotelial, inflamación, estrés oxidativo, activación de trombosis y el sistema renina-angiotensina. La perfusión útero-placentaria deficiente se ha reconocido como una característica en todos los síndromes de preeclampsia (Dinesh, 2005).

La invasión del trofoblasto hacia las arterias espirales es responsable de la circulación útero-placentaria deficiente. La invasión deficiente del trofoblasto y la subsecuente remodelación de las arterias espirales resultan en diámetros de las arterias espirales de sólo 40% respecto a los hallados en embarazos normales. En la preeclampsia, las arterias espirales son remodeladas por el trofoblasto mediante la invasión de sus paredes, causando la pérdida de la capa muscular y la lámina elástica interna. Esto convierte al sistema placentario normal de alto flujo y baja resistencia en un sistema de bajo flujo y alta resistencia que resulta en isquemia placentaria, que se cree es el desencadenante de este cuadro clínico, a través de sustancias liberadas por el útero o la placenta isquémica que afecta la función endotelial, ya sea por liberación de sustancias vasoconstrictoras o inhibición de las influencias vasodilatadoras. Las células endoteliales activadas o dañadas por radicales libres de oxígeno, peroxidación de lípidos, quimiotaxis de células inflamatorias y agentes vasopresores (desequilibrio prostaciclina/tromboxano A_2) causa vasoconstricción, promueve la trombosis y fibrosis, la coagulación vascular diseminada, la hipertensión y la lesión de múltiples órganos (Widschwendter y col., 1998).

El conjunto de hallazgos clínicos de la preeclampsia se ha observado solamente en mujeres embarazadas, llevando a la conclusión de que la placenta es la responsable de ocasionar esta condición (Mutter y Karumanchi., 2007).

Tierney y col. (2003) mencionan que existen cuatro factores etiológicos principales que desencadenan la preeclampsia:

- 1) Mal adaptación inmunológica
- 2) Isquemia placentaria
- 3) Estrés oxidativo
- 4) Susceptibilidad genética

Existen evidencias donde se muestra que las especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) participan de manera importante en el desarrollo de la preeclampsia. El daño producido por el estrés oxidativo observado en condiciones de preeclampsia, indica como una fuente a la mitocondria por ser un sitio productor de ERO (Wang y Walsh, 1998).

1.6 La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos citosólicos ubicuos, presentes con algunas excepciones en todas las células eucariontes. Tienen una forma filamentosa o granular. La estructura característica de las mitocondrias las hace fácilmente distinguibles de otros elementos intracelulares. Contienen su propio ADN, que además en parte controla su número, tamaño y función. Las dimensiones de la mitocondria son de aproximadamente 0.5 μm de diámetro y 1.0 μm de longitud. La mayoría de las células de plantas y animales contienen varios cientos a miles de mitocondrias (Vázquez y Tuena de Gómez-Puyou, 2002).

El modelo típico de la mitocondria (Fig. 3), consiste en dos sacos membranosos, uno dentro del otro, con lo que se forman dos compartimientos, uno externo que corresponde a un espacio limitado por las dos membranas, la externa y la interna y otro espacio interno, limitado solamente por la membrana interna llamado matriz mitocondrial (Vázquez y Tuena de Gómez-Puyou, 2002).

La membrana externa está compuesta por alrededor del 30-40% de lípidos y del 60-70% de proteínas, entre las que se encuentran las enzimas de la oxidación de aminoácidos, de la biosíntesis de ácidos grasos y de fosfolípidos de membrana, entre otros. La característica más importante de la membrana externa es que presenta una permeabilidad poco selectiva (Vázquez y Tuena de Gómez-Puyou, 2002).

La membrana interna está formada por aproximadamente 80% de proteínas y es rica en ácidos grasos insaturados, lo que explica su baja viscosidad y su susceptibilidad a la lipoperoxidación. La membrana interna es altamente selectiva e impermeable a la mayoría de

las moléculas, a excepción del O₂, CO₂ y el H₂O. Esto permite el establecimiento del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) y evita pérdidas en el mismo. La selectividad de esta membrana se debe a la presencia de proteínas translocadoras y acarreadores específicos (Mathews y Van Holde, 2004).

En la matriz mitocondrial se encuentran las enzimas solubles del metabolismo, como las del ciclo de Krebs y la oxidación de los ácidos grasos. Además, se encuentran sustratos, iones inorgánicos y cofactores, así como el ADN, ARN mitocondrial y ribosomas que generan varias proteínas mitocondriales (Vázquez y Tuena de Gómez-Puyou, 2002).

El espacio intermembranal, limitado por las dos membranas, no presenta ninguna estructura u organización especial, sin embargo, contiene una serie de proteínas solubles importantes para la función mitocondrial, tales como la adelinato cinasa que interviene en la transferencia del enlace de alta energía del ATP (Henze y Martin, 2003).

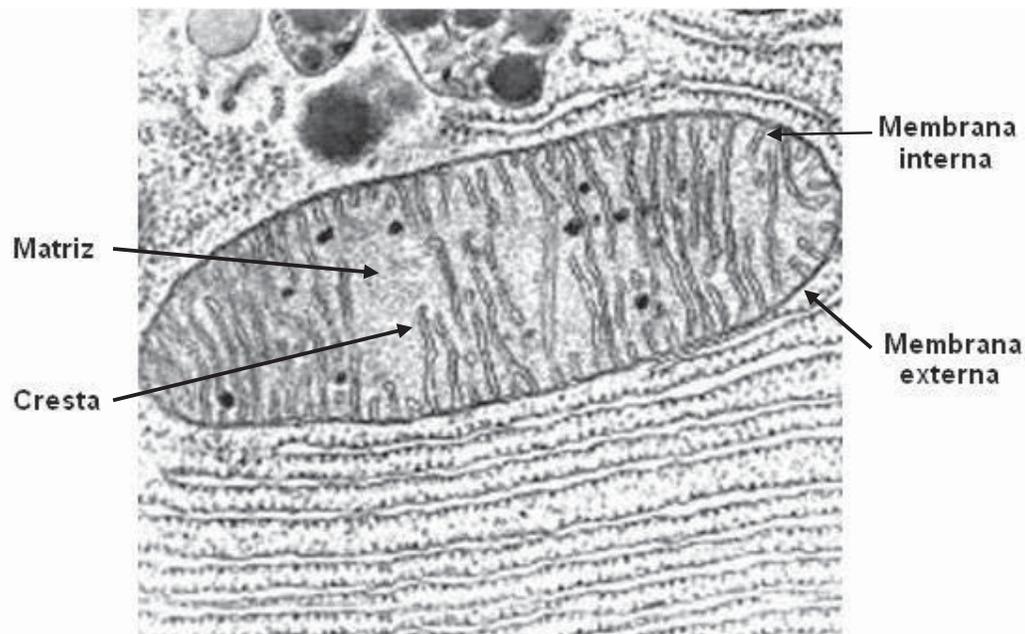


Figura 3.- Estructura mitocondrial. La mitocondria está integrada por la membrana externa, la membrana interna, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial, ubicada dentro de la membrana interna, formando crestas debido a su plegamiento (Berg y col., 2008)

Se han descrito dos tipos de mitocondrias en la placenta (Fig. 4), con diferencias estructurales y funcionales, las cuales dependen del tipo de células trofoblásticas a las que pertenecen. En células citotrofoblásticas se encuentran mitocondrias de gran tamaño, con morfología similar a las mitocondrias del hígado, con crestas laminares y una forma redondeada, mientras que el sincitiotrofoblasto contiene mitocondrias pequeñas con una

matriz condensada y vesículas parecidas a las crestas, de forma irregular, con protuberancias en las membranas interna y externa. Además, las mitocondrias del sincitiotrofoblasto, contienen la proteína P450_{sc} (enzima de ruptura de la cadena de colesterol) que cataliza el primer paso en la esteroidogénesis (Martínez y col, 1997).

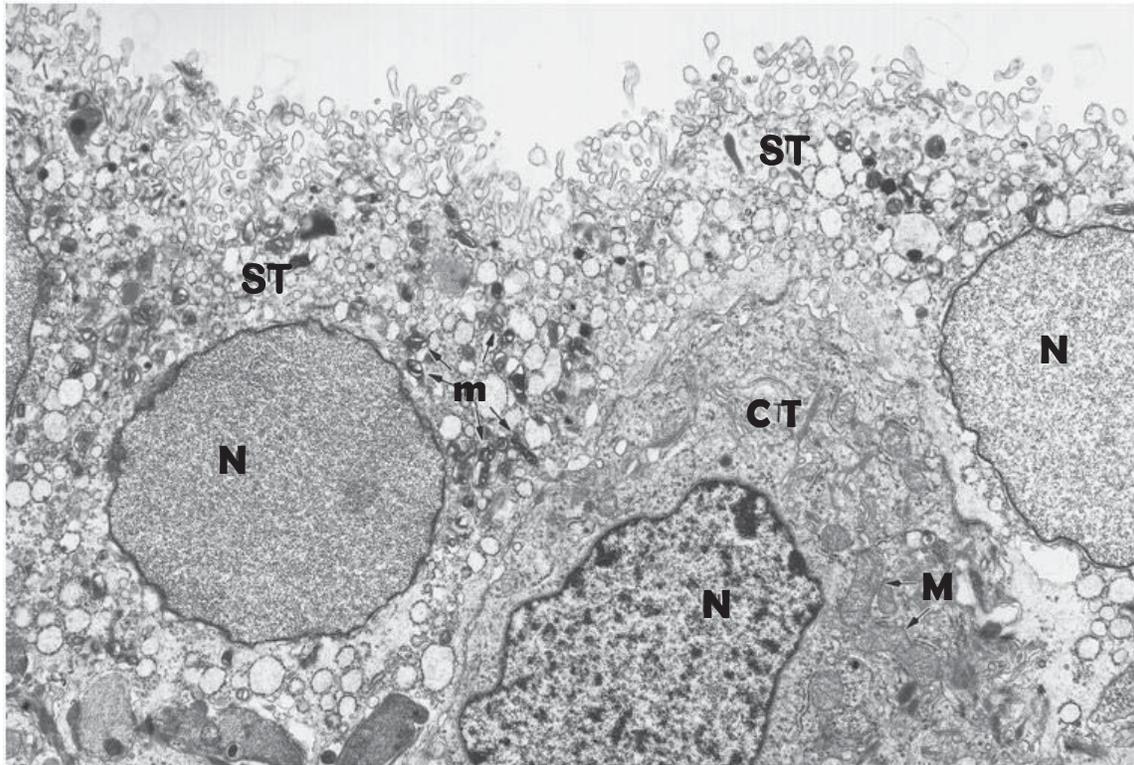


Figura 4.- Ultraestructura de células humanas de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto. Microfotografía electrónica de las vellosidades de la placenta humana, mostrando el sincitiotrofoblasto (ST) y el citotrofoblasto subyacente (CT). Núcleo (N) y mitocondria (M) y (m) (Martínez y col., 1997).

A pesar de la amplia variedad de formas y tamaños que presentan las mitocondrias, tienen como característica común la membrana externa e interna como barrera de permeabilidad selectiva. En la membrana interna esta propiedad permite establecer un gradiente de iones que es esencial para llevar a cabo su función primaria que es la síntesis del ATP (Vázquez y Tuena de Gómez-Puyou, 2002).

1.6.1 La cadena transportadora de electrones

Desde el punto de vista de la bioenergética, las mitocondrias son los orgánulos de las células eucariontes aeróbicas, donde ocurren las transformaciones energéticas más importantes: la oxidación de sustratos y la fosforilación de ADP para formar ATP. Estos dos fenómenos se reúnen conceptualmente en uno solo, conocido como la fosforilación oxidativa (Vázquez y Tuena de Gómez-Puyou, 2002).

La estructura de la membrana interna mitocondrial permite fijar los componentes de la cadena respiratoria en un ordenamiento secuencial que facilita la transferencia de electrones entre ellos, lo que determina una alta velocidad y eficiencia del sistema. Durante las reacciones enzimáticas involucradas en la glucólisis, en la oxidación de ácidos grasos y en el ciclo de Krebs, los equivalentes reductores [nicotinamida adeninucleótido reducido (NADH) y dinucleótido de flavina y adenina reducido (FADH₂)], generados por la oxidación de moléculas en dichas vías metabólicas, inician la fosforilación oxidativa. La cadena respiratoria transfiere los electrones del NADH o FADH₂, generados por la oxidación de nutrientes, hasta el O₂. La energía liberada por las reacciones redox que se llevan a cabo en los complejos es almacenada en forma de un gradiente de protones que es responsable de la generación del gradiente electroquímico ($\Delta\Psi$), el cual es usado por la ATP sintasa para la formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi). El $\Delta\Psi$ es necesario también para el transporte iónico y de proteínas (Lehninger y col., 2000).

La cadena respiratoria es un ensamble de más de 20 captadores de electrones capaces de experimentar cambios reversibles en su estado redox (Fig.5). Se encuentran principalmente asociados, ya sea de manera covalente o no covalente, a estructuras proteicas oligoméricas que forman grandes complejos enzimáticos embebidos de manera parcial en la membrana interna mitocondrial (Calderón-Cortés, 2008). A continuación, se describen algunas particularidades de cada uno de los complejos:

1. Complejo I (NADH: ubiquinona oxidorreductasa): también conocido simplemente como NADH deshidrogenasa, cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona con el bombeo de cuatro protones hacia el espacio intermembranal.
2. Complejo II (Succinato: ubiquinona oxidorreductasa): es una enzima que tiene una función dual: participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs) y como complejo de la cadena respiratoria; esto lo coloca como un regulador importante

en el metabolismo. Cataliza la oxidación de succinato a fumarato, y transfiere los electrones vía FADH_2 a la poza de ubiquinona de la cadena respiratoria. Este es el único complejo respiratorio que no es una bomba de protones: la transferencia de electrones no está acoplada a la generación del gradiente electroquímico.

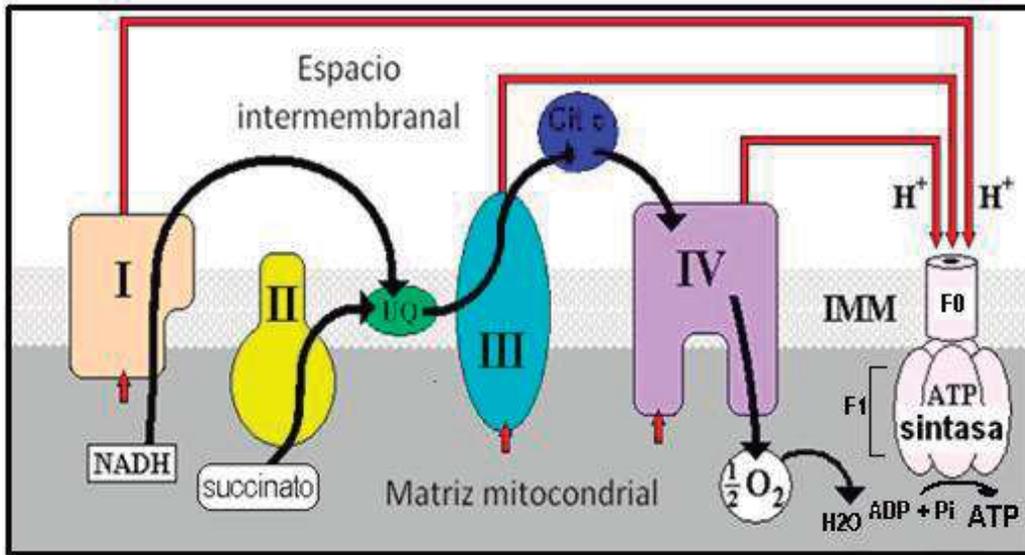


Figura 5.- Cadena transportadora de electrones (CTE). La energía obtenida a través de la transferencia de electrones (flechas negras) a lo largo de la CTE es usada para bombear protones (flechas rojas) desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, creando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna denominado $\Delta\Psi$. Este gradiente electroquímico de protones permite a la ATP sintasa utilizar el flujo de H^+ que se genera a través de esta enzima para generar ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico [3].

1. Complejo III (Ubiquinol: citocromo *c* oxidorreductasa): este complejo, denominado también complejo *bc₁*, cataliza la oxidación del ubiquinol y la reducción del citocromo *c* soluble. Es un complejo proteico oligomérico que transfiere dos electrones desde un quinol de relativamente bajo potencial redox a un citocromo *c* y bombea cuatro protones al lado electropositivo de la membrana por cada par de electrones transferidos a dos moléculas de citocromo *c*.
2. Complejo IV (Citocromo *c* oxidasa): es el componente terminal de la cadena respiratoria. La enzima cataliza la transferencia de cuatro electrones provenientes de cuatro moléculas de citocromo *c* reducido hacia una molécula de oxígeno, produciendo dos moléculas de agua y consumiendo cuatro protones; contribuyendo también a la generación del gradiente electroquímico de protones. La citocromo *c*

oxidasa contribuye de manera importante a la formación del gradiente electroquímico, por lo que esta sección de la cadena respiratoria se le conoce como sitio III de acoplamiento.

3. Complejo V (ATP sintasa): Es la enzima que aprovecha el gradiente electroquímico generado por la cadena respiratoria para fosforilar el ADP y transformarlo en ATP. La ATP sintasa tiene un diámetro de 10 nm, y es el complejo más pequeño identificado hasta ahora. Trabaja con un grado de efectividad cercano al 100%. Esta enzima está formada por dos componentes principales; uno anclado a la membrana mitocondrial interna, llamado F_0 , y otro que sobresale por la cara interna de la estructura llamada F_1 . El componente F_0 , es el motor impulsado por protones (Vázquez y Tuena de Gómez-Puyou, 2002).

La formación del ATP depende de la presencia de adenosín difosfato (ADP) y P_i . En condiciones fisiológicas, la membrana mitocondrial tiene una alta concentración de P_i , de manera que la concentración de ADP es la reguladora de la velocidad de los procesos. Al estado metabólico caracterizado por la presencia de sustrato oxidable, ausencia de ADP y consumo lento de oxígeno, se le denomina estado 4. La adición de ADP promueve un consumo de oxígeno rápido (estado 3), que se mantiene hasta que todo el ADP sea transformado a ATP y regrese al estado 4. La relación entre la respiración en estado 3 y estado 4 se denomina cociente respiratorio, el cual es usado para expresar el grado de acoplamiento entre los procesos de oxidación y fosforilación. Valores bajos del cociente respiratorio indican mitocondrias dañadas o desacopladas (Chance y Williams, 1956).

La integridad de las mitocondrias es especialmente susceptible al daño oxidativo, ya que es una fuente intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO), pero también principal blanco de ellas, provocando una disminución en la síntesis de ATP mitocondrial, pérdida de la homeostasis de calcio celular e inducción de la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, los cuales inducen a la célula a apoptosis (Mataix, 2005).

1.7 Estrés oxidativo y nitrosativo y su relación con la preeclampsia

El estrés oxidativo puede derivarse como consecuencia de un incremento de la exposición a oxidantes o del descenso de la protección contra estos oxidantes; lo cual puede ocurrir simultáneamente (Davies, 1999). Se define como un desbalance ente la producción de

ERO y la protección antioxidante (enzimática y no enzimática) (Many y col., 2000). De igual manera, el estrés nitrosativo se refiere al desequilibrio entre especies reactivas de nitrógeno (ERN) y los sistemas antioxidantes. Por lo tanto, son susceptibles al daño oxidativo proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Padmini y col., 2009).

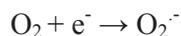
Estudios recientes indican que la patogénesis de la preeclampsia está asociada con el estrés oxidativo que ocurre en la mitocondria (Padmini y col., 2009).

1.7.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las ERO son moléculas pequeñas que contienen oxígeno, altamente reactivas, las cuales pueden ser altamente tóxicas e iniciar reacciones en cadena que pueden comprometer la vida de la célula. Dentro de las ERO se incluyen a los radicales libres (RL) de O_2 . Un RL se puede definir como aquella especie química que posee un electrón (e^-) desapareado. Se incluyen entre las ERO al radical superóxido (O_2^{\bullet}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Martínez, 2005).

1.7.1.1 Radical superóxido (O_2^{\bullet})

Es un radical cargado negativamente, producto de la reducción del oxígeno molecular.



La mitocondria es uno de los principales sitios de producción del O_2^{\bullet} en la célula, debido a que en la CTE, una pequeña parte del oxígeno consumido es reducido principalmente por los electrones provenientes de los sitios redox de la CTE (Grenn y col., 2004). Los principales sitios de producción de radical superóxido son los complejos I y III (Fig. 6).

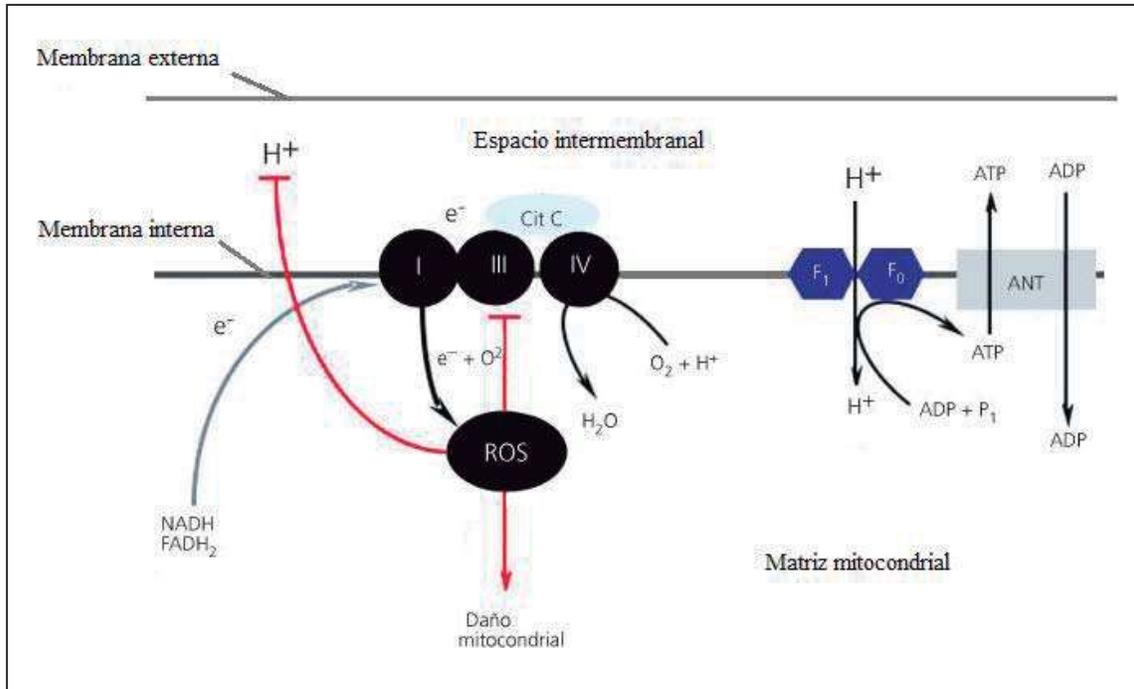


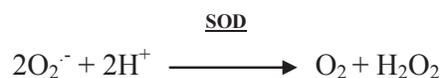
Figura 6.- Generación de ERO en mitocondria. El oxígeno consumido es reducido principalmente por los electrones provenientes de los sitios redox de la CTE, siendo los complejos I y III los principales productores del radical superóxido (Buqué y col., 2008).

El O_2^- tiene la capacidad de reaccionar con muchos compuestos orgánicos e inorgánicos, tales como quinonas, metales de transición, ascorbato, α -tocoferol, catecolaminas, tioles, hemoproteínas y enzimas como la aconitasa (Grenn y col., 2004).

Es importante señalar que el O_2^- tiene efectos benéficos a dosis moderadas, ya que participa en la vasoconstricción en células del músculo liso (Laurino y col., 1991), entre muchas otras.

1.7.1.2 Peróxido de hidrógeno

Es un metabolito del oxígeno, formado por la dismutación del O_2^- , reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD).



El H₂O₂ no es un radical libre debido a que no posee ningún electrón desapareado, pero es una ERO por su alta reactividad en presencia de metales de transición generando un potente oxidante, el radical hidroxilo (OH[•]) (Fridovich, 1995).

1.7.1.3 Radical hidroxilo

Es el radical más reactivo entre ERO, tiene la capacidad de reaccionar de modo directo con cualquier clase de molécula biológica a una velocidad elevada (Fridovich, 1995).

El mecanismo de producción del OH[•] es primordialmente por la descomposición del H₂O₂ en presencia de metales de transición, principalmente el ión ferroso (Fe²⁺) y cúprico (Cu²⁺), por la reacción de Fenton (Minotti y col., 1987).



Este radical es el principal responsable del daño a los lípidos de membrana, mediante el proceso de la lipoperoxidación.

1.7.2 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

La reacción del óxido nítrico (NO[•]) con las ERO favorece la generación de especies reactivas de nitrógeno (ERN), las cuales son capaces de reaccionar con diversas biomoléculas por medio de reacciones de oxidación, hidroxilación, nitrosilación y nitración. Aunque esto puede ocurrir en condiciones fisiológicas normales; en ciertas circunstancias, cuando existe una producción elevada en ERN mayor que los niveles de antioxidantes, se establece una condición conocida como “estrés nitrosativo” (Valko y col., 2007; Guzmán y col., 2006).

1.7.2.1 Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO[•]) tiene carácter de radical libre al contener un electrón desapareado. Sin embargo, es una especie biológica relativamente estable con una vida media mayor a la de otras ERN (Rojo y col., 2003). Es sintetizado en los organismos vivos a partir de L-arginina, por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS) (Figura 7).

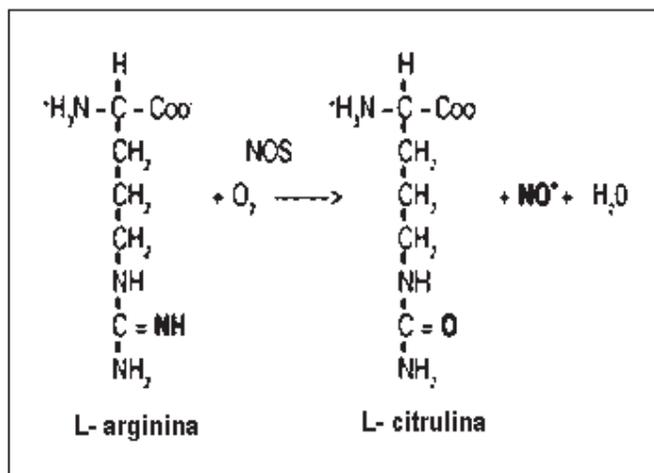


Figura 7.- Reacción catalizada por la NOS. La óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la reacción de oxidación de la L-arginina para generar y L-citrulina y NO^\bullet [4].

El NO^\bullet tiene una importancia biológica en diversos organismos, ya que participa en procesos como la neurotransmisión, la vasodilatación, la respuesta inmune y en la regulación del consumo de oxígeno en la mitocondria. El NO^\bullet ejerce sus acciones biológicas a través de reacciones con diversas biomoléculas como se describe a continuación.

- Reacciones con metaloproteínas: dan lugar a la unión del NO^\bullet a hemoproteínas como la guanilato ciclasa, la citocromo oxidasa mitocondrial y a proteínas con centros hierro-azufre (Fe-S) tales como, la aconitasa (Castro y col., 1994).
- Reacción con grupos sulfhidrilos: lleva a la formación de nitrosotioles, que representan formas de almacenamiento de NO^\bullet (Rojo y col., 2003).
- Reacción con el oxígeno: en medios aerobios, el NO^\bullet reacciona con el oxígeno molecular para generar dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet), el cual es también un radical libre, con mayor poder oxidante que el NO^\bullet (Rojo y col., 2003).
- Reacción con el anión superóxido: da lugar a la formación de una especie no radical, el anión peroxinitrito (ONOO^-), que es una molécula inestable y reactiva, que en ausencia de otras moléculas se isomeriza a nitrato. Tanto el anión peroxinitrito como su ácido conjugado, son oxidantes fuertes que atacan un número variado de biomoléculas (Rojo y col., 2003).
- Reacción con radicales orgánicos: reacciona a velocidades elevadas. Destacan las reacciones con los radicales lipídicos que aparecen durante los procesos de

peroxidación de membranas tales como el radical lipoperóxido (LOO^\bullet), que da lugar a la formación de complejos de lípidos con el NO^\bullet (Rojo y col., 2003).

En la mitocondria el NO^\bullet compete con el O_2 por el sitio de unión binuclear a_3Cu del complejo IV de una manera reversible. La inhibición del consumo de O_2 por el NO^\bullet disminuye el potencial transmembranal y el gradiente electroquímico (Ghafourifar y Richter, 1997). La regulación fisiológica del consumo de oxígeno representa un efecto benéfico, sin embargo, si la inhibición por el óxido nítrico de la citocromo *c* oxidasa es prolongada, ocasiona la generación del anión superóxido y puede reaccionar con el NO^\bullet para formar ONOO^- , el cual provoca daños celulares irreversibles (Tórtora y col, 2007).

1.7.2.2 Relación de óxido nítrico y la preeclampsia

Algunos autores han encontrado disminución de los metabolitos del NO^\bullet en suero y orina en pacientes con preeclampsia, pero no en el plasma (Silver y col., 1996). También, se encontró que el sistema de GMPc estaba disminuido en la orina o incrementado en el plasma de mujeres con preeclampsia (Begum y col., 1996). En la circulación feto-placentaria (vena umbilical) se encontró que la concentración de NO^\bullet era invariable en la preeclampsia (Boccardo y col., 1996). Estudios recientes demuestran el incremento en los metabolitos del NO^\bullet (NO_2^- y NO_3^-) en mitocondrias de placenta con preeclampsia (Padmini y col., 2009).

1.7.2.3 Peroxinitrito

El peroxinitrito (ONOO^-) es un oxidante muy potente, producido por la reacción del anión superóxido y el óxido nítrico (Radi, 2000).



Tanto el anión peroxinitrito, como su ácido conjugado, son oxidantes fuertes que atacan un número variado de biomoléculas, incluso sulfhidrilos de bajo y alto peso molecular, metalproteínas, lípidos, carbohidratos y ADN, dando lugar a la formación de productos oxidados y nitrados (Beckaman y col., 1990).

La mitocondria representa un blanco de las acciones tóxicas del peroxinitrito. Radi y col. (1994), mostraron que el peroxinitrito afecta varios componentes de la CTE (los

complejos I, II y III) y de la síntesis de ATP, así como el centro Fe-S de la aconitasa, causando una inhibición de la respiración y una caída de la síntesis de ATP o dañando el ADN con la subsecuente activación de una enzima que consume energía, la poli (ADP-ribosa) sintetasa (Bolaños y col., 1997). Dichos efectos, tienen un impacto sobre la homeostasis del calcio. Además, la interacción del peroxinitrito con las mitocondrias puede determinar la señalización de procesos de muerte celular programada, apoptosis (Radi, 2000).

Lowe (2000), propone que en la preeclampsia, la deficiencia de NO^{*} (secundaria al daño oxidativo) y el aumento de ONOO⁻, contribuyen directa e indirectamente en dicha patología, de acuerdo con estudios realizados en vasos sanguíneos de placentas de pacientes con preeclampsia (Roggensack y col., 1999).

1.7.3 Daño a biomoléculas por ERO y ERN

Los efectos tóxicos ocasionados en las células debido a las ERO y ERN son consecuencia de su interacción con lípidos de membranas, proteínas y ácidos nucleicos. Dichas alteraciones afectan la función placentaria en patologías del embarazo tales como la diabetes gestacional, el aborto y la preeclampsia (Myatt y Cui, 2004).

1.7.3.1 Daño a lípidos

Las membranas celulares son susceptibles a la oxidación, entre las que destaca la membrana mitocondrial debido a su alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados (AGP). Los AGP tienen en su estructura química dobles enlaces separados por grupos metileno, lo que hace que las uniones C-H sean considerablemente susceptibles al daño por ERO (Velázquez y col., 2004).

El radical OH^{*}, ataca un AGP en el carbono adyacente a un doble enlace y provoca un rompimiento hemolítico de un enlace C-H por la sustracción de un hidrógeno, lo cual genera un radical lipídico (L^{*}) al retener el ácido graso un electrón desapareado. El radical L^{*} capta el oxígeno y se forma un peróxido lipídico (LOO^{*}). Este compuesto es altamente reactivo, capaz de sustraer un átomo de hidrógeno de la cadena insaturada vecina para transformarse en un hidroperóxido (LOOH) inestable, mientras que el radical lipídico formado (LOO^{*}) puede reiniciar el ciclo, generándose así una reacción en cadena (Fig. 8). La reacción en cadena

finaliza con la interacción de un LOO^\bullet con otro radical o con un antioxidante. El hidroperóxido lipídico puede fragmentarse en compuestos tales como el malondialdehído (MDA) o el 4-hidroxi nonenal (4-HNE) (Velázquez y col., 2004).

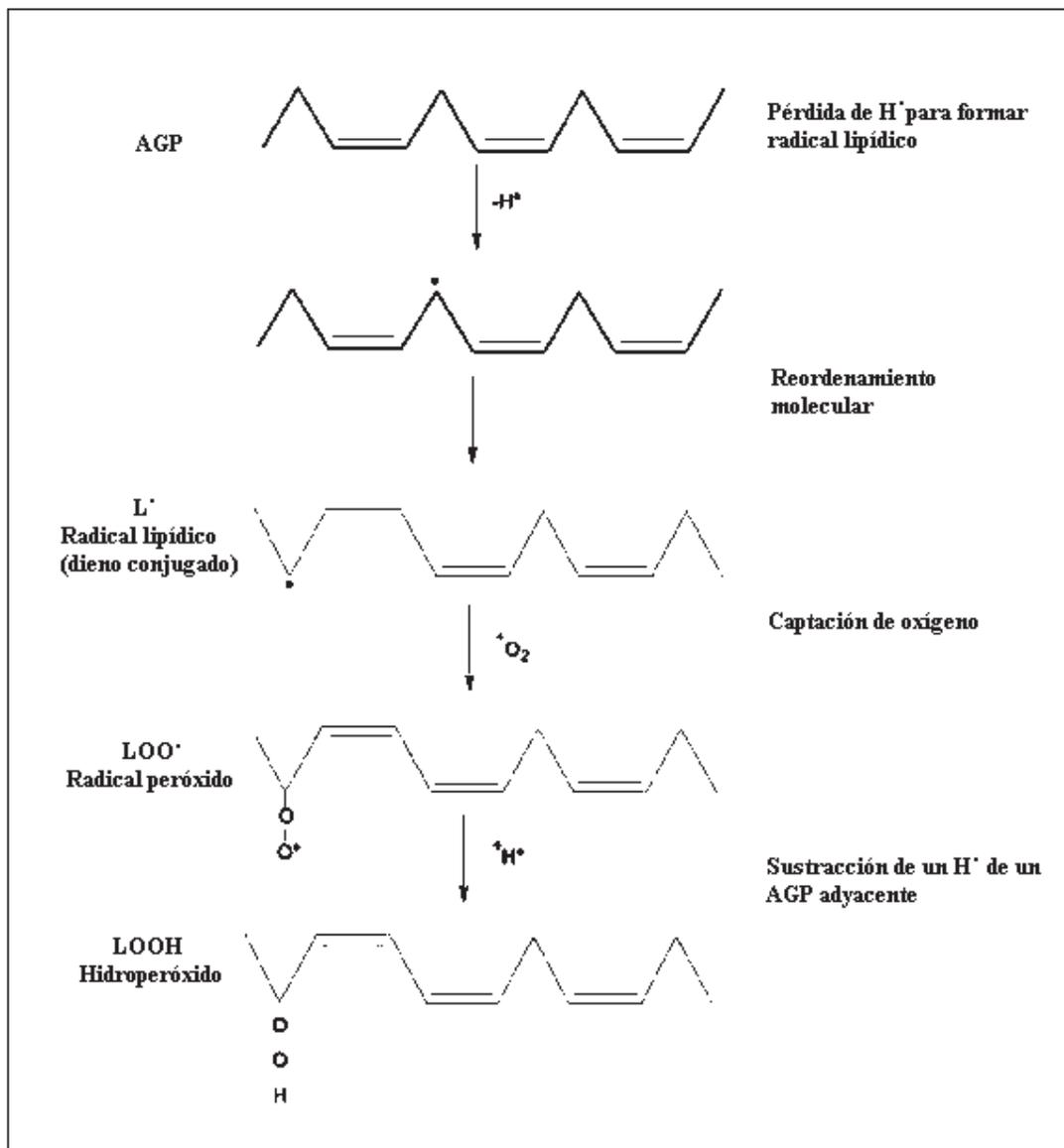


Figura 8.- Esquema de la lipoperoxidación. En la figura se muestra la reacción en cadena de la lipoperoxidación. Una especie, principalmente el OH^\bullet capta un átomo de hidrógeno de un doble enlace de un ácido graso poliinsaturado formando un radical lipídico (L^\bullet), el cual en contacto con el oxígeno, se transforma en un peróxido lipídico (LOO^\bullet) que es capaz de extraer un átomo de hidrógeno de una cadena insaturada adyacente y transformarse en un hidroperóxido (LOOH). La reacción en cadena finaliza con la interacción de un LOO^\bullet con otro radical o con un antioxidante y el LOOH puede fragmentarse produciendo compuestos como el MDA [5].

Los productos de la lipoperoxidación son aldehídos, cetonas, ésteres y alcoholes. Este proceso repetitivo provoca que la membrana pierda sus propiedades fisicoquímicas, así como a la inhibición de la actividad de proteínas enzimáticas asociadas a la misma y culmina con la muerte de la célula (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Padmini y col. (2009), demostraron en mitocondrias de placenta con preeclampsia que los niveles de MDA se encuentran elevados, consecuencia del daño oxidativo en la membrana provocado por las ERO.

1.7.3.2 Daño a proteínas

Las proteínas son blanco de las ERO/ERN, provocando graves daños sobre el metabolismo y la arquitectura celular, induciendo a su destrucción (Comporti, 1985; Stadman, 1992).

Webster y col. (2008) proponen que las proteínas sufren daño de diversas formas:

- Oxidación y nitrosilación de los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina) al actuar a nivel de los enlaces insaturados, en los anillos aromáticos y en los grupos tiol (-SH) y produciendo cambios en otros aminoácidos como la arginina, lisina, cisteína, entre otros, dando lugar a aldehídos.
- Fragmentando proteínas mediante el radical OH^\bullet producido por la reacción del H_2O_2 con metales de transición.
- Formando entrecruzamientos y agregación de proteínas.

1.7.3.3 Daño de los ácidos nucleicos

El ADN es especialmente susceptible al daño causado por ERO. Se ha calculado que las ERO, causan modificaciones en diez mil bases del ADN por célula cada día. El principal agente dañino es el radical OH^\bullet . Las ERO y ERN fragmentan las cadenas de ADN y modifican las bases nitrogenadas que van a ser incorporadas al ADN, lo que produce derivados desoxiguanosina que provocan importantes mutaciones (Fraga y col., 1990). Las enzimas reparadoras del ADN pueden eliminar la mayoría del daño oxidativo, pero no en su totalidad. El daño oxidativo en el ADN mitocondrial es unas 15 veces mayor que al ADN

nuclear debido a la cercanía del ADN a la CTE y a la carencia de histonas (Fraga y col., 1990).

1.8 Aconitasa

La aconitasa [citrato (isocitrato) hidratasa, EC 4.2.1.3] es una enzima del ciclo de Krebs que cataliza la isomerización reversible de citrato a isocitrato mediante la introducción de una molécula de agua sobre un doble enlace de su cadena carbonada.

El citrato experimenta un reordenamiento, la transposición del grupo hidroxilo de la posición 3 a la posición 2 formando el isocitrato, su isómero. El proceso consta de una deshidratación para formar el producto intermediario “*cis*-aconitato”, que se hidrata y el resultado final es la transposición del grupo hidroxilo de la molécula (Fig. 9).

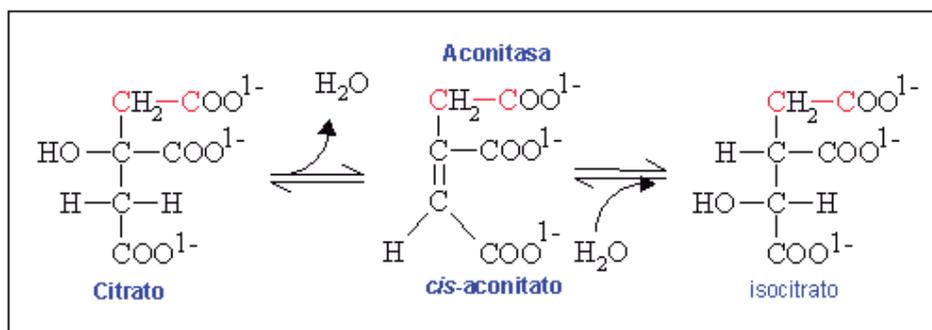


Figura 9. Reacción de la aconitasa. Se muestra la reacción que cataliza la enzima aconitasa de citrato a isocitrato vía *cis*-aconitato [6].

La enzima presenta un centro 4Fe-4S cúbico esencial para su actividad catalítica. Tres de los átomos de hierro en la estructura cúbica se encuentran unidos a azufres de la cisteína del esqueleto de la aconitasa; mientras que el cuarto átomo hierro (Fe_{α} , llamado hierro lábil) se encuentra ligado a un azufre inorgánico y participa en la unión del sustrato al sitio activo interaccionando con grupos carboxilo e hidroxilo de este. Este centro es responsable de la susceptibilidad de la aconitasa a las ERO y ERN (Fig. 10).

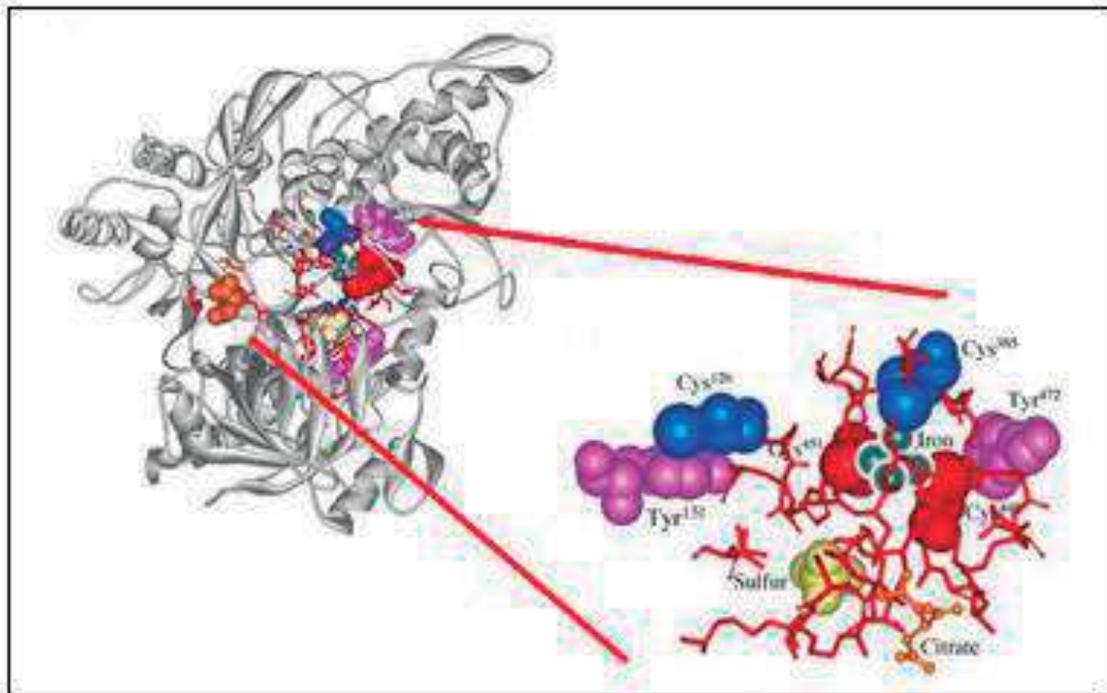


Figura 10.- Estructura de la aconitasa. Estructura tridimensional de la aconitasa, señalando la ubicación de su centro $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ [7].

La exposición de la aconitasa al superóxido y peroxinitrito provoca la liberación del Fe^{α} del centro $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, produciendo $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ con la subsecuente inactivación de la enzima. A su vez, el átomo de Fe libre puede catalizar la formación de radical OH^{\bullet} mediante la reacción de Fenton. Debido a su alta sensibilidad a las ERO, la actividad de la enzima se emplea como marcador de daño oxidativo y/o nitrosativo. La aconitasa sufre una inactivación de manera dependiente a la concentración de ONOO^{-} (Fig. 11) (Castro y col., 1994).

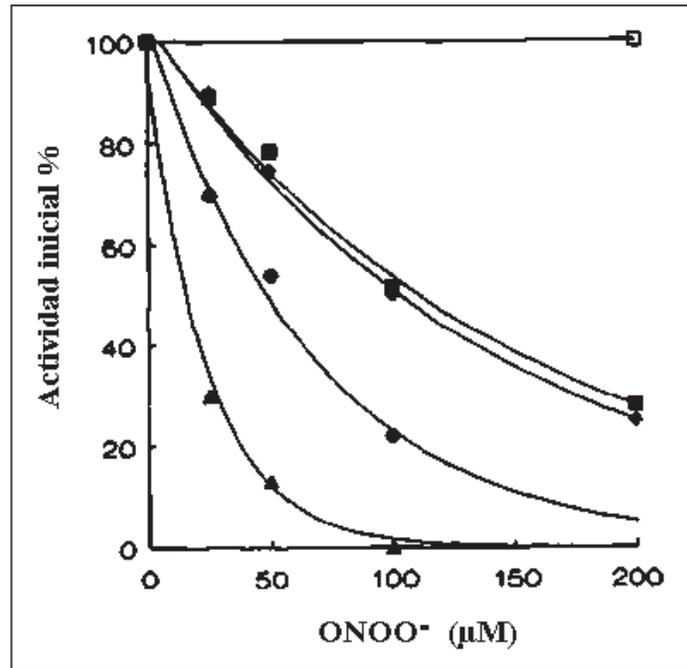


Figura 11. Inactivación de la aconitasa mitocondrial de corazón de cerdo por el peroxinitrito. Diferentes concentraciones de aconitasa (7.25 (▲), 24.2 (●), 48.3 (◆) y 109 (■) μM) fueron incubadas con 50, 100, 150 y 200 μM de peroxinitrito y se cuantificó la actividad enzimática después de incubar por 5 minutos (Castro y col., 1994).

2. JUSTIFICACIÓN

Durante la preeclampsia existen alteraciones asociadas a la producción excesiva de ERO y en el metabolismo de NO'. La mitocondria es blanco de las ERO y ERN, por lo tanto la disfunción mitocondrial es un factor determinante en el desarrollo de la preeclampsia y aunado a la alta prevalencia de preeclampsia en las muertes maternas en Michoacán, es importante estudiar el estrés oxidativo para el futuro de nuevas intervenciones terapéuticas y farmacológicas.

3. HIPÓTESIS

La preeclampsia está asociada el estrés oxidativo y nitrosativo de mitocondrias de placenta humana.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Determinar los niveles de estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias provenientes de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto de placenta humana de pacientes normales y con preeclampsia.

4.2 Objetivos Específicos:

- Medir los niveles de consumo de oxígeno de mitocondrial
- Determinar los niveles de lipoperoxidación mitocondrial
- Determinar los niveles de óxido nítrico mitocondrial
- Cuantificar la actividad de la enzima aconitasa como marcador de daño oxidativo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Todos los reactivos y sustancias utilizadas fueron de grado reactivo y se adquirieron de Sigma Chemical Inc. (Eugene OR, USA) y JT Baker.

5.2 Material biológico

De acuerdo al convenio realizado con el comité de ética del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva”, se utilizaron placentas de pacientes normotensas y con preeclampsia, las cuales fueron proporcionadas con los datos que comprueban embarazo normal y con preeclampsia. Las placentas se colectaron inmediatamente después del parto, posteriormente, se les agregó un buffer de fosfatos (PBS) que contenía NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10.1 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, a pH 7.3 y se colocaron en un contenedor especial con hielo, para ser transportadas al Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, donde fueron procesadas.

5.3 Aislamiento y purificación de las mitocondrias de placenta

Las mitocondrias fueron aisladas de acuerdo al método descrito por Martínez y col., (1997). Las placentas fueron procesadas durante los primeros 30 minutos después del parto. Los cotiledones fueron separados y lavados con un medio con 250 mM de sacarosa y 1 mM de EDTA (pH a 7.4 con Tris-base). El tejido fue homogenizado en 20 ml de este medio a 1,000 rpm de 1-2 veces. El pH del homogenado se ajustó a 7.4 con Tris-base y se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min para remover los restos celulares. Posteriormente, se decantó el sobrenadante en un tubo previamente frío y se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min a. A continuación, se decantó el sobrenadante, el cual se guardó a 4 °C, mientras que el precipitado, el cual contiene las mitocondrias de citotrofoblasto, se resuspendió cuidadosamente en 3 ml del medio y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 2 ml de medio. El sobrenadante guardado se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min. Después, se desechó el sobrenadante y el precipitado, el cual contiene las mitocondrias de sincitiotrofoblasto, se resuspendió

cuidadosamente en 3 ml del medio y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min. Después se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 2 ml de medio. Posteriormente, ambos precipitados mitocondriales se colocaron por separado en un gradiente de sacarosa al 35%, 1 mM EDTA y 10 mM de Tris-base, (pH 7.4) y se centrifugaron a 15,000 rpm durante 40 min. A continuación, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en suficiente medio, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min y se desechó el sobrenadante. Por último, la pastilla se resuspendió en 1 ml de medio y se determinó la concentración de proteína. Todos los procedimientos se realizaron a 4°C, mientras que las centrifugaciones se realizaron con el rotor JA20 de una centrifuga Beckman.

5.4 Determinación de la proteína mitocondrial

La concentración de la proteína mitocondrial se determinó por el método de Lowry (Lowry 1951). El procedimiento se realizó por duplicado. Para realizar la curva de calibración, se agregaron los volúmenes correspondientes a 0, 12.5, 25, 75 y 100 µg de albúmina sérica bovina a partir de una solución patrón de 0.5 mg/ml y se completó un volumen de 200 µl en cada tubo con agua desionizada. En el caso de las muestras mitocondriales, se agregó 10 µl de muestra y 190 µl de agua desionizada. Tanto a la curva de calibración como a las muestras se les agregó 1ml de solución C (compuesta por una mezcla de la solución A: Na₂CO₃ al 2%, NaOH al 0.4%, tartrato de sodio y potasio al 0.2% y la solución B: CuSO₄ al 0.5%), se agitó y se dejó reposar por 30 min. Al término de este tiempo, se determinó la absorbencia de las muestras a 660 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Se graficó la curva de calibración en Excel (Microsoft Office) y por extrapolación se estimó la concentración de proteínas de las muestras, empleando la línea de correlación.

5.5 Determinación del consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno mitocondrial fue determinado con un electrodo de tipo Clark acoplado a un monitor biológico de oxígeno YSI 5300 y un graficador. El medio de respiración consistió en una solución con 250 mM de sacarosa, 10 mM de H₃PO₄-Tris (pH 7.4), 10 de mM MgCl₂, 1 mM de EGTA y 0.1% de albúmina sérica bovina. Se agregó 1 mg/ml de proteína mitocondrial y succinato 10 mM como sustrato oxidable (estado 4), en presencia de 2 µM de rotenona para inhibir el transporte reverso de electrones del complejo II

al complejo I y la formación de ERO en este complejo. Para estimular la fosforilación oxidativa (estado 3), se agregó 200 μM de ADP.

5.6 Determinación de la lipoperoxidación

Para determinar los niveles de lipoperoxidación se utilizó una modificación del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Buege y Aust, 1978). Por medio de este método se cuantifica la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por las siglas en inglés de ThioBarbituric Acid Reactive Species) entre las cuales se encuentra el malondialdehído, uno de los principales producto de la oxidación de lípidos (Fig. 12).

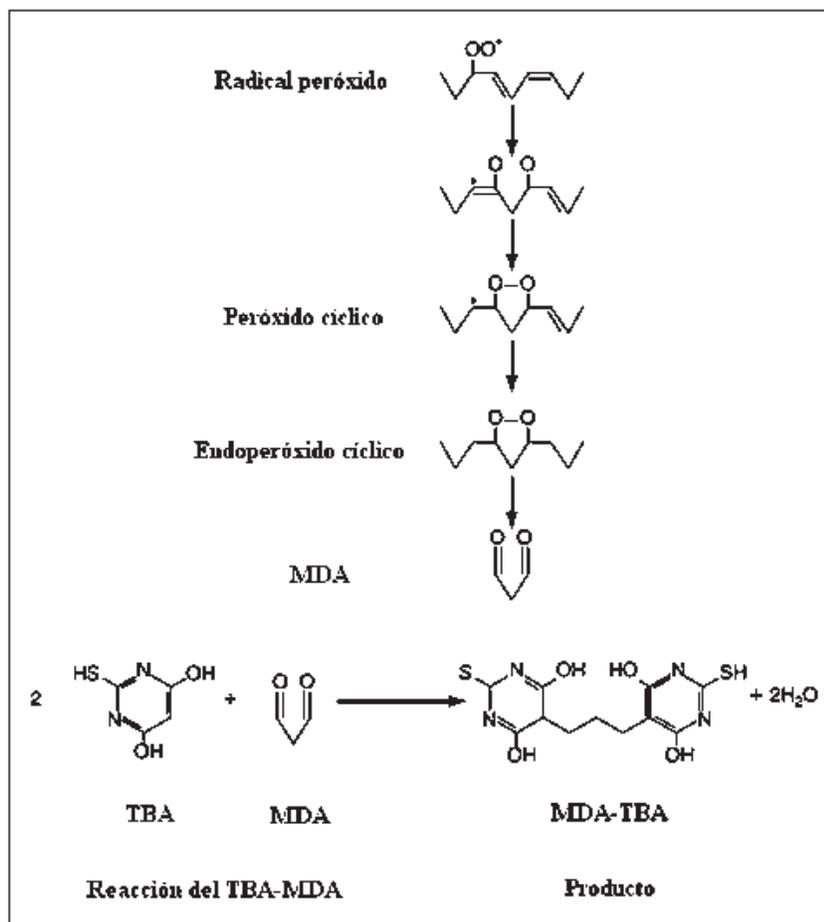


Figura 12.- Diagrama de la formación del aducto MDA-TBA. En la figura se muestra las reacciones involucradas en la formación del malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la lipoperoxidación. Se muestra también la reacción entre el MDA y el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar el aducto MDA-TBA, el cual se cuantifica espectrofotométricamente a 532 nm [8].

En tubos de ensaye se agregó 1 mg de proteína mitocondrial y medio de reacción de 50 mM de KH_2PO_4 50 mM (pH 7.4) hasta completar un volumen de 1 ml. Se preincubó con diferentes concentraciones de FeSO_4 durante 30 min con agitación suave. Posteriormente, se adicionó a cada tubo 2 ml de solución ácida (ácido tricloroacético 15%, TBA 0.375% y HCl 0.25 N) y los tubos se calentaron en un baño de agua hirviendo. Después de 15 min, se colocaron los tubos durante 10-15 min en hielo. Después, se centrifugaron los tubos a 7,500 rpm durante 5 min a 4 °C, se tomó 1.5 ml del sobrenadante y se leyó a una absorbencia de 532 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer. Los resultados fueron expresados en nmoles de TBARS/mg de proteína y se calcularon en base al coeficiente de extinción molar del malondialdehído ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5.7 Determinación del óxido nítrico

La determinación del NO^{\bullet} se realizó de manera indirecta por medio de la cuantificación de nitritos por el método de Griess (Green y col., 1982), el cual consiste en una reacción de diazotización (Fig. 13) para la determinación espectrofotométrica de nitritos formados por la oxidación espontánea de NO^{\bullet} bajo condiciones fisiológicas.

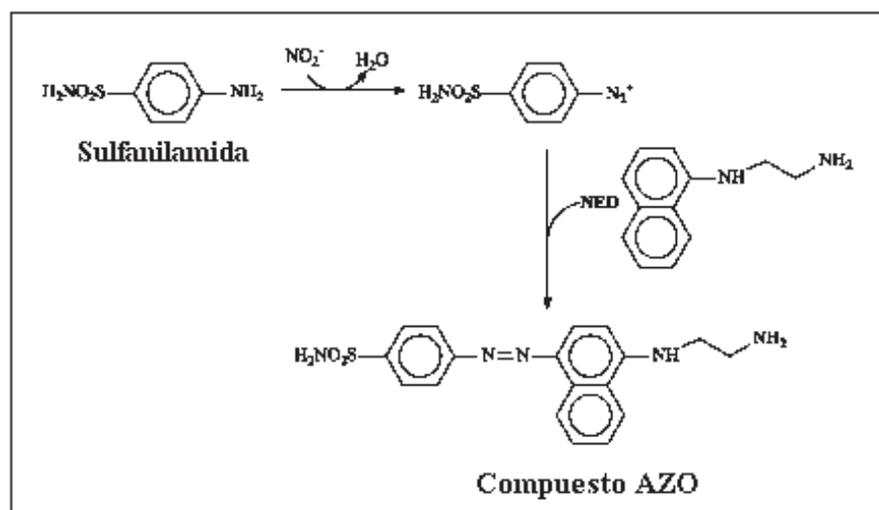


Figura 13.- Determinación indirecta del óxido nítrico. Se muestra la reacción de nitritos (producto del metabolismo del NO^{\bullet}) con el reactivo de Griess, compuesto por sulfanilamida y N-1-naftiletildiamina (NED), produciendo un compuesto AZO, que puede detectarse espectrofotométricamente a 540 nm (Green y col., 1982) [9].

La detección límite para este ensayo está entre 0.1 y 1 μM de nitritos. Se cuantifica el nitrito porque es uno de los principales productos estables y no volátiles del NO^{\bullet} .

El ensayo se realizó agregando en tubos de ensaye, 0.5 mg de proteína mitocondrial y medio de incubación que contenía NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10.1 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, a pH 7.3 y se ajustó a un volumen final de 2 ml. Se incubaron los tubos por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 20 μl de HClO_4 al 0.4% y se incubó por 10 min. Después, se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Por último, se tomó 1400 μl del sobrenadante y se agregó 100 μl de reactivo de Griess. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en ausencia de luz y se determinó la absorbencia de las muestras a 540 nm. Para determinar la concentración de óxido nítrico se preparó una curva estándar empleando concentraciones conocidas de NaNO_2 para obtener concentraciones en el rango μM . La concentración de óxido nítrico se calculó mediante la gráfica obtenida de la curva patrón.

5.8 Determinación de la actividad de la aconitasa

La actividad de la aconitasa se determinó mediante un método directo midiendo la aparición de *cis*-aconitato a una λ de 240 nm (Henson y Cleland, 1976). Se agregó en tubos de ensaye 80 μg de proteína mitocondrial y 250 μl de solución permeabilizante (50 mM de Tris-HCl (pH 7.4) y 0.02% (v/v) de Tritón X-100), se agitó vigorosamente y se incubó durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 9,900 rpm durante 5 min a 4 °C. Se tomaron 200 μl del sobrenadante y se mezcló suavemente con el medio de reacción que contenía 90 mM de Tris-HCl y 20 mM de isocitrato como sustrato (pH= 8) a 30 °C. Finalmente, se determinó la absorbencia a 240 nm. Los resultados fueron expresados en nmoles de *cis*-aconitato/mg de proteína/ min y fueron calculados en base al coeficiente de extinción molar del aconitato (3.6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

5.9 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a la prueba t Student para determinar la significancia ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$) de la diferencia entre los valores promedio respecto al control (mitocondrias de placenta normotensas), utilizando el programa Graph Pad Prism 4.

6. RESULTADOS

6.1 Signos de pacientes normales y con preeclampsia

En la tabla 2 se muestran los datos clínicos que comprueban la presencia de preeclampsia en las pacientes del Hospital General “Dr. Miguel Silva”. Dichos datos fueron proporcionados por el personal del hospital, en los que se puede apreciar, el aumento en la presión arterial en el grupo preecláptico. La proteinuria es otro signo de este síndrome, considerándose significativa la eliminación de más de 300 mg/ml al día en orina. En la tabla 2 se muestran los niveles de proteína en la orina, los cuales se encuentran elevados en el grupo preecláptico, mientras que los datos de las pacientes normales no fueron proporcionados debido a que no fueron relevantes.

Paciente	Edad		Presión arterial (mmHg)		Proteinuria (>300 mg/ml)	
	Normal	Preecláptica	Normal	Preecláptica	Normal	Preecláptica
1	25	29	115/70	150/90	N.D.	900 mg/ml
2	17	30	120/70	140/100	N.D.	350 mg/ml
3	38	23	120/80	160/100	N.D.	380 mg/ml
4	34	19	120/70	190/130	N.D.	700 mg/ml

Tabla 2.- Signos de pacientes normales y con preeclampsia. En la tabla se muestran los principales signos que indican la presencia de preeclampsia, y los signos de pacientes normales que se encuentran dentro del rango descrito como normal. N.D.=no determinado.

6.2 Niveles del consumo de oxígeno

Para determinar la integridad mitocondrial, se midió el consumo de oxígeno en el estado 3 y el estado 4. En la figura 14 se muestra la gráfica representativa del consumo de

oxígeno de mitocondrias provenientes de células de citotrofoblasto de placenta humana de pacientes normotensas, donde se observa que la adición de 10 mM de succinato acelera el consumo de O_2 (15% aproximadamente) y que la adición de 200 μM de ADP tiene un efecto de pequeña magnitud (5% aproximadamente) sobre dicho parámetro.

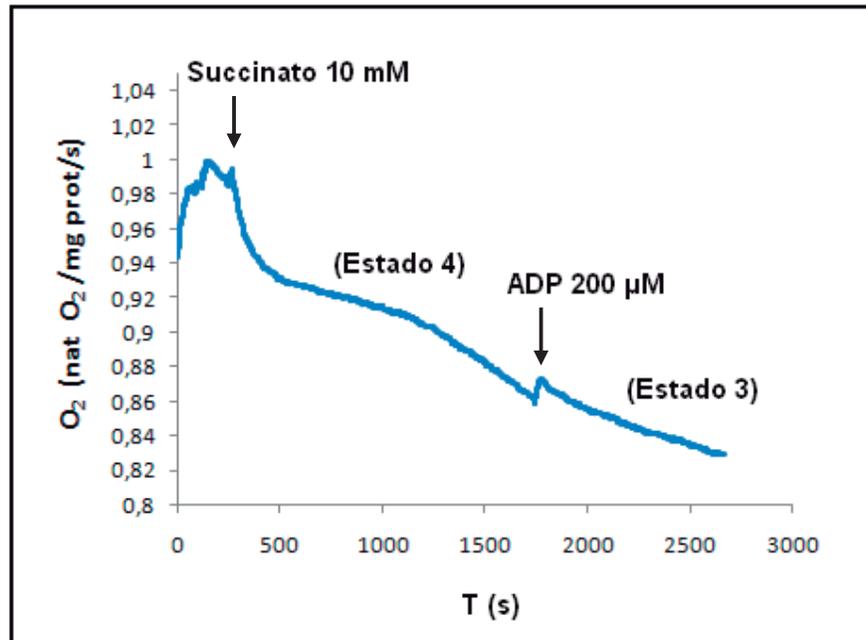


Figura 14.- Consumo de oxígeno de mitocondrias de citotrofoblasto de placenta humana de pacientes normales.- En la figura se muestra el consumo de oxígeno ($\text{nat } O_2 / \text{mg proteína/s}$) estimulado con succinato (estado 4) y en presencia de ADP (estado 3). Se muestra un trazo representativo de una $n=4$.

En la figura 15 se muestra la gráfica representativa del consumo de oxígeno de mitocondrias de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana de pacientes normotensas, donde se observa que la adición de 10 mM de succinato acelera el consumo de O_2 (5% aproximadamente) y que la adición de 200 μM de ADP tiene un efecto de pequeña magnitud (2% aproximadamente) sobre dicho parámetro.

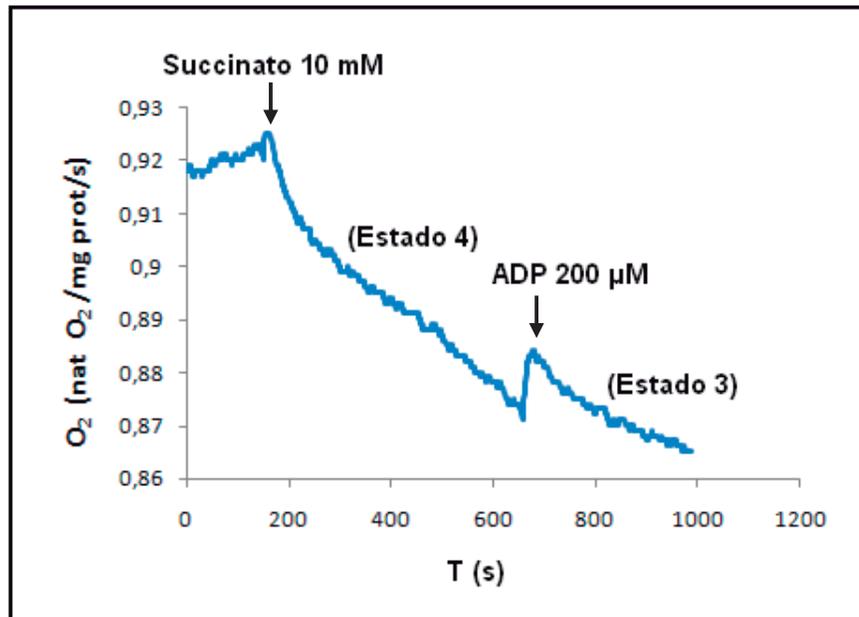


Figura 15.- Consumo de oxígeno de mitocondrias de sincitiotrofoblasto de placenta humana de pacientes normales.- En la figura se muestra el consumo de oxígeno (nat O₂/mg proteína/s) estimulado con succinato (estado 4) y en presencia de ADP (estado 3). Se muestra un trazo representativo de una n=4.

En la figura 16 se muestra una gráfica representativa de 2 experimentos del consumo de oxígeno de mitocondrias de sincitiotrofoblasto de placenta humana de pacientes con preeclampsia; en contraste con lo observado en mitocondrias de mujeres normotensas, se puede observar un aumento en el consumo de oxígeno (20% aproximadamente) y que la adición de succinato y ADP no tuvo ningún efecto. Mientras que en la figura 17 se observa la gráfica que representa los niveles del consumo de oxígeno de mitocondrias de sincitiotrofoblasto de mujeres con preeclampsia correspondiente a 2 experimentos, se puede observar un aumento en el consumo de oxígeno de un 14% aproximadamente y que la adición de succinato y ADP no tuvo ningún efecto.

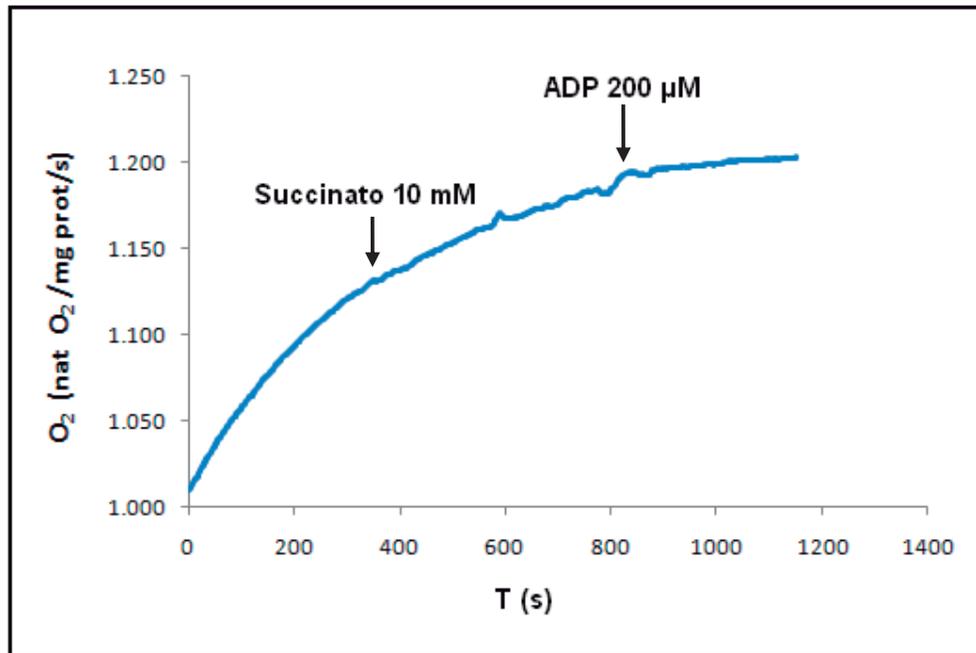


Figura 16.- Consumo de oxígeno de mitocondrias de citotrofoblasto de placenta humana de pacientes con preeclampsia. En la figura se muestra el consumo de oxígeno (nat O₂/mg proteína/s) estimulado con succinato (estado 4) y en presencia de ADP (estado 3). Se muestra un trazo representativo de una n=3.

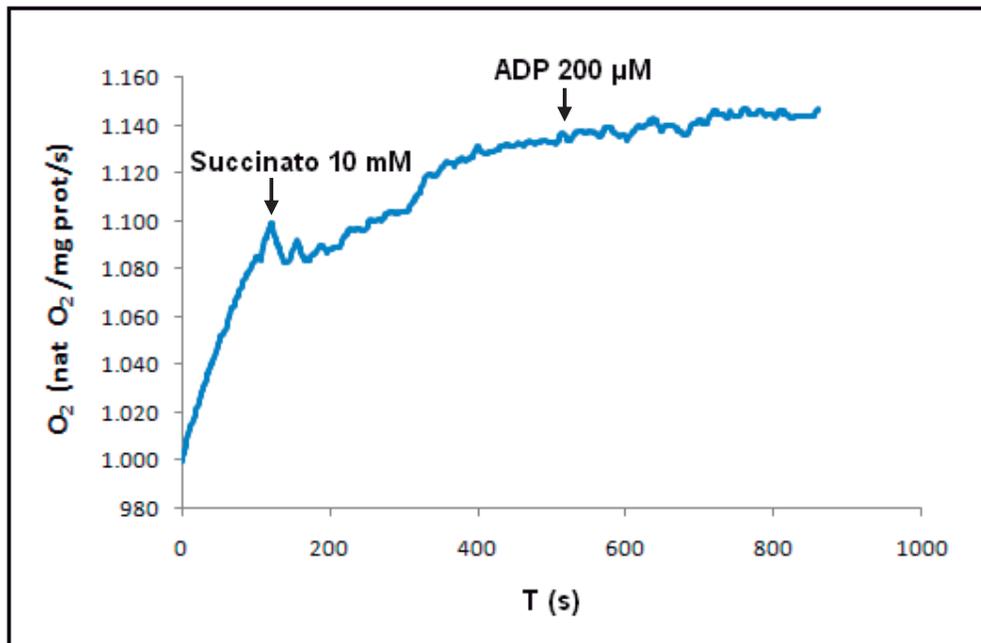


Figura 17.- Consumo de oxígeno de mitocondrias de sincitiotrofoblasto de placenta humana de pacientes con preeclampsia. En la figura se muestra el consumo de oxígeno (nat O₂/mg proteína/s) estimulado con succinato (estado 4) y en presencia de ADP (estado 3). Se muestra un trazo representativo de una n=3.

Para obtener el cociente respiratorio (CR) se dividió el promedio de las velocidades de respiración en el estado 3 entre el promedio de las velocidades en estado 4. Los resultados se muestran en la tabla 3, donde se observa que las mitocondrias de placenta humana provenientes de citotrofoblasto de pacientes normotensas presentan un cociente respiratorio menor 0.60526316 ± 0.49656 en comparación con las mitocondrias de sincitiotrofoblasto 1.42465753 ± 0.13548 debido a una disminución en la velocidad del estado 3, lo cual es indicativo de una menor actividad de la CTE en mitocondrias de citotrofoblasto. En muestras provenientes de ambos tipos de mitocondrias de placentas de pacientes con preeclampsia, no se pudo calcular el cociente respiratorio debido a que como se mencionó anteriormente, en lugar de consumirse el oxígeno se observa una aparente producción del mismo, lo cual sugiere que se producen ERO debido a un posible daño en la CTE.

Tipo de mitocondrias de placenta humana	Estado 3	Estado 4	Cociente respiratorio (CR)
Mitocondrias de citotrofoblasto normal	0.000115 ± 0.00012	0.00019 ± 0.00011	0.653174 ± 0.49656
Mitocondrias de sincitiotrofoblasto normal	0.00026 ± 0.00021	0.0001825 ± 0.00021	1.424657 ± 0.13548
Mitocondrias de citotrofoblasto con preeclampsia	N.D.	N.D.	N.D.
Mitocondrias de sincitiotrofoblasto con preeclampsia	N.D.	N.D.	N.D.

Tabla 3.- Cocientes respiratorios de mitocondrias de placenta humana.- En la tabla se muestran los datos obtenidos del consumo de oxígeno en estado 3 con la adición de ADP y el estado 4 en presencia de succinato como sustrato, así como el CR de cada tipo de mitocondrias. $n=4 \pm DE$. N.D.=no determinado.

6.3 Niveles de lipoperoxidación

Para evaluar el daño oxidativo en los lípidos de membrana de placentas humanas, se evaluaron los niveles de la lipoperoxidación estimulada por el tratamiento con Fe^{2+} en mitocondrias de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto.

En las mitocondrias de citotrofoblasto (Fig. 18), no se observaron diferencias entre mitocondrias de mujeres normotensas y preeclámpticas. Cuando se agregó 100 y 200 μM de Fe^{2+} se observó un aumento en la lipoperoxidación en ambos tipos de mitocondrias, el cual se mantuvo constante en mujeres normotensas. Sin embargo, es de resaltarse que los niveles de lipoperoxidación fueron significativamente más altos en las mitocondrias de citotrofoblasto de placenta de pacientes preeclámpticas bajo el mismo tratamiento, lo cual sugiere que durante la preeclampsia aumenta la sensibilidad a la lipoperoxidación en esta población de mitocondrias, lo cual puede ser atribuido a una menor capacidad antioxidante o a un aumento en el grado de insaturación de los lípidos mitocondriales.

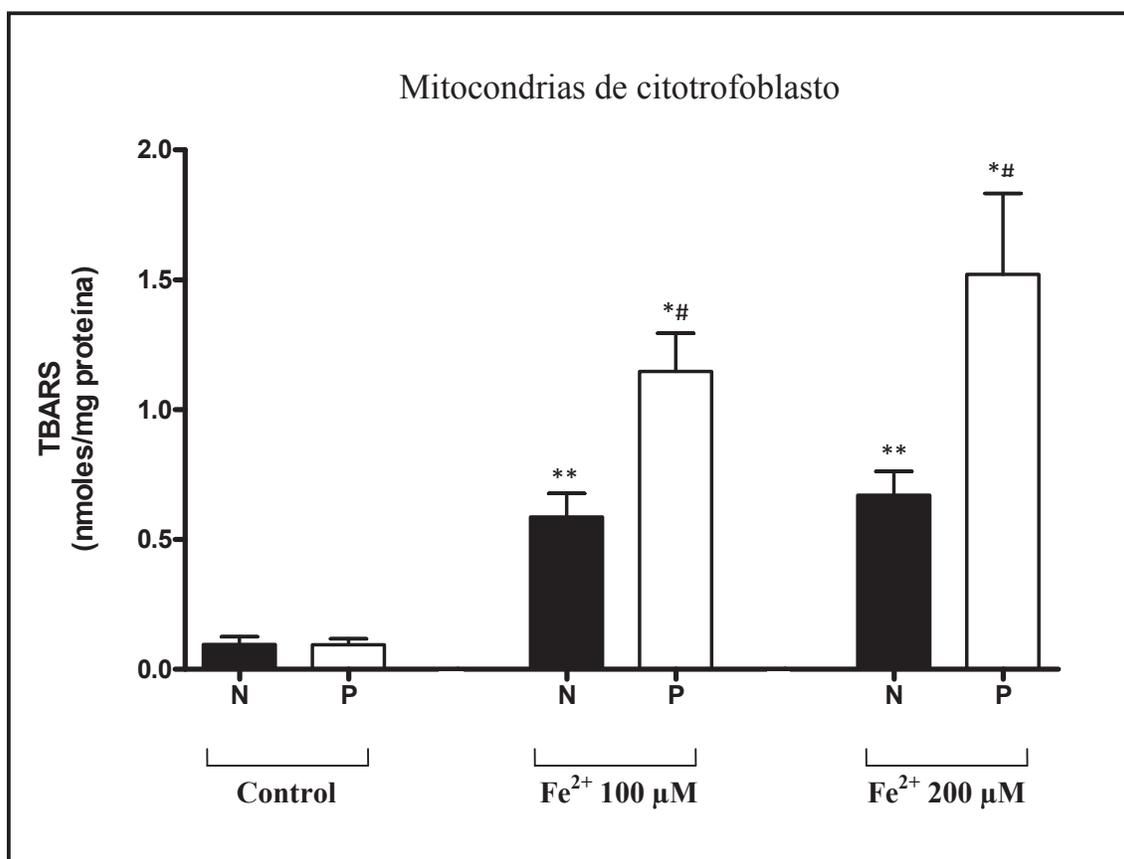


Figura 18.- Niveles de lipoperoxidación en mitocondrias de citotrofoblasto de placenta humana.- Las mitocondrias fueron tratadas con las concentraciones señaladas en la figura bajo el protocolo descrito en “Materiales y métodos”. Los valores representan la media de \pm EE de $n=4$ para pacientes normotensas y $n=2$ para pacientes preeclámpticas. * $p<0.05$, y ** $p<0.01$, respecto a las mitocondrias control y # $p<0.05$ respecto a las mitocondrias de pacientes normotensas con el mismo tratamiento. N=pacientes normales y P=pacientes con preeclampsia.

En mitocondrias de sincitiotrofoblasto (Fig. 19) se observó que los niveles de lipoperoxidación basales son mayores en mitocondrias de placentas de mujeres normotensas, (barras negras) que en las mitocondrias de mujeres preeclámpticas (barras blancas). No obstante, se observó una baja sensibilidad al Fe^{2+} en mitocondrias de pacientes normotensas, mientras que en mitocondrias de pacientes preeclámpticas se observó un aumento progresivo en los niveles de lipoperoxidación respecto a la concentración de Fe^{2+} . De manera similar a lo observado en las mitocondrias de citotrofoblasto, se observó que las mitocondrias de pacientes preeclámpticas son más susceptibles a los efectos de una misma concentración de Fe^{2+} que las mitocondrias de pacientes normotensas.

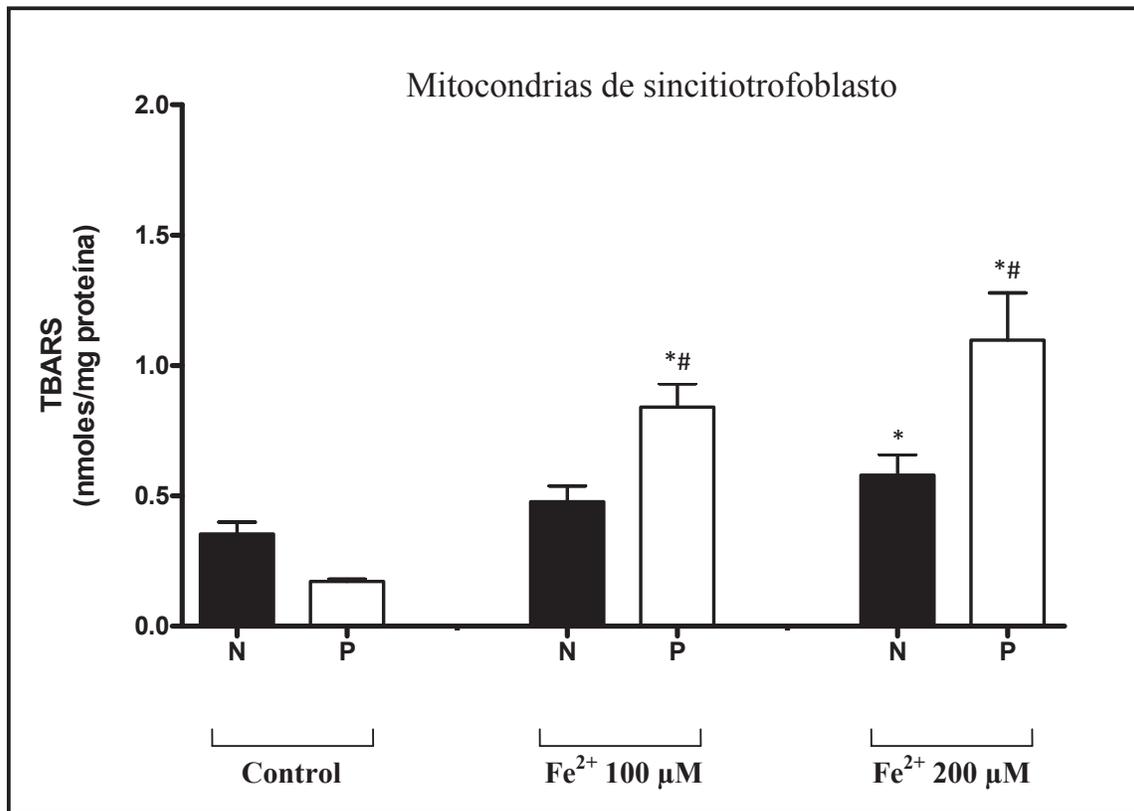


Figura 19.- Niveles de lipoperoxidación en mitocondrias de sincitiotrofoblasto de placenta humana.- Las mitocondrias fueron tratadas con las concentraciones señaladas en la figura bajo el protocolo descrito en “Materiales y métodos”. Los valores representan la media de \pm EE de $n=4$ para mitocondrias de pacientes normotensas y $n=2$ para mitocondrias de pacientes preeclámpticas $*p<0.05$ respecto a las mitocondrias control y $\#p<0.05$ respecto a las mitocondrias de pacientes normotensas con el mismo tratamiento. N=pacientes normales y P=pacientes con preeclampsia.

6.4 Niveles de óxido nítrico

Para evaluar el posible establecimiento de condiciones de estrés nitrosativo durante la preeclampsia debido a un aumento en la producción de NO^\bullet , se determinaron los niveles de este radical en mitocondrias de placenta humana de citotrofoblasto (C) y sincitiotrofoblasto (S). En la figura 18 se observa que en las mitocondrias de sincitiotrofoblasto hubo una mayor producción de NO^\bullet en el grupo preeclámptico (barras blancas) respecto al grupo normotenso (barras negras). En contraste, no se observaron diferencias entre ambos grupos en mitocondrias de citotrofoblasto. Es de resaltar que el mayor nivel de NO^\bullet se observó en las mitocondrias de sincitiotrofoblasto preeclámptico, lo cual podría desencadenar un mayor nivel de estrés nitrosativo en esta población de mitocondrias.

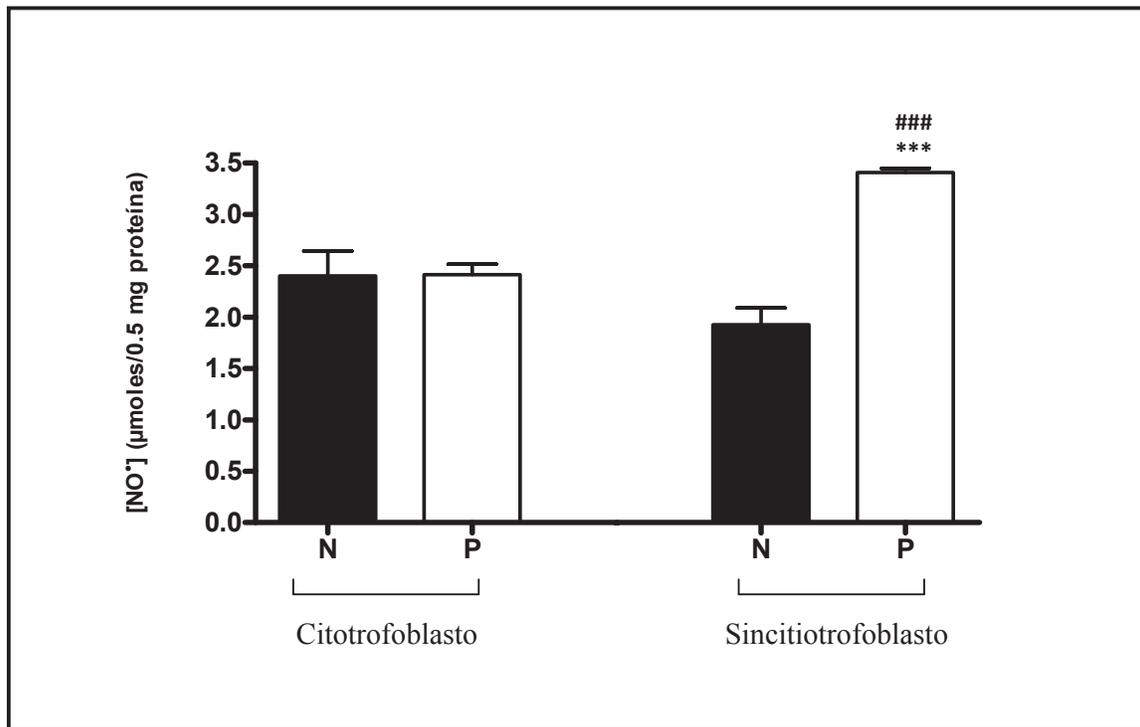


Figura 20.- Niveles de óxido nítrico en mitocondrias de placenta humana. Se muestra el valor de la media \pm EE de mitocondrias de pacientes normotensas ($n=4$) y preeclámpticas ($n=3$). $***p<0.001$, respecto a las mitocondrias de sincitiotrofoblasto del grupo normotenso y $###p<0.001$ respecto a las mitocondrias de citotrofoblasto del grupo preeclámptico. N=pacientes normales y P=pacientes con preeclampsia.

6.5 Actividad de la aconitasa

La aconitasa es una enzima presente en las mitocondrias y es susceptible al daño oxidativo y nitrosativo; por este motivo, se midieron los niveles de su actividad como un marcador biológico de los estreses oxidativo y nitrosativo. Los resultados obtenidos de dicha actividad se muestran en la figura 19, donde se observó un aumento en los grupos preeclámpticos, tanto de mitocondrias de citotrofoblasto de un 20% aproximadamente ($p < 0.05$), como de mitocondrias de sincitiotrofoblasto de un 40% aproximadamente ($p < 0.05$), con respecto al grupo normal de cada una de ellas. En el grupo preeclámptico se observa un aumento significativo ($p < 0.01$) de la actividad de la aconitasa en mitocondrias de sincitiotrofoblasto, con respecto a las de citotrofoblasto del mismo grupo.

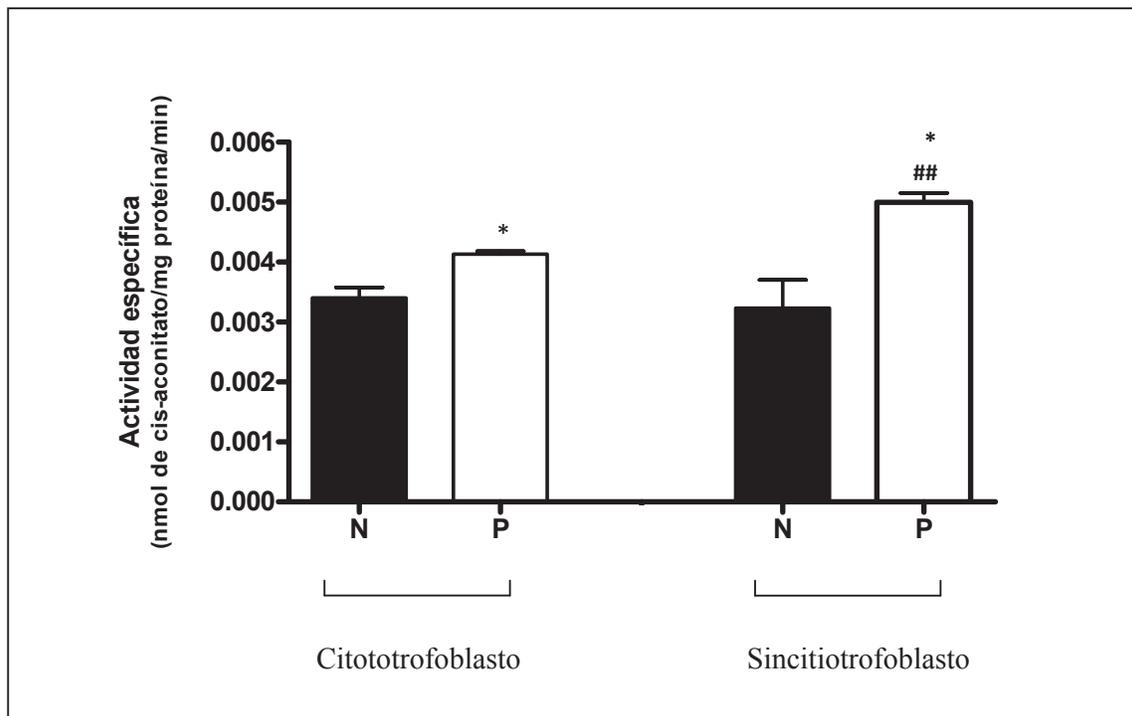


Figura 21.- Actividad de la aconitasa en mitocondrias de placenta humana. Se muestran los valores que representan la media \pm EE de $n=3$. * $p < 0.05$ respecto a las mitocondrias del grupo normal y ## $p < 0.01$ respecto a las mitocondrias de citotrofoblasto preeclámptico.

7. DISCUSIÓN

Actualmente, la preeclampsia sigue siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad materna en casi todos los países industrializados y en desarrollo. Aunque en México esta complicación se ha identificado desde hace varios años como la principal causa de muerte materna en el Sistema Nacional de Salud (Díaz, 2006), existe un conocimiento limitado sobre la etiología de dicho síndrome.

Muchas investigaciones sugieren que la placenta juega un papel primordial en la preeclampsia a causa de una placentación anormal y una perfusión placentaria reducida provocando disfunción endotelial. (Llurba y col., 2004). Sin embargo, la disfunción endotelial de la placenta por sí sola no es suficiente para el desarrollo de la preeclampsia; son necesarios además diversos factores tales como, la herencia genética y factores medioambientales (Hernández y col., 2007).

Diversos estudios muestran que el estrés oxidativo contribuye a la disfunción endotelial en la preeclampsia, junto con la interacción de la circulación útero-placentaria y la predisposición materna (Hubel, 1999). La mitocondria es fuente y blanco importante de la producción de ERO y ERN, lo cual concuerda con diversos reportes acerca de un estado de estrés oxidativo en mitocondrias de células endoteliales de placenta humana de pacientes con preeclampsia (Padmini y col., 2009). Debido a esto, y a la falta de estudios sobre la comparación en el estrés oxidativo y nitrosativo entre los distintos tipos de mitocondrias presentes en el tejido placentario, fue de nuestro interés medir los niveles en cada tipo mitocondrial.

De los registros obtenidos en la recolección de los datos clínicos de las pacientes (Tabla 2) y de la evaluación médica, se demostró que las placentas provenían de pacientes con preeclampsia ya que se observaron aumentos en la presión arterial y la proteinuria. Esto constituyó el punto de partida de esta investigación.

Los resultados en la cuantificación de los niveles de consumo de oxígeno mitocondrial (Tabla 3), en el estado 3 y 4, se aprecia un CR muy bajo en mitocondrias de citotrofoblasto, lo que sugiere un daño sustancial en la CTE. Esto puede ser debido probablemente al método de aislamiento, ya que no se contó con un homogenizador especial para tejidos grandes. De igual manera, las mitocondrias provenientes de sincitiotrofoblasto también presentaron un cociente respiratorio bajo que, sin embargo, fue mayor al de citotrofoblasto, probablemente por las diferencias estructurales y funcionales entre los dos tipos mitocondriales (Martínez y col., 1997). De igual modo, el CR también fue menor al esperado para este tipo de mitocondrias

(aprox. 2), lo que indica también un probable daño en la CTE. En mitocondrias de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto preeclámpticas, se observó un incremento en la producción de oxígeno (Fig. 16 y 17). Una probable explicación para este fenómeno, es que exista una alta producción de H_2O_2 el cual es metabolizado por la catalasa para convertirlo en agua y oxígeno (Céspedes y col., 1995). Esto por lo tanto, apoyaría la hipótesis de que la preeclampsia está relacionada con el estrés oxidativo mitocondrial, el cual a su vez, se ha relacionado con el desarrollo de la hipertensión (Dikalova et al. 2010) y la inflamación (Aguilera-Aguirre et al. 2009) los cuales son procesos que han sido relacionados con la preeclampsia.

En mitocondrias de sincitiotrofoblasto se observaron unos valores mayores de lipoperoxidación en condiciones basales (Fig. 19) respecto a las de citotrofoblasto (Fig. 18). Esto es probablemente debido a las diferencias estructurales entre los tipos mitocondriales (Martínez y col., 1997), ya que las mitocondrias de sincitiotrofoblasto son más pequeñas y probablemente varían en su composición lipídica. Sin embargo, en condiciones basales, no se observó un incremento en la lipoperoxidación en mitocondrias de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto preeclámpticas. Con el fin de corroborar una posible participación de la composición de lípidos en dicho fenómeno, las mitocondrias se sometieron a concentraciones de 100 y 200 μM Fe^{2+} , las cuales son capaces de estimular la lipoperoxidación (Cortés-Rojo *et al.* 2009). Los resultados mostraron una mayor susceptibilidad al Fe^{2+} en mitocondrias de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto de pacientes preeclámpticas, lo que sugiere que existe una mayor susceptibilidad a la lipoperoxidación posiblemente por una modificación del tipo de ácidos grasos presentes en las membranas mitocondriales en la preeclampsia o que este fenómeno disminuye la capacidad de las defensas antioxidantes de contrarrestar el daño en los lípidos.

Los resultados obtenidos en la medición de los niveles de NO^* mostraron un aumento significativo en mitocondrias de pacientes preeclámpticas provenientes solo de sincitiotrofoblasto (Fig. 20). Estudios recientes en células trofoblásticas de placenta humana sugieren que el NO^* juega un papel importante como modulador de la formación de oxidantes intracelulares, pero al mismo tiempo es una molécula inestable que puede reaccionar con radicales libres como el anión superóxido y formar peroxinitrito, que es una especie reactiva de oxígeno altamente oxidante de biomoléculas (Goda y col., 1996). Sin embargo, las mitocondrias de citotrofoblasto preeclámpticas, no muestran un aumento respecto a su control, probablemente a que este tipo celular se encuentra disminuido al final del embarazo y

más cercano a la porción fetal y a las diferencias estructurales y funcionales en las mitocondrias de este tipo celular (Martínez y col. 1997).

La enzima aconitasa fue utilizada como marcador de daño oxidativo y nitrosativo por su susceptibilidad a las ERO y ERN. Los resultados (fig. 21), muestran un incremento significativo en su actividad en la preeclampsia tanto en mitocondrias de citotrofoblasto y de sincitiotrofoblasto. Esto puede ser explicado en función de que durante el embarazo normal el metabolismo materno sufre una serie de ajustes para brindar a la madre y al feto una adecuada nutrición; uno de estos cambios radica en que el organismo necesita un mayor aporte de insulina al precisar una mayor utilización de glucosa (Esplin y col., 2001). No obstante que la mayor actividad de la aconitasa se contrapone a la hipótesis de que se presenta un mayor nivel de estrés oxidativo y nitrosativo durante la preeclampsia, es posible especular que el antagonismo aumentado a la insulina en la preeclampsia, y por lo tanto, un posible aumento en la glicemia durante este fenómeno, podrían disparar mecanismos que aumenten la expresión de esta enzima para aumentar el metabolismo de los carbohidratos. Otra posibilidad es que la producción aumentada de ERO durante la preeclampsia podría estar asociada con un aumento en la expresión de esta enzima para compensar su inactivación debido al estrés oxidativo aumentado. De cualquier modo, lo anterior indica que la medición de la actividad de la aconitasa podría no ser un marcador adecuado de estrés oxidativo mitocondrial durante la preeclampsia. Por lo tanto, sería más conveniente medir el estrés oxidativo en esta patología mediante otro marcador tal como la relación GSSG/GSH.

8.- CONCLUSIÓN

La preeclampsia está asociada con un aumento en la formación de ERO en la CTE y de NO, lo cual podría favorecer un estado de estrés oxidativo y nitrosativo debido a la posible reacción entre estas especies para formar ERN, mientras que la mayor susceptibilidad de los lípidos de membrana al ataque oxidativo podría dar lugar a la producción de radicales lipídicos que favorezcan el estrés oxidativo mitocondrial, el cual es posible que no pueda ser estimado con la actividad de la aconitasa durante la preeclampsia.

9.- LITERATURA CITADA

Abad, A. 1999. Estudio de la respuesta de los vasos coriónicos humanos in vitro. *Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Facultad de Medicina: Dpto. de Pediatría, Obstetricia y Ginecología.* <http://www.tesisenxarxa.net/TDX-0701105-112448/> (Accesada Marzo, 2010).

Agarwal, A., Gupta, S. y Sharma, R. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3(28): 1-28.

Aguilera-Aguirre L, Bacsí A, Saavedra-Molina A, Kurosky A, Sur S, Boldogh I. Mitochondrial dysfunction increases allergic airway inflammation. *J Immunol* 2009; 183: 5379-387.

Aliaga Parreño, R. 2005. Reactividad de las arterias corionicas frente a factores vasoactivos derivados del endotelio. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España. http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UV/AVAILABLE/TDX-0701105-112448//aliaga.pdf. (Accesada Febrero, 2010).

Bajo, J.M., Melchor, J.C. y Mercé, L.C. 2007. Fundamentos de obstetricia (SEGO). Edit. Gráficas Marte, S.A. Madrid, España. 19:147-189.

Beckman, J.S., Beckaman, T.W., Marshall, P.A. y Freeman, B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite. Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1620.

Begum, S., Yamasaki, M. and Mochisuki, M. 1996. The role of nitric oxide metabolites during pregnancy. *Kobe T. Med. Sci.* 42: 131-41.

Berg, J.M., Stryer, L. y Tymoczko, J. 2008. Biochemistry. Reverté: Barcelona. 17. 476.

Boccardo, P., Soregaroli, M. and Aiello, S. 1996. Systemic and fetal maternal nitric oxide synthesis in normal pregnancy and preeclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 103: 879-86.

Bolaños, J.P., Almeida, A., Stewart, V., Peuchen, S., Land, J.M., Clark, J.B. y Heales, S.J. 1997. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative disease. *J. Neurochem.* 68(6): 2227-2239.

Buegue, J.A. y Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-320.

Buqué, X., Aspichueta P. y Ochoa, B. 2008. Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Revista Española de Enfermedades Digestivas.* 100(9).

Calderón-Cortés, E. 2008. Influencia del calcio sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa mitocondrial en cerebro de rata durante el desarrollo de la hipertensión. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biológicas opción Biología Experimental Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-UMSNH.

Castro, L., Rodríguez, M. and Radi, R. 1994. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269(47): 9409-09415.

Céspedes, M., Hernández, L. y Llopiz, N. 1995. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 15(2): 10-15.

Chance, B. y Williams, G.R. 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.* 17: 65-134.

Comporti, M. 1985. Lipid and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest.* 53: 599-623.

Cortés-Rojo, C. 2004. Efecto del estrés oxidativo sobre la cadena respiratoria de *S. cerevisiae*. Tesis de Maestría en Biología Experimental. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-UMSNH.

Cunningham, F.G., MacDonald, P.C., Gant, N.F., Leveno, K.J. y Gilstrap III, L.C. 1996. Williams. Obstetricia. 4^a ed. *Barcelona (E): Masson, S.A.*

Davies, K.J.A. 1999. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*. 48:41-47.

Díaz Echeverría, D. 2006. MORTALIDAD MATERNA. Una tarea inconclusa. Fundar, Centro de Análisis e Investigación, A. C. 3: 1-48. http://www.fundar.org.mx/fundar_1/site/files/6ovv491dg9hmdxe.pdf (Accesada en mayo 2010).

Dikalova AE, Bikineyeva AT, Budzyn K, *et al.* Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ Res*. 2010; 107: 106-16.

Dinesh M. Shah. 2005. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 288: 614-625.

Esplin, M.S., Fausett, M.B. y Fraser, A. 2001. Paternal and Maternal Components of the Predisposition to Preeclampsia. *N. Engl. J. Med*. 344(12): 867-872.

Fraga, C.G. Shinegaga, M.K., Park, J.W., Degan P. y Ames, B.N. 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4533-4537.

Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem*. 64: 971-12.

Gallego, C. 2007. Gametogénesis, fecundación del sexo, nidación, placentación. Apuntes de ginecología. Apuntes de medicina. Revista electrónica de PortalesMedicos.com <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/832/1/Gametogenesis,-fecundacion-del-sexo,-nidacion,-placentaci%F3n.-Apuntes-de-ginecologia.-Apuntes-de-medicina#> (Accesada mayo 2010).

Ghafourifar, P. y Saavedra, Molina A. 2006. Functions of mitochondrial nitric oxide synthase. En: Nitric oxide, cell signaling, and gene expression. (Lamas, S. y Cadenas, E. eds.) USA. 4: 79-81.

Goda, N., Suematsu, M., Mukai, M., Kiyokawa, K., Natori, M., Nozawa, S. y Ishimura Y. 1996. Modulation of mitochondrion-mediated oxidative stress by nitric oxide in human placental trophoblastic cells. *Am. Physiol. Soc.* H1893-H1899.

Green, K., Brand, M.D. and Murphy, M.P. 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 53:110-118.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glowoski, J., Skipper, P.I., Wishnok, J.S. y Tannenbaum, S.R. 1982. Analysis of nitrate, and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138.

Guzmán, G., A.M., Velásquez G.A. y Sierra V.M.P. 2006. Óxido nítrico, estrés oxidativo y función mitocondrial. *Rev. Endocrinol. Nutr.* 14 (4): 227-232.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M. 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 1: 1396-1397.

Helewa, M.E., Burrows, R.F., Smith, J., Williams, K., Brain, P. and Rabkin, S.W. 1997. "Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 1. Definitions, evaluation and classification of hypertensive disorders of pregnancy". *Can. Med. Assoc. J.* 157(6): 715-725.

Henson, C.P., y Cleland, W.W. 1967. Purification and kinetic studies of beef liver cytoplasmic aconitase. *J. Biol. Chem.* 242: 3833-3838.

Henze, K. y Martin, W. (2003). Evolutionary biology: essence of mitochondria. *Nature.* 426(6963) 127-8.

Hernández Cruz, J., Hernández García, P., Yanes Quesada, M. e Isla Valdés, A. 2007. Factores de riesgo de preeclampsia: enfoque inmunoendocrino. Parte I. *Rev. Cubana Med. Gen. Integr.* 23(4): 1-14.

Hubel, C. A. 1999. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222: 359-372.

Laurino, F.L.R., Da Luz, P.L. y Uint, L. 1991. Evidence of superoxide radical-dependent coronary vasospasm after angioplasty in intact dogs. *Circulation*. 83:1705-1715.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2000. Biosignaling and oxidative phosphorylation and photophosphorylation. En: Principles of biochemistry. 3a. Edición. Worth Publishers. Nex York. 12: 421-479, 19: 690-750.

Leslie, M. and Xiaolan, C. 2004. Oxidative stress in the placenta. *Histochem. Cell Biol.* 122: 369–382.

Lowe, D.T. 2000. Nitric Oxide Dysfunction in the Pathophysiology of Preeclampsia. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*. 4 (4): 441–458.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. t Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1): 265-275.

Many, A., Hubel, C.A., Fisher, S.J., Roberts, J.M. and Zhou, Y. 2000. Invasive Cytotrophoblasts Manifest Evidence of Oxidative Stress in Preeclampsia. *American Journal of Pathology*.156(1):321-331.

Martínez, F., Kiriakidou, M. y Strauss, J. 1997. Structural and Functional Changes in Mitochondria Associated with Trophoblast Differentiation: Methods to Isolate Enriched Preparations of Syncytiotrophoblast Mitochondria. *Endocrinology*. 138(5): 2172-2183.

Martínez, G. 2005. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cubana Farm.* 39 (3): 1-5.

Mataix, B. 2005. Tesis de doctorado en medicina: Efecto de los ácidos grasos de la dieta y la suplementación con Q10 sobre el estrés oxidativo cerebral durante el envejecimiento. Instituto de Nutrición y Tecnología en Alimentos. Universidad de Granada, España.

Mathews. C.K. y Van Holde, K.E. 2004. Bioquímica 3ª Edición. Edit. McGraw-Hill Interamericana. España. Capítulo 23.

- Merkis, C.I., Cristofolini, A. L., Franchino, M.A., Moschetti, E. y Koncurat, M.A. 2005. Relación entre Área Total y Área Epitelial de vellosidades placentarias porcinas en diferentes estadios gestacionales. *In Vet.* 7: 1668-3498.
- Minotti, G. y Aust., D. 1987. The role iron in the iniciation of the lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 44: 191-208.
- Mutter, W. and Karumanchi, S. 2007. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvascular Res.* 75: 1-8.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2005. Informe sobre la salud en el mundo. <http://www.who.int/whr/2005/chapter4/es/index1.html> (Accesada en febrero 2010).
- Pacheco, J. Inmunología de la implantación. 1999. *Ginecol Obstet.* 45 (1): 14-22.
- Padmini, E., Lavanya, S. and Uthra V. Preeclamptic placental stress and over expression of mitochondrial HSP70. 2009. *Clin. Chem. Lab.* 47(9): 1073-1080.
- Peralta-Pedrero, M.L., Guzmán-Ibarra, M.A., Cruz-Alvear, A. y Martínez-García, M.C. 2004. Utilidad para establecer el diagnóstico y severidad de los síntomas y signos más frecuentes de la paciente preecláptica. *Gaceta Médica de México.* 140: 513-517.
- Pérez-Gallardo V. 2009. Estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de riñón de rata en edad avanzada durante la diabetes mellitus experimental. Tesis de Maestría en Biología Experimental. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-UMSNH.
- Radi, R. 2000. Peroxinitrito: una década de investigación sobre la bioquímica y biología celular de un intermediario citotóxico. *Actas Fisiol.* 6: 123-130.
- Radi, R., Rodríguez, M., Castro L. y Terreli, R. 1994. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 89-95.
- Roggensack, A. M., Zhang, Y., and Davidge, S. T. 1999. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension* 33(1), 83-89.

Rojo, D., García, L., Clapés, S. y Álvarez M. 2003. El óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas en la preeclampsia. *Invest. Biomed.* 22(2): 130-40.

Secretaría d Salud de Michoacán. 2009. Gobierno de Michoacán y municipios trabajan para prevenir la mortalidad materno-infantil. http://www.michoacan.gob.mx/Salud/Gobierno_de_Michoacan_y_municipios_trabajan_para_prevenir_la_mortalidad_materno-infantil (Accesada en mayo 2010).

Secretaría de Salud. Dirección General de Salud Reproductiva. Lineamiento Técnico Para la Prevención, Diagnóstico y Manejo de la Preeclampsia/Eclampsia. 2da edición. México, 2000.

Silver, R.K., Kupfermic, M.T. and Rusell, T.L. 1996. Evaluation of nitric oxide as a mediator of severe preeclampsia. *Am. Obstet. Gynacol.* 175: 1013-1017.

Tierney, McPhee, Papadakis. 2003. Diagnóstico clínico y tratamiento. 38ª ed. México, Manual Moderno. 770-773.

Tórtora, V., Quijano, C., Freeman, B., Radi, R. y Castro, L. 2007. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: Mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation. *Free Radic. Biol. Med.* 42: 1075-1088.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Croninn, M.T.D., Mazur, M. y Telser, J. 2007. Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (1): 44-84.

Vázquez Memije M.E. y Tuena de Gómez Puyou. M. Mitocondria. 2002. Una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. Edit. Prado. México. 1, 5: 22, 25, 28, 34, 36, 67-83.

Velázquez Paniagua, M., Prieto Gómez, B. y Contreras Pérez, R. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. Elixir del Dr. Thermes. Ciencias Julio. 75: 36-43.

Wang, Y. and Walsh, S.W. 1998. Placental Mitochondria as a Source of Oxidative Stress in Pre-eclampsia. *Placenta.* 19:581-586.

Webster, R.P., Roberts, V.H.J. and Myatt, L. 2008. Protein Nitration in Placenta-Functional Significance. *Placenta*.29(12):985-994.

Widschwendter, M., Schröcksnadel, H. y Mörtl, M.G. 1998. Pre-eclampsia: a disorder of placental mitochondria? *Molecular Medicine*. 1357: 286-291.

CITAS DE FIGURAS

1.- Tomada y modificada de

http://img.freebase.com/api/trans/image_thumb/wikipedia/images/commons_id/792233?maxheight=510&mode=fit&maxwidth=510

2.- Tomada y modificada de

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/45/Gray37.png/200px-Gray37.png>

3.- Tomada y modificada de <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/ETC.PNG>

4.- Tomada y modificada de <http://www.elementos.buap.mx/num53/htm/figura-11-x.jpg>

5.- Tomada y modificada de

http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2005/adriazola_jm/xml/ressources/fig007a.jpg

6.- Tomado de <http://www.bioquimicaqui11601.ucv.cl/unidades/krebs/Image105.gif>

7.- Tomada y modificada de

<http://www.usc.edu/programs/neuroscience/faculty/profile.php?fidm=10>

8.- Tomado y modificado de <http://media.wiley.com/CurrentProtocols/NS/ns0717/ns0717-fig-0009-1-full.gif>.

9.- Tomada y modificada de

<http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v29n5/31080fr2.gif>