



11227

76
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Medicina
División de Estudios de Postgrado
Unidad Medica
Hospital Regional "General Ignacio Zaragoza"

I. S. S. S. T. E.

"DETECCION DE CITOTOXICIDAD ENDOTELIAL EN HOMOGENADO
PLACENTARIO DE PACIENTES PREECLAMPTICAS"

T E S I S

Que para obtener el Titulo de:

ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

P R E S E N T A

ADRIANA MONROY GUZMAN

Mexico, D. F. Marzo de 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

11227

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
UNIDAD MEDICA
HOSPITAL REGIONAL "GENERAL IGNACIO ZARAGOZA"

I. S. S. S. T. E.

"DETECCION DE CITOTOXICIDAD ENDOTELIAL EN HOMOGENADO
PLACENTARIO DE PACIENTES PREECLAMPTICAS".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

P R E S E N T A :

ADRIANA MONROY GUZMAN

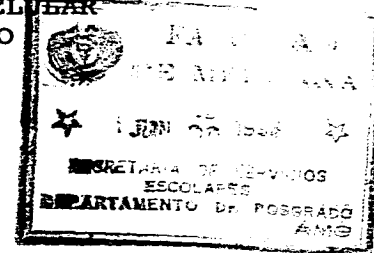
MEXICO, D.F. marzo de 1996.

I N D I C E

I.	INTRODUCCION	pag. 1
II.	ANTECEDENTES	pag. 8
III.	JUSTIFICACION	pag. 10
IV.	HIPOTESIS	pag. 11
V.	OBJETIVOS	pag. 11
VI.	MATERIAL Y METODOS	pag. 12
VII.	RESULTADOS	pag. 16
VIII.	ANALISIS DE RESULTADOS	pag. 19
IX.	DISCUSION	pag. 20
X.	CONCLUSIONES	pag. 22
XI.	BIBLIOGRAFIA	pag. 22

Alejandro Zentella

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
DOCTOR EN FILOSOFIA POR LA UNIVERSIDAD DE ROCKEFELLER
INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE FIOLOGIA CELULAR
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ASESOR BASICO DE TESIS.



Alberto Trejo

DR. ALBERTO TREJO GONZALEZ.
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA.
PROFESOR TITULAR DEL CURSO
HOSPITAL REGIONAL "GRAL. IGNACIO ZARAGOZA".
ASESOR CLINICO DE TESIS.

Irma del Toro

~~DRA. IRMA DEL TORO GARCIA.~~
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA.
JEFE DE INVESTIGACION.
HOSPITAL REGIONAL "GRAL. IGNACIO ZARAGOZA".



Benjamin Manzano

DR. BENJAMIN MANZANO SOSA.
ESPECIALISTA EN CIRUGIA GENERAL.
JEFE DE ENSEÑANZA.
HOSPITAL REGIONAL "GRAL. IGNACIO ZARAGOZA".

INTRODUCCION

Los desórdenes hipertensivos son causa de una alta morbilidad y mortalidad en todo el mundo por lo que en los últimos años se ha incrementado la búsqueda de enfoques terapéuticos y es sólo mediante el conocimiento de la fisiopatología de los desórdenes causantes de estas enfermedades que se obtiene la base de una terapia racional y útil.

Bajo circunstancias normales, la presión en el sistema arterial se mantiene dentro de límites relativamente estrechos y mecanismos muy complejos están involucrados en mantener estos límites constantes. Durante las últimas décadas se ha ampliado nuestro conocimiento de las interacciones del corazón y el sistema circulatorio, de la modulación de la resistencia vascular y sus interacciones con el sistema nervioso autónomo, hormonas presoras y vasodilatadoras, manejo celular de los electrolitos, volumen plasmático y algunas reacciones metabólicas localizadas. Este conocimiento ha logrado el reconocer la etiología de algunas formas de hipertensión, como la renovascular y el adecuado tratamiento de éstas; sin embargo en una gran parte de las patologías hipertensivas se mantienen sin elucidar los factores etiológicos. Dentro de las patologías hipertensivas en donde aún no se reconocen estos

factores se encuentran las enfermedades hipertensivas del embarazo, e importantemente por su frecuencia y consecuencias se encuentra la toxemia.

La preeclampsia es única para el embarazo humano y complica del 6 al 8% de las gestaciones que sobrepasan las 24 semanas. En la mayoría de países, la enfermedad hipertensiva del embarazo muestra ser la mayor causa simple de mortalidad materna, y de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (1), es la principal causa de morbilidad y mortalidad perinatal. La preeclampsia fue inicialmente descrita hace más de cien años y no obstante la extensiva investigación en este campo, nuestro limitado conocimiento de la fisiopatología y etiología son evidentes en la terapéutica actual, la cual se mantiene siendo empírica, con suspensión temprana del embarazo con los riesgos quirúrgicos y de prematuridad yatrogénica que sobrelleva.

La preeclampsia es una condición cuyo manejo requiere de la interacción de diversas especialidades, entre ellas la Medicina Interna, pues dentro de sus manifestaciones se encuentran emergencias agudas que ponen en peligro la vida y que son parte de la interacción del internista con el obstetra, como lo son el manejo de la emergencia hipertensiva, las manifestaciones neurológicas severas, el edema pulmonar, la insuficiencia renal aguda, el síndrome HELLP e incluso el paro cardiopulmonar. Del mismo modo ofrece oportunidades únicas para el estudio de la fisiopatología de las enfermedades hipertensivas. En particular es una condición en la que el entendimiento de la respuesta endotelial a la hipertensión en el

embarazo puede tener relevancia en otras enfermedades hipertensivas.

Hay creciente evidencia de que el daño a las células endoteliales y la función alterada de estas juegan un papel importante en la patogenia de la preeclampsia. En el pasado, el endotelio vascular fue despreciado por fisiólogos y clínicos, imputándosele un papel únicamente de sostén. Actualmente, las actividades sintéticas de este órgano diseminado son considerablemente significativas. Las primeras investigaciones sobre la fisiología vascular presentaban datos controversiales debido a que el revestimiento endotelial de los vasos en estudio se encontraba dañado o se había removido completamente. Las células endoteliales se encuentran unidas a la pared del vaso sanguíneo por colágeno y diversos glucosaminoglicanos, incluyendo fibronectina. Una monocapa de epitelio escamoso, el endotelio esta en contacto directo con la sangre, manteniendo una posición estratégica para participar en los ajustes homeostáticos. Como barrera física y metabólica, la capa endotelial regula el transporte capilar, controla el contenido de lípidos plasmáticos, y modula la reactividad del músculo liso vascular. La autorregulación puede ser típica, con diferentes autacoides probablemente mediando la acción de algún otro. El endotelio modula la reactividad del músculo liso vascular en respuesta a estímulos vasoactivos. La prostaglandina I₂ (PGI₂) y el factor relajante derivado del endotelio (EDRF) son considerados los más importantes mediadores de vasodilatación. Un eicosanoide, PGI₂ es un poderoso vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria. Después de su descubrimiento, el EDRF se encontró que era el óxido

nítrico (NO), formado por L-arginina como precursor. La generación concomitante y liberación de aniones superóxido a partir de las células endoteliales vasculares y de los macrófagos son los responsables del barrido de EDRF.

No obstante lo anterior, el control de la función vascular por el endotelio es más compleja, ya que las células endoteliales no solamente liberan diferentes sustancias vasodilatadores, sino que también median la contracción del músculo vascular liso con factores difusibles de contracción derivados del endotelio (EDCF). Los EDCF son inducidos por ácido araquidónico; son producidos probablemente a través de tromboxano A₂ (TXA₂) y prostaglandina H₂ (PGH₂), otros dos eicosanoides. Las contracciones causadas por anoxia pueden ser causadas por la liberación de endotelina y anión superóxido, los cuales aceleran la inactivación de EDRF.

El endotelio vascular juega un papel activo en prevenir la formación de trombos in vivo. Tanto factores intracelulares como de superficie celular contribuyen a esta regulación. Las plaquetas no estimuladas no se adhieren a monocapas intactas de células endoteliales. La exposición de la capa subendotelial por daño o remoción de células endoteliales causa agregación plaquetaria y liberación de TXA₂ y componentes activos en coagulación. Esta propiedad no trombogénica parece ser intrínseca de la membrana plasmática y no esta relacionada con la producción de PGI₂; en contraste, la inhibición de la adhesión de plaquetas estimuladas a células endoteliales es altamente dependiente de PGI₂. Las plaquetas

activadas tienen un mecanismo para modular la síntesis de PGI₂. Las células endoteliales pueden también convertir prostaglandina endoperóxido, secretada por plaquetas, en PGI₂. Este mecanismo puede ser el más importante en la microvasculatura donde la proporción de células endoteliales con plaquetas es 1:1. La síntesis de PGI₂ no es el único mecanismo que previene trombosis en la pared del vaso, las células endoteliales pueden modular los efectos del ADP y ATP liberados por las plaquetas, producen heparan sulfato, trombomodulina y nexin proteasa, y activan la fibrinólisis mediante la producción de activador de plasminógeno (tPA). El heparan sulfato inactiva la trombina vía antitrombina III; la trombomodulina acelera la activación de proteína C y la proteasa nexin inactiva la trombina.

El daño a la célula endotelial y la función endotelial alterada juegan un papel importante en la patogenia de la preeclampsia. La evidencia del daño endotelial está dada por las lesiones morfológicas características de la preeclampsia: la endoteliosis glomerular y cambios ultraestructurales en los vasos uterinos y placentarios. La anomalía más consistente en la mujer preecláptica es la lesión renal denominada endoteliosis glomerular, la cual no está presente en otras formas de hipertensión. El endotelio glomerular tumefacto observado en estas lesiones fue uno de los primeros indicios de que las células endoteliales son blancos para la lesión de la preeclampsia. Este hallazgo está presente en más del 70% de las mujeres primíparas con preeclampsia y revierte completamente después del parto. Pocos otros vasos de mujeres preeclápticas han sido examinados sistemáticamente para daño celular

endotelial. Sin embargo, arterias del cordón umbilical de infantes de mujeres preeclámplicas han mostrado desorganización endotelial, la cual no esta presente en vasos similares de infantes de parturientas normales.

Los hallazgos clínicos prominentes de preeclampsia, edema, y el escape proteico del capilar glomerular, son compatibles con pérdida de las funciones de transporte normales del endotelio. El aumento en el índice de desaparición de azul de Evans unido a albúmina del espacio intravascular de pacientes preeclámplicas (2) provee evidencia directa de la pérdida de la integridad celular endotelial en estas mujeres.

La evidencia bioquímica de daño celular endotelial en mujeres preeclámplicas es aún más fuerte. La fibronectina y el antígeno de factor VIII, dos factores conocidos por ser liberados de células endoteliales dañadas, están incrementados en sangre de pacientes preeclámplicas (3). Se ha reportado que el suero de pacientes preeclámplicas tiene actividad mitogénica que excede al que se presenta en suero de mujeres control. (4) Datos similares han sido reportados en el síndrome urémico hemolítico en el cual el daño endotelial ha sido fuertemente implicado como el factor fisiopatológico.

Otros cambios fisiopatológicos bien establecidos de la mujer preeclámptica pueden ser explicados por daño endotelial. Aunque puede demostrarse coagulación intravascular diseminada por pruebas convencionales de laboratorio en sólo el 20% de pacientes con preeclampsia severa, indicadores más sensibles demostraron alteraciones en la coagulación en un porcentaje

mucho mayor. Las proporciones de antígeno de actividad de factor VIII, conteo plaquetario y la β -tromboglobulina circulante son anormales en una alta proporción de mujeres con preeclampsia. La reducción de niveles de antitrombina II, otro indicador de activación de la coagulación, parece ser uno de los más confiables medios usados para diferenciar preeclampsia de hipertensión preexistente.

Una de las anormalidades fisiopatológicas de la preeclampsia es la sensibilidad aumentada de estas mujeres a agentes presores. Los vasos removidos de mujeres preeclámpticas producen menos prostaciclina que vasos similares de mujeres embarazadas normales, lo cual es compatible con disfunción celular endotelial por reducción de los efectos vasodilatadores del endotelio normal.

El endotelio dañado expresa antígenos que hace a estas células importantes blancos inmunológicos. En un número significativo de pacientes con preeclampsia severa se han encontrado anticuerpos contra las células endoteliales vasculares humanas. La unión de estos anticuerpos anticélulas endoteliales vasculares y los complejos inmunes en monocapas de células endoteliales pueden estar involucrados en la secreción alterada de PGI_2 , adherencia aumentada de plaquetas y activación de la cascada del complemento que se encuentran en estas pacientes. Algunas evidencias señalan que la deficiencia en secreción de PGI_2 no es un cambio primario en la patogenia de la preeclampsia.

No obstante estos cambios consistentes con daño celular endotelial que pueden ser

demostrados en mujeres preeclámplicas, no hay evidencia que apoye esto como la causa, más que el resultado de otras alteraciones fisiológicas en el trastorno.

ANTECEDENTES

La evidencia de que el suero de pacientes preeclámplicas daña a las células endoteliales in vitro, sugiere la existencia de un factor citotóxico circulante (5,6). Algunos datos sugieren que el trofoblasto puede ser la fuente del factor o factores causantes del daño celular endotelial. Evidencia histopatológica, epidemiológica y experimental señalan a la reducción de la perfusión trofoblástica como el primero y más consistente cambio en preeclampsia. La ocurrencia de preeclampsia en embarazos abdominales y molares indica que factores uterinos y fetales, respectivamente, no se requieren. El trabajo de algunos investigadores indica que las arterias espirales que perfunden el espacio intervelloso de la placenta preeclámptica falla notablemente en adquirir los cambios morfológicos que ocurren en un embarazo normal. Normalmente, las arterias espirales del sitio de implantación placentaria aumentan al menos cuatro veces de diámetro y pierden sus componentes elástico y muscular; estos cambios se extienden a través de la decidua y en la porción miometrial de los

vasos y parece estar totalmente establecida a las 18 a 20 semanas de gestación. En vasos de mujeres preeclámpicas, estos cambios fisiológicos fallan en extender el desarrollo de la porción decidual y algunos vasos nunca presentan los cambios normales; más aún, muchos vasos son ocluidos por material fibrinoide y exhiben invasión de células espumosas adyacentes. Estos hallazgos, los cuales son muy similares a los que se encuentran en la reacción a injerto, se denomina aterosclerosis. Es interesante que la aterosclerosis puede ser demostrada en cerca del 10% de los sitios de implantación durante el primer trimestre en mujeres nulíparas y en una baja proporción de multíparas, lo cual sugiere que esto puede ser una manifestación inicial que conduzca a preeclampsia. Estos trastornos tienen claramente el potencial para reducir la perfusión trofoblástica.

Las condiciones obstétricas que aumentan el riesgo de preeclampsia incluyen mola hidatidiforme, gestaciones múltiples, hiperhidrosis inmune y no inmune; todas estas condiciones están asociadas con un aumento en la masa trofoblástica y reducción relativa de la perfusión placentaria. De forma similar, las condiciones médicas asociadas con un aumento en la incidencia de preeclampsia, tales como diabetes, hipertensión, y enfermedades de la colágena, incluyen componentes de enfermedad microvascular en su fisiopatología que podrían reducir la perfusión placentaria. En la mujer embarazada con hipertensión crónica hay hipertrofia del músculo liso de las arterias espirales que irrigan el espacio intervelloso. En las mujeres diabéticas, aún sin preeclampsia, se ha demostrado aterosclerosis en arterias

espirales. Esta observación es de especial interés porque se ha propuesto recientemente que un aumento en la glucosilación de proteínas de la membrana celular endotelial, dada por la hiperglucemia, puede derivar en daño celular endotelial.

JUSTIFICACION

Hasta el presente, la identidad del factor o factores que causan el daño celular endotelial en la preeclampsia y su origen u orígenes, aún son especulativos, y son campo de importantes investigaciones. Algunos datos han sugerido que estos factores pudiesen ser anticuerpos anticélulas endoteliales; sin embargo, la mejoría del cuadro tras la terminación del embarazo sugieren una vida media corta, lo cual no se correlaciona con la posibilidad de un anticuerpo.

La existencia de daño endotelial en la preeclampsia, posiblemente mediado por un factor o factores citotóxicos libres en el suero, con origen en la placenta, se apoyaría por los cambios presentes en la placenta de pacientes preeclámpticas y las evidencias de citotoxicidad de células endoteliales in vivo e in vitro del suero de pacientes preeclámpticas. De esta forma, al producirse el alumbramiento se obtendría una disminución del factor o factores citotóxicos circulantes, con mejoría del cuadro clínico de la toxemia,

lo que sugeriría que un aumento en este factor o factores también estaría en relación a mayores manifestaciones de toxemia.

HIPOTESIS

Si la placenta fuese el origen del factor o factores citotóxicos liberados a la circulación, el homogenado placentario de pacientes preeclámpticas y eclámpticas produciría citotoxicidad en células endoteliales in vitro. Si esta citotoxicidad endotelial se correlacionara con la expresión clínica de la toxemia, los homogenados de placentas de pacientes eclámpticas causarían mayor daño en las células endoteliales que los homogenados de placentas de pacientes preeclámpticas.

OBJETIVOS

Determinar si el homogenado placentario de pacientes toxémicas causa citotoxicidad en las células endoteliales crecidas en cultivo y si esta citotoxicidad se encuentra en relación con la severidad del cuadro clínico.

MATERIAL Y METODOS

Cultivo celular

Las células endoteliales fueron aisladas de venas de cordones umbilicales humanos frescos. Se utilizó una técnica estéril en la obtención y manipulación de los cordones, el cordón fue separado de la placenta y colocado en sol. glucosada al 5% hasta su procesamiento, no sobrepasando las ocho horas. El cordón fue canulado con una aguja de punción lumbar número trece, recortada a 3 cm. de longitud; se lavó una vez mediante la utilización de sol. salina HEPES para retirar la presencia de sangre, posteriormente se ligaron ambos extremos del cordón umbilical mediante abrazaderas y se agregó tripsina al 0.05% en sol. de EDTA, manteniéndose en incubación en un baño a 37°C durante 15 min. Al término, se abrió uno de los extremos del cordón y la solución conteniendo tripsina y las células fueron colocadas en un tubo de 50 ml. y centrifugado en un centrífuga clínica a 1,000 rpm durante 12 min., obteniéndose un botón celular, el cual fue resuspendido en medio 199 (TC199), posteriormente fueron sembradas en cajas Falcon de 25 cm₂ con 3 ml. de medio 199 adicionado con 15% de suero fetal bovino, L-glutamina 2mM, heparina 90 µg/ml, factor de crecimiento endotelial 20 µg/ml, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, anfotericina B 0.25 µg/ml. manteniéndose en

ambiente humidificado a 37°C con CO₂ al 5%, se subcultivaron mediante la disociación de las monocapas confluentes utilizando una solución de tripsina-EDTA al 0.1% y utilizándose la segunda generación para los ensayos. (7)

Preparación de homogenado placentario.

Las placentas fueron obtenidas de alumbramientos de pacientes ingresadas a los servicios de Obstetricia del Hospital Regional "Gral. Ignacio Zaragoza" y del Instituto Nacional de Perinatología con embarazo mayor de 20 semanas, normal y alumbramiento normal. Las pacientes preeclámpticas fueron definidas como pacientes con cifras tensionales iguales o mayores a 140/90, proteinuria de al menos 300 mg. en 24 hr. y a las pacientes eclámpticas como aquellas que además de los criterios anteriores presentaran crisis convulsivas. Las muestras de placenta fueron obtenidas inmediatamente después del alumbramiento tomándose aproximadamente 20 gr. de tejido placentario cercano a la emergencia del cordón umbilical y congeladas mediante su introducción en nitrógeno líquido y mantenidas a -70°C hasta su preparación; durante la cual se agregaron aproximadamente 40 ml. de medio 199 a 20 gr. de tejido placentario y se homogenizó mediante la utilización del politrón; a este homogenado se le centrifugó durante 30 min. en un rotor SS34 a 5,000 rpm (3,500 g) a 4°C, el sobrenadante fue ultracentrifugado en un rotor 60 Ti durante una hora a 24,000 rpm (27,000

g). Una vez obtenido el sobrenadante, este fue esterilizado mediante filtración con diámetro de poro de 0.22 μm , y finalmente se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford.

Ensayos.

Las células endoteliales de cordón umbilical humano crecidas en monocapas fueron subcultivadas en cajas de 24 pozos, cuando llegaron estas a confluencia se agregó placenta normal, preecláptica y ecláptica a los pozos en concentración de 5 mg. de proteína por ml. de medio y se mantuvieron en incubación durante 72 hr. a 37°C y 5% de CO₂ posterior a los cuales se les determinó liberación de LDH o reducción de MTT.

Determinación de LDH

Se tomaron 200 μl de muestra de medio (LDH liberado), se agregó detergente Tritón X-100 al medio restante (0.01 del volumen), se incubó durante 15 min y nuevamente se tomaron 200 μl de muestra (LDH total). Se leyó la absorbancia a 340 nm en una celda de cuarzo, haciendo la lectura blanco con amortiguador de Tris-NaCl (Tris 0.984 g/ml, NaCl 1.19 g/ml, pH 7.2).

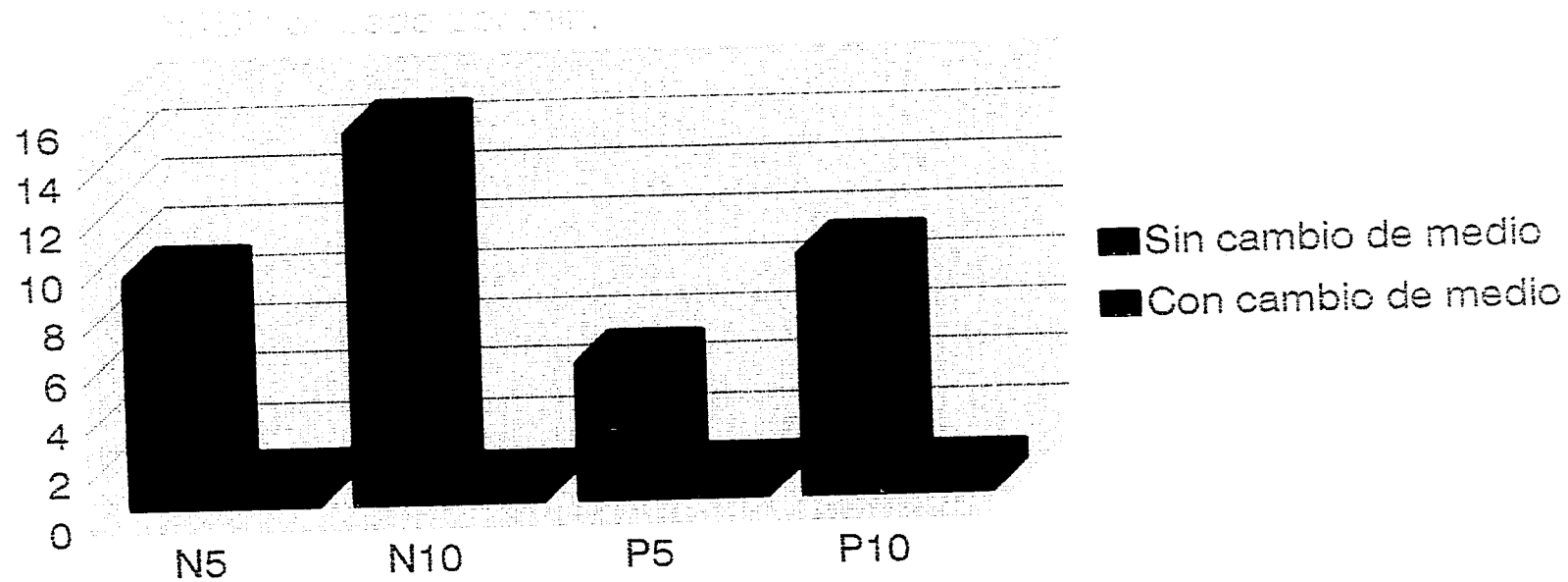
Se adicionó amortiguador Tris-NaCl con NADH 833 μ l, se leyó cada 15 seg. por 2 min., posteriormente se adicionó la muestra (16.7 μ l) y nuevamente se leyó cada 15 seg. por 2 min., se adicionó piruvato (170 μ l). Se leyó cada 15 seg. por 2 min. y se calculó la disminución de Abs 340 nm/min y se calculó la actividad de LDH presente en la muestra. (Abs 340 nm/min)/0.00622= nmol de NADH oxidado por minuto)

Determinación de reducción de MTT

Se adicionó 50 μ l de una solución de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) 5 mg/ml disuelta en sol. amortiguadora fosfato salina de Dulbecco (PBS), incubándose durante 4 hr. al término se retiró el medio y se agregó 1 ml. de sol. ácido-isopropanol 0.04 N. Se leyó la absorbancia a 570 nm y se sustrajo la lectura a 630 nm. El control positivo se obtuvo agregando Tritón X-100 al 0.1%, el control negativo no fue adicionado con MTT.

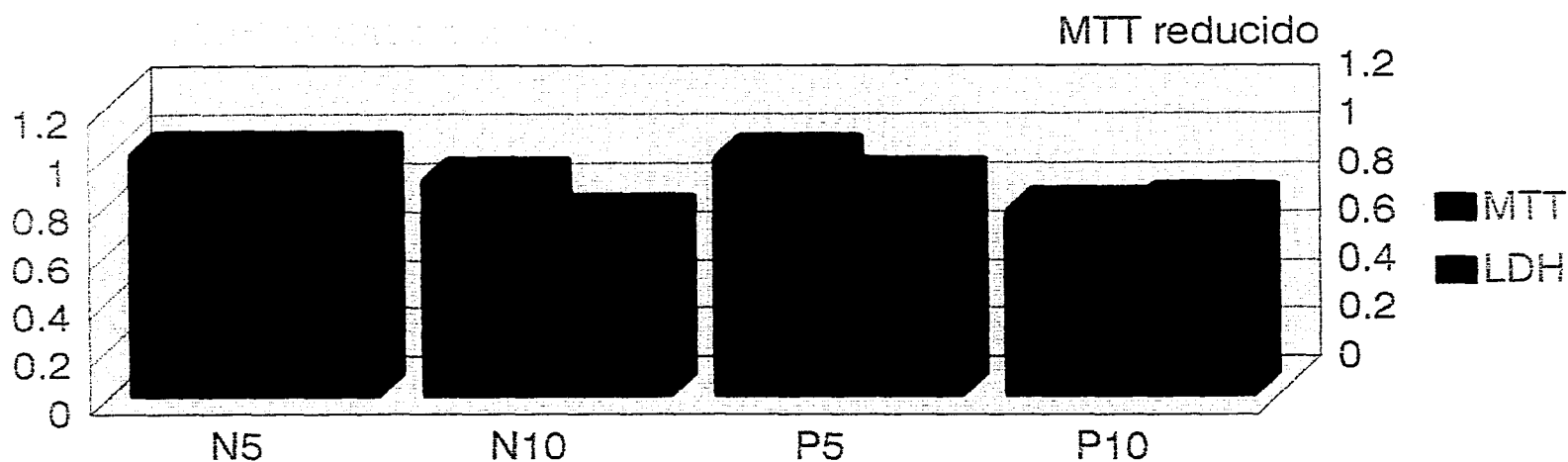
ACTIVIDAD DE LDH

CELULAS ENDOTELIALES



N= Placenta normal
P= Placenta preecláptica
5 y 10 = mg. adicionados.

COMPARACION DE ACTIVIDAD LDH Y REDUCCION MTT CELULAS ENDOTELIALES



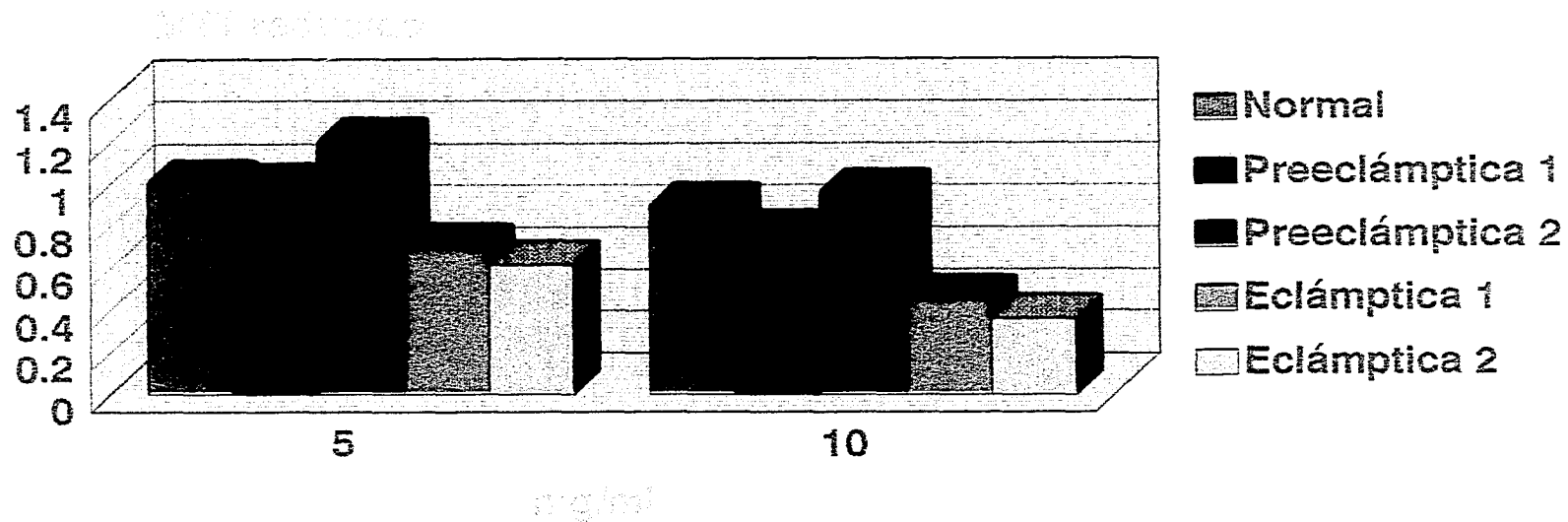
N= Placenta normal

P= Placenta preeclámptica

5 y 10 = mg. adicionados.

PLACENTAS PREECLAMPTICAS Y ECLAMPTICAS

RECUCCION DE MTT
Células endoteliales



ANALISIS DE RESULTADOS

La actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células endoteliales posterior al período de incubación con el homogenado placentario normal o preeclámptico medida sin eliminar el medio es hasta diez veces mayor a la actividad encontrada cuando se cambia 24 hr. antes el medio que contiene el homogenado placentario. La actividad de LDH se ve incrementada al doble cuando la concentración de homogenado placentario es de 10 mg/ml. cuando no se ha eliminado el medio con homogenado. La actividad de LDH de las células incubadas con homogenado placentario normal a la cual no se le eliminó el medio es mayor al preeclámptico. Estos resultados sugieren que existe actividad de LDH en el homogenado placentario normal y preeclámptico, siendo mayor está en el homogenado placentario normal.

La comparación entre la actividad de LDH y la reducción de MTT por las células endoteliales posterior a la incubación con homogenado de placenta normal y preeclámptica muestran resultados similares. La reducción de MTT y la actividad de LDH por las células incubadas con el homogenado de placenta normal en concentración de 5 mg/ml es un 1.5% mayor al del homogenado placentario preeclámptico en la misma concentración, mientras que a concentración de 10 mg/ml la diferencia es del 14%.

En los niveles de reducción de MTT por las células endoteliales incubadas con homogenado de placentas normales, preeclámpticas y eclámpticas a concentración de 5 mg/ml no existe diferencia entre las de homogenado normal y preeclámptica, mientras que las incubadas con homogenado eclámptico muestra una disminución de la reducción de casi la mitad de la obtenida por las incubadas con homogenado placentario normal. A la concentración de 10 mg/ml de homogenado placentario se encuentra una situación similar.

DISCUSION

La existencia de actividad de LDH presente en el homogenado placentario se explica pues al realizarse la homogenización se rompen las células placentarias liberando LDH al medio, esta actividad de LDH en los homogenados placentarios es mayor en los provenientes de placentas normales por unidad de proteína en comparación a la encontrada en los homogenados de placentas toxémicas. Un aumento de la actividad de LDH en las placentas normales se explica como una mayor síntesis de esta proteína en relación al resto de proteínas en las placentas normales, mientras que en las preeclámpticas esta síntesis se vería disminuída. Sin

embargo una inhibición de la enzima por factores presentes en el homogenado placentario también explicaría una disminución en la actividad de la enzima en relación a la cantidad de proteína.

Los métodos utilizados aquí para medir el daño producido a las células endoteliales son diferentes y valoran diferentes niveles. La lactato deshidrogenasa es una enzima citoplásmica cuya actividad medida en el medio de cultivo implica la liberación de esta por daño celular aumentando la permeabilidad de la membrana para esta enzima. La reducción de MTT depende de una actividad metabólica y respiratoria conservada por la célula. La disminución en la reducción de MTT por las células endoteliales incubadas con homogenados de placentas eclámpticas en relación a las normales indica una disminución en el nivel metabólico y respiratorio de la célula endotelial, manifestando un daño celular a este nivel dado por factores presentes en el homogenado de estas placentas. La menor actividad de lactato deshidrogenasa al medio en las células endoteliales incubadas con homogenados placentarios preeclámpticos en relación a los normales indican que el daño celular dado por los factores presentes en el homogenado de placenta pueda no estar dado a este nivel, o que si existe daño endotelial y liberación de lactato deshidrogenasa al medio este disminuida la actividad de la enzima por daño a la estructura de la enzima o la presencia de inhibición.

Ahora bien existe una disminución en la reducción de MTT en aquellas células que fueron incubadas con homogenados placentarios eclámpticos en relación a los preeclámpticos y

normales, esto manifestando un mayor daño celular en estas, producido por una mayor actividad o concentración de factores presentes en el homogenado placentario toxémico, correlacionando el mayor daño celular metabólico y respiratorio con el estado clínico; sin embargo el que no exista un cambio en relación a la reducción de MTT entre las células endoteliales incubadas con homogenados de placentas preeclámpticas y normales sugiere que este método no es lo suficientemente sensible para detectar un posible nivel de daño menor.

Durante el presente trabajo no se logró determinar por problemas técnicos la actividad de lactato deshidrogenasa del medio de células endoteliales incubadas con homogenados de placentas eclámpticas; cuyo desarrollo quedaría como continuación del presente trabajo.

CONCLUSIONES

El homogenado placentario toxémico causa daño celular metabólico y respiratorio en células endoteliales en cultivo.

Este daño esta asociado con la severidad de la toxemia, siendo mayor en aquellas pacientes con cuadro clínico de eclampsia en relación a aquellas con preeclampsia.

BIBLIOGRAFIA

1. MacGillivray I. Preeclampsia: the hypertensive disease of pregnancy. Philadelphia: WB. Sanders, 1983.
2. Campbell DM, Campbell AJ. Evans blue disappearance rate in normal and preeclamptic pregnancy. Clin. Exp. Hypertens. 1983, 2:163-169.
3. Roberts JM. Pregnancy related hypertension. In: Creasy RK, Resnik R. eds. Maternal fetal medicine: principles and practice. Philadelphia: WB Sanders, 1989.
4. Musci JM, Roberts JM, Rodgers GM, Taylor RN. Mitogenic activity is increased in the sera of preeclamptic women prior to delivery. Am. J. Obstet. Gynecol. 1988;159:1446-51.
5. Rodgers GM, Taylor RN, Roberts JM. Preeclampsia is associated with a serum factor cytotoxic to human endothelial cells. Am. J. Obstet. Gynecol. 1988;159:908.
6. Tsukimori K, Maeda H, Shingu M, Koyanagi T, Nobunaga M, Nakano H. The possible role of endothelial cells in hypertensive disorders during pregnancy. Obstet Gynecol 1992;80:229-33.
7. Jaffe EA, Nachman L, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J. Clin. Invest. 1973;52:2745-56.

8. Taylor RN, Crombleholme WR, Friedman SA, Jones LA, Casal DC, Roberts JM. High plasma cellular fibronectin levels correlate with biochemical and clinical features of preeclampsia but cannot be attributed to hypertension alone. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1991;165(4):895-901.

9. Taylor RN, Casal DC, Jones LA, Varma M, Martin JN, Roberts JM. Selective effects of preeclamptic sera on human endothelial cell procoagulant protein expression. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991;165:1705-10.

10. Ferris TF. Pregnancy, preeclampsia, and the endothelial cell. *N. Engl. J. Med.* 1991;325(20):1439-40.

11. Dudley DJ, LaMarche S, Mitchell MD. An endothelial cell model for the investigation of the molecular regulation of fetal vascular tone. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1991;165:1723-6.

12. Kraayenbrink AA, Dekker GA, van Kamp GJ, van Geijn HP. Endothelial vasoactive mediators in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1993;169:160-5.

13. Choo V. Views on vasoactive substances. *Lancet* 1994;343:845-6.

14. Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994;171:944-8.

15. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: An endothelial cell disorder. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1989;161:1200-4.

16. Zeeman, GG, Dekker GA. Pathogenesis of Preeclampsia: A Hypothesis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 1992;35(2):317-337.