

Antioxidantes eritrocitarios y peroxidación lipídica en la fisiopatología perinatal.

Papel de crecimiento intrauterino, de la edad gestacional y de la hiperbilirrubinemia neonatal.

Carlos Paredes¹, Elena Casas¹, Vicente Marco¹, Joaquín Duarte¹, Francisco Martínez¹, Juan Brines¹, Maria José Garcia², Maria del Carmen Tormos² y Guillermo T. Sáez².

¹Depto. De Pediatría, Obstetricia y Ginecología y ²Depto. de Bioquímica y Biología Molecular Facultad de Medicina. Universitat de Valencia.

Resumen

Hemos estudiado el metabolismo oxigénico y grado de estrés oxidativo en tres situaciones fisiopatológicas relacionadas con el periodo perinatal como son: Retraso en el crecimiento intrauterino (RCIU), niños pretérmino (PT) y la hiperbilirrubinemia neonatal (BTC).

Hemos observado diferencias significativas tanto en el grado de peroxidación lipídica como en los niveles de antioxidantes sanguíneos en los tres grupos estudiados con respecto a la población sana. Así, el RCIU se acompaña de un aumento en los niveles plasmáticos en cordón del malondialdehído (MDA) junto con una disminución también significativa de la actividad superóxido dismutasa (SOD). En los niños PT no se observa aumento de la peroxidación lipídica aunque sí la disminución de la SOD y un aumento del glutatión reducido (GSH). En ambos grupos el resto de parámetros no se ven alterados con respecto a los niños control.

En los niños con hiperbilirrubinemia existe un aumento muy significativo del MDA, mientras que los niveles eritrocitarios de GSH están incrementados con respecto al grupo control. Estos resultados indican que trastornos fisio-metabólicos del recién nacido se acompañan de alteraciones en el balance pro-antioxidante que pueden contribuir tanto a la patogénia como al pronóstico de cuadro fisiopatológico neonatal.

Palabras clave: Estrés oxidativo, enzimas antioxidantes, peroxidación lipídica, hiperbilirrubinemia, crecimiento intrauterino, pretermino.

Introducción.

La presencia de niveles fisiológicos de antioxidantes en el neonato es clave para hacer frente a la acción citotóxica inducida por las especies moleculares oxigénicas (estrés oxidativo) y, por lo tanto, para el mantenimiento de la homeostasis celular y orgánica (1). Diversas patologías asociadas al periodo neonatal reconocen como mecanismo patogénico subyacente al estrés oxidativo que aparece como resultado de alteraciones en la adecuada maduración de los niveles de antioxidantes tisulares (2).

Durante los últimos años se centrado la atención experimental y biomédica en la identificación de antioxidantes naturales del plasma sanguíneo, así como de parámetros indicativos de estrés oxidativo. Además de la reconocida efectividad de los sistemas enzimáticos como Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutathion Peroxidasa (GPx) y la acción antioxidantes de vitaminas como C y E, se ha propuesto como agentes defensivos contra el estrés oxidativo al Glutathion Reducido (GSH), el Ácido Úrico y la Bilirrubina (3).

En este sentido cabe destacar el papel de la Bilirrubina, cuyos niveles plasmáticos aparecen frecuentemente incrementados durante los primeros días de vida como consecuencia de la hemólisis que acontece en estos niños y a la que se atribuyen propiedades antioxidantes (4). Sin embargo, los trabajos realizados en este sentido son todavía escasos y en algunos casos contradictorios.

En este trabajo nos hemos planteado el estudio de la posible relación existente entre los niveles altos de bilirrubina y el estatus pro-antioxidante en niños recién nacidos valorando como antioxidantes las actividades enzimáticas, SOD, CAT y GPx y la concentración de GSH y como parámetro de estrés oxidativo los niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) como índice de peroxidación lipídica. Por otra parte hemos estudiado también los cambios, tanto de antioxidantes como de MDA, en niños RCIU y PT, como sujetos susceptibles de padecer retrasos en la maduración de los sistemas antioxidantes y, por lo tanto, de un estrés oxidativo.

Metodología

Todos los recién nacidos objeto de estudio procedieron del Hospital Clínico Universitario de Valencia, Servicio de Pediatría Obstetricia y Ginecología.

Para el estudio de la hiperbilirrubinemia ($BTC > 15 \text{ mg/dl}$) se han utilizado niños recién nacidos de ambos sexos con edades comprendidas entre 1 y 5 días de vida y pesos al nacer entre 2700 y 4000g. Para el resto de los grupos los criterios de clasificación fueron: Retraso en el crecimiento intrauterino (RCIU), con peso inferior al percentil 10 correspondiente a su edad gestacional ; niños pretérmino (PT), de edades gestacionales < 37 semanas.

A partir de sangre total, ya sea procedente de cordoón o venoclisis, se lleva a cabo su procesamiento, previa separación de alícuotas, para la determinación de hemoglobina (Kit de Boehringer MPR 3-124729) y de actividades enzimáticas siguiendo los protocolos descritos en Greenwald RA ed. 1986 (5). Las actividades se expresan como unidades, μmoles tal y como se especifican en las tablas I y II. La determinación de MDA se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita previamente (6). En todos los casos se aplicó la t de Student para el cálculo de la significancia entre los valores control y los del problema.

Resultados y Discusión

En la tabla (I) se representa los valores de MDA y antioxidantes mencionados anteriormente en sangre tanto de niños control como hiperbilirrubinémicos, así como la significancia estadística encontrada al comprobar un mismo parámetro en ambos grupos estudiados.

Al contrario de lo cabría esperar, la peroxidación lipídica es mucho mayor en el plasma de los niños con hiperbilirrubinemia que en los normales o grupo control. Así, el valor basal de MDA de $38,35 \text{ nmol/ml}$ calculado para los niños control alcanza el valor de $70,12 \text{ nmoles/ml}$ en el plasma de niños hiperbilirrubinémicos, lo que respresenta un incremento del 45% y, por lo tanto estadísticamente significativo ($p < 0.005$).

Al comparar las actividades enzimáticas, entre los dos grupos estudiados, no se observan diferencias. Cabe la excepción de la actividad CAT que es mayor en los niños afectados de lesión eritrocitaria (34.54 U/mgHb del control frente a 45.25 U/mgHb en niños afectados). Sin embargo esta diferencia no resulta estadísticamente significativa y, por lo tanto, carente de significado fisiopatológico. Por el contrario, el GSH también se encuentra aumentado en el grupo de niños con hiperbilirrubinemia. Este aumento es estadísticamente significativa con $p < 0.05$. Aunque por el momento no conocemos el mecanismo bioquímica de este efecto, este resultado estaría a favor

de una mayor capacidad antioxidante del plasma en los niños hiperbilirrubinémicos si no fuera por el incremento tan llamativo de MDA que se observa en estos últimos.

En base a los resultados obtenidos todo parece indicar que el mayor grado de peroxidación lipídica en el grupo de niños afectos puede ser el resultado de la destrucción eritrocitaria que acontece en estos sujetos, lo que condiciona secundariamente un aumento en la disponibilidad plasmática de materiales peroxidables, es decir, de los fosfolípidos constituyentes de la membrana celular. Por otra parte, también conviene señalar que la actividad antioxidante de la bilirrubina se ha observado siguiendo distintas aproximaciones experimentales, si bien, en algunos casos los resultados obtenidos son algo contradictorios. En este sentido cabe destacar las últimas observaciones realizadas por Mireles LC y cols (7) que señalan un doble papel antioxidante/prooxidante de esta molécula hematógena dependiendo de su concentración plasmática.

Por lo que respecta a los recién nacidos con RCIU hemos observado un aumento del MDA en el plasma de la sangre de cordón con respecto al grupo control que podría explicarse, en parte, por la disminución significativa de la actividad SOD que presentan los neonatos con retraso de su crecimiento intrauterino. Esta enzima es responsable de la detoxificación de radicales superóxido cuya producción tras el nacimiento está aumentada como consecuencia del incremento en la oferta del oxígeno respirado. En los recién nacidos PT también se observa una disminución de esta enzima (SOD). Sin embargo en este grupo no se observa aumento de la peroxidación lipídica, lo que podría estar relacionado con el incremento significativo de antioxidante GSH cuya acción estabilizadora de radicales superóxido e hidroxilo es muy importante.

Conclusiones

- 1.- La peroxidación lipídica, estimada por los niveles de MDA, en el plasma de niños afectos de hiperbilirrubinemia es significativamente mayor que en los niños normales. No se observan cambios en las actividades enzimáticas antioxidantes, mientras que el GSH está significativamente aumentado.
- 2.- Los niños con RCIU presentan mayor índice de MDA y menor actividad de la SOD.
- 3.- Los niños PT presentan una actividad SOD disminuida y niveles de GSH más altos.

Bibliografia.

1.- Fridowich, I (1978)

The biology of oxygen radicals

Science 209, 875-877

2.- Saugstad, O.D. (1990)

Oxygen toxicity in the neonatal period.

Acta Paediatr.Scand. 79, 881-892

3.- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.

Protection against oxidants in biological systems. The superoxide theory of oxygen toxicity.

In Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (eds.) : Free Radicals Biology and Medicine. Oxford England, Clarendon Press 1989 p.86.

4.- Stocker, R., and Ames, B. (1988)

Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8130-8134.

5.- Greenwald, R.A. ed. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. CRC Press. Boca Raton Florida, USA.

6.- Mitsuru, U., and Midori, M. (1978)

Determination of malondialdehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test.

Anal. Biochem. 86, 271-278.

7.- Mireles, L.C., Lum, M.A., and Dennery, P.A. (1999)

Antioxidant and cytotoxic effects of bilirubin on neonatal erythrocytes.

Pediatr. Res 45(3) 355-362.

Tabla I

Peroxidación lipídica y estatus antioxidante sanguíneo en la hiperbilirrubinemia neonatal.

	CONTROL	HIPERBILIRRUBINEMIA
MDA		
Nmoles/ml	38.35±8.65 (13)	70.12±14.82 (12)*
SOD		
U/mg.Hb	2.97±0.94 (10)	2.99±0.80 (13)
Catalasa		
U/g.Hb	34.54±17.70 (13)	45.25±13.20 (10)
GSH		
µmoles/g.Hb	2.42±0.96 (8)	3.99±1.67 (6)**
GPx		
U/g. Hb	68.85±15.77 (9)	69.88±19.73 (8)

Los resultados son media±S.D. con el n° de experimentos en parentesis.

*p<0.05, **p<0.005.

Tabla II¹

Peroxidación lipídica y niveles de antioxidantes en neonatos R.C.I.U. y P.T.

	MDA Nmoles/ml	SOD U/mgHb	CATALASA U/g.Hb	GPx U/g.Hb	GSH μmoles/g.Hb
Control	36.12±8.9 (53)	3.75±1.17 (44)	60±20 (38)	35±12 (45)	2.9±1.9 (32)
P.T.	34.79±13.4 (18)	2.66±0.58 (16)*	50±20 (17)	43±23 (10)	8.0±3.0 (9)*
R.C.I.U.	73.13±15.8 (3)	2.38±1.5 (3)**	40±10 (3)	38±7 (5)	3.4±2.1 (5)

Los resultados son media±S.D. con el n° de experimentos en paréntesis.

*p<0.005 y **p<0.05