

**HIPERHOMOCISTEINEMIA,
ESTRÉS OXIDATIVO Y FACTORES PROTROMBÓTICOS
EN RESPUESTA A ESTRÉS CRÓNICO EN RATAS**

Scoppa Hilda G, Farías Marcos, Echeagaray Norberto A, Bensi Nora, Binotti Silvana, Stagnoli Soledad, Gauna Hector, Niebylski Ana.

Orientación Fisiología Animal. Dpto Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto. Provincia Córdoba

Scoppa Hilda G: Dirección postal: Ruta 8,km 601.(5800) Rio Cuarto. Córdoba. Argentina.

e-mail: hscoppa@exa.unrc.edu.ar

RESUMEN

Estudios clínicos han demostrado que el aumento de la homocisteína en plasma se asocia a mayor riesgo de enfermedades tromboembólicas. Los mecanismos subyacentes no se han dilucidado completamente e implicarían al estrés oxidativo y a los efectos proinflamatorios. Los niveles plasmáticos de homocisteína están afectados por factores nutricionales, genéticos y la exposición a estrés. El objetivo de este estudio fue evaluar los cambios en los niveles plasmáticos de homocisteína, estrés oxidativo y factores protrombóticos, en ratas sometidas a estrés crónico. Se utilizaron ratas Wistar machos controles y estresadas, expuestas a estrés por inmovilización durante 14 días, 2 horas por día. Luego del último estrés, se extrajeron muestras de sangre y se determinaron los niveles plasmáticos de corticosterona, homocisteína, lipoproteína (a) (Lp(a)), malondialdehído (MDA) y fibrinógeno, capacidad antioxidante del plasma (FRAP), tiempo de coagulación, tiempo de tromboplastina parcial activado y recuento de plaquetas. Los animales estresados mostraron mayores valores de corticosterona ($p=0.01$), homocisteína ($p=0.009$), Lp(a) ($p=0.02$), fibrinógeno ($p=0.02$) y plaquetas ($p=0.009$) con respecto a los controles. También se encontró una menor capacidad antioxidante del plasma, menor tiempo de coagulación ($p=0.01$) y de tromboplastina parcial activada ($p=0.03$) en los animales estresados. El incremento de la homocisteína en los animales estresados se asoció con una disminución en la capacidad antioxidante plasmática y un menor tiempo de coagulación, evidenciándose como un factor protrombótico adicional a los factores clásicos como el incremento del fibrinógeno y del número de plaquetas en respuesta al estrés. El incremento en la Lp(a), al competir con el plasminógeno, sería un factor predisponente que aumentaría el riesgo de episodios tromboembólicos en situaciones de estrés crónico.

Palabras claves: Homocisteína, Trombosis, Estrés oxidativo

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han demostrado que la presencia de una concentración elevada de homocisteína en plasma constituye un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y de tromboembolismo venoso. El mecanismo fisiopatológico a través del cual la homocisteína induce el daño vascular no se ha dilucidado completamente. Diversas investigaciones han involucrado a la lesión endotelial, al incremento de agregación plaquetaria mediada por el tromboxano, a la proliferación de células musculares lisas, al aumento de la unión entre la lipoproteína (a) y la fibrina, a la inhibición de la expresión de trombomodulina en la superficie celular con reducción en la activación de la proteína C y al aumento de la oxidación de LDL (1).

Existen evidencias de los efectos tóxicos de la homocisteína sobre la pared arterial que promueven aterosclerosis y trombosis. El aumento de homocisteína origina menor biodisponibilidad de óxido nítrico, mayor proliferación celular, aumento de estrés oxidativo y activación de plaquetas; sin embargo aún no ha sido establecida la relación causa – efecto. Recientemente se ha reportado que la hiperhomocisteinemia interfiere en la formación de redes de fibrina más compactas y ramificadas, asociadas a una fibrinólisis defectuosa (1).

La homocisteína (HC) es un aminoácido azufrado que desempeña un papel importante en la transferencia de grupos metilos en el metabolismo celular y es sintetizada como producto intermedio del metabolismo de la metionina por acción de la enzima metionina adenosiltransferasa (MAT). Por su parte, la metionina se puede regenerar a partir de la homocisteína por reacciones de remetilación catalizadas por la enzima homocisteínametiltransferasa (HMT) llamada también metionina sintetasa, para cuya función se requiere tanto de la vitamina B12 como del 5,10-metilentetrahidrofolato, este último actuando como co-sustrato, una vez que es convertido a 5-metilentetrahidrofolato por acción de la enzima metilentetrahidrofolatoreductasa (MTHFR) (1, 2).

Existen diversas causas que pueden aumentar las concentraciones plasmáticas de la homocisteína (3-5), conduciendo a una hiperhomocisteinemia, entre las que podemos

mencionar: a) mutaciones enzimáticas a nivel de MTHFR y HMT, b) alteraciones nutricionales como: deficiencia de folatos, deficiencia de cobalamina, deficiencia de piridoxina y fallas en la absorción de la vitamina B12, c) alteraciones sistémicas, entre las que se encuentran: insuficiencia renal crónica, hipotiroidismo, anemia perniciosa, insuficiencia hepática, neoplasias y trasplantes, d) factores farmacológicos y tóxicos, e) exposición al estrés (6).

Los resultados de investigaciones de intervención secundaria actuales pueden contribuir a dilucidar la participación de la homocisteína en la patogenia y en la prevención de la enfermedad vascular.

Teniendo en cuenta que los niveles plasmáticos de homocisteína están afectados por factores nutricionales, genéticos, exposición a estrés, entre otros, el objetivo de este estudio fue, evaluar los cambios en los niveles plasmáticos de homocisteína, el estrés oxidativo y los factores protrombóticos en ratas sometidas a estrés crónico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho albinas de la cepa Wistar, separadas en dos grupos de 20 ratas cada uno: controles y estresadas. Se expusieron a estrés por inmovilización en plancha, 2 horas por día durante 14 días. Se extrajeron muestras de sangre al final de los 14 días y se determinaron los niveles plasmáticos de:

- Corticosterona por radioinmunoensayo (RIA) (Armario A. y Castellanos J.) (7) Estándar de corticosterona procedente de Sigma, antisuero contra corticosterona procedente de Bioclin (UK).
- Homocisteína por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), acoplada a detección de fluorescencia (Minniti G. y col.) (8)
- Capacidad antioxidante del plasma (FRAP) (M. Benzie y Strain) (9)
- Malonildialdehído (MDA) por método de Okawa (10)
- Lipoproteína (a) por ELISA (Lequin R. M.) (11)
- Fibrinógeno (M. Clauss) (12)

- Tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) (M. coagulométrico, utilizando el kit de Hemo-Médica)
- Recuento de plaquetas (Analizador hematológico, M. impedancia)

En todos los casos se siguieron estrictamente las instrucciones provistas por los fabricantes.

Análisis estadístico: La significancia estadística de los resultados fue evaluada con el programa estadístico STATÍSTICA (Statasoft, Inc.1992, V7, Microsoft).

RESULTADOS

Valores plasmáticos de corticosterona: Los niveles de corticosterona plasmática fueron monitoreados y analizados para verificar la situación de estrés a la que fueron sometidos los animales en el modelo experimental utilizado. Las ratas Wistar sometidas a estrés crónico por inmovilización presentaron valores mayores estadísticamente significativos con respecto a los controles no estresados (**Figura I**).

Figura I: Concentración plasmática de Corticosterona

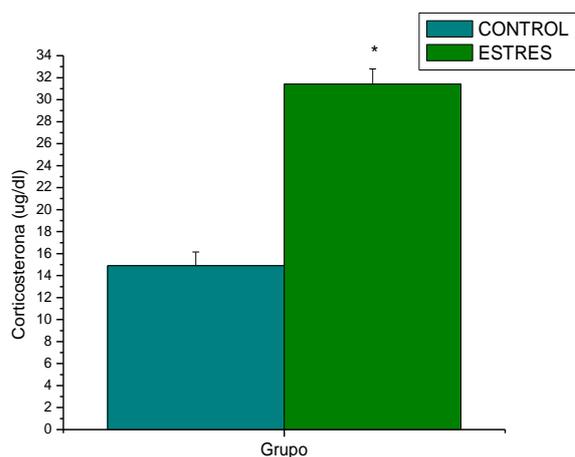


Figura I: Valores de Corticosterona en plasma en ratas Wistar sometidas a estrés crónico por inmovilización. Valores medios: Controles: 14,91±1,23 estresados: 31,41±1,39 (n=20). $p < 0,005$.

Concentraciones de homocisteína en plasma: Se determinaron las concentraciones de homocisteína plasmática en ratas Wistar sometidas a estrés crónico observándose que los

animales estresados presentaron un incremento significativo en los valores de homocisteína plasmática con respecto a los animales controles no estresados (**Figura II**)

Figura II: Concentración plasmática de Homocisteína

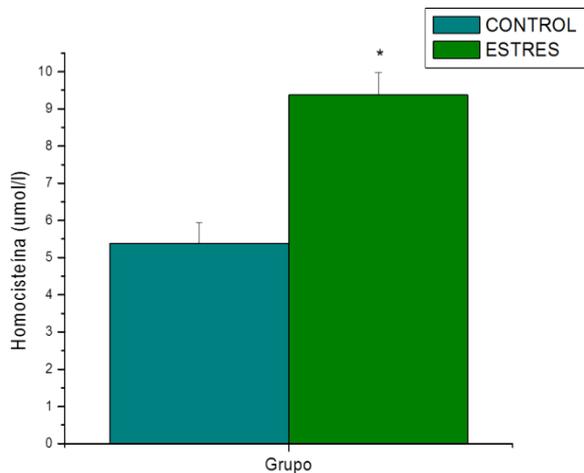


Figura II: Concentraciones de homocisteína en plasma de ratas sometidas a estrés crónico por inmovilización. Valores medios: Controles: 5,38±0,57, estresados: 9,37±0,60 (n= 20). p<0.005.

Capacidad antioxidante del plasma total (FRAP): Al determinar la capacidad antioxidante del plasma total se obtuvieron valores significativamente menores en la capacidad antioxidante del plasma total en los animales estresados con respecto a los animales controles no estresados (**Figura III**).

Figura III: Capacidad antioxidante del plasma total

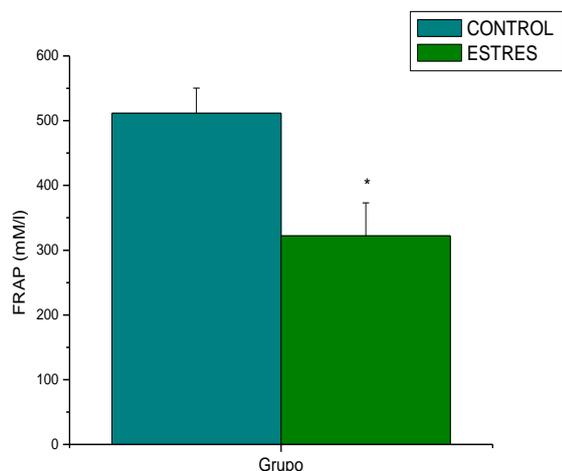


Figura III: Capacidad antioxidante del plasma total en ratas Wistar sometidas a estrés crónico por inmovilización y en controles. Valores medios: Controles: $511 \pm 38,80$, estresados: $322 \pm 51,15$ (n= 20). $p < 0.05$.

Concentraciones de Malondialdehído (MDA) plasmático: La producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y la disminución de las defensas antioxidantes, favorecen el proceso oxidativo y aceleran el progreso de aterosclerosis. Por lo tanto, se determinaron las concentraciones plasmáticas de MDA como indicadores de estrés oxidativo, encontrándose que los animales estresados no mostraron diferencias significativas con respecto a los animales controles no estresados (**Figura IV**).

Figura IV: Concentracion plasmática de MDA

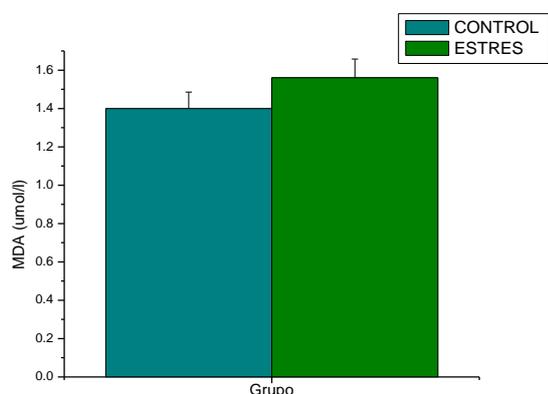


Figura IV : Concentraciones deMDA plasmático en ratas Wistar sometidas a estrés crónico por inmovilización y en controles. Valores medios; Controles: $1,40 \pm 0,46$, estresados: $1,70 \pm 0,58$ (n=20).

Valores de lipoproteína (a) en plasma: Se evaluaron los valores plasmáticos de lipoproteína (a), observándose un incremento significativo en los animales estresados con respecto a los animales controles no estresados (**Figura V**).

Figura V: Concentración plasmática de lipoproteína (a)

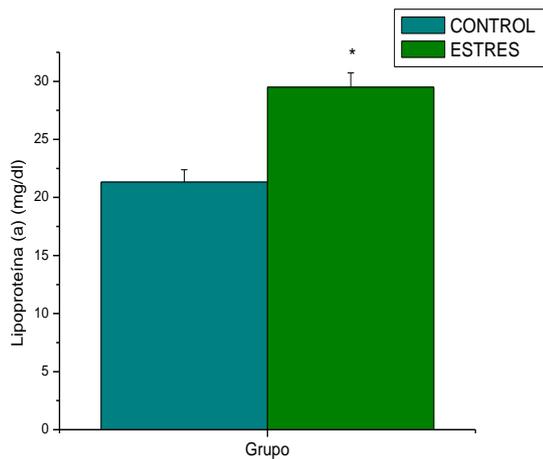


Figura V: Valores de lipoproteína (a) en plasma en ratas Wistar sometidas a estrés crónico por inmovilización y en controles. Los valores medios para cada grupo fueron : Controles: $21,33 \pm 1,05$, estresados: $29,50 \pm 1,23$ (n= 20). $p < 0.05$.

Valores plasmáticos de fibrinógeno: El fibrinógeno es un precursor de la fibrina y participa en los procesos de inflamación, aterogénesis y trombogénesis. Se determinaron los valores plasmáticos de fibrinógeno en ratas sometidas a estrés crónico y en controles. Los resultados revelaron que los animales estresados presentaron mayores niveles plasmáticos de fibrinógeno con respecto a los animales controles no estresados (**Figura VI**).

Figura VI: Concentración plasmática de Fibrinógeno

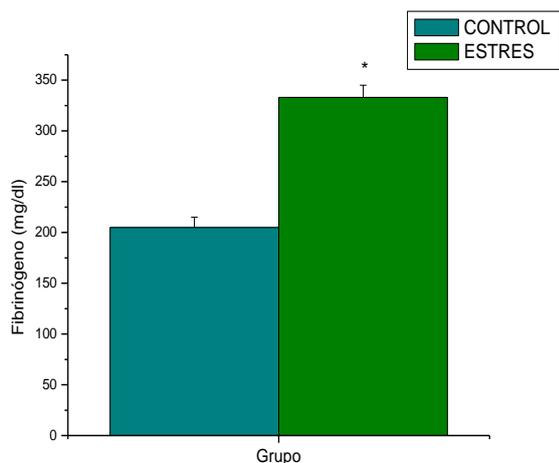


Figura IV: Valores plasmáticos de fibrinógeno en ratas Wistar sometidas a estrés crónico por inmovilización y en controles. Valores medios: Controles: 205±10, estresados: 330±12 (n=20). $p < 0.05$.

Efecto del estrés crónico por inmovilización sobre el tiempo de tromboplastina parcial activado y el número de plaquetas: Al determinarse el tiempo de tromboplastina parcial activado y realizarse el recuento de plaquetas en animales estresados y controles, se evidenció una disminución del tiempo de tromboplastina parcial activado y mayor número de plaquetas con respecto a los animales controles no estresados (**Tabla 1**).

Tabla 1: Efecto del estrés crónico sobre el número de plaquetas y el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT)

Determinación	Controles	Estresados
Rto plaquetas / mm ³	480.000±1,15	641.115±0,78
APTT (seg)	41,20±2,10	37,60±1,20

Valores medios ± SEM del número de plaquetas y del tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT), de ratas Wistar estresadas y controles (n=20).

DISCUSIÓN

La patología del estrés es uno de los principales problemas sociales y de salud pública de las sociedades contemporáneas y el gran desafío de los investigadores se centra en encontrar los mecanismos que rigen el estrés crónico en humanos. Uno de los desafíos fundamentales a los que se enfrenta el investigador es el intento de reproducir en modelos animales situaciones de estrés equiparables a los modelos actuales. El creciente interés de diferentes disciplinas en la investigación del estrés es debido fundamentalmente a que la exposición a situaciones estresantes puede influir en la aparición y desarrollo de diversas patologías(13, 14).

Los niveles de corticosterona plasmática, principal glucocorticoide presente en los roedores, fueron monitoreados y analizados con el propósito de verificar y caracterizar la situación de estrés a la que fueron sometidos los animales en el modelo experimental utilizado (7,14). Los resultados encontrados sobre los valores de corticosterona plasmática, mostraron que la inmovilización a la que fueron sometidos los animales en nuestro experimento es una situación de estrés intenso. Los animales estresados presentaron niveles aumentados de corticosterona plasmática con respecto a sus controles no estresados.

En estudios clínicos previos en humanos y animales se han observado modificaciones en los niveles plasmáticos de homocisteína en respuesta al estrés agudo y crónico. Estudios con ratas han mostrado que el estrés de refrenamiento incrementó un 37% los niveles de homocisteína, en otro estudio realizado con mujeres (40-63 años), la mitad post-menopáusicas, que fueron sometidas a pruebas de estrés psicológico (test aritmético y de discurso) demostró un incremento significativo de homocisteína con regreso a los valores normales durante la fase de recuperación. Otros estudios realizados con ratas Wistar hembras demostraron niveles aumentados de homocisteína en animales expuestos a diferentes tipos de estrés agudo (4). Estos hallazgos son comparables a los resultados obtenidos en nuestro trabajo que han demostrado que los animales sometidos a estrés crónico por inmovilización presentaron un incremento significativo en los niveles plasmáticos de homocisteína con respecto a los controles no estresados.

La homocisteína es un aminoácido de gran importancia en el metabolismo celular que se ha considerado como factor aterogénico en diversas patologías tales como las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. En los últimos años se ha puesto atención a la relación entre la hiperhomocisteinemia y el daño a células neuronales a través de diversos mecanismos de neurotoxicidad tales como: generación de especies reactivas de oxígeno, efectos protrombóticos, promoción del estrés oxidativo, formación de derivados de homocisteína, incremento de la toxicidad de la proteína β -amiloide y la activación de apoptosis, entre otros (15-16).

En los últimos años la hiperhomocisteinemia se ha considerado como un factor de riesgo en varias enfermedades neurológicas y cerebrovasculares como son: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia y enfermedad cerebrovascular. Las alteraciones neurológicas relacionadas con hiperhomocisteinemia se pueden explicar por mecanismos de neurotoxicidad de la homocisteína, tales como: generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), efectos protrombóticos, promoción del estrés oxidativo, formación de derivados de homocisteína (ej: tiolactona de homocisteína), efectos pro-inflamatorios, activación de apoptosis y acumulación de la proteína β -amiloide)(1,17).

Los elevados niveles plasmáticos de homocisteína en los animales estresados provocarían disfunción endotelial mediada en parte por los radicales libres formados durante la oxidación de la homocisteína reducida. Esto es coincidente con la disminución de la capacidad antioxidante del plasma, que fue observada en los animales estresados de nuestro estudio.

La producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y la disminución de las defensas antioxidantes, favorecen el proceso oxidativo y aceleran el progreso de aterosclerosis. Las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres han sido implicados como importantes mediadores patológicos en un gran número de trastornos clínicos, sin embargo, esta implicancia no significa que estos radicales desempeñen siempre un papel directo en el desarrollo de la enfermedad. De hecho, estas especies reactivas predisponen al organismo a enfermedades causadas por otros agentes. En muchos casos, el daño oxidativo

es más una consecuencia del daño tisular que produce la enfermedad, que una causa del mismo (16).

Se ha demostrado que una deficiencia absoluta o relativa de las defensas antioxidantes puede conducir a una situación de estrés oxidativo incrementado, que se ha podido asociar a una gran variedad de patologías incluyendo enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y diabetes entre otras. Benzie y col. propusieron un método que determina la potencialidad plasmática de reducir los iones férricos (Ferric Reducing Ability of Plasma. FRAP), el cual ha sido aplicado para evaluar la capacidad antioxidante total del plasma en nuestro estudio (9). Otros estudios realizados en humanos han demostrado que la capacidad antioxidante total en plasma disminuida se encuentra asociada a mayor expresión clínica del Síndrome Metabólico. Esta condición oxidativa puede contribuir directa o indirectamente a inflamación, trombosis, arterosclerosis y resistencia a la insulina (18).

Los niveles plasmáticos incrementados de MDA pueden constituir una respuesta evidente frente a un daño oxidativo en órganos y tejidos (16). Sin embargo, en nuestro trabajo no se evidenciaron cambios en las concentraciones de MDA en los animales estresados con respecto a los controles no estresados.

Se observó también un incremento en la homocisteína y en Lipoproteína (a), factores que son considerados como trombogénicos por diferentes mecanismos involucrados en el desarrollo de enfermedad vascular. El incremento de la Lipoproteína (a) en los animales sometidos a estrés crónico al compartir con el plasminógeno sería también considerado un factor predisponente que aumentaría el riesgo de trombosis intravascular en situaciones de estrés.

Estos hallazgos sugieren que la hiperhomocisteinemia y el aumento de Lp(a), con la consecuente activación plaquetaria y de los factores de la coagulación, potenciarían el estado protrombótico en situaciones de estrés crónico. Además, el estrés crónico incrementó los niveles de fibrinógeno y plaquetas, disminuyó el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y el tiempo de coagulación en los animales seleccionados en este estudio.

La relación entre la hiperfibrinogenemia, aterosclerosis y trombosis es compleja. Ciertos factores trombogénicos como el fibrinógeno tendrían importancia en la patogénesis de la aterosclerosis, con efectos subsecuentes en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En ese sentido se sabe que el fibrinógeno participa en procesos de inflamación, aterogénesis y trombogénesis. También es un reactante de fase aguda y aumenta la degranulación de las plaquetas en respuesta al difosfato de adenosina (5, 15).

Si bien es cierto que existen diversos estudios en torno al mecanismo de acción de la homocisteína como factor aterogénico, sobre todo en enfermedades cardiovasculares y tromboembólicas, es importante profundizar en los mecanismos de neurotoxicidad provocados por una hiperhomocisteinemia, tales como los tipos de especies reactivas de oxígeno (EROs) que se están generando, los mecanismos apoptóticos implicados en el daño neuronal, la determinación y cuantificación de derivados de homocisteína y los efectos moleculares del estrés oxidativo, entre otros. La homocisteína como aminoácido azufrado juega un papel importante en diversos procesos metabólicos celulares, sin embargo en concentraciones superiores a los valores de referencia se convierte también en un factor neurotóxico relevante en diversas alteraciones neurológicas (17).

En conclusión, el estrés crónico incrementó los niveles de fibrinógeno y plaquetas, disminuyó el APTT. Se observó también un incremento en la homocisteína y en Lipoproteína (a), factores que son considerados como trombogénicos por diferentes mecanismos involucrados en el desarrollo de enfermedad vascular. Los elevados niveles plasmáticos de Homocisteína provocarían disfunción endotelial mediada en parte por los radicales libres formados durante la oxidación de la homocisteína reducida. Esto es coincidente con la disminución de la capacidad antioxidante del plasma observada en los animales estresados. El incremento de la Lipoproteína (a), al compartir con el plasminógeno sería también considerada un factor predisponente que aumentaría el riesgo de trombosis intravascular en situaciones de estrés. Estos hallazgos sugieren que la hiperhomocisteinemia y el aumento de Lp(a), con la

consecuente activación plaquetaria y de los factores de la coagulación, potenciarían el estado protrombótico en situaciones de estrés crónico.

BIBLIOGRAFIA

1. Rivara M, Di Genaro G, Gonzalez R. Homocisteína y enfermedad vascular oclusiva. Rev. Cat. Medicina. 2006;154: 24-30.
2. Valero-Muñoz M, Martín-Fernández B, Ballesteros S, Cachofeiro V, Lahera V, de las Heras N. Rosuvastatina mejora la sensibilidad a la insulina en ratas con sobrepeso inducido por dieta grasa. papel de sirtuina 1 en el tejido adiposo. Clin Invest Arterioscl. 2014 ;26: 161-7.
3. Carmena R. Riesgo elevado de disfunción lipoproteica en la diabetes mellitus tipo 2. Rev Esp Cardiol Supl. 2008; 8: 19-26.
4. De Souza F, Rodriguez M, Tufik S, Nobrega J, Dalmeida V. Acute stressor-selective effects on homocysteine metabolism and oxidative stress parameters in female rats. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 2006; 85: 400-7.
5. Kamath S y Lip G y Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinant. QJM 2003; 96:711-29.
6. Araya A, Cubillo A .Hiperhomocisteinemia y enfermedad arterial coronaria.Rev. Médica. Costa Rica. 2012; 69: 83-90.
7. Armario A., Castellanos J. M. A simple procedure for direct corticosteron radioinmoassay in the rat Rev. Española de Fisiología.1984;40: 437-42.
8. Minniti G., Piana A., Armani U., Cerone R. Determination of plasma serum homocysteine by high- performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. A. 1998; 828 (1-2): 401-5.
9. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. Anal Biochem1996; 239:70-6.
10. Okawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95:351-8.

11. Lequin R. M. " Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). 2005; Clinical Chemistry 51:2415
12. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol 1957; 17: 237-46
13. Bachen E, Muldoon, Matthews K, Stephen B. Manuck S. Effects of hemoconcentration and sympathetic activation on serum lipid responses to brief mental stress. Psychosom. Med. 2002; 64: 587-94.
14. Armario García A. Fisiología y fisiopatología del estrés. El estrés crónico: Aspectos clínicos y terapéuticos. Ed. Mayo. Mod. 2007; 1:19-29.
15. Botero JC, Salazar D, Cortez O. Síndrome metabólico y riesgo cardiovascular .Rev CES Med; 2006; 20: 73-81.
16. Van Haaften R, Haenen G, Evelo C, Bast A. Effect of vitamin e on glutathione dependent enzymes. Drug Metab. Rev. 2003; 35: 215-53.
17. Cuevas M, Jimenez Resendiz S, Vazquez J. La homocisteína: un aminoácido neurotóxico. Facultad Medicina. Universidad Autónoma del Estado de Puebla. Mexico. Rev. 2009; 28: 3-8.
18. Galván Melendez M., Calderón Salinas J., Intrigo Ortega M., Torres Castorena A., Melendez Hurtado C., Quintanar Escorza M. Estrés oxidativo en pacientes con diferente expresividad clínica del Síndrome Metabólico. Med. Interna. México. 2014. 30: 651-9.