



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



"EVALUACION DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y EL
ESTRÉS OXIDATIVO A TRAVÉS DE LA CONCENTRACION
DE LA DIMETILARGININA ASIMETRICA Y EL
MALONDIALDEHIDO COMO MARCADORES
TEMPRANOS DE PREECLAMPSIA"

ROBERTO HERNAN GONZÁLEZ SEPÚLVEDA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUIA: Dra. Pilar Barja

SANTIAGO, CHILE
2009



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



"EVALUACION DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y EL
ESTRÉS OXIDATIVO A TRAVÉS DE LA CONCENTRACION
DE LA DIMETILARGININA ASIMETRICA Y EL
MALONDIALDEHIDO COMO MARCADORES
TEMPRANOS DE PREECLAMPSIA"

ROBERTO HERNAN GONZÁLEZ SEPÚLVEDA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: PILAR BARJA YAÑEZ
PROFESOR CONSEJERO	: HECTOR ADARMES
PROFESOR CONSEJERO	: MONICA DE LOS REYES

SANTIAGO, CHILE
2009

ÍNDICE	página
1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1. Generalidades.....	8
3.2. Mecanismos etiopatogenicos en la preeclampsia.....	9
3.2.1 Alteración en la angiogenesis feto-placentaria.....	11
3.2.2 Disfunción endotelial.....	14
3.2.2.1 Oxido nítrico y dimetilarginina asimétrica.....	15
3.2.3 Rol del Estrés Oxidativo en la Preeclampsia.....	20
3.2.3.1 Daños a biomoleculas por estrés oxidativo.....	23
3.2.3.2 Lipoperoxidacion.....	24
3.3 Predictores de preeclampsia.....	25
3.3.1 Historia clínica y factores de riesgo.....	25
3.3.1.1 Edad.....	26
3.3.1.2 Antecedentes previos de preclampsia.....	26
3.3.1.3 Embarazos múltiples.....	26
3.3.1.4 Periodos interpartos.....	27
3.1.1.5 Historia familiar de preclampsia.....	27
3.1.1.6 Hipertensión crónica.....	27
3.1.1.7 Diabetes insulino dependiente.....	28
3.1.1.8 Nefropatías.....	28
3.1.1.9 Dislipidemia.....	28
3.1.1.10 Índice de masa corporal.....	28
3.1.1.11 Antecedentes de hipertensión.....	29
3.3.2 Doppler de arterias uterinas.....	29
3.3.3 Proteinuria.....	30
3.3.4 Acido úrico.....	30
3.3.5 Proteína placentaria 13.....	31
3.3.6 Proteína plasmática A asociada al embarazo.....	32
3.3.7 Apolipoproteína E.....	32
3.3.8 sFlt-1.....	33
3.3.9 Endoglina soluble.....	34
4. HIPOTESIS.....	35
5. OBJETIVOS.....	35
5.1. Objetivos Generales.....	35
5.2. Objetivos Específicos.....	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
6.1. Diseño.....	36
6.2. Tamaño muestral.....	37
6.3. Técnicas analíticas y bioquímicas aplicadas.....	38
6.3.1 Estrés oxidativo: MDA.....	38
6.3.2 Disfunción Endotelial: ADMA.....	39
7. ANALISIS ESTADISTICO.....	42
8. RESULTADOS.....	42
8.1. Variable bioquímica de disfunción endotelial (ADMA).....	43
8.2. Variable bioquímica de estrés oxidativo (MDA).....	44
9. DISCUSIÓN.....	46

10. CONCLUSIÓN.....	48
11. BIBLIOGRAFÍA.....	49

1 RESUMEN

La preeclampsia es un síndrome del embarazo que se caracteriza por presentar hipertensión arterial, proteinuria y edema. Este síndrome tiene involucrado en su fisiopatología mecanismos como son el estrés oxidativo, una deficiente angiogenesis y disfunción endotelial.

El objetivo de este estudio es evaluar un marcador de disfunción endotelial como es la dimetilarginina asimétrica y un marcador de estrés oxidativo como es el malondialdehído en mujeres preeclámpicas como predictores de esta patología.

Se realizó un estudio de cohorte retrospectivo seleccionando mujeres embarazadas chilenas controladas en el Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Clínico de la Universidad de Chile. A un grupo de mujeres con PE (casos) y a un grupo de mujeres con embarazos normales (controles) se les tomó muestras de plasma para determinar estos marcadores a las 12 y 22 semanas de gestación.

El análisis de varianza no arrojó diferencias significativas entre mujeres preeclámpicas y mujeres con embarazos normales. Pero al analizar las mujeres que presentaron restricción de crecimiento fetal (RCF) a las 22 semanas se registró una diferencia significativa en los promedios de la dimetilarginina asimétrica entre casos y controles. Esto nos hace concluir que la dimetilarginina asimétrica tendría una importante relevancia fisiopatológica en las mujeres que cursan con restricción de crecimiento fetal.

2 INTRODUCCION

La preeclampsia (PE) es una enfermedad de la etapa de parto en el embarazo, que se reconoce clínicamente por la triada: hipertensión arterial, proteinuria y edema. La PE, en algunos casos, puede progresar con convulsiones (proceso conocido como eclampsia), coma, y muerte (**Pritchard *et al.*, 1954**).

La frecuencia de presentación, tanto en Chile como en el resto del mundo, es variable alcanzando entre el 3–5 % de las embarazadas (**Villar *et al.*, 2003**). La causa y el mecanismo responsable de este trastorno ha sido materia de intenso debate por muchos años, y a pesar de ello, constituye un problema aún no dilucidado (**Lyell *et al.*, 2003**). Sin embargo, existen diversas teorías que incluyen la participación de factores genéticos, nutricionales, vasculares y autoinmunes. Entre estos factores toman gran importancia la disfunción endotelial y el estrés oxidativo (**Gupta *et al.*, 2005**).

La disfunción endotelial materna es una característica del establecimiento de la preeclampsia, pero no está claro si es una causa o consecuencia de ella. Varios mediadores de vasodilatación estarían involucrados, como las prostaciclina, pero hay evidencia para sugerir que el más potente vasodilatador en el endotelio materno es el óxido nítrico (NO). Una deficiencia del NO materno sería importante en el desarrollo de la preeclampsia (**Savvidou *et al.*, 2003**).

El NO es producido enzimáticamente por la óxido nítrico sintasa (NOS), que cataliza la transformación de L-arginina, en presencia de oxígeno, en L-citrulina y NO. Además, se ha descrito que la dimetilarginina asimétrica actúa como un inhibidor endógeno de la NOS endotelial (eNOS) ya que compite con esta enzima por la L-arginina (**Kim *et al.*, 2006**).

El malondialdehído (MDA) es uno de los productos secundarios más conocidos de la lipoperoxidación y se puede utilizar como indicador del daño en la membrana celular. Se ha relacionado el estrés oxidativo con la patogénesis de varias enfermedades (**Grotto *et al.*, 2007**), incluyendo la preeclampsia.

Hasta el momento no se ha descrito un mecanismo etiopatogénico preciso que describa de forma definitiva la o las causas desencadenantes de la preeclampsia, con lo cual se hace más difícil el abordaje clínico desde el punto de vista del diagnóstico precoz, prevención y tratamiento de este síndrome. Aún no existe un tratamiento para prevenir el desarrollo de este desorden, sólo existen los pasos para evitar o reducir complicaciones tales como las hipertensión y las convulsiones eclámpticas (**Affi y Churchill, 2003**).

En este estudio de carácter retrospectivo, se pretende determinar el papel de la dimetilarginina asimétrica y el malondialdehído como marcadores tempranos de disfunción endotelial y estrés oxidativo respectivamente, en mujeres de 12 y 24 semanas de embarazo.

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Generalidades

La preeclampsia es una de las afecciones más comunes de las embarazadas y una de las principales causas mundiales de mortalidad materna y perinatal (**Mutter, 2008**); Este síndrome se caracteriza por hipertensión en la segunda mitad del embarazo (presión arterial sistólica ≥ 140 mm. Hg. y/o presión arterial diastólica ≥ 90 mm Hg.) y proteinuria (excreción urinaria ≥ 0.3 g/d) (**Mignini et al., 2006**), presentándose en muchas ocasiones edema, manifestaciones que pueden desaparecer luego del parto.

Los desórdenes hipertensivos del embarazo complican alrededor del 10% de los embarazos, de estos desórdenes aproximadamente el 70% tienen como causa el embarazo propiamente tal (hipertensión relacionada con preeclampsia) y el 30% restante son debidos a una condición de hipertensión preexistente (hipertensión crónica) (**Afifi y Churchill, 2003**). El inicio clínico de la preeclampsia es a menudo insidioso y asintomático, puede incluir dolor de cabeza, disturbios visuales, dolor epigástrico, aumento de peso, edema de las manos y de la cara. Estos signos y síntomas tempranos son importantes para el reconocimiento clínico, puesto que pueden anunciar la progresión a una enfermedad más severa y a menudo más peligrosa para la vida. (**Maynard et al., 2005**).

Este síndrome también puede evolucionar a un cuadro severo denominado eclampsia que se presenta con convulsiones, coma y muerte de la madre y/o hijo. El diagnóstico generalmente se realiza durante la segunda mitad del embarazo (**Davison et al., 2004**). Esta patología además puede causar restricción del crecimiento fetal y partos prematuros iatrogénicos, esto último es debido a que el único tratamiento conocido en la actualidad frente a la aparición de alguna de las manifestaciones de este síndrome clínico es la interrupción del embarazo. La tasa de parto prematuro asociado a esta condición alcanza al 15%, como también el 40% de las causas de inducción del parto (**Merviel et al., 2004**). Estudios epidemiológicos han demostrado una relación entre la preeclampsia y un riesgo mayor de padecer una enfermedad coronaria materna y el síndrome metabólico en la edad avanzada (**Mehendale, 2007**).

3.2 Mecanismos Etiopatogénicos en la Preeclampsia

Se han propuesto muchas causas (por ej. genéticas, nutricionales, inmunológicas e infecciosas) y mecanismos patológicos (placentación anormal, estrés oxidativo, y disfunción endotelial) (**Mignini et al., 2006**). Entre éstas, la más aceptada es la toxémica, que indica que por una alteración en la migración del trofoblasto extravelositario a partir de las 12 semanas de gestación, no se produciría el aumento de calibre de la arteria espiral de la placenta, lo cual se comprueba por medio del Doppler ecográfico. Esto trae como consecuencia la hipoperfusión del territorio útero-placentario, generando un factor desconocido que una vez producido en la placenta, llevaría a disfunción del endotelio vascular materno (**Gupta et al., 2005**). Existen diversos candidatos para este factor desconocido sintetizado en la placenta, entre los cuales se incluye al estrés oxidativo, déficit de óxido nítrico (NO), exceso de dimetil-arginina asimétrica (ADMA), incremento de homocisteína plasmática y aumento de factores antiangiogénicos, entre otros.

Numerosos factores pueden predisponer a la madre a este trastorno, que pueden ser genéticos, de comportamiento o ambiental. La lista de factores predisponentes incluyen la hipertensión, diabetes, el aumento de la resistencia a la insulina, aumento de la testosterona, raza, el aumento de la tensión arterial y la concentración de homocisteína. Curiosamente, estos son también factores de riesgo para otras enfermedades endoteliales (**Roberts y Cooper, 2001**).

Los factores etiológicos hipotéticos pueden calificarse, al menos, en 4 grupos: genéticos, inmunológicos, nutricionales, infecciosos, y las interacciones entre ellos. Las alteraciones fisiopatológicas hipotéticas son numerosas, incluyendo la falla en la invasión de las células del trofoblasto, el estrés oxidativo, disfunción endotelial, alteraciones en hormonas calciotróficas, la liberación de los factores de crecimiento, y las proteínas antiangiogénicas, entre otras. Estos cambios pueden llevar a la hipertensión, proteinuria y otros síntomas del síndrome clínico de la preeclampsia (**Mignini et al., 2006**).

Lo cual esta resumido en el siguiente cuadro

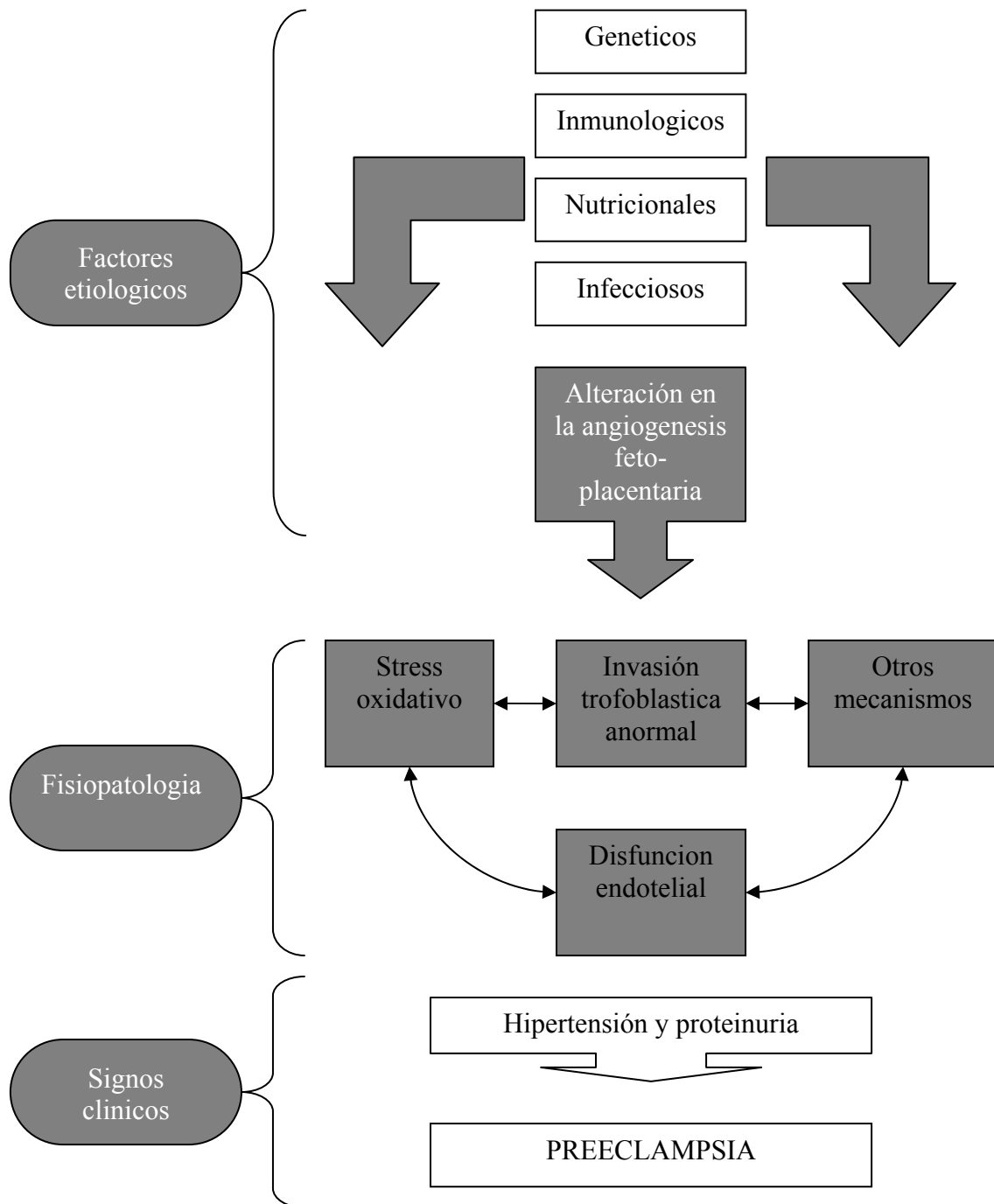


Fig. 1 Un marco para las revisiones sistematicas de los mecanismos fundamentales de la preeclampsia (Mignini *et al.*, 2006).

3.2.1 Alteración en la angiogenesis feto-placentaria

Se debe entender, en primera instancia, determinados mecanismos de la placentación en mujeres embarazadas para concebir de manera adecuada la fisiopatología de la preeclampsia.

La fisiología de la placentación resulta clave para entender la relación entre embarazo e hipertensión. Las células trofoblásticas son células especializadas de la placenta, las que en las vellosidades coriónicas constituyen el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto veloso. Estas células, en su mayor parte, permanecen en los compartimientos fetales, formando las vellosidades flotantes, estructuras irrigadas por la sangre materna en el espacio intervellósario (**Redman y Sargent, 2005**).

En la base de las vellosidades, el citotrofoblasto forma las columnas de anclaje, sobre la que las células se agregan entre sí, adquiriendo posteriormente un fenotipo invasor, el que posteriormente llega hasta las arterias espirales del útero. Este mecanismo del citotrofoblasto se puede considerar como un proceso neoplásico, ya que las células que invaden la pared del útero se asemejan a células tumorales. Después de la invasión estas células pleomórficas adquieren un fenotipo endotelial. Por lo tanto, a partir de las 12 semanas de gestación aproximadamente (edad gestacional en que ocurre este cambio) las arterias espirales del útero materno ya no están revestidas por sus propias células endoteliales, sino que la pared de los vasos está revestida por células trofoblásticas invasoras modificadas; En embarazos normales, células inmunológicas como los macrófagos y células NK facilitan la invasión citotrofoblastica en los segmentos miométrales y la amplia remodelación de las arterias espirales. En la etapa preclínica de la preeclampsia, la invasión citotrofoblastica ha sido restringida con lo cual se ha producido una remodelación arterial insuficiente (**Redman y Sargent, 2005**).

En la siguiente figura se observa la migración del trofoblasto en mujeres embarazadas a nivel materno-placentario

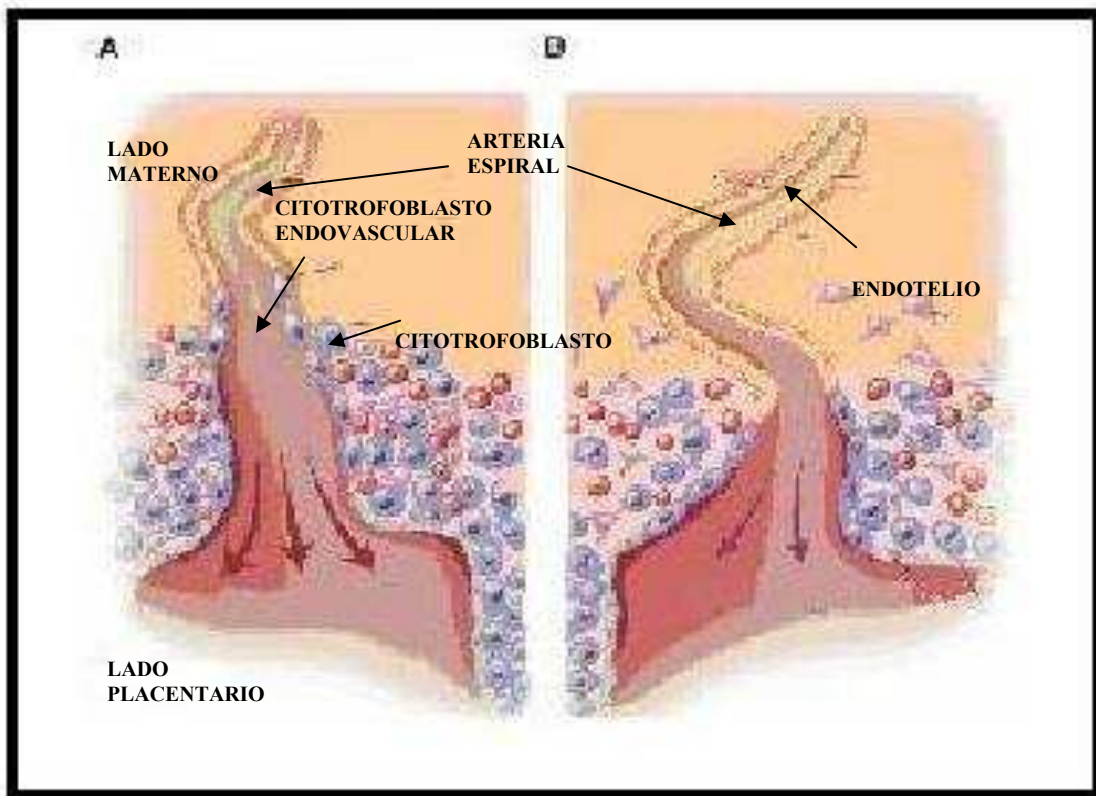


Figura 2. En la figura se muestra la disminución de la invasión trofoblástica de la arteria espiral uterina. Se aprecia una placentación normal (A) con la invasión de células del trofoblasto extravelositario debido a lo cual aumenta el diámetro de la arteria en espiral. Mientras que a la derecha se muestra una placentación anormal (B) correspondiente a la presentada en pacientes preeclámpticas con una baja o nula invasión citotrofoblástica (**Redman y Sargent, 2005**).

La invasión deficiente del trofoblasto y la subsecuente remodelación de las arterias espirales en mujeres preeclámpticas resultarían en un diámetro de las arterias espirales de sólo un 40% respecto a los hallados en embarazos normales (**Wilson *et al.*, 2003**). Al existir una invasión deficiente se convierte el sistema placentario normal de alto flujo y baja resistencia en un sistema de bajo flujo y alta resistencia (puede ser detectada clínicamente por la velocimetría Doppler de las arterias uterinas). Como consecuencia, se produce una 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 (**Roberts y Cooper, 2001**).

Por lo tanto, se debería considerar dos categorías de origen de la preeclampsia: el origen placentario y el origen materno. La preeclampsia placentaria se produce cuando la placenta se encuentra en hipoxia sumándole un ambiente de estrés oxidativo. La preeclampsia materna se origina de la presencia de una placenta normal, pero la madre padece o es susceptible de presentar una enfermedad microvascular, como es el caso de una madre hipertensa o diabética; La mezcla de orígenes y presentaciones de este síndrome es común (**Burton y Jauniaux, 2004**).

Se ha sugerido que la reducción de la perfusión placentaria, por si sola, no es suficiente para que se produzca preeclampsia. La anormal placentación debe interactuar con los factores maternos para que se genere el síndrome. Alteraciones placentarias idénticas a las vistas en preeclampsia, se han reportado con restricción del crecimiento fetal intrauterino y partos prematuros, sin que se presente este síndrome, en los cuales la predisposición materna estaba ausente (**Lala y Chakraborty, 2003**).

Daños secundarios, como depósito de fibrina y trombosis pueden ocurrir en la placenta de pacientes con alteración de la perfusión placentaria, los cuales pueden presentar o no preeclampsia. Además, no todas las mujeres que cursan con baja perfusión placentaria desarrollan preeclampsia, por lo tanto, la respuesta materna debe ser el factor decisivo en el desarrollo de esta enfermedad sistémica (**Walker, 2000**).

Normalmente, el citotrofoblasto placentario sigue la vía de diferenciación llamada pseudo-vasculogénesis, la que lo lleva a adquirir el fenotipo vascular. Sin embargo existe una falla de este proceso en la PE, pero no se sabe exactamente a qué nivel del mecanismo se produce el desperfecto. La pseudovasculogénesis está regulada por una combinación de tensión de oxígeno y factores angiogénicos y antiangiogénicos (**Valdés y Germain, 2001**). Además, hay que considerar que la unidad fetoplacentaria en humanos, esta expuesta a grandes fluctuaciones en la concentración de oxígeno durante el embarazo. La tensión de oxígeno en el oviducto y útero de la mayoría de las especies de mamíferos en el momento de la implantación oscila entre 11 y 60 mm. Hg, que corresponde a aproximadamente el 1-9% de oxígeno. La presión parcial de oxígeno (PO₂) medida dentro de la placenta humana in vivo es inferior a 20 mm. Hg en las 7 a 10 semanas de gestación (**Burton y Jauniaux, 2004**). Mantener una baja concentración de oxígeno durante el período embrionario parece privilegiar la blastulación normal y la

diferenciación celular, y puede protegerlo de los efectos nocivos de las especies radicales libres de oxígeno. Una vez que este proceso se completa a las 11-14 semanas, la tensión de oxígeno intraplacentaria se eleva a más de 50 mm. Hg en una circulación materna plenamente establecida. A pesar de este aumento, los valores siguen siendo bajos en el feto porque la difusión de las características de la placenta se limitan a esta etapa de la gestación. A las 13 a 16 semanas, la PO₂ en la sangre fetal es de 24 mm. Hg, mientras que durante el segundo semestre del embarazo, la tensión de la vena umbilical oscila entre el 35 y el 55 mm. Hg. Todos estos valores son relativamente bajos en comparación con los valores de PO₂ encontrados en la circulación materna, lo que indica que existe un importante gradiente de O₂ entre la madre y los tejidos fetales durante el embarazo. (**Burton y Jauniaux, 2004**).

Respecto a esto, en estudios in Vitro, ha encontrado que existe un efecto importante de la tensión de oxígeno sobre la diferenciación de las células. Con oxígeno al 2% no hay expresión de integrina alfa1, que es una molécula de adhesión vascular, la que sí se expresa en un ambiente con una tensión de oxígeno al 20%. También se pudo demostrar que en las células endoteliales, las propiedades fundamentales de proliferación y diferenciación están controladas, en cierta medida, por la tensión de oxígeno (**Valdés y Germain, 2001**).

3.2.2 Disfunción endotelial

La activación y disfunción endotelial es una característica patogénica importante en mujeres con preclampsia (**Wang *et al.*, 2004**).

Los signos clínicos de hipertensión, proteinuria y edema reflejan dos de los principales eventos patológicos a nivel vascular (es decir, el aumento de la vasoconstricción y el incremento en la permeabilidad vascular). Cambios bioquímicos a nivel circulatorio como el aumento de células de adhesión endoteliales y la disminución de vasodilatadores como las prostaciclina y óxido nítrico hacen pensar que se pueden usar como indicadores de alteración en la función endotelial. Además, de la evidente activación neutrófilo-plaquetaria y el notable aumento de la adhesión plaqueta-

endotelial y neutrófilo-endotelial, sustenta aun más la existencia de un disturbio endotelial en el sistema vascular de mujeres con preeclampsia (**Wang et al., 2004**).

Se ha reportado que la permeabilidad de la monocapa de las células endoteliales presenta un fuerte incremento en mujeres gestantes preeclámpticas, este incremento de la permeabilidad se asocia con una alteración en la distribución de las proteínas de unión endotelial. Además, los sueros de mujeres embarazadas con preeclampsia presentan niveles elevados de lipoperóxidos y citoquina interleucina-8 (IL-8), lo cual hace presumir que estos podrían ser agentes que afectan la permeabilidad endotelial en preeclampsia (**Wang et al., 2004**).

La disfunción endotelial materna es una característica del establecimiento de la preeclampsia, pero no está claro si es una causa o consecuencia de ella. Varios mediadores de vasodilatación estarían involucrados, como las prostaciclina, pero hay evidencia para sugerir que el más potente vasodilatador en el endotelio materno es el óxido nítrico (NO). Una deficiencia del NO materno sería importante en el desarrollo de la preeclampsia (**Savvidou et al., 2003**).

3.2.2.1 Óxido nítrico y dimetilarginina asimétrica

Muchos trabajos recientes se han focalizado en el rol del NO en la mantención de la normotensión en el embarazo (**Holden et al., 1998**). Muchos efectos vasculares protectores del endotelio incluida la vasodilatación, la inhibición de la adhesión de leucocitos y monocitos, la inhibición de la agregación plaquetaria, la modulación de la proliferación de fibroblastos y células de músculo liso vascular, además de propiedades antioxidantes estarían reguladas por el óxido nítrico (**Perticone et al., 2005**). El óxido nítrico es un gas radical libre con diversas funciones de señales intracelulares y extracelulares, que es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) usando como sustrato la L-arginina. Existen tres isoformas de NOS. La NOS es inhibida competitivamente por residuos de arginina con nitrógenos guanidinos metilados; entre las que se describen la NGNG-dimetilarginina (dimetilarginina asimétrica, ADMA) y la NG-metil-L-arginina (L-NMMA) (**Holden et al., 1998**). Ambos, ADMA y L-NMMA

son detectados en orina y plasma humano, aunque ADMA está presente en concentraciones diez veces más altas que el L-NMMA (Holden *et al.*, 1998).

Mujeres en riesgo de preeclampsia, con una alta resistencia de la circulación placentaria, o un feto con bajo peso para la edad gestacional, o ambos, han mostrado concentraciones elevadas de ADMA, el cual es un factor potencial que contribuye con el desarrollo de la preeclampsia y asociado con la disfunción endotelial. ADMA aumenta en pacientes con factores de riesgo por enfermedad vascular y es un predictor independiente de eventos vasculares futuros. ADMA, conjuntamente con su estereoisómero biológicamente inactivo, dimetilarginina simétrica (SDMA), sintetizado a partir de residuos metilados de arginina por proteína-arginina metiltransferasas. ADMA actúa inhibiendo la NOS, mientras que SDMA no tiene actividad inhibitoria (Savvidou *et al.*, 2003).

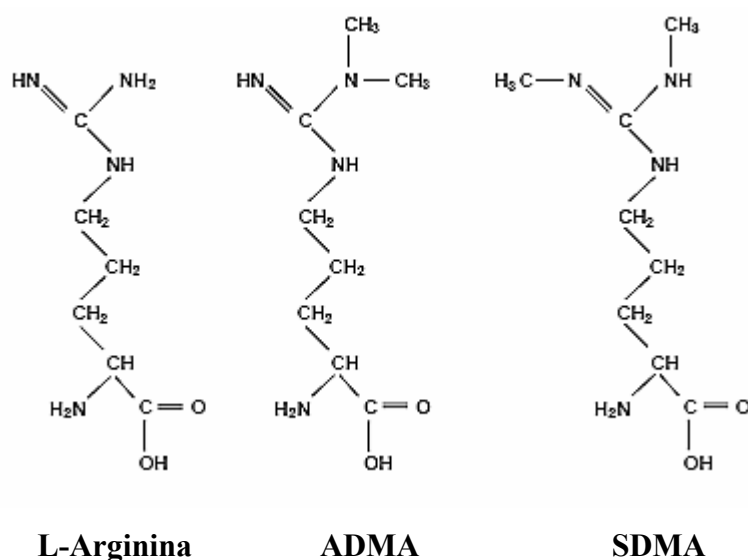


Fig. 3 Estructuras químicas de la L-Arginina, la dimetilarginina asimétrica (ADMA) y la dimetilarginina simétrica (SDMA) (Böger y Zocalli, 2003).

La N-metilación de los aminoácidos lisina, histidina, y arginina en proteínas es una forma específica de modificación post-traducciona que permite que la célula amplíe el repertorio funcional de su proteoma. Los átomos terminales del nitrógeno del grupo guanidino de la arginina se pueden metilar por una familia de enzimas de arginina-metiltransferasas (PRMTs), de las cuales existen dos clases. Hasta la fecha,

nueve miembros de la familia enzimática PRMT han sido identificados, la mayoría de ellos pertenecen a la clase 1. Ambas clases de PRMT catalizan la monometilación de la arginina, pero cuando a un segundo grupo metílico se une a la monometilarginina (MMA), el producto de la reacción es dependiente de PRMT. Las PRMTs clase 1 cataliza la formación de ADMA, mientras que las PRMTs clase 2 catalizan la formación del SDMA (Teerlink, 2007).

El aislamiento de apreciables cantidades de ADMA y SDMA humanos en la orina condujo a la hipótesis de que la excreción renal es la única vía para la eliminación de las metilargininas libres. Sin embargo, la investigación de la vía de eliminación de estos aminoácidos mostró que la excreción urinaria de SDMA fue 30 veces mayor que la de L-NMMA o ADMA en conejos (Tran *et al.*, 2003). Por lo tanto, las vías de eliminación de estas dos metilargininas difieren. En el caso de SDMA, donde la excreción es exclusivamente por vía renal; en cambio en ADMA es primordialmente metabolizada en riñón y placenta por dos dimetilarginina dimetilaminotransferasas (DDAH I y II) respectivamente (Savvidou *et al.*, 2003).

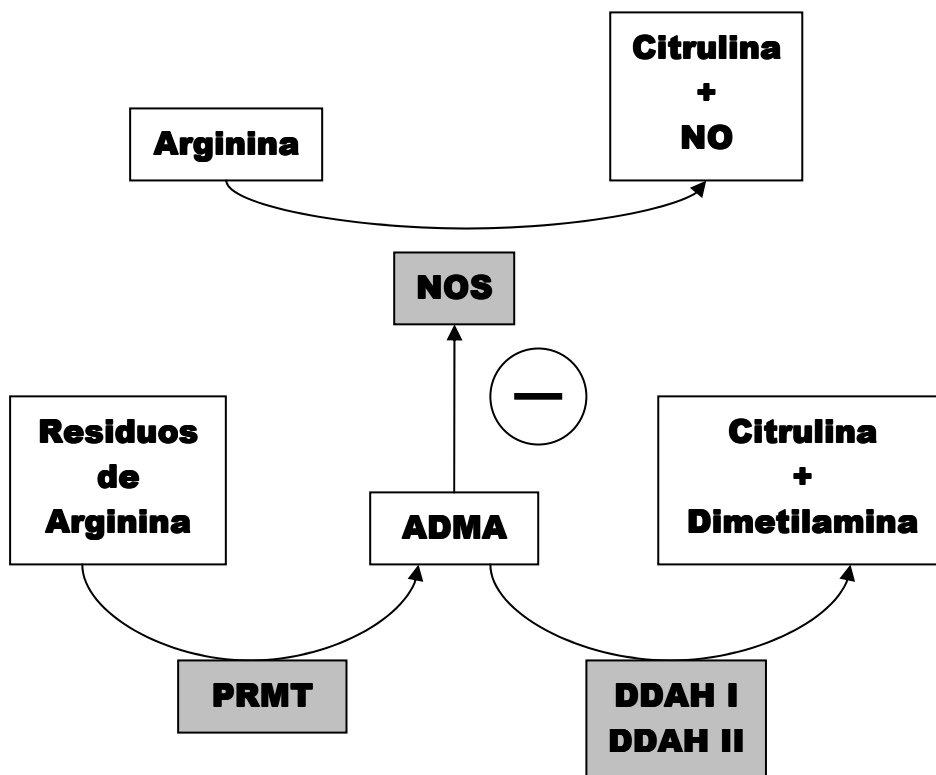


Fig. 2 Síntesis de ADMA a partir de residuos metilados de arginina, esta reacción es sintetizada por metiltransferasas de arginina, y su degradación a citrulina y dimetilamina a través de la acción de la dimetildiaminohidrolasas de dimetilarginina I y II (Savvidou *et al.*, 2003).

Las argininas metiladas libres son liberadas al citosol por la proteólisis de proteínas metiladas. ADMA es degradada en forma activa por la enzima intracelular dimetilaminohidrolasa de la dimetilarginina (DDAH) en citrulina y la dimetilamina (DMA). Se ha estimado que el humano genera aproximadamente 300 μ moles de ADMA por día, de las cuales más del 80% es metabolizado por DDAH a DMA, el cual es excretado en la orina. El resto escapa a la degradación de DDAH y forma parte del plasma después de la exportación de la célula. Debemos notar que DDAH es también activo hacia MMA, pero no puede metabolizar SDMA (**Teerlink, 2007**).

Esto puede explicar, en parte, porque la concentración plasmática de SDMA es similar a la concentración de ADMA, a pesar de que probablemente se forma mucho más ADMA durante la metilación de arginina. En seres humanos, los riñones desempeñan un papel importante en la eliminación de dimetilargininas, excretando ADMA y SDMA en la orina. Sin embargo, la extracción renal de la red arterial es perceptiblemente más alta para ADMA comparado a SDMA. Esto indica que para el ADMA, estaría involucrado no sólo la excreción sino que también el metabolismo intra-renal, muy probablemente por DDAH. Para SDMA, que no es degradado por DDAH, la excreción renal es la vía principal de eliminación; mientras que para el ADMA, la degradación por DDAH constituye la principal ruta de eliminación (**Teerlink, 2007**). Puesto que ADMA es metabolizado por DDAH, pero SDMA es excretado sin cambios, una elevada relación ADMA/SDMA sugiere un deterioro de la actividad de DDAH y excluye una patología renal subclínica como una explicación del alza de ADMA. DDAH II se expresa fuertemente en la placenta y con esto se tiende a especular que la disfunción placentaria de DDAH II puede ser uno de los acontecimientos que inician el desarrollo de la preeclampsia. (**Savvidou et al., 2003**).

Los niveles plasmáticos y tisulares elevados de ADMA en enfermedades se explican por la reducción de la excreción renal y el catabolismo reducido de la dimetilaminohidrolasa de la dimetilarginina (DDAH). Esto último se asocia a la pérdida de función por el polimorfismo de un gen de DDAH, por lo cual se produce la inhibición funcional de la enzima en el estrés oxidativo en estado patológico (**Baylis et al., 1998**).

El papel fisiopatológico de ADMA también se apoya por los efectos observados por la infusión de ADMA sobre la función endotelial, presión arterial y función cardíaca. La infusión intraarterial de ADMA (8 $\mu\text{M}/\text{min.}$) reduce el flujo de la sangre del antebrazo y causa disfunción endotelial en voluntarios sanos normales. La infusión de ADMA en conejillos de Indias anestesiados se asocia con el aumento de nueve veces del volumen del plasma y aumenta la presión arterial alrededor 15-20%. Se ha demostrado que una dosis baja y rápida de ADMA en voluntarios humanos sanos comparables con concentraciones fisiopatológicas relevantes de ADMA de 2.6 μM , produjo efectos hemodinámicos profundos. Los autores observaron una disminución del ritmo cardíaco, un aumento en resistencia vascular periférica, una disminución del gasto cardíaco y un aumento en la presión arterial (**Sydow y Münzel, 2003**).

En embarazo normal, hay una caída inicial en la presión arterial para luego retornar a valores basales en el tercer trimestre. Estos cambios en la presión arterial son relacionados con cambios similares de los valores plasmáticos de ADMA. En las mujeres que desarrollan preeclampsia, los valores plasmáticos de ADMA son elevados junto con el deterioro de la función endotelial y esto ocurre antes de la evidencia clínica de preeclampsia. La severidad de la disfunción endotelial y los niveles intracelulares de ADMA se relacionan directamente con el grosor de la íntima del vaso dañado. Un ensayo clínico es consistente con el papel del ADMA en la estenosis. La exposición de cultivos de células endoteliales a concentraciones fisiopatológicamente relevantes de ADMA, reduce la síntesis de NO, aumenta la generación del radical superóxido y la adherencia de los monocitos a las células endoteliales. La evidencia también existe en seres humanos, donde ADMA incrementa la interacción endotelio-monocito (**Cooke, 2004**).

Además, en la angiogénesis se requiere de la elaboración de derivados del endotelio como el óxido nítrico (NO). Factores angiogénicos inducen la liberación de NO desde las células endoteliales, que regulen una multiplicidad de procesos implicados en la angiogénesis. Estos procesos modulados por el NO incluyen la supervivencia de células endoteliales, la proliferación, migración, y la interacción con la matriz extracelular. Trastornos de la vía sintasa del NO menoscaban la angiogénesis (**Cooke, 2003**). En consecuencia, el inhibidor competitivo de la NOS, dimetilarginina asimétrica (ADMA) actúa como inhibidor endógeno de la angiogénesis. Por el

contrario, los agentes que aumentan la síntesis de NO, como dosis bajas de estatinas, mejorar la angiogénesis. La modulación de la vía NO sintasa podría convertirse en una nueva vía terapéutica para los trastornos relacionados con la angiogénesis (**Cooke, 2003**).

3.2.3 Rol del estrés oxidativo en la fisiopatología de la preeclampsia

La transformación de la energía de la dieta a partir de proteínas, hidratos de carbono, grasas se produce principalmente en la mitocondria de las células animales a través de una serie de reacciones de oxidación-reducción, y la energía liberada en estas reacciones es usada por la adenosin difosfato (ADP), para generar así adenosin trifosfato (ATP). El paso final de este proceso utiliza el oxígeno (O₂), como un electrón receptor, y esto ha sido posible por la acumulación de O₂ en la atmósfera debido a las actividades fotosintéticas de cianobacterias hace unos 2 mil millones de años. Todo el proceso se conoce como fosforilación oxidativa, El ATP es fundamental como forma de almacenamiento de la energía química necesaria para conducir muchas reacciones bioquímicas en la célula, como son: la biosíntesis de proteínas, activación el transporte de moléculas a través de las membranas celulares, homeostasis iónica, contracciones musculares (**Burton y Jauniaux, 2004**).

La mayoría de los O₂ utilizado durante la oxidación de la dieta orgánica se convierte en moléculas de agua a través de las reacciones sintetizadas por las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, estas enzimas, en particular, las del complejo III, no son totalmente eficientes y se producen "fugas" de electrones hacia el oxígeno molecular donde se forma el anión superóxido (O₂⁻). Una parte importante cantidad (1-2%), del O₂ que consumimos se desvía a la producción de O₂⁻. De este modo, el O₂⁻ que se formo depende de la tasa de tensión de oxígeno. El anión superóxido pertenece a una clase de moléculas denominadas radicales libres, que junto con radicales intermedios se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS) (**Burton y Jauniaux, 2004**).

Los ROS se caracterizan por su alta reactividad, y con el fin de evitar daños a la biomoléculas, se han desarrollado una serie de defensas antioxidantes. El O₂⁻ en la matriz mitocondrial es detoxificada por la enzima superóxido dismutasa-Manganeso

(MnSOD). El SOD se encuentra en todas las células aeróbicas, y se encuentra en el citoplasma también como isoformas alternativas de cobre/zinc (Cu/Zn SOD). La enzima convierte el O_2^- en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez es reducido en agua y oxígeno por las enzimas antioxidantes como son la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px). Además de estas enzimas antioxidantes, otras moléculas como tioles, ceruloplasmina, transferrina y vitaminas de la dieta, como por ejemplo, ascorbato (vitamina C), y-tocoferol (vitamina E), desempeñan un papel fundamental en la defensa contra los radicales libres (**Burton y Jauniaux, 2004**).

Un balance homeostático complejo se debe alcanzar con ellos, y en los niveles fisiológicos normales, los radicales libres regulan una amplia variedad de funciones celulares a través de sus acciones sobre los factores de transcripción redox-sensible. Es esencial que estas defensas actúen en conjunto, porque un desequilibrio puede dar lugar a la producción de otros radicales altamente reactivos como el anión hidroxilo (OH^-), anión peróxido (RO_2^-), y el anión hidroperóxido (HO_2^-). Si la generación de estos radicales es superior a las defensas celulares, entonces pueden ocurrir daños importantes en las proteínas, lípidos, y en el ADN, como resultado del estrés oxidativo celular. Las consecuencias pueden ir desde la activación de las proteínas de respuesta al estrés, perturbación de los mecanismos de señalización y daños estructurales, apoptosis o necrosis (**Burton y Jauniaux, 2004**).

Aunque bajo condiciones fisiológicas normales, se produce la mayor cantidad intracelular de ROS, como un subproducto de la respiración aeróbica. Estas ROS también pueden surgir de otras reacciones metabólicas y enzimas oxidadas; como es por acción de la NAD(P)H oxidasa, que está asociada a membrana y desempeña un rol importante en miocitos, células endoteliales, y que también está presente en la placenta. Bajo condiciones patológicas, sin embargo, existen diferentes mecanismos que pueden entrar en juego, y una fuente potencialmente importante es la enzima xantina deshidrogenasa/xantina oxidasa. En su forma deshidrogenasa, esta enzima convierte hipoxantina en xantina, y la xantina en ácido úrico, pasando el electrón libre desapareado al NAD^+ (**Burton y Jauniaux, 2004**). Durante períodos de hipoxia, la enzima es transformada por proteasas calcio-dependientes a su forma oxidada, que utiliza el O_2 como receptor del electrón, generando O_2^- . Esta conversión es la responsable del aumento de la producción de radicales libres que se asocia con

episodios de isquemia-reperfusión, y da cuenta de porque las fluctuaciones de la concentración de O₂ puede ser particularmente nociva para células.

Las fluctuaciones en la concentración de O₂ pueden ocurrir dentro de la placenta humana debido a la singular estructura de desarrollo del suministro de sangre materna a nivel fetal (**Burton y Jauniaux, 2004**).

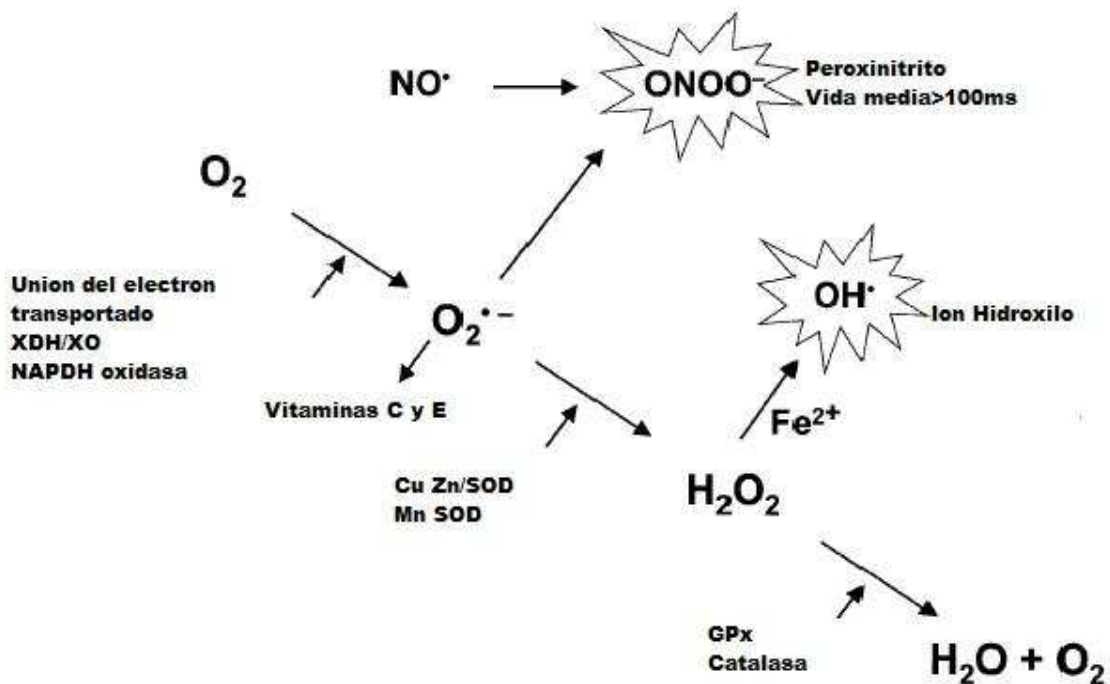


Fig. 3 Diagrama que muestra las vías de detoxificación de los ROS. Una excesiva producción de anión superóxido (O₂^{•-}) conduce a una mayor formación del peligroso radical hidroxilo (OH[•]). Alternativamente, el O₂^{•-} reacciona con el Oxido Nítrico y forma el peroxinitrito. La formación de peroxinitrito es 10 veces más rápida que la reacción producida entre O₂ y SOD (**Burton y Jauniaux, 2004**).

3.2.3.1 Daño a biomoléculas por estrés oxidativo

Las reacciones de oxidación producidas por especies reactivas de oxígeno como son el radical superóxido y el radical hidroxilo producen un daño considerable en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Lo cual afecta de manera importante, la integridad de las células y por ende, inciden de manera fundamental en la fisiopatología de distintas enfermedades, incluyendo la preeclampsia.

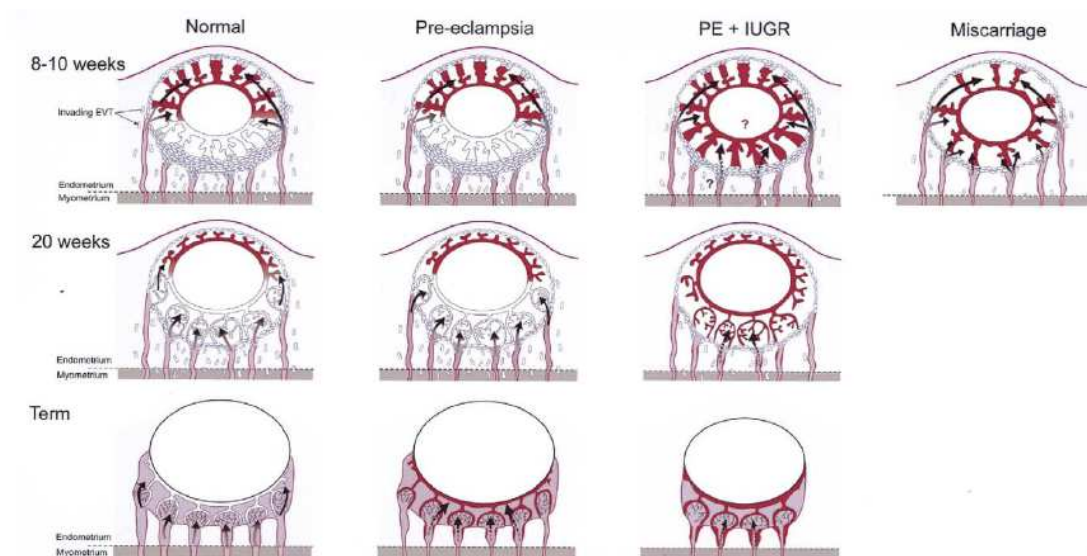


Fig.4 Se observa en este diagrama, diferentes grados de estrés oxidativo relacionado con desarrollo placentario en embarazos normales, preeclampsia temprana y tardía, preeclampsia y restricción de crecimiento fetal y aborto. En embarazos normales, la invasión trofoblástica es completa y las células citotrofoblásticas agregadas proporcionan una matriz fundamental para establecer de manera eficaz la arteria espiral. En el inicio del embarazo, la circulación se inicia en la periferia (como lo indican las flechas). En el aborto, la invasión trofoblástica es muy deficiente, lo que conduce a una matriz trofoblástica muy delgada, lo cual genera un incompleto establecimiento de la arteria espiral, determinando un inicio prematuro y desorganizado del flujo sanguíneo, con el consiguiente estrés oxidativo en la placenta. En el caso de la preeclampsia esta situación es intermedia. En los casos de aparición temprana, el comienzo de la circulación materna puede ser anormal, debido a la mala evolución del depósito de la matriz citotrofoblástica. En el inicio del estrés oxidativo se produce un deterioro en el crecimiento vellosos normal, mientras que los cambios ateróticos secundarios en la arteria espiral (representado por los sombreados) conducen a una hipoxia placentaria y a la restricción del crecimiento fetal. En los casos de preeclampsia de aparición tardía la situación es menos grave porque el estrés oxidativo a nivel placentario se desarrolla solo al final de la gestación (**Burton y Jauniaux, 2004**).

3.2.3.2 Lipoperoxidación

De todas las biomoléculas que pueden ser atacadas por los ROS, los lípidos, especialmente fosfolípidos de membranas, son probablemente los más susceptibles. Esto parece estar relacionado con el grado de insaturación de estas moléculas. Las reacciones de lipoperoxidación consisten en un proceso de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Como consecuencia de este proceso, se destruyen los PUFA, compuestos que poseen tres o más uniones carbono-carbono con doble enlace, que les confiere una zona de enlace lábil que permite que una molécula activa como el radical hidroxilo les sustraiga un átomo de hidrógeno (etapa de iniciación). Así, se genera un radical lipídico que continúa participando de reacciones en cadena (etapa de propagación), ya que se trata de un proceso autocatalítico, perpetuando así el proceso. El radical lipídico se combina con el oxígeno formando un lipoperóxido, el que a su vez puede retirar un nuevo átomo de hidrógeno de otro carbono molecular y formar un hidroperóxido. La lipoperoxidación sigue propagándose de esta manera y llega a su término cuando dos hidroperóxidos reaccionan entre sí dando un tetróxido o cuando son neutralizados por los antioxidantes. Los tetróxidos son inestables, al romperse generan aldehídos de bajo peso molecular (como por ejemplo el MDA que puede ser medido espectrofotométricamente) y cadenas hidrocarbonadas (etano, etileno, pentano, dienos conjugados, etc.). Los aldehídos son moléculas muy reactivas y, por lo tanto, se desplazan sólo hasta escasa distancia del sitio de su formación (**Rodrigo y Rivera, 2003**).

Se ha observado que los marcadores bioquímicos de lipoperoxidación tales como malondialdehído (MDA) en placenta (**Madazli et al., 2002**) y en eritrocitos (**Ilhan et al., 2002**) están elevados en la PE. Al ser el MDA, un producto de la descomposición de la peroxidación del lípido, se considera que el MDA en niveles elevados se debe al estrés oxidativo visto en la PE (**Var et al., 2003**). Se ha visto que la severidad de la enfermedad está correlacionada con la concentración de MDA en suero (**Serdar et al., 2002**) y eritrocitos (**Madazli et al., 2002**). Por consiguiente, se propuso que mientras mayor es la lipoperoxidación, mayor es la severidad de la PE (**Panburana**

et al., 2000). Además, la determinación de MDA en el cordón umbilical podría ser útil en el reconocimiento de los recién nacidos que están en el riesgo de la asfixia (Zeteroglu *et al.*, 2004). Existe una variedad de métodos descritos en la literatura para determinación de MDA en matrices biológicas. El principal método utilizado es la reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico. En 1968, se aplicó la reacción de ácido tiobarbitúrico con MDA obteniendo buenos resultados, donde el producto de esta reacción puede ser detectada por colorimetría (532-535 nm) o fluorimetría (excitación a 532 nm y emisión 553 nm) (Yagi *et al.*, 1968). Aunque este método es fácil y de bajo costo, el uso de la prueba de TBARS (método de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico) ha recibido amplias críticas a lo largo de los años. El principal problema de esta técnica es la falta de especificidad, ya que el TBA reacciona con una variedad de compuestos tales como azúcares, aminoácidos, una variedad de aldehídos y bilirrubina, que producen interferencia en las mediciones de MDA en colorimetría y fluorimetría. Se han reportado variados métodos de determinación de MDA mediante HPLC (cromatografía líquida de alta presión). Esta técnica es mucho más específica, fiable, reproducible, ya que el MDA está separado de otras sustancias que puedan interferir con su determinación. En los últimos años se han introducido variadas innovaciones para mejorar la especificidad de procedimientos anteriores. Uno de estos avances es la diferencia entre la detección de MDA libre y MDA total en el plasma (De Grotto *et al.*, 2007).

3.3 Predictores de Preeclampsia

Hay diversos estudios orientados a determinar predictores de preeclampsia, pero no se ha encontrado ninguna sustancia que detecte manera precoz la presentación de esta patología, para prevenir o tratar de manera temprana y así obtener un mejor pronóstico de esta enfermedad. A continuación, se describen algunos métodos que han demostrado que podrían influir en la presentación de este síndrome.

3.3.1 Historia Clínica y factores de riesgo

Se han realizado revisiones sistemáticas de variadas publicaciones para estimar de manera global la importancia de los factores de riesgo de la preeclampsia, para que los

profesionales de la salud los incorporen en la evaluación de la paciente embarazada y así determinar el grado de riesgo de esta de presentar esta patología.

Algunos de los factores considerados de importancia en estos estudios son: edad, presentación de preclampsia previamente, antecedentes familiares de preclampsia, embarazos múltiples, período interparto; además de condiciones medicas preexistentes como son: diabetes insulino dependiente, hipertensión crónica, nefropatías, enfermedades autoinmunes, dislipidemia. También se debería considerar en el exámen, el índice de masa corporal y obviamente, la medición de la presión sanguínea y el nivel de proteínas en la orina (**Duckitt y Harrington, 2005**). A continuación se abordan cada uno de estos factores.

3.3.1.1 Edad

Las mujeres mayores de 40 años tienen el doble de riesgo de desarrollar preclampsia que mujeres menores. Se sugiere que el riesgo se va incrementando en un 30% cada año que pasa después de los 34,9 años; En mujeres menores a esta edad, no parece afectar la edad en el riesgo de presentar este síndrome (**Bianco et al., 1996**).

3.3.1.2 Antecedentes previos de preclampsia

Pacientes con historial de preclampsia previa al segundo embarazo se estima que posee un riesgo 7 veces mayor que una mujer sin antecedentes previos de esta patología (**Makkonen et al., 2000; Dukler et al., 2001**).

3.3.1.3 Embarazos múltiples

Cuando una mujer esta embarazada de gemelos, el riesgo de esta, de desarrollar PE se triplica (**Coonrod et al., 1995; Lee et al., 2000; Odegard et al., 2000**).

2.3.1.4 Periodos interpartos

La asociación entre el riesgo de preeclampsia y el intervalo interparto fue más importante que la asociación entre el riesgo y el cambio de pareja. El riesgo de un segundo o tercer embarazo estuvo directamente relacionado al tiempo transcurrido desde el parto anterior. Si el intervalo fue de 10 años o más, el riesgo de preeclampsia fue de aproximadamente el mismo que en mujeres nulíparas. Después del ajuste para la presencia o ausencia de un cambio de pareja, edad materna, y año del parto, la probabilidad de presentar preeclampsia se incrementó 1,12 por cada año de aumento en este intervalo (**Skjaerven et al., 2002**).

3.3.1.5 Historial familiar de preclampsia

El riesgo de manifestar preclampsia en mujeres con antecedentes familiares de este síndrome, casi se triplica. Las mujeres con toxemia preeclamptica severa es muy probable que sus madres hayan tenido antecedentes de preclampsia (**Arngrimsson et al., 1998; Cincotta et al., 1998**). La PE podría tener un componente hereditario importante, pero varios estudios no han mostrado resultados consistentes con esta afirmación, a pesar de haber diferencias obvias en la población. Un solo gen para la producción de PE es poco probable, por esto se postula que existen varias modificaciones genéticas producidas por factores ambientales, que estarían asociadas a la enfermedad. Los estudios realizados hasta el momento sobre la base genética de la PE se han concentrado en la composición genética materna, pero han ignorado el potencial genético paterno y la influencia fetal (**Broughton, 1999**).

3.3.1.6 Hipertensión crónica

Se han comparado los resultados en 129 mujeres con hipertensión crónica que no han desarrollado preeclampsia superpuesta con 26 mujeres con hipertensión crónica que presentaron preclampsia y estas tuvieron tasas significativamente mayores de morbilidad perinatal (odds-ratio de 8,8, 2,6 a 39,0), de restricción del crecimiento fetal (5,6, 1,8 a 16,0), y partos prematuros antes de las 32 semanas (15,0, 5,7 a 38,0). Una presión diastólica ≥ 110 mm. Hg. a las 20 semanas es considerado un buen predictor de preeclampsia (**McCowan et al., 1996**).

3.3.1.7 Diabetes insulino dependiente

El riesgo de preeclampsia casi cuadruplica, si la embarazada posee la condición de diabética insulino dependiente antes del embarazo (**Garner *et al.*, 1990; Ros *et al.*, 1998**).

3.3.1.8 Nefropatías

Se encontró que la prevalencia de enfermedad renal es mayor en mujeres que desarrollaron preeclampsia en comparación con los que no (5,3% v 1,8%) (**Davies *et al.*, 1970**)

3.3.1.9 Dislipidemia

La presencia de anticuerpos antifosfolípidos (anticuerpos anticardiolipina y/o anticoagulante lúpico) aumenta significativamente el riesgo de desarrollar preeclampsia. Sin embargo, cuando las mujeres que desarrollaron preeclampsia se corresponde con mujeres normales, no eran más propensos a ser positivo para anticoagulante lúpico o anticuerpos anticardiolipina (**Dreyfus *et al.*, 2001**).

3.3.1.10 Índice de masa corporal

Aunque los estudios que analizaron el índice de masa corporal antes de embarazo utilizan diferentes rangos, todos ellos mostraron efectos en la misma dirección, lo que sugiere una duplicación del riesgo de preeclampsia con un índice de masa corporal mayor (**Bianco *et al.*, 1998; Thadhani *et al.*, 1999**). Un estudio de cohortes mostró que las mujeres con un índice de masa corporal > 35 previo al embarazo, posee cuatro veces mas riesgo de preeclampsia en comparación con las mujeres con un índice de masa corporal antes del embarazo de 19-27 (**Bianco *et al.*, 1998**).

3.3.1.11 Antecedentes de Hipertensión

En un estudio caso-control se compararon presiones sistólicas mayores a 130 mm. Hg con pacientes con tensión arterial < 110mm Hg en la primera visita antes de las 18 semanas. Las mujeres que presentaban presión sistólica arterial mayor a 130mm Hg fueron mucho más proclives a desarrollar el cuadro. La asociación con una presión diastólica ≥ 80 mm. Hg en comparación con <60 mm. Hg es similar, pero no significativa (Odegard *et al.*, 2000). En un estudio caso-control se encontró que la presión arterial media > 90 mm. Hg en la primera visita prenatal se asocio significativamente con el desarrollo de graves toxemias preeclámpticas (Stamilio *et al.*, 2000).

3.3.2 Doppler de arterias uterinas

La preeclampsia y restricción del crecimiento fetal se caracterizan por una formación anormal de la placenta, como resultado de un flujo sanguíneo uteroplacentario inadecuado. Esto ha llevado a la idea de utilizar la ecografía doppler para evaluar la velocidad de la circulación de la sangre en la arteria uterina como parte de la ecografía de rutina de mujeres embarazadas. La baja velocidad diastólica final y la aparición temprana de una escotadura diastólica caracterizan las formas de la onda en el ecodoppler de la arteria uterina en mujeres que no están embarazadas o que están en su primer trimestre. La persistencia de una escotadura diastólica (más allá de las 24 semanas de gestación) y una velocidad de flujo anormal se han asociado con una inadecuada invasión trofoblástica. La predicción precisa de la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino es fundamental para permitir la asignación prudente de recursos para la vigilancia y el tratamiento preventivo de mujeres preeclámpticas. Sin embargo, los estudios sobre la exactitud de predicción de los índices del Doppler de arteria uterina han puesto de manifiesto que los resultados han sido variados. Por lo tanto, se ha puesto en duda, si la ecografía doppler de la arteria uterina debería utilizarse como una prueba predictiva. Aunque su valor diagnóstico es incuestionable. Se han evaluado la exactitud, de los 15 índices de la ecografía doppler de arteria uterina en la predicción de la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino. La ecografía doppler de arteria uterina predice de manera más confiable la preeclampsia que la restricción del crecimiento intrauterino fetal (Cnossen *et al.*, 2008).

En concreto, un mayor índice de pulsatilidad con escotaduras en el segundo trimestre predice de mejor manera, si una paciente presentará una preeclampsia de bajo riesgo o de alto riesgo. Un mayor índice de pulsatilidad o la presencia de escotaduras bilaterales es buen predictor de una preeclampsia grave. Un incremento en el índice de pulsatilidad por sí solo o en combinación con muescas es un buen predictor de pacientes con restricción del crecimiento intrauterino de bajo riesgo, mientras que el mejor predictor en pacientes de alto riesgo fue un aumento del índice de resistencia. Otros índices de la ecografía doppler de la arteria uterina mostraron valor predictivo bajo a moderado (**Cnossen *et al.*, 2008**).

3.3.3 Proteinuria

La proteinuria es un signo tardío en el embarazo inducido por trastornos hipertensivos, y síndrome HELLP (hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y recuento bajo de plaquetas) y eclampsia, aunque podrían producirse en ausencia de proteinuria. Después de medición de la presión arterial, la medición de proteinuria mediante una varilla es la prueba de elección más común para la preeclampsia. Varios estudios han demostrado un gran número de falsos positivos y falsos negativos cuando se usa la tirilla de análisis de orina en comparación con el análisis bioquímico de total de proteína excretada en 24 horas. La pobre sensibilidad y especificidad de la prueba y el hecho de que la proteinuria es una característica tardía de la enfermedad solo se hace uso rutinario de varillas en población normotensa de bajo riesgo, además se le considera ineficaz en la predicción de la preeclampsia. Sin embargo, como la medición con la varilla es de fácil de uso y barato, el objetivo de utilizar una varilla es ayudar en el diagnóstico de la preeclampsia y no en su predicción (**Dekker y Sibai, 2001**).

3.3.4 Acido úrico

El “clearance” del ácido úrico es mayor de forma desproporcionada en la preeclampsia en comparación con el “clearance” de creatinina y urea. La explicación de esta disminución de urato radica en el patrón bifásico de daño renal en la preeclampsia. La función tubular es lo primero que se ve implicado, y más tarde en el proceso de la enfermedad glomerular, la funcionalidad renal también se ve afectada. El ácido úrico se

utiliza como un indicador de la gravedad de la enfermedad establecida en la preeclampsia y se ha informado que es un buen predictor para resultados perinatales adversos. En la mayoría de los pacientes, el aumento de las concentraciones de urato parece coincidir con el aumento en la presión sanguínea, y precede al desarrollo proteinurico (un signo de daño glomerular) de la enfermedad.

Las concentraciones de ácido úrico se han utilizado para el diagnóstico precoz de la preeclampsia, pero no para la hipertensión como tal. La baja sensibilidad en la mayoría de los estudios, hace pensar que la medición de ácido úrico es una herramienta útil, pero no para ser utilizado como un predictor específico de preeclampsia (**Dekker y Sibai, 2001**).

3.3.5 Proteína placentaria 13

La proteína placentaria 13 (PP-13) es un dímero de 32 kDa de proteínas, que pertenece a un grupo de proteínas que son expresadas de manera importante en la placenta. Se cree que participa en la implantación placentaria y en la remodelación vascular materna (**Nicolaides et al., 2006**). Durante el embarazo normal, los niveles de la PP-13 aumentaran gradualmente, pero niveles anormalmente bajos de la PP-13 se han observado en mujeres a las 11-13 semanas de gestación que luego desarrollaron preeclampsia y restricción de crecimiento fetal (RCF), en comparación con los mujeres controles (**Burger et al., 2004**). En otro estudio, el análisis de suero materno, los niveles de PP-13 a las 9-12 semanas de gestación, también encontró niveles bajos en mujeres que desarrollaron preeclampsia en comparación con los controles (**Chafetz et al., 2007**). La combinación de medición en suero materno de PP-13 con estudios anticipados de doppler de la arteria uterina en el embarazo parece mejorar la capacidad para predecir preeclampsia severa (**Nicolaides et al., 2006**). En este estudio, se encontró que las mujeres que presentaron posteriormente preeclampsia y parto prematuro (parto antes de las 34 semanas) tuvieron una mediana superior en el índice de pulsatilidad de la arteria uterina y una mediana menor en el suero PP-13 en el primer trimestre en comparación con los controles. Por lo tanto, se llegó a la conclusión que se puede alcanzar un 90% de tasa de detección de la enfermedad utilizando el suero de PP-13 para todas las mujeres y los estudios doppler alcanzaron 14% de detección de mayor riesgo con una tasa de falsos positivos del 6%. La PP-13, por lo tanto, utilizada sola o en combinación con

estudios doppler, parece ser un área prometedora para la investigación futura en este ámbito (**Nicolaides et al., 2006**).

3.3.6 Proteína plasmática A asociada al embarazo

La proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) es una proteína compleja glicosilada muy grande producida por el desarrollo de trofoblasto (**Bersinger et al., 2003**), que se utiliza en muchos centros como marcador de síndrome de Down. Se ha demostrado que es responsable de la escisión de factor de crecimiento insulínico (IGF), proteínas de unión que son inhibidores de la acción de IGF, en variados fluidos biológicos (**Laursen et al., 2001**). PAPP-A se muestra elevada en el plasma de las mujeres preeclámpicas desde hace casi 30 años (**Hughes et al., 1980**). Estudios más recientes han demostrado que en el primer trimestre, la reducción de los niveles séricos de PAPP-A se asocia con la preeclampsia; los niveles también son bajos en otras complicaciones del embarazo (**Ong et al., 2000b, Yaron et al., 2002, Smith et al., 2002**). Se ha sugerido que la PAPP-A es más útil como marcador de RCF que de preeclampsia (**Canini et al., 2008**). En un artículo reciente, (**Spencer et al. 2008**) describe un pequeño aumento en el riesgo de desarrollar preeclampsia y lo ha relacionado con la disminución de los niveles de PAPP-A. A pesar de que la PAPP-A por sí sola no es un buen predictor de la preeclampsia, a su juicio, al igual que PP-13, la sensibilidad puede mejorarse mediante la combinación con estudios doppler de la arteria uterina.

3.3.7 Apolipoproteína E

Uno de los mecanismos de desarrollo de la preeclampsia que se ha postulado es el metabolismo anormal de los lípidos asociado con el estrés oxidativo. Las mujeres con preeclampsia tienen un perfil lipídico anormal, con elevadas concentraciones de lipoproteínas ricas en triglicéridos, que pueden contribuir a la disfunción endotelial (**Sattar et al., 1997**). La apolipoproteína E (apoE) es una de las principales lipoproteínas de baja densidad (VLDLs) cuya función consiste en modificar respuestas inflamatorias y la eliminación del exceso de colesterol de la circulación a través de la regulación de la absorción hepática (**Belo et al., 2004**). El gen apoE en el cromosoma 19 tiene 3 alelos comunes y codifica 3 isoformas de ApoE en el plasma, las E2, E3 y E4.

ApoE e4 es un conocido de factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer familiar, mientras que las dos isoformas E2 y E4 se han asociado con niveles elevados de triglicéridos y VLDL (**Francoual et al. 2002**). Se ha postulado que los niveles de apoE y los polimorfismos de su gen se asocian con un mayor riesgo de preeclampsia. **Nagy et al., 1998**, encontró una mayor incidencia del alelo apoE E2 entre las mujeres con preeclampsia en comparación con los controles. **Makkonen et al., 2001**, estudiaron 133 mujeres con preeclampsia y, por el contrario, consideró que ninguno de los alelos apoE queda de manifiesto representado en comparación con los controles (**Belo et al. 2004**). El papel de esta vía de investigación en la predicción de la preeclampsia es por lo tanto, incierto.

3.3.8 sFlt-1

FLT-1 soluble (también conocido como receptor 1 de VEGF soluble o sFLT-1) es una variante splicing secretada de la FLT-1. Se une y neutraliza la acción de angiogénicos VEGF y PlGF (**Venkatesha et al., 2006**) y se piensa que es uno de los péptidos que participan en el desarrollo de preeclampsia. Los niveles séricos maternos de sFLT-1 han demostrado ser elevados en mujeres con preeclampsia en comparación con los controles (**Koga et al., 2003, Salahuddin et al. 2007**), que son equivalentes a la gravedad de la enfermedad (**Chaiworapongsa et al., 2004**) y que disminuyen notablemente después del parto (**Koga et al., 2003**). También se ha demostrado que los niveles de sFLT-1 se incrementan en nulíparas (uno de los principales factores de riesgo conocidos para el desarrollo de preeclampsia) en comparación con las mujeres múltiparas (**Wolf et al., 2005**). Una serie de estudios reveló que el ARNm del sFLT-1 está regulado en la placenta de las mujeres con preeclampsia, lo que aumenta los niveles sistémicos (**Maynard et al., 2003**). Además, estos autores han demostrado que cuando un adenovirus recombinante que codifica sFLT-1 se inyecta en ratas preñadas, se presenta hipertensión y proteinuria, además se ha observado glomeruloendoteliosis, una de las lesiones patológicas típicas vista en la preeclampsia. Se ha descubierto que aunque los niveles fetales de sFLT-1 (medido en sangre del cordón umbilical) son elevados en la preeclampsia, los niveles séricos maternos eran 29 veces más altos y se llegó a la conclusión de que no había contribución fetal substancial en la elevación de los niveles observados de sFLT-1 circulante de madres preeclámpicas (**Carty et al., 2008**). En un estudio sobre los cambios de los niveles circulantes de factores

angiogénicos del primer y segundo trimestre determinó que el incremento en los valores de s-Flt1 es un predictor importante de preeclampsia.

3.3.9 Endoglina soluble

Otro péptido que se ha implicado en la patogénesis de la preeclampsia es la endoglina soluble (sEng). La endoglina, es un co-receptor que participa en la transformación de los factores de crecimiento $\beta 1$ y $\beta 3$ (Luft, 2006), es expresada en las membranas de células endoteliales y sincitiotrofoblastos. Mutaciones en el gen que codifica la endoglina son la causa principal de Telangiectasia hemorrágica hereditaria, una condición genética caracterizada por malformaciones atrioventriculares, epistaxis, y telangiectasia (Venkatesha *et al.*, 2006). En un embarazo normal, los niveles sericos de la sEng caen en el primer y segundo trimestre, pero en las mujeres que van a desarrollar preeclampsia, esta reducción no es pronunciada (Rana *et al.*, 2007). En conformidad con estudios con sFLT-1, también se ha demostrado que los niveles séricos de sEng son elevados en mujeres embarazadas con preeclampsia, correlacionado con la gravedad de la enfermedad, y su disminución después del parto (Venkatesha *et al.*, 2006). Un prometedor descubrimiento en términos de predicción de esta condición, es que los niveles de sEng son elevados varias semanas antes de la presentación de los síntomas clínicos en mujeres que desarrollaron preeclampsia; además, en pacientes que desarrollaron preeclampsia, parto prematuro, los niveles sericos de sEng son elevados (aproximadamente el doble), a las 17-20^a semanas de gestación (Levine *et al.*, 2006). En otro estudio se encontró que, aunque los niveles de sEng y sFLT-1 se encuentran elevados en el suero de las mujeres preeclampticas a las 17-20^a semanas de gestación, en comparación con los controles, pero los niveles a las 11-13^a semanas fueron similares entre casos y controles. Ambos, sEng y sFLT-1 parecen, por lo tanto, ser péptidos importantes en la patogénesis de la preeclampsia, pero cuando se utilizan, por si solos, no parecen tener suficiente valor predictivo que se traduzca en un paso obligado en la práctica clínica habitual (Rana *et al.*, 2007).

4. HIPÓTESIS

Los niveles plasmáticos elevados de malondialdehído en las mujeres embarazadas de 12 y 22 semanas con ecografía doppler alterada tienen correlación positiva con los niveles plasmáticos de dimetilarginina asimétrica en mujeres preeclámpticas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Establecer la asociación entre un marcador bioquímico de estrés oxidativo, (malondialdehído) y un marcador de disfunción endotelial (dimetilarginina asimétrica), con ecografía doppler alterada y su uso como marcador precoz de preeclampsia.

5.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración plasmática de dimetilarginina asimétrica (ADMA) y dimetilarginina simétrica (SDMA), en mujeres embarazadas a las 12 y 22 semanas de gestación con ecografía doppler normal y alterada.
- Determinar la concentración de malondialdehído (MDA), en plasma de mujeres embarazadas a las 12 y 22 semanas de gestación con ecografía doppler normal y alterada.
- Establecer la correlación entre las variables medidas en embarazadas con ecografía doppler normal con respecto a las embarazadas con ecografía alterada a las 12 y 22 semanas de gestación.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño

Sujetos en estudio: Este es un estudio caso-control de mujeres embarazadas que acudieron a un control ecográfico rutinario en la Unidad de Medicina Fetal del Hospital Clínico de la Universidad de Chile durante los años 2005 y 2006. Los grupos de estudio se determinaron de acuerdo al pronóstico del embarazo. Se determinaron para los fines de este estudio dos grupos: las muestras de mujeres con ecografía doppler normal y alterada.

Todas las pacientes ingresaron al protocolo entre las 11-14 semanas de gestación, al momento de realizar la ecografía Doppler de la arteria uterina por vía transvaginal.

Criterios de Inclusión: Todas las mujeres embarazadas entre 11-14 semanas que hayan accedido al Doppler de arteria uterina y aceptaran ser incluidas en el estudio mediante el consentimiento informado.

Criterios de Exclusión: Se excluyeron todas las embarazadas con patologías crónicas como lupus eritematoso, hipertensión arterial crónica, nefropatías, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, obesidad, dislipidemia, antecedentes de alcoholismo o tabaquismo; debido a que estas patologías generan estrés oxidativo. Además se eliminaron aquellas mujeres que presenten embarazos múltiples y enfermedades mentales.

Plasma: Las muestras de plasma (con EDTA como anticoagulante) se obtendrán a las 12 y 22 semanas e inmediatamente antes del parto de mujeres normales y preeclámpticas. Las muestras se almacenarán a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de realizar las determinaciones.

6.2 Tamaño Muestral

El tamaño muestral calculado fue de 56 pacientes, 28 para el grupo de mujeres preeclámpticas y 28 controles sanos. Este número fue estimado considerando la dispersión de resultados obtenidos en estudios preliminares de medición de los parámetros de estrés oxidativo, disfunción endotelial y angiogénesis, que son objeto de estudio en la presente memoria, en base a la fórmula para cálculo de tamaño muestral para estimar diferencias entre medias del programa computacional winepiscopes 2.0 (Snedecor, 1986).

$$n = \left[\frac{(Z_a) + Z_b \times SD}{m_1 - m_2} \right]^2$$

Donde:

- Z(a) = valor de la t de Student para el nivel de confianza especificado
- Z (b) = valor de la t de Student para la potencia especificada
- SD = desviación estándar esperada
- m1 = media esperada de la población 1
- m2 = media esperada de la población 2
- m1-m2= diferencia entre las dos medias esperadas

Poder estadístico: 80%

Error alfa: 0.05

6.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS Y BIOQUÍMICAS APLICADAS

6.3.1 Estrés oxidativo: MDA

El MDA es un producto de la acción de las especies reactivas de oxígeno sobre los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular. Las concentraciones plasmáticas de MDA fueron medidas por HPLC acoplado a detección fluorométrica con detección de excitación a una longitud de onda de 532 nm. y emisión a 553 nm. (**Young y Trimbre, 1991**).

Reactivos utilizados:

Acido metafosfórico 1.22 M

Acido tiobarbitúrico 0.44 M

Agua HPLC (bidestilada y desionizada)

Tetrametoxipropano 1mM (estándar MDA)

Tampón fosfato 25 mM pH 6,5

Hidróxido de sodio 1M

Procedimiento:

Para construir la curva de calibración se prepararon las siguientes diluciones del estándar: 0 μ M, 0.24 μ M, 0.48 μ M, 1.2 μ M, 2.4 μ M, 4.8 μ M.

Derivatización:

Se efectuó la siguiente mezcla en tubo de ensayo (volumen total 1 ml)

250 uL de acido metafosfórico 1,22 M.

450 uL de agua HPLC

50 uL de muestra, estándar (MDA) o agua (blanco)

250 uL de TBA 0.44 M

Se hirvió la mezcla durante 1 hora y luego se enfrió a 4°C. Inmediatamente antes de la inyección en el equipo de HPLC se mezclaron 200 µL de muestra, estándar o blanco con 360 µL de metanol HPLC y 40 µL de hidróxido de sodio 1M. Posteriormente se centrifugaron las mezclas y se filtraron. Finalmente se inyectaron en el equipo de HPLC para su medición.

Condiciones

Fase móvil: tampón fosfato 25 mM pH 6.5 en metanol (50% de tampón y 50% de metanol).

Flujo: 0.8 ml/min.

Detección: excitación 532 nm.; emisión 553 nm.

6.3.2 Disfunción endotelial: Dimetilarginina Asimétrica (ADMA)

La ADMA es un inhibidor endógeno de óxido nítrico sintasa, que compite por la unión del sustrato natural que es la L-arginina. Es producida a partir de residuos de arginina metilados y transformada en proteína por metiltransferasas y es metabolizada por la enzima DDAH. ADMA causa vasodilatación dependiente de endotelio y es un predictor independiente de futuros eventos vasculares (**Savvidou *et al.*, 2003**). La separación cromatográfica de los derivados de arginina y sus análogos metilados es generalmente por HPLC. Ya que la ADMA y SDMA porque son estructuralmente muy similares, la separación de este par de compuestos es difícil de lograr (**Teerlink, 2007**).

Soluciones Standard

Arginina	}	1mM c/u en HCl 10mM
Homoarginina		
ADMA		
SDMA		

Solución standard combinada

Arginina 100 µM

Homoarginina, ADMA y SDMA 10 µM c/u

Prepararla a partir de las soluciones standard usando HCl 10 mM

Esta solución standard de trabajo guardarla en alícuotas a -20°C

Solución standard interno

Monometilarginina: 1mM en HCl 10mM

Alicuotar y guardar a -20°C

Solución de trabajo.-

40uM preparada en PBS (10mM fosfato de sodio- 140 mM NaCl pH 7)

Reactivos de Derivatización

Solución Stock

-Disolver 10 mg de OPA en 0.2ml de metanol

-Agregar 1.8 ml de buffer borato potasio 200 mM pH 9.5

-Agregar 10ul de ácido 3-mercaptopropiónico.

Esta solución se usa dentro de 48 horas

Justo antes de usar se debe diluir 5 veces, quedando con una concentración de OPA y ácido mercaptopropiónico de 7.5 y 11.5 mM respectivamente.

Purificación de las muestras y standards y derivatización

Tanto las muestras como los standards se pasan por un filtro que posee una fase sólida de extracción SPE (Oasis MCX SPE)

Procedimiento

1.-0.2 ml de plasma o standard se mezclan con 0.1 de standard interno y 0.7 ml de PBS.

2.-Se pasan por SPE sin precondicionar haciendo vacío

3.-Lavar consecutivamente con 1ml de HCl 100mM y 1 ml de metanol

4.-Eluir los analitos en tubos de 3ml, con 1ml de una solución de amoniaco concentrado/agua/metanol (10/40/50)

5.- Evaporar el solvente bajo corriente de Nitrógeno a una T° de 60-80 $^{\circ}\text{C}$

6.-Resuspender el residuo con 1 ml de agua

7.- Agregar 0.1 ml de OPA** mezclar bien.

Buffer borato pH 9.5

Solución A

H₃BO₃ 0,1 mol en KCl 0.1 mol (6,2 g de H₃BO₃ + 7,46 g KCL por litro)

Solución B

NaOH 0.1 N

50 ml de A + 33(34) ml de B = pH 9.5

PBS

10mM fosfato de sodio

140 mM NaCl

llevar a pH 7

Cromatografía

Tipo de columna: Symmetry C18 (3.9 x 150 mm.; tamaño de partícula 5µm;

Tamaño del poro 100 Å).

Fase móvil A: 50 mM de buffer fosfato de potasio (pH 6,5), contiene 8,7% de acetonitrilo.

Fase móvil B (solución de limpieza de columna): acetonitrilo/agua (50/50, v/v).

Flujo: 1,1 ml/min. bajo condiciones isocraticas con un 100% de fase móvil A.

Temperatura de columna: 30 C°.

Ultima elución: 50% B desde 20 a 23 min.

Retorno a condiciones iniciales del gradiente: Entre 22 y 23 minutos + 7 minutos adicionales para equilibrar la columna = 30 min.

Volumen de inyección: 20 μ L.

Detección fluorométrica:

-Excitación: 340 nm.

-Emisión: 455 nm.

(Después de la elución de arginina, la ganancia del detector fue cambiada a una sensibilidad diez veces más alta).

7. ANALISIS ESTADISTICO

Tamaño muestral y correlaciones entre las variables: El tamaño muestral se estimó en un $n=28$, considerando la dispersión de resultados obtenidos en estudios preliminares de medición de estas variables de estrés oxidativo. Los resultados son expresados como promedios \pm error estándar. Para el análisis estadístico de los datos se realizó análisis de varianza para establecer si las diferencias son estadísticamente significativas entre las medias de cada grupo con diferente condición, y también para establecer diferencias entre tiempos, para cada una de las variables medidas en el plasma de embarazadas normales, preeclámpticas y con restricción de crecimiento. Se consideraron diferencias significativas aquellas que tengan un $p < 0,05$. La correlación será analizada mediante el test de correlación de Pearson para establecer el grado de relación lineal entre las variables cuantitativas medidas, en las que se haya apreciado una diferencia significativa.

8. RESULTADOS

De las pacientes muestreadas se seleccionaron todas las mujeres preeclámpticas y con restricción de crecimiento fetal y los controles.

El promedio de la edad de pacientes muestreadas es de 29 años. En mujeres preeclámpticas el promedio fue 29,5 años, la media de la edad materna en mujeres que presentaron restricción de crecimiento fetal es de 29 años y en las pacientes controles es de 29 años.

El promedio de gestaciones a la fecha para el total de embarazadas muestreadas fue de 2 gestaciones, el promedio para el grupo control es de 2, mientras que para pacientes con restricción de crecimiento fetal y preeclámpticas fueron 2,03 y 2,06 respectivamente.

La incidencia global de PE en el grupo total fue 2,5% y de restricción del crecimiento fetal fue 5,8%.

8.1 Variable bioquímica de disfunción endotelial (ADMA).

Los resultados de la dimetilarginina asimétrica (ADMA) se presentan en las figura 5 y 6. Los promedios de ADMA a las 12 semanas en mujeres controles y preeclámpticas son $1,23 \pm 0,054 \mu\text{mol/l}$ y $1,32 \pm 0,101 \mu\text{mol/l}$ respectivamente. No existiendo entre ellos una diferencia significativa ($p < 0,05$). Esta misma variable medida a las 22 semanas, mostró una media en mujeres controles y preeclámpticas de $1,35 \pm 0,068 \mu\text{mol/l}$ y $1,48 \pm 0,99 \mu\text{mol/l}$ respectivamente. No registrándose una diferencia significativa entre estas dos variables ($p < 0,05$).

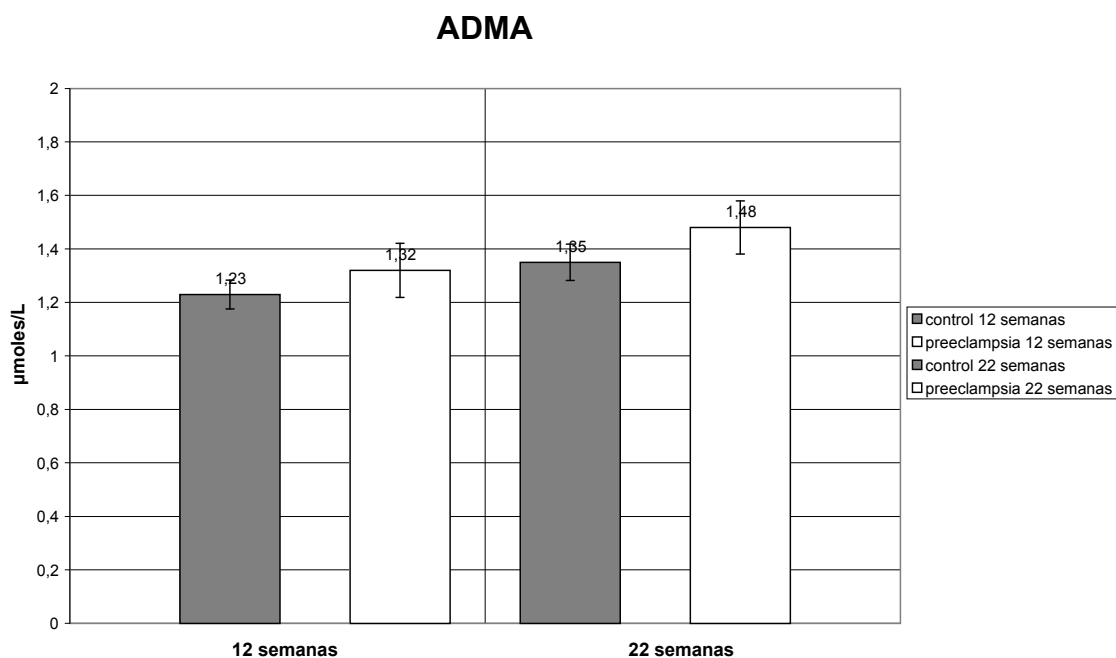


Figura 5. Concentraciones de ADMA en mujeres embarazadas controles y preeclámpticas a las 12 y 22 semanas.

La dimetilarginina asimétrica también fue medida en mujeres que presentaron restricción de crecimiento fetal (RCF). Los promedios que presentaron las mujeres controles y las que presentaron restricción de crecimiento fetal a las 12 semanas fueron de $1,23 \pm 0,054 \mu\text{mol/l}$ y $1,28 \pm 0,083 \mu\text{mol/l}$ respectivamente. No se encontró diferencia significativa de esta variable ($p < 0,05$). En cambio a las 22 semanas, los controles promediaron $1,3 \pm 0,068 \mu\text{mol/l}$ en comparación con mujeres con RCF que promediaron $1,65 \pm 0,085 \mu\text{mol/l}$. Observándose una diferencia significativa entre caso-control a las 22 semanas ($p = 0,0102$).

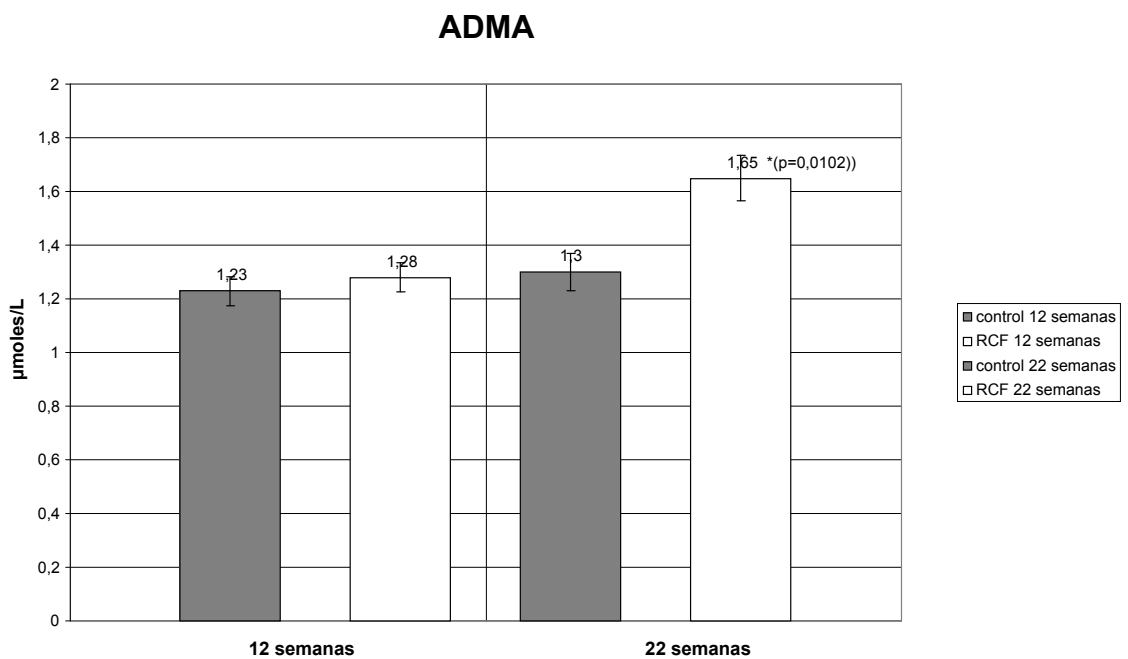


Figura 6. Concentraciones de ADMA en mujeres embarazadas controles y con restricción de crecimiento a las 12 y 22 semanas.

8.2 Variable bioquímica de estrés oxidativo (MDA)

Los valores de los promedios de MDA a nivel plasmático en las mujeres preeclámpticas y sus controles a las 12 semanas son de $1,44 \pm 0,014 \mu\text{mol/l}$ y $1,42 \pm 0,062 \mu\text{mol/l}$ respectivamente. A las 22 semanas los promedios de las mujeres con preeclampsia fueron de $1,55 \pm 0,097 \mu\text{mol/l}$ y sus controles registraron una media $1,57 \pm 0,061 \mu\text{mol/l}$. No encontrándose una diferencia significativa en ninguna de las dos tomas de muestras a las 12 y 22 semanas. (Fig.7).

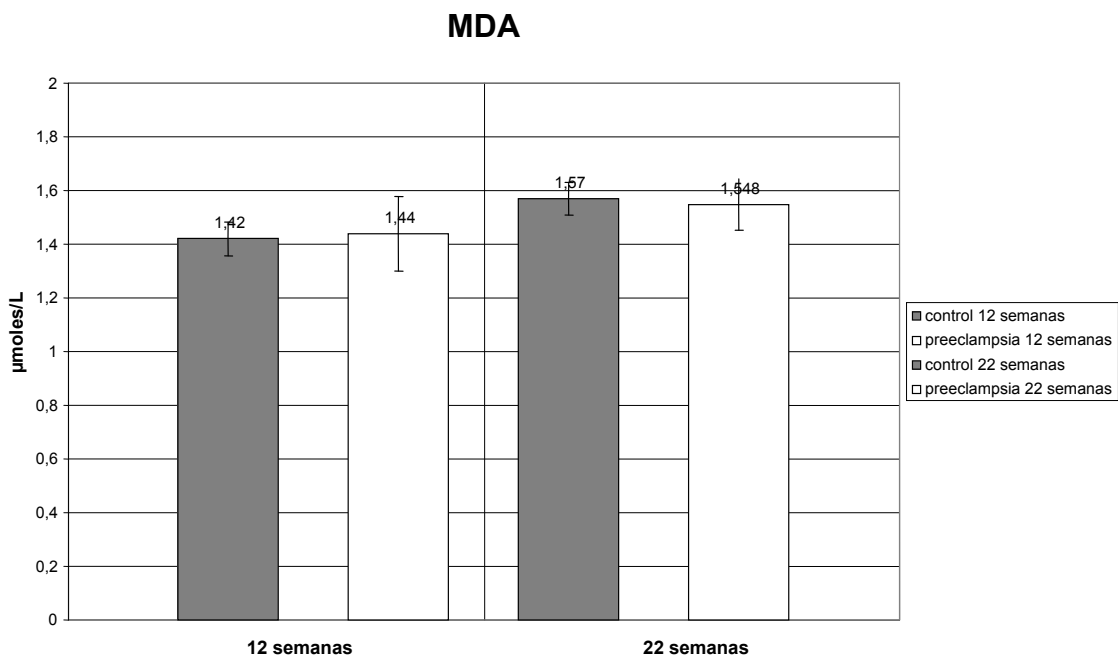


Figura 7. Concentraciones de MDA en mujeres embarazadas controles y preeclámpticas a las 12 y 22 semanas.

En mujeres que presentaron restricción de crecimiento fetal a las 12 y 22 semanas, los promedios fueron de $1,6 \pm 0,073 \mu\text{mol/l}$ y $1,44 \pm 0,104 \mu\text{mol/l}$ respectivamente. No apreciándose una diferencia significativa entre semanas ni entre caso-control ($p < 0,05$).

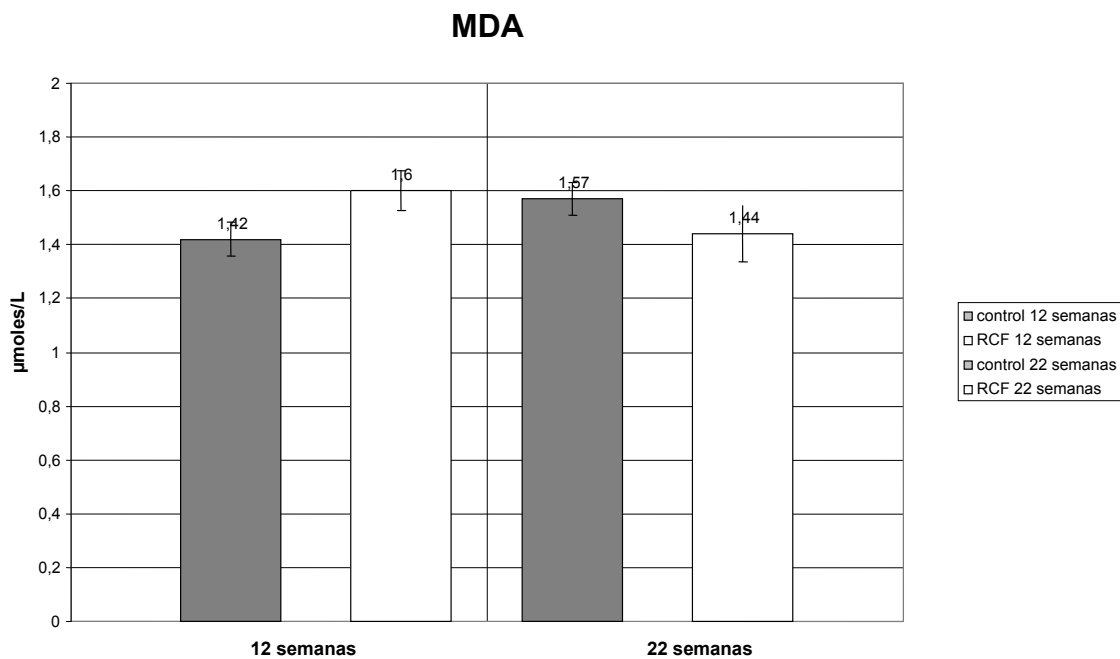


Figura 8. Concentraciones de MDA en mujeres embarazadas controles y con restricción de crecimiento fetal a las 12 y 22 semanas.

9. DISCUSIÓN

En esta investigación se trató de relacionar algunas variables plasmáticas de disfunción endotelial, como es la dimetilarginina asimétrica y una variable de estrés oxidativo como es el malondialdehído con la presentación de preeclampsia y restricción de crecimiento. Estas variables són de importancia en la fisiopatología de la preeclampsia y restricción de crecimiento fetal.

Varios autores (**Lala y Chakraborty, 2003; Redman y Sargent, 2005**) han postulado que el daño del endotelio vascular iniciado por las especies reactivas de oxígeno, donde los principales afectados por este daño son los vasos placentarios, en los cuales se produciría una disfunción endotelial que conduciría a una mala irrigación de la placenta lo cual derivaría en una placentación pobre que sería insuficiente para satisfacer la demanda del feto, la que aumenta en gran medida a partir de la semana 20 de gestación.

En esta dirección, se midió el malondialdehído (MDA), para establecer el nivel de importancia y predicción que tendría el daño biomolecular de las membranas celulares del endotelio vascular producido por los radicales libres. Los lípidos de las membranas celulares son las moléculas más susceptibles de presentar este daño, por lo tanto, la medición de su lipoperoxidación, es de vital importancia para establecer el nivel de daño a raíz del estrés oxidativo. Se midió la concentración plasmática de MDA mediante HPLC que es una técnica mucho más sensible y específica que la reacción TBARS. En este estudio no se encontraron diferencias entre las medias de los grupos control, preeclampsia y restricción de crecimiento fetal a las 12 semanas ni a las 22 semanas, lo que coincide con estudios anteriores de diferentes autores (**Lurba *et al.*, 2004; Diedrich *et al.*, 2001; Bowen *et al.*, 2001 y Regan *et al.*, 2001**). Además, estos aldehídos son moléculas muy reactivas y, por lo tanto, se desplazan sólo hasta escasa distancia del sitio de su formación, por lo tanto, quizás no alcanzaron a distribuirse a niveles sistémicos importantes, distribuyéndose sólo de manera local en la placenta. Sin embargo, existen diferentes estudios en los cuales sí existen diferencias entre mujeres enfermas y controles. En este estudio se tomaron muestras a las 22 semanas y no se observaron diferencias, quizás si se tomaran muestras en semanas posteriores a los 180

días (último tercio de la gestación) se podrían observar diferencias, ya que en ese período aumentan de manera dramática las demandas del feto.

También se estudio la importancia que podría tener la dimetilarginina asimétrica (ADMA) como predictor precoz, ya que esta variable refleja la disfunción endotelial que produciría una placentación insuficiente para la mayor demanda de parte del feto, sobre todo en el último tercio. Variados estudios han establecido al ADMA como una variable de notable importancia en la normotesion, angiogenesis y disfunción endotelial en mujeres embarazadas (**Holden *et al.*, 1998; Cooke, 2004; Savvidou *et al.*, 2003**), pero no estaba totalmente claro si esta variable presentaba niveles elevados a temprana edad gestacional, lo cual era interesante de indagar en dos patologías de conocida relación, tanto en su presentación como en su fisiopatología. En este estudio se estableció una diferencia en mujeres a las 22 semanas que presentaron restricción de crecimiento fetal en comparación con sus controles; los promedios de las mujeres preeclámpticas no presentaron diferencias en comparación con los de sus controles.

Ness y Sibai, 2005 afirman que la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) y la preeclampsia difieren en la gravedad y sintomatología, pero que comparten la misma patología placentaria. Por otra parte, las madres que han tenido embarazos complicados por preeclampsia o RCIU poseen un riesgo cardiovascular mayor a lo largo de su vida. ¿Por qué, entonces algunas mujeres desarrollan RCIU y otros desarrollan preeclampsia? En opinión de ellos, la preeclampsia se desarrolla cuando la placentación anormal, mediada por una alta concentración de citoquinas circulantes, interactúa con el síndrome metabólico prenatal, que constan de adiposidad, resistencia a la insulina/hiperglucemia, hiperlipidemia, y coagulopatía. En cambio el RCIU se desarrolla en ausencia de síndrome metabólico prenatal. Por esto, el feto se ve afectado por una placentación insuficiente, pero la madre no desarrolla clínicamente este síndrome. Lo que a la luz de los resultados obtenidos en este estudio puede ser totalmente factible, ya que la dimetilarginina asimétrica se presentó en concentraciones mayores en mujeres con restricción de crecimiento, siendo de mayor relevancia fisiopatologica, como factor de disfunción endotelial perfilándose como un marcador de importancia en la génesis de esta patología. Quizás no siendo de tan marcada importancia en la presentación de la preclampsia, por que este síndrome debe ser gatillado además por otros factores como son la interacción con el síndrome metabólico

prenatal entre otros. Por esto mismo, fue importante incluir la restricción de crecimiento fetal en este estudio, para tratar de distinguir la importancia de los diferentes mecanismos fisiopatológicos en estas patologías.

En el caso de la preeclampsia, se ha determinado en variados estudios (McKeeman *et al.*, 2004; Levine *et al.*, 2006; Salahuddin *et al.* 2007), que el sFlt1 es un factor anti-angiogénico de importancia tanto en la patogénesis de esta patología como en la predicción de la misma. En resultados recientes de esta patología en Chile, este factor bioquímico es de suma importancia, el cual sería interesante de incorporar en un modelo de predicción junto con otros índices clínicos de importancia (**Rodrigo, comunicación personal**). Al parecer, la elaboración de un modelo de la combinación de variados marcadores clínicos y bioquímicos como es sFlt1, el IMC y la ecografía doppler en mujeres preeclámplicas; Y el ADMA junto con la ecografía doppler u otros para el caso de mujeres con restricción de crecimiento, es el camino apropiado para acercarse de mejor manera a la predicción de estas patologías. También es de vital importancia encontrar el factor desconocido que gatillaría esta cadena de eventos fisiopatológicos para elaborar de mejor manera un plan de prevención totalmente efectivo.

10. CONCLUSIÓN

- No se encontraron diferencias en los niveles de dimetilarginina asimétrica y malondialdehído en mujeres embarazadas preeclámplicas en comparación con sus controles.
- Existe diferencias entre los niveles de dimetilarginina asimétrica a las 22 semanas de mujeres embarazadas que presentaron restricción de crecimiento en comparación con sus controles.
- La dimetilarginina asimétrica podría incorporarse en un modelo de predicción de restricción de crecimiento fetal junto a otros índices clínicos como es por ejemplo el índice de resistencia de la arteria uterina observado en la ecografía doppler.

11. BIBLIOGRAFIA

1. **AFIFI, Y.; CHURCHILL, D.** 2003. Pharmacological treatment of hypertension in pregnancy. *Curr. Pharm.* 9:1745-1753.
2. **ARNGRIMSSON R.; BJORNSSON S.; GEIRSSON R.T.; BJORNSSON H.; WALKER J.J.; SNAEDAL G.** 1990. Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 97: 762-769.
3. **ASKIE L.M.; DULEY L.; HENDERSON-SMART D. J.; STEWART L.A.** 2007. Antiplatelet agents for prevention of pre-eclampsia: a meta-analysis of individual patient data. *The Lancet* 369: 1791-1798.
4. **BAYLIS C.; BEINDER E.; SÜTÖ T.; AUGUST P.** 1998. Recent insights into roles of nitric oxide and rennin-angiotensin in the pathophysiology of preeclamptic pregnancy. *Semin. Nephrol.* 18: 208-230.
5. **BELO L.; GAFFNEY D.; CASLAKE M.** 2004. Apolipoprotein E and cholesteryl ester transfer protein polymorphisms in normal and preeclamptic pregnancies. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 112: 9–15.
6. **BERSINGER N.A.; SMARASON A.K.; MUTTUKRISHNA S.** 2003. Women with preeclampsia have increased serum levels of pregnancy-associated plasma protein a (PAPP-A), inhibin A, activin A, and soluble E-selectin. *Hypertens. Pregn.* 22: 45–55.
7. **BIANCO A.; STONE J.; LYNCH L.; LAPINSKI R.; BERKOWITZ G.; BERKOWITZ RL.** 1996. Pregnancy outcome at age 40 and older. *Obstet. Gynecol.* 87: 917-922.
8. **BIANCO A.T.; SMILEN S.W.; DAVIS Y.; LOPEZ S.; LAPINSKI R.; LOCKWOOD C.J.** 1998. Pregnancy outcome and weight gain recommendations for the morbidly obese woman. *Obstet. Gynecol.* 91: 97-102.

9. **BOWEN, R.; MOODLEY, J. y DUTTON, M.** 2001. Oxidative stress in pre-eclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 80: 719-725.
10. **BÖGER, R.; ZOCALLI C.** 2003. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscl. Supple.* 4: 23–28.
11. **BROUGHTON, P.** 1999. What is the place of genetics in the pathogenesis of pre-eclampsia?. *Biol. Neonato.* 76: 325-330.
12. **BURTON, G.; JAUNIAUX, E.** 2004. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 11: 342–352.
13. **BURGER O.; PICK E.; ZWICKEL J.** 2004. Placental protein 13 (PP-13): Effects on cultured trophoblasts, and its detection in human body fluids in normal and pathological pregnancies. *Placenta.* 25:608–622.
14. **CANINI S.; PREFUMO F.; PASTORINO D.** 2008. Association between birth weight and first-trimester free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein A. *Fertil. and Steril.* 89:174–178.
15. **CARTY D.; DELLES C.; DOMINICZAK A.** 2008. Novel Biomarkers for Predicting Preeclampsia. *Trends Cardiovasc. Med.* 18(5-24): 186–194.
16. **CHAIWORAPONGSA T.; ROMERO R.; ESPINOZA J.** 2004. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190:1541–1547.
17. **CHAFETZ I.; KUHNREICH I.; SAMMAR M.** 2007. First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 197:35–37.

18. **CHAPPELL, L.C.;** **SEED, P.T.;** **KELLY, F.J.;** **BRILEY, A.;** **HUNT, B.J.;** **CHARNOCK-JONES, D.S.;** **MALLET, A.;** **POSTON, L.** 2002. Vitamin C and E supplementation in women at risk of preeclampsia is associated with changes in indices of oxidative stress and placental function. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187:777-784.
19. **CINCOTTA R.B.;** **BRENNECKE S.P.** 1998. Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas. *Int. J. Gynaecol Obstet.* 60:23-27.
20. **CNOSSEN J.S.;** **MORRIS R.K.;** **TER RIET G.;** **MOL B.;** **VAN DER POST J.A.M.;** **COOMARASAMY A.;** **ZWINDERMAN A.H.;** **ROBSON S.C.;** **BINDELS P.J.E.;** **KLEIJNEN J.;** **KHAN K.S.** 2008. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ* 178:701-711.
21. **COOKE, J.** 2003. NO and angiogenesis. *Atheroscl. Supple.* 4: 53–60.
22. **COOKE, J.** 2004. Asymmetrical Dimethylarginine: The Über Marker?. *Circulation.* 109: 1813-1818.
23. **COONROD D.V.;** **HICKOK D.E.;** **ZHU K.;** **EASTERLING T.R.;** **DALING J.R.** 1995. Risk factors for preeclampsia in twin pregnancies: a population-based cohort study. *Obstet. Gynecol.* 85: 645-650.
24. **DAVIES A.M.;** **CZACZKES J.W.;** **SADOVSKY E.;** **PRYWES R.;** **WEISKOPF P.;** **STERKV V.** 1970. Toxemia of Pregnancy In Jerusalem I. *Epidemiological Studies Of A Total Community.* *Isr. J. Med. Sci.* 6: 253-266.
25. **DAVISON, J.;** **HOMUTH, V.;** **JEYABALAN, A.;** **CONRAD, K.;** **KARUMANCHI, S.;** **QUAGGIN, S.;** **DECHEND, R. y LUFT, F.** 2004. New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 2440-2448.

26. **DEKKER G.; SIBAI B.** 2001. Primary, secondary, and tertiary prevention of pre-eclampsia. *The Lancet*, 357: 209-215.
27. **DIEDRICH, F.; RENNER, A. y RATH, W.** 2001. Lipid hydroperoxides and free radical scavenging enzyme activities in preeclampsia and HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) syndrome: no evidence for circulating primary products of lipid peroxidation. *Am J. Obstet Gynecol.* 185: 166-172.
28. **DREYFUS, M.; HEDELIN, G.; KUTNAHORSKY, R.; LEHMANN, M.; VIVELLE, B.; LANGER, B.** 2001. Antiphospholipid antibodies and preeclampsia: a case-control study. *Obstet. Gynecol.* 97: 29-34.
29. **DUCKITT, K.; HARRINGTON, D.** 2005. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 330: 565.
30. **DUKLER D.; PORATH A.; BASHIRI A.; EREZ O.; MAZOR M.** 2001 Remote prognosis of primiparous women with preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 96: 69-74.
31. **DULEY L.; MEHER S.; ABALOS E.** 2006. Management of pre-eclampsia. *BMJ.* 25: 463–468.
32. **ESPINOZA J.; ROMERO R.; NIEN J.K.; GOMEZ R.; KUSANOVIC J.P.; GONÇALVES L.F.; MEDINA L.; EDWIN S, HASSAN S., CARSTENS M.; GONZALEZ R.** 2007. Identification of Patients at Risk for Early Onset and/or Severe Preeclampsia With the Use of Uterine Artery Doppler Velocimetry and Placental Growth Factor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196: 326.1–326.13.
33. **FRANCOUAL J.; AUDIBERT F.; TRIOCHE P.** 2002. Is a polymorphism of the apolipoprotein E gene associated with preeclampsia? *Hypertens. Pregn.* 21: 127–133.

34. **GARNER P.R.; D'ALTON M.E.; DUDLEY D.K.; HUARD P.; HARDIE M.** 1990. Preeclampsia in diabetic pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163: 505-508.
35. **GREENBERG J.; BELL S.; VAN AUSSDAL W.** 2008. Omega-3 Fatty Acid Supplementation During Pregnancy. *Rev. Obstet. Gynecol.* 1(4): 162–169.
36. **GROTTO D., SANTA MARIA L.D., BOEIRA S., VALENTINI J., CHARAO M.F., MORO A.M., NASCIMENTO P.C., POMBLUM V.J., GARCIA S.C.** 2007. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. *J. of Pharm. and Biomedic. Anal.* 43: 619–624.
37. **GUPTA, S.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.** 2005. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet. Gynecol. Surv.* 60: 807-816.
38. **HOLDEN D. P.; FICKLING S. A., WHITLEY G. ST.J.; NUSSEY S. S.** 1998. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am. J. of Obstet. and Gynecol.* 178: 551-556.
39. **HUGHES G.; BISCHOF P.; WILSON G.; KLOPPER A.** 1980. Assay of a placental protein to determine fetal risk. *BMJ* 280: 671-673.
40. **ILHAN, N.; ILHAN, N.; SIMSEK, M.** 2002. The changes of trace elements, malondialdehyde levels and superoxide dismutase activities in pregnancy with or without preeclampsia. *Clin. Biochem.* 35: 393-397.
41. **JAMES P.; NELSON-PIERCY C.** 2004. Management of hypertension before, During, and after pregnancy. *Heart* 90: 1499-1504.

42. **KIM, Y.J.; PARK, H.S.; LEE, H.Y.; HA, E.H.; SUH, S.H.; OH, S.K.; YOO, H.-S.** 2006. Reduced l-arginine Level and Decreased Placental eNOS Activity in Preeclampsia. *Placenta*. 27: 438-444.
43. **KOGA K.; OSUGA Y.; YOSHINO O.** 2003. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:2348-2351.
44. **LALA, P. Y CHAKRABORTY, C.** 2003. Factors Regulating Trophoblast Migration and Invasiveness: Possible Derangements Contributing to Preeclampsia and Fetal Injury. *Placenta* 24: 575-587.
45. **LAURSEN L.S.; OVERGAARD M.T.; SOE R.** 2001. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. *FEBS Lett.* 504: 36-40.
46. **LAWOYIN T.O.; ANI F.** 1996. Epidemiologic aspects of pre-eclampsia in Saudi Arabia. *East. Afr. Med. J.* 73: 404-406.
47. **LEE C.J.; HSIEH T.T.; CHIU T.H.; CHEN K.C.; LO L.M.; HUNG T.H.** 2000. Risk factors for pre-eclampsia in an Asian population. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 70: 327-33.
48. **LEVINE R.J.; LAM C.; QIAN C.** 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 355: 992-1005.
49. **LURBA, E.; GRATACOS, E. y MARTIN-GALLAN, P.** 2004. A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia an normal pregnancy. *Free Radic Biol Med.* 37: 557-570.
50. **LUFT F.C.** 2006. Soluble endoglin (sEng) joins the soluble fms-like tyrosine kinase (sFLT) receptor as a pre-eclampsia molecule. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21: 3052–3054.

51. **LYELL, D.J.; LAMBERT-MESSERLIAN, G.M.; GIUDICE, L.C.** 2003. Prenatal screening, epidemiology, diagnosis, and management of preeclampsia. *Clin. in Lab. Med.* 23: 413-442.
52. **MADAZLI, R.; BENIAN, A.; AYDIN, S.; UZUN, H.; TOLUN, N.** 2002. The plasma and placental levels of malondialdehyde, glutathione and superoxide dismutase in pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol.* 22: 477-480.
53. **MAKKONEN N.; HEINONEN S.; KIRKINEN P.** 2000. Obstetric prognosis in second pregnancy after preeclampsia in first pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 19: 173-181.
54. **MAKKONEN N.; HEINONEN S.; HILTUNEN M.** 2001. Apolipoprotein E alleles in women with pre-eclampsia. *J. Clin. Pathol.* 54: 652–654.
55. **MAYNARD S.E.; MIN J.Y.; MERCHAN J.** 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Investig.* 111: 649–658.
56. **MAYNARD S.; VENKATESHA S.; THADHANI R.; KARUMANCHI S.** 2005. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. *Pediatr. Res.* 57: 1-7.
57. **MCKEEMAN G.; ARDILL J.; CALDWELL C.; HUNTER A.J.; MCCLURE N.** Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop. 2004. *Am. J. of Obstet. and Gynecol.* 191: 1240-1246.
58. **MCCOWAN L.M.; BUIST R.G.; NORTH R.A.; GAMBLE G.** 1996. Perinatal morbidity in chronic hypertension. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 103: 123-129.

59. **MEHENDALE, S.; KILARI A.; DANGAT K.; TARALEKAR V.; MAHADIK S.; JOSHI S.** 2007. Fatty acids, and oxidative stress in preeclampsia. *Int. J. of Gynecol. and Obstet.* 100: 234-238.
60. **MERVIEL, P.; CARBILLON, L.; CHALLIER, J.C.; RABREAU, M.; BEAUFILS, M.; UZAN, S.** 2004. Pathophysiology of preeclampsia: links with implantation disorders. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 115: 134-147.
61. **MIGNINI, L.E.; VILLAR J.; KHAN K. S.** 2006. Mapping the theories of preeclampsia: The need for systematic reviews of mechanisms of the disease. *Am. J. of Obstet. and Gynecol.* 194: 317-321.
62. **MUTTER, W. y KARUMANCHI, S.** 2008. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc. res.* 75:1-8.
63. **NAGY B.; RIGO J.; FINTOR L.** 1998. Apolipoprotein E alleles in women with severe pre-eclampsia. *J. Clin. Pathol.* 51: 324-325.
64. **NESS R.; SIBAI B.** 2006. Shared and disparate components of the pathophysiology of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am. J. of Obstet. and Gynecol.* 195: 40-49
65. **NICOLAIDES K.H.; BINDRA R.; TURAN O.M.** 2006. A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 27:13-17.
66. **ODEGARD R.A.; VATTEN L.J.; NILSEN S.T.; SALVESEN K.A.; AUSTGULEN R.** 2000. Risk factors and clinical manifestations of pre-eclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 107:1410-1416.
67. **OKEN E.; NING Y.; RIFAS-SHIMAN S.; RICH EDWARDS R.; OLSEN S.; GILLMAN M.** 2007. Diet During Pregnancy and Risk of Preeclampsia or Gestational Hypertension. *Ann. Epidemiol.* 17: 663–668.

68. **ONG C.Y.; LIAO A.W.; SPENCER K.** 2000. First trimester maternal serum free beta human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications. *Brit. J. Obstet. Gynaecol.* 107: 1265–1270.
69. **PANBURANA, P.; PHUAPRADIT, W.; PUCHAIWATANANON, O.** 2000. Antioxidant nutrients and lipid peroxide levels in Thai preeclamptic pregnant women. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 26: 377-381.
70. **PEREZ-CUEVAS R.; FRASER W.; REYES H.; REINHARZ D.; DAFTARI A.; HEINZ C.S.; ROBERTS J.M.** 2003. Critical pathways for the management of preeclampsia and severe preeclampsia in institutionalised health care settings. *BMC Pregn. and Childbirth* 3:6
71. **PERTICONE, F; SCIACQUA, A.; MAIO, R.; PERTICONE, M; MAAS, R.; BOGER, RH.; TRIPEPI, G.; TECH, S.; SESTI, G.; ZOCCALI, C.** 2005. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J of the Am. Coll. of Cardiol.* 46: 518-523.
72. **PRITCHARD, J.A.; WEISMAN R; RATNOFF O.D.; VOSBURGH G.J.** 1954. Intravascular hemolysis, thrombocytopenia and other hematological abnormalities associated with severe toxemia of pregnancy. *New Eng. J. of Med.* 250: 89-98.
73. **RANA S.; ARUMANCHI S.A.; EVINE R.J.** 2007. Sequential changes in antiangiogenic factors in early pregnancy and risk of developing preeclampsia. *Hypertension* 50: 137–142.
74. **REDMAN, C.; SARGENT, I.** 2005. Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science* 308: 1592-1594.
75. **REGAN, C.; LEVINE, R. y BAIRD, D.** 2001. No evidence for lipid peroxidation in severe preeclampsia. *Am J. Obstet Gynecol.* 185: 572-578.

76. **ROBERTS, J.M.; COOPER, D.W.** 2001. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *The Lancet* 357: 53-56.
77. **ROBERTS J.M., CATOV J.M.** Aspirin for pre-eclampsia: compelling data on benefit and risk. *The Lancet* 369: 1765-1766.
78. **RODRIGO, R.; RIVERA, G.** 2003. Papel del estrés oxidativo y de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles.
79. **ROS H.S.; CNATTINGIUS S.; LIPWORTH L.** 1998. Comparison of risk factors for preeclampsia and gestational hypertension in a population-based cohort study. *Am. J. Epidemiol.* 147: 1062-1070.
80. **RUMBOLD A., MAATS F.; CROWTHER C.** 2005. Dietary intake of vitamin C and vitamin E and the development of hypertensive disorders of pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 11: 67-71.
81. **RUMBOLD A.; CROWTHER C.; HASLAM R.; DEKKER G.; ROBINSON J.** 2006. Vitamins C and E and the Risks of Preeclampsia and Perinatal Complications. *N. Engl. J. Med.* 354: 1796-806.
82. **SALAHUDDIN S.; LEE Y.; VADNAIS M.** 2007. Diagnostic utility of soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin in hypertensive diseases of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 197: 281-286.
83. **SATTAR N. BENDOMIR A. BERRY C.** 1997. Lipoprotein subfraction concentrations in preeclampsia: Pathogenic parallels to atherosclerosis. *Obstet. Gynecol.* 89: 403-408.
84. **SAVVIDOU, M.D.; HINGORANI, A.D.; TSIKAS, D.; FROLICH, J.C.; VALLANCE, P.; NICOLAIDES, K.H.** 2003. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *The Lancet.* 361: 1511-1517.

85. **SELJESKOG E.; HERVIG T.; AZAM M.** 2006. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clin. Biochem.* 39: 947-954
86. **SERDAR, Z.; GUR, E.; COLAKOETHULLARY, M.; DEVELIOETHLU, O.; SARANDOL, E.** 2003. Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia. *Arch. Gynecol. Obstet.* 268: 19-25.
87. **SIBAI B.; DEKKER G.; KUPFERMINE M.** 2005. Pre-eclampsia. *The Lancet* 365: 785-799.
88. **SKJAERVEN R.; WILCOX A.J.; LIE R.T.** 2002. The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 346: 33-38.
89. **SMITH G.C.; STENHOUSE E.J.; CROSSLEY J.A.** 2002. Early pregnancy levels of pregnancy associated plasma protein A and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 87:1762–1767.
90. **SPENCER K.; YU C.K.H.; REMBOUSKOS G.** 2005. First trimester sex hormone-binding globulin and subsequent development of preeclampsia or other adverse pregnancy outcomes. *Hypert. Pregn.* 24: 303–311.
91. **STAMILIO D.M.; SEHDEV H.M.; MORGAN M.A.; PROPERT K.; MACONES G.A.** 2000. Can antenatal clinical and biochemical markers predict the development of severe preeclampsia? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182:589-594.
92. **SYDOW K.; MÜNDEL T.** 2003. ADMA and oxidative stress. *Atheroscl. Suppl.* 4: 41-51.
93. **TEERLINK T.** 2007. HPLC analysis of ADMA and other methylated l-arginine analogs in biological fluids. *J. of Chromat. B.* 851: 21-29.

94. **THADHANI R.; STAMPFER M.J.; HYNTER D.J.; MANSON J.E.; SOLOMON C.G.; CURHAN G.C.**; 1999. High body mass index and hypercholesterolaemia: risk of hypertensive disorders of pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 94: 543-50.
95. **TRAN, C.L.T.; LEIPER, J.M.; VALLANCE, P.** 2003. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscl. Suppl.* 4: 33-40.
96. **VALDES, G. y GERMAIN, A.** 2001. ¿Podemos Prevenir Eficazmente la Preeclampsia?.[Online]<www.medwave.cl/congresos/interamericanohipertension/4.act?tpl=im_ficha_congresos.tpl> Medwave, Edición septiembre.
97. **VAR, A.; KUSCU, N.K.; KOYUNCU, F.; UYANIK, B.S.; ONUR, E.; YILDIRIM, Y.; ORUC, S.** 2003. Atherogenic profile in preeclampsia. *Arch. Gynecol. Obstet.* 268: 45-47.
98. **VENKATESHA S.; TOPORSIAN M.; LAM C.** 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Med.* 12: 642–649.
99. **VILLAR, J.; MERIALDI, M.; GULMEZOGLU, A.; ABALOS, E.; CARROLI, G.; KULIER, R. y DE ONIZ, M.** 2003. Nutritional interventions during pregnancy for the prevention or treatment of maternal morbidity and preterm delivery: An overview of randomized controlled trials. *J. of Nutrit.* 133: 1606-1625.
100. **WALKER, J.** 2000. Pre-eclampsia. *The Lancet.* 356: 1260–1265.
101. **WANG, Y.; GU Y, ZHANG y, LEWIS DF.** 2004. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia: decreased endothelial nitric oxide synthase expression is associated with increased cell permeability in endothelial cells from preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190: 817-824.

102. **WILSON, M.I.; GOODWIN, T.M.; PAN, V.I.; INGLES, S.A.** 2003. Molecular epidemiology of preeclampsia. *Obstet. and Gynecol. Surv.* 58: 39-66.
103. **WOLF M.; SHAH A.; LAM C.** 2005. Circulating levels of the antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. *Am. J. Obstet.* 193:16-22.
104. **YAGI K.; NISHIGAKI I.; OHAMA H.** 1968. *Vitamins* 37: 105–112.
105. **YARON Y.; HEIFETZ S.; OCHSHORN Y.** 2002. Decreased first trimester PAPP-A is a predictor of adverse pregnancy outcome. *Prenat. Diagn.* 22: 778-782.
106. **YOUNG, I.; TRIMBLE, E.** 1991. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Ann. of Clin. Bioch.* 28: 504-508.
107. **ZETEROGLU, S.; USTUN, Y.; USTUN, Y.E.** 2004. Placental and cord malondialdehyde and maternal and perinatal outcomes. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 85: 47-49.