



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



“PAPEL DE LA VASCULOGÉNESIS Y EL ESTRÉS  
OXIDATIVO EN LA PREDICCIÓN DE PREECLAMPSIA, EN  
MUJERES, DURANTE EL PRIMER TRIMESTRE DEL  
EMBARAZO”

**CÉSAR ANDRÉS PINTO MORALES**

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

PROFESOR GUÍA: Dr. MAURO PARRA CORDERO

SANTIAGO, CHILE  
2010



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



“PAPEL DE LA VASCULOGÉNESIS Y EL ESTRÉS  
OXIDATIVO EN LA PREDICCIÓN DE PREECLAMPSIA, EN  
MUJERES, DURANTE EL PRIMER TRIMESTRE DEL  
EMBARAZO”

**CÉSAR ANDRÉS PINTO MORALES**

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

NOTA FINAL: .....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: MAURO PARRA CORDERO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: HECTOR ADARMES	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: VICTOR PARRAGUEZ	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
**2010**

<b>ÍNDICE</b>	<b>página</b>
RESUMEN .....	4
1. INTRODUCCIÓN .....	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. Preeclampsia .....	7
2.1.1. Preeclampsia Placentaria .....	9
2.1.2. Preeclampsia Materna .....	9
2.2. Disfunción Endotelial en la Preeclampsia .....	10
2.3. Disfunción de la Placentación .....	11
2.4. Estrés Oxidativo en la Preeclampsia .....	12
2.5. Factores Relacionados con Angiogénesis en la Preeclampsia .....	16
2.6. Perspectivas Acerca del Uso de Factores Relacionados con Angiogénesis y Estrés Oxidativo en la Predicción Precoz de la Preeclampsia .....	21
3. HIPÓTESIS .....	22
4. OBJETIVOS .....	22
4.1. Objetivos Generales .....	22
4.2. Objetivos Específicos .....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
5.1. Diseño del Protocolo .....	23
5.1.1. Obtención muestra .....	23
5.2. Criterios de Inclusión .....	23
5.3. Criterios de Exclusión .....	24
5.4. Variables sanguíneas .....	24
5.4.1. Técnicas analíticas y bioquímicas a aplicar .....	24
5.4.1.1. Variables relacionadas con angiogénesis .....	24
5.4.1.1.1. sFlt1, sEng y PIGF.....	24
5.4.1.1.2. Parámetros relacionados con estrés oxidativo .....	24
5.4.1.2.1. Estrés oxidativo: Malondialdehído (MDA) .....	24
5.4.1.2.2. Capacidad antioxidante del plasma .....	25
5.4.1.3. Variables clínicas .....	25
5.5. Métodos Estadísticos .....	25
6. RESULTADOS .....	26
6.1. Variables Clínicas .....	26
6.2. Factores Relacionados con el Estrés Oxidativo .....	26
6.3. Factores Relacionados con Vasculogénesis .....	27
6.4. Regresión Logística Múltiple.....	27
6.5. Curva de ROC.....	28
7. DISCUSIÓN .....	31
8. CONCLUSIÓN .....	33
9. ANEXO.....	34
10. BIBLIOGRAFÍA .....	35

## **RESUMEN**

La preeclampsia es un síndrome caracterizado por remodelación anormal de las arterias espirales, defectuosa vasculogénesis y disfunción en el endotelio vascular materno. Sus características clínicas más importantes son: hipertensión y proteinuria.

El objetivo de este estudio fue evaluar el valor predictivo de marcadores bioquímicos relacionados con angiogénesis y estrés oxidativo sobre la ocurrencia de esta enfermedad. Se invitó a participar de este estudio a mujeres embarazadas entre las 11 – 14 semanas y se obtuvieron muestras de sangre que se congelaron hasta ser analizadas. Se seleccionaron todas las muestras de sangre de embarazos preeclámpticos (n=32) y cinco controles para cada caso provenientes de embarazos normotensos (n=143).

El análisis multivariado mostró que solamente dos marcadores bioquímicos (sFlt1 y PlGF) y uno clínico (IMC) son independientes y significativamente predictores de la aparición de preeclampsia a las 11-14 semanas de gestación. Además, se demostró que la combinación de éstos, pueden predecir en el primer trimestre de la gestación a más de las mitad de las mujeres que desarrollarán preeclampsia, con solo un 10% de falsos positivos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La preeclampsia, es una enfermedad que se produce durante el embarazo y cuyas características más importantes en la madre son hipertensión vascular y proteinuria producto del daño glomerular, además de provocar varios otros desórdenes sistémicos. Se origina probablemente en la placenta y causa problemas maternos y fetales. Esta patología afecta a un porcentaje importante de embarazos entre 3 a 5 % (Walker, 2000; Sibai *et al*, 2005) y es causa de morbi-mortalidad tanto fetal como materna. Es una complicación potencialmente peligrosa de la segunda mitad del embarazo, del parto o del posparto temprano (Redman y Sargent, 2005).

La preeclampsia severa puede conducir al síndrome de HELLP (“hemolysis, elevated liver-enzyme levels, and a low platelet count”), convulsiones (eclampsia) y/o restricción del crecimiento fetal (Sibai *et al*, 2005). El síndrome HELLP se ha asociado a una incidencia de 10-20% de mortalidad perinatal, atribuible en gran parte al parto prematuro (Abramovici *et al*, 1999; Roelofsen *et al*, 2003).

La enfermedad es más severa cuando es de inicio temprano y se caracteriza por neonatos de pequeño tamaño para la edad gestacional, como también se le atribuye una mayor posibilidad de reincidencia de la misma en embarazos futuros, que cuando la enfermedad es de inicio tardío (Redman y Sargent, 2005).

La placenta tiene un papel central en la preeclampsia, según lo evidenciado por la rápida desaparición de los síntomas de la enfermedad después del parto (Venkatesha *et al*, 2006). Esta es una de las razones más comunes de inducción del parto antes del término del embarazo (Redman y Sargent, 2005). Algunos de los factores de riesgo que se describen para la presentación de la enfermedad incluyen: una historia anterior de preeclampsia, primíparas, obesidad, antecedentes familiares de preeclampsia, embarazos múltiples y patologías crónicas tales como hipertensión o diabetes mellitus. Paradojalmente, se describe que el tabaquismo reduce el riesgo de contraer la enfermedad.

Las causas placentarias primarias y la enfermedad sistémica secundaria aún son debatidas (Redman y Sargent, 2005). Se piensa que la insuficiente circulación útero-placentaria conduce a la hipoxia de la placenta y a la liberación de los factores placentarios que causan daño en el endotelio vascular materno. De este modo, se apoya la teoría de la

toxemia, que propone que la placenta comprometida produce las sustancias que conducen al síndrome materno.

En la placenta hipóxica se produce el fenómeno de estrés oxidativo, en el que se incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), según lo sugerido por el hecho que en la preeclampsia aumentan las concentraciones de los productos de la lipoperoxidación en el plasma materno y del cordón umbilical (Walsh *et al*, 2000).

Hasta la fecha, los mecanismos por los cuales se produce la preeclampsia no están del todo dilucidados. Actualmente, hay evidencia que sugiere que el estrés oxidativo placentario juega un rol principal en la patogenia de la preeclampsia, aunque el mecanismo exacto aún no se conoce (Redman y Sargent, 2000). Además, la placenta posiblemente como resultado de la isquemia, secreta un factor o factores a la circulación materna que directa o indirectamente daña las células endoteliales de la madre (Maynard *et al*, 2005). Algunos de estos factores circulantes provenientes de la placenta, pueden estar involucrados en la patogenia de la enfermedad, tales como la variante soluble del receptor “fms-like tyrosine kinase1” (sFlt1) (Levine *et al*, 2006), que liga al “placental growth factor” (PlGF) y al “vascular endothelial growth factor” (VEGF). El “soluble endoglin” (sEng) es otro receptor libre y su ligando es el “transforming growth factor” -  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1 y TGF-  $\beta$ 2) (Levine *et al*, 2006). Estos receptores libres, al unirse a los factores de crecimiento se les consideran factores antiangiogénicos.

Debido a que esta enfermedad afecta a un importante número de embarazos y tiene un gran impacto sobre la salud materna y fetal, pudiendo incluso llevar a la muerte de ambos, es de vital importancia encontrar la manera de predecir su presentación para poder prevenir el síndrome o iniciar una adecuada terapia temprana de la enfermedad.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Preeclampsia

La preeclampsia, es un síndrome específico del embarazo de la especie humana (Burton y Jauniaux, 2004), que cursa con defectuosa vasculogénesis placentaria y disfunción endotelial materna extensa. Se caracteriza por hipertensión y proteinuria, pudiendo encontrarse además hemólisis, trabajo prematuro de parto, anormalidades en el hígado, trombocitopenia, síndrome de HELLP (“hemolysis, elevated liver-enzyme levels, and a low platelet count”), eclampsia (etapa extrema de la enfermedad caracterizada por convulsiones generalizadas), restricción del crecimiento fetal y muerte (Maynard *et al*, 2005). Según los criterios de la Sociedad Internacional de Estudio de la Hipertensión en el embarazo, la definición para el diagnóstico de la preeclampsia es una hipertensión inducida por el embarazo (presión sistólica > 140 mm Hg y presión arterial diastólica > 90 mm Hg) que ocurre después de la semana 20 de gestación, con proteinuria ( $\geq 300$  mg de proteína por día o de una relación proteína urinaria / creatinina  $\geq 30$  mg / mmol) (Brown *et al*, 2001). De todas maneras, la preeclampsia debe ser visualizada como un desorden multisistémico, que puede afectar de diversas formas al cerebro, los pulmones, los riñones y el hígado. Afecta cerca del 5% de los embarazos en sociedades desarrolladas. En el resto del mundo la incidencia es más alta, pudiendo encontrarse alrededor de 8.370.000 casos anuales en todo el mundo (Villar *et al*, 2003). Esto es suficiente para decir que la preeclampsia es un importante problema de la salud mundial. Los factores de riesgo para esta enfermedad pueden incluir un historial con presentaciones anteriores de preeclampsia, mujeres primíparas, mujeres con obesidad, alto índice de masa corporal (IMC), antecedentes familiares de preeclampsia, embarazos múltiples y patologías crónicas tales como hipertensión o diabetes mellitus, también se pueden considerar patologías heredadas como la trombofilia, lo que hace pensar que la herencia juega un papel en la presentación de la enfermedad, pero no sigue características mendelianas simples, por lo que es poco probable que un único gen sea el responsable. Contradictoriamente, se describe que el consumo de tabaco reduce el riesgo de contraer la enfermedad (Lain *et al*, 2003), por sus efectos pro-angiogénicos (Heeschen *et al*, 2001).

El inicio clínico de la preeclampsia es a menudo insidioso y asintomático, pero puede incluir cefalea, disturbios visuales, epigastralgia, aumento de peso y edema facial y de las extremidades. 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). Las complicaciones severas de la preeclampsia en la madre pueden incluir falla renal aguda, edema cerebral, hemorragia cerebral, convulsiones (eclampsia), edema pulmonar; trombocitopenia, anemia hemolítica, coagulopatías y lesiones en el hígado, incluyendo el síndrome de HELLP (Maynard *et al*, 2005). En el caso del recién nacido, la muerte es la secuela más común de la precocidad y bajo peso al nacimiento, incluyendo prolongadas estancias en la unidad de cuidados intensivos neonatal, distres respiratorio, enterocolitis necrotizante, hemorragia intraventricular, sepsis y muerte (Sibai *et al*, 1985; Friedman *et al*, 1995).

La preeclampsia se asocia a una respuesta inflamatoria sistémica de causa desconocida, que también se produce en el embarazo normal, pero en menor magnitud (Redman y Sargent, 2003). Múltiples factores del proceso inflamatorio que están involucrados (leucocitos inflamatorios, endotelio, cascada de la coagulación, plaquetas y reactivos de fase aguda) producen cambios sistémicos que son considerados parte de la fisiología normal del embarazo. Estos cambios se intensifican en el tercer trimestre del embarazo, aún más cuando se manifiesta la preeclampsia y podrían contribuir con los disturbios maternos.

En el síndrome clínico se presentan disturbios circulatorios sistémicos secundarios, que se pueden atribuir a la disfunción generalizada del endotelio materno. La placenta, específicamente las células del trofoblasto que se encuentran solamente en este tejido, tienen un papel central en la preeclampsia, según lo evidenciado por la rápida desaparición de los síntomas de la enfermedad después del parto (Venkatesha *et al*, 2006).

Existen dos grandes tipos de esta enfermedad, la placentaria y la materna. En la “preeclampsia placentaria”, el problema se presenta en una placenta que está bajo condiciones de hipoxia y con el consecuente estrés oxidativo (Burton y Jauniaux, 2004). La “preeclampsia materna” se produce de la interacción entre una placenta normal y una constitución materna susceptible, o que sufre de una enfermedad microvascular, como son

la hipertensión o la diabetes mellitus. Las presentaciones mixtas, combinando contribuciones maternas y placentarias, también son comunes (Redman y Sargent, 2005).

### **2.1.1 Preeclampsia Placentaria**

La preeclampsia placentaria evoluciona en dos etapas: preclínica y clínica. En la primera etapa se presenta un desarrollo temprano defectuoso de la placenta y por consiguiente, un acceso restringido a la fuente de sangre materna. En la segunda etapa, una placenta cada vez más hipóxica produce los signos maternos del cuadro, incluyendo hipertensión y proteinuria, así como las anormalidades de la coagulación y del hígado.

En los últimos dos trimestres del embarazo, la placenta requiere aumentar el acceso a la fuente de sangre materna. Esto es producido por una remodelación extensa de las arterias espirales maternas, a través de la invasión de los citotrofoblastos que reemplazan las células del endotelio materno formando un pseudosendotelio, además, estas arterias pierden la musculatura lisa que las rodea, produciéndose así una gran dilatación de ellas, transformándose en un conducto flácido y de baja resistencia. En muchos casos de preeclampsia placentaria, se inhibe la invasión de los trofoblastos, las arterias se remodelan mal y la capacidad de la circulación uteroplacental es pequeña. Esto se llama placentación pobre y se produce antes de las 20 semanas de gestación y antes de que aparezcan los signos clínicos.

Para lograr la invasión de los citotrofoblastos, éstos requieren mandar señales a algunas células inmunes como macrófagos y células NK que colaboran en su invasión a las arterias espirales. Estudios recientes sugieren que en la preeclampsia estas señales pueden ser muy débiles, por lo que no se produzca la estimulación a las células inmunes que deben colaborar en la placentación (Hiby et al, 2004; Parham, 2005).

### **2.1.2 Preeclampsia Materna**

En adultos se produce una respuesta inflamatoria sistémica similar a la preeclampsia, pero de menor grado, que caracteriza a las enfermedades arteriales, la hipertensión, la obesidad, o la diabetes, que son condiciones que también predisponen fuertemente a la preeclampsia en mujeres jóvenes. Estas patologías conducen a la “preeclampsia materna”, donde el problema es más una respuesta anormal materna que un

embarazo anormal. En este caso, el embarazo puede ser una “prueba de estrés” metabólico y vascular, que revela la salud de una mujer durante el último tiempo y que se correlaciona con una incidencia más alta de enfermedades vasculares como: enfermedad cardíaca isquémica, derrame cerebral e hipertensión. Estas enfermedades pueden evidenciarse muchos años después de un episodio de preeclampsia (Sattar y Greer, 2002).

## **2.2 Disfunción Endotelial en la Preeclampsia**

El endotelio es una monocapa de células poligonales planas, que se extienden ininterrumpidamente sobre la superficie luminal de todo el sistema vascular, una barrera biológica estratégicamente situada entre el músculo liso vascular y el flujo sanguíneo. Las funciones del endotelio son numerosas y varían según el tamaño y la distribución de los vasos sanguíneos (Luscher y Barton, 1997). Participa en la modulación del tono vascular, en el control de la hemostasis primaria, como barrera de defensa, en la inflamación, en el transporte de nutrientes y otros solutos, junto con la activación e inactivación de diversas hormonas vasoactivas (Rodrigo *et al*, 2005).

La disfunción endotelial se caracteriza por un cambio de las acciones del endotelio que apuntan hacia la reducción de la vasodilatación, un estado proinflamatorio y propiedades protrombóticas (Endemann y Schiffrin, 2004). La disfunción endotelial generalizada podría ser responsable de todos los signos clínicos del síndrome materno de la preeclampsia.

A pesar de la patología placentaria, la preeclampsia es un desorden multisistémico y sus manifestaciones reflejan grandes desórdenes en el endotelio, que a menudo dan por resultado vasoconstricción e isquemia de órganos periféricos.

La importancia de los factores de riesgo cardiovasculares, como la obesidad, ha consolidado la hipótesis que la preexistencia de una susceptibilidad o disfunción vascular materna, puede tener un papel patológico por lo menos en algunos casos de preeclampsia (Maynard *et al*, 2005). En estudios recientes se ha encontrado relación entre la preeclampsia y un mayor índice de masa corporal (IMC) (Levine *et al*, 2004). La permeabilidad capilar aumenta en la preeclampsia y los individuos preeclámpticos son más propensos a desarrollar edema periférico y pulmonar (Venkatesha *et al*, 2006). En el riñón, el daño endotelial da lugar a proteinuria y produce la endoteliosis glomerular, que constituye una lesión patológica característica. Aunque alguna vez fue considerada

patognomónica para la preeclampsia, los estudios recientes de biopsias renales han demostrado que una endoteliosis glomerular leve, puede ocurrir también en un porcentaje significativo en el término de los embarazos normales y ésta es más severa en preeclámpticas. Esto sugiere, que la disfunción endotelial de la preeclampsia puede ser una exageración de un proceso presente en todo embarazo cercano al término.

### **2.3 Disfunción de la Placentación**

La placenta humana consiste en un elaborado árbol ramificado que se baña por la sangre materna circulante, por lo que se clasifica histológicamente como una placenta de tipo hemocorial, lo que favorece el intercambio gaseoso, de nutrientes y de productos metabólicos.

La placenta humana es probablemente la única en experimentar una transición en la oxigenación hacia el final del primer trimestre.

La placenta se vincula al endometrio materno anclándose con las vellosidades. Durante la placentación normal, los citotrofoblastos cruzan los puentes placentario-maternos e invaden el endometrio, miometrio materno y las arterias espirales adyacentes penetran las paredes de las arterias y substituyen las células del endotelio materno, estimulando la remodelación de la pared arterial, la pérdida del músculo liso y la consecuente dilatación de las arterias, transformándolas de vasos pequeños, a vasos flácidos, con capacitancia de alto calibre, pasando de un flujo uterino de sangre de algunos mililitros por minuto en el estado de ingravidez hasta aproximadamente 700 mL/min en un embarazo a término (Kliman, 2000). Esta transformación vascular permite el aumento del flujo de sangre uterina necesario para mantener el feto durante el embarazo. En la preeclampsia, esta transformación es inconclusa. Durante la enfermedad la invasión de los citotrofoblastos a las arterias se limita al endometrio superficial y en el miometrio las arterias espirales siguen siendo estrechas y reducidas (Pijnenborg *et al*, 1991; Meekins *et al*, 1994). Sin embargo, durante el embarazo normal la invasión disminuye progresivamente hacia la periferia de la placenta (Brosens, 1988), por lo tanto, igualmente en embarazos normales es posible encontrar arterias que no son transformadas totalmente (Meekins *et al*, 1994).

En el endometrio, los citotrofoblastos son enfrentados por muchas células NK y algunos macrófagos. Durante el embarazo normal, estas células inmunes facilitan la invasión profunda de los citotrofoblastos en el miometrio y promueven la remodelación extensa de la arteria espiral. En la etapa preclínica de la preeclampsia, la invasión es restringida y se produce una remodelación arterial incompleta (Redman y Sargent, 2005). La causa para la transformación incompleta no es conocida, pero se cree que puede haber un defecto primario del citotrofoblasto endovascular o una anomalía en el endometrio uterino que estas células están procurando invadir (Brosens et al, 2002). El PlGF podría desempeñar un papel en esta invasión defectuosa del citotrofoblasto característica en la preeclampsia (Zhou, 1997; Torry, 2003). Además, el crecimiento vascular placentario se puede ver afectado al final del embarazo al aumentar factores antiangiogénicos como el sFlt1 y por la paralela disminución de factores angiogénicos como el VEGF y el PlGF.

La insuficiente invasión de los citotrofoblastos en el endometrio durante el primer trimestre del embarazo es el factor predisponente más ampliamente reconocido para la presentación de la preeclampsia (Hubel, 1999).

## **2.4 Estrés Oxidativo en la Preeclampsia**

Para transformar la energía de la dieta: proteínas, hidratos de carbono y grasas, son necesarios una serie de mecanismos que se producen principalmente en las mitocondrias de las células animales, a través de una serie de reacciones de óxido-reducción. La energía liberada en estas reacciones se utiliza fosforilando al ADP (adenosín difosfato), generando así ATP (adenosín trifosfato); el último paso de este proceso utiliza el oxígeno como un receptor de electrones. Todo el proceso se conoce como fosforilación oxidativa. El ATP es fundamental como la forma de almacenamiento de la energía química necesaria para conducir muchas reacciones bioquímicas en una célula.

La mayor parte del oxígeno usado durante la oxidación de los elementos de la dieta se convierte en el agua, gracias a las acciones de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, estas enzimas, no son totalmente eficientes y los electrones pueden “escapar” sobre el oxígeno molecular para formar el anión superóxido. El anión superóxido pertenece a una clase de moléculas llamadas radicales libres, que forman parte de las llamadas especies reactivas de oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno se

caracterizan por su alta reactividad, lo que genera un potencial para producir alteraciones en biomoléculas. Cuando se produce un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad del organismo para detoxificarse, se produce un estado conocido como estrés oxidativo. Algunos desórdenes metabólicos maternos, por ejemplo, diabetes, son asociados con el aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (Wiznitzer et al, 1999).

La producción de especies reactivas de oxígeno en la unidad feto-placentaria tiene especial relevancia debido a su naturaleza altamente vascularizada y a que este tejido es rico en mitocondrias lo que favorece la producción de estas especies reactivas de oxígeno (Liochev y Fridovich, 1997). También hay una abundancia de macrófagos que contribuyen a la producción local de radicales libres, incluidas las especies reactivas de cloro, que también podrían contribuir al desarrollo de estrés oxidativo (Myatt y Cui, 2004).

Al medir la presión parcial de oxígeno en el espacio intervelloso placentario y placa basal de la decidua se ha encontrado valores de alrededor de 20 mm Hg entre las 7 a 10 semanas la gestación (Rodesch *et al*, 1992; Jauniaux *et al*, 2000). El hecho de mantener una concentración baja de oxígeno durante el período embrionario parece favorecer la blastulación, la diferenciación normal de la células y puede proteger contra los efectos perjudiciales de los radicales libres (Burton *et al*, 2003). Estudios tempranos con ultrasonido en la placenta, evidencian que la circulación intraplacentaria materna está establecida completamente a las 10 a 12 semanas de embarazo (Hustin y Schaaps, 1987; Kliman, 2000). Una vez que este proceso esté completo, la tensión del espacio intervelloso de oxígeno se eleva a más de 50 mm Hg. Mientras este proceso no se complete, el espacio intervelloso está lleno un líquido claro, probablemente un ultrafiltrado del plasma materno suplementado por las secreciones de las glándulas uterinas (Schaaps y Hustin, 1988; Burton *et al*, 2002), por lo tanto la placenta humana no se puede considerar verdaderamente hemocorial hasta el final del primer trimestre.

Hay considerable evidencia que implica al estrés oxidativo placentario en la patogénesis de la preeclampsia (Redman y Sargent, 2000). La placenta hipóxica de la preeclampsia sufre el estrés oxidativo, lo que puede producir la degeneración del trofoblasto y posiblemente contribuir al deterioro de la invasión de éste a las arterias espirales, dificultando su remodelación. A su vez, la remodelación disminuida de las

arterias espirales (sea por esta razón o no), genera insuficiente perfusión a la placenta produciendo hipoxia y estrés oxidativo en la placenta y el estrés oxidativo placentario genera directa o indirectamente estrés oxidativo en la circulación materna.

El mantenimiento de la capa muscular de las arterias espirales puede generar perfusión intermitente y oclusiones por trombos, seguidas por disoluciones del coágulo, lo que puede llevar a una hipoxia/reoxigenación repetida. La hipoxia/reoxigenación es un estímulo potente para la transformación de la xantina dehidrogenasa en xantina oxidasa, enzima altamente expresada en los citotrofoblastos y aumentada en las placentas de mujeres con preeclampsia y fuente importante en la generación del anión superóxido. La hipoxia/reoxigenación, es a su vez un estímulo mucho más potente que la sola hipoxia para la generación del estrés oxidativo placentario, por lo tanto, la mantención de niveles constantes en la concentración de oxígeno es un factor más importante que el valor absoluto de esta en la generación del estrés oxidativo (Burton y Hung, 2003). Así lo confirman estudios de placentas *in vitro* mantenidas en condiciones constantes con bajos niveles de oxígeno (12-16 mm Hg), donde se ha encontrado que ellas no exhiben ningún aumento en el estrés oxidativo (Martin, 1964), sin embargo, al reintroducir el oxígeno después de un período de hipoxia se genera una rápida producción de las especies reactivas de oxígeno (Burton y Jauniaux, 2004).

Producto de la hipoxia/reoxigenación se genera un cierto grado de lesión del endotelio materno que es característico en el embarazo humano normal, especialmente hacia el término cuando el consumo fetal y placentario de oxígeno está en su punto más alto (Burton y Hung, 2003).

Un ambiente bajo en oxígeno dentro del útero durante el embarazo temprano puede conferir protección ante el estrés oxidativo. Por el contrario, se requiere un flujo de sangre profuso y constante hacia la placenta durante el segundo y tercer trimestre de gestación para apoyar el crecimiento fetal. Este aumento en la tensión de oxígeno experimentado por la placenta durante la transición (10 a 12 semanas) es potencialmente peligroso (Burton y Jauniaux, 2004).

Mecanismos adaptativos mejoran el sistema de defensa antioxidante materno para contrarrestar el efecto de los radicales libres. Sin embargo, el embarazo es un estado donde esta adaptación y el equilibrio puede ser fácilmente alterado. Entonces, si la generación de

los radicales excede las defensas celulares puede ocurrir daño en las proteínas, lípidos, y DNA, resultando en estrés oxidativo celular. Por lo tanto, una respuesta defectuosa a un estímulo oxidante, constituiría un evento precoz en la preeclampsia.

Durante la preeclampsia se han encontrado bajas concentraciones de vitaminas antioxidantes en el suero, lo que apoya el concepto de un aumento del estrés oxidativo. Se han reportado reducciones significativas en el suero de vitamina C en pacientes con preeclampsia leve y grave (Kharb, 2000; Mohindra *et al*, 2002). Por consiguiente, parece probable que la administración de las vitaminas C y E podría ejercer un efecto protector por el refuerzo de las defensas antioxidantes.

Como los niveles de antioxidantes solubles son altamente influenciados por la ingesta dietética materna, la dieta puede desempeñar un papel en la presentación de la preeclampsia. Un estudio ha sugerido que una ingesta de vitamina C por debajo de lo recomendado puede duplicar el riesgo de preeclampsia (Zhang *et al*, 2002), pero no hay evidencia de un efecto similar de la vitamina E.

La evidencia del aumento del estrés oxidativo sistémico en mujeres preeclámpticas, ha provocado la realización de estudios que evalúan antioxidantes como las vitaminas C y E para la profilaxis de la patología. Por otra parte, las propiedades antiinflamatorias de la vitamina E puede resultar especialmente eficaz, ya que tendría una acción múltiple, como antioxidante y antiinflamatorio (Redman y Sargent, 2005).

Como resultado del fenómeno del estrés oxidativo se generan productos de lipoperoxidación, estos productos pueden ser utilizados como biomarcadores de estrés oxidativo que pueden ser fácilmente detectados en la placenta con preeclampsia. Se piensa que la generación de lipoperoxidación en la preeclampsia es iniciada en la placenta a través de una exagerada producción del anión superóxido que reacciona rápidamente con el óxido nítrico para formar peroxinitrito.

Uno de los primeros biomarcadores de lipoperoxidación que aumentan en el plasma de mujeres con preeclampsia, es el malondialdehído (MDA) (Hubel *et al*, 1989). El MDA es un producto directo de la acción de las especies reactivas de oxígeno sobre los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular. Otros biomarcadores de lipoperoxidación que aumentan en el embarazo con preeclampsia son el F2-isoprostanos y 4-hidroxi-nonal (Noris *et al*, 2004).

En mujeres preeclámplicas se han encontrado productos de lipoperoxidación, en niveles significativamente elevados dentro de los tejidos placentarios (Staff *et al*, 1999; Madazli *et al*, 2002), así como también en el plasma y en la orina (Kumar y Das, 2000; McKinney *et al*, 2000; Barden *et al*, 2001).

La gravedad de la enfermedad se ha correlacionado con la concentración de MDA en el suero (Serdar *et al*, 2002) y en los eritrocitos (Madazli *et al*, 1999). En consecuencia, se demostró que cuanto mayor sea el nivel de lipoperoxidación, mayor es la severidad de la preeclampsia (Panburana *et al*, 2000).

En general, la combinación de elevación de la lipoperoxidación y la disminución de los marcadores de la capacidad antioxidante como las vitaminas C y E, ofrece una indicación clara de la presencia de estrés oxidativo. La evidencia sugiere que el estrés oxidativo es un importante mediador en la preeclampsia, pero el mecanismo por el cual se produce este fenómeno parece involucrar muchos factores, además, también parecen estar involucrados factores antiangiogénicos.

## **2.5 Factores Relacionados con Angiogénesis en la Preeclampsia**

La placenta preeclámptica, posiblemente como resultado de la isquemia, secreta un factor o factores en la circulación materna, que directa o indirectamente daña las células endoteliales maternas (Maynard *et al*, 2005). Uno de estos factores que aumentan en la circulación de las mujeres preeclámpticas es el receptor soluble de VEGF sFlt-1 (conocido también como sVEGFR1), que también liga al PlGF (Levine *et al*, 2006), ambos factores angiogénicos. Por lo tanto, el sFlt1 se comporta como un factor antiangiogénico, al evitar la interacción entre estos factores (PlGF y VEGF) con su receptor de membrana (Flt1 o VEGFR1). La causa por la que se produce la versión soluble no es conocida aún, aunque se sabe que es la misma proteína, pero sin el dominio de transmembrana, lo que la hace soluble (Maynard *et al*, 2005).

El sFlt1 no es específico del embarazo, pero durante éste, el factor es secretado mayormente a la sangre materna por los trofoblastos, que son sobre estimulados en el estado de hipoxia (Redman y Sargent, 2005).

En embarazos normotensos, los niveles de sFlt1 se mantienen constantes durante las etapas temprana y media de la gestación, hasta las 33 -36 semanas, para luego, alrededor de

los dos últimos meses de gestación, aumentar hasta llegar al momento del parto, correspondiéndose, con la disminución de los niveles de VEGF y PIGF libre. Estos cambios ocurren antes y son más pronunciados en las mujeres en que la preeclampsia se desarrollará más adelante. En estas mujeres los niveles de sFlt1 empiezan a cambiar a las 21 a 24 semanas de gestación y se hace un cambio más pronunciado a las 29 a 32 semanas de gestación (Levine *et al*, 2004). A su vez, estos cambios en los niveles de sFlt1 son mayores en los casos de mayor severidad de la patología, o sea, en las mujeres en que la preeclampsia se manifiesta antes (<37 semanas de gestación) y en las mujeres en que la preeclampsia se asocia a un recién nacido pequeño para su edad gestacional (Levine *et al*, 2004).

En estudios realizados en los últimos años se ha demostrado que los niveles de sFlt1 aumentan entre las 11 a 9 semanas antes del inicio de la preeclampsia y aumentos importantes en los niveles de sFlt1 se producen alrededor de las cinco semanas antes del inicio de la enfermedad, siendo los niveles encontrados en esta etapa de la gestación similares a los encontrados al término de una gestación normal, pero, en las mujeres en las que se presentará la preeclampsia estos niveles seguirán aumentando hasta una semana antes del inicio de los signos de la enfermedad (Levine *et al*, 2004).

El VEGF es importante en la angiogénesis y en el mantenimiento de la función de las células endoteliales y al igual que el PIGF, es sintetizado por los citotrofoblastos. Se cree que VEGF puede ser particularmente importante en mantener la función del endotelio fenestrado (Esser *et al*, 1998), que se encuentra en el glomérulo renal, cerebro, y el hígado, órganos desproporcionadamente afectados en preeclampsia. El VEGF también induce vasodilatación, si bien no se trata de un efecto poderoso, igualmente, se podría esperar que la disminución de los niveles de VEGF podrían contribuir en cierta medida al aumento de la presión arterial. Esto podría explicar varios, aunque por supuesto no todos, de los principales síntomas de la enfermedad (Luttun y Carmeliet, 2003).

Además, el PIGF parece actuar sinérgicamente con VEGF y pueden ser necesarios para reparar tejidos injuriados y en la angiogénesis de tejidos isquémicos (Carmeliet *et al*, 2001; Luttun *et al*, 2002).

En ensayos experimentales con glomerulonefritis, se demostró que el VEGF es necesario para la reparación del capilar glomerular (Ostendorf *et al*, 1999; Masuda *et al*,

2001). También se ha reportado la presencia de hipertensión y proteinuria en pacientes con cáncer que fueron tratados con señales inhibitoras de VEGF (Kabbinavar *et al*, 2003; Yang *et al*, 2003).

Los niveles de VEGF medidos en el suero disminuyen cinco semanas antes de establecerse la preeclampsia, pero éstos niveles no son lo suficientemente bajos para considerarlo un predictor significativo de la enfermedad (Levine *et al*, 2004).

PIGF, al igual que el sFlt-1, comienza a disminuir 11 a 9 semanas antes de inicio de la preeclampsia, con reducciones substanciales durante las 5 semanas antes del inicio de la hipertensión o proteinuria (Levine *et al*, 2004).

Los niveles de PIGF son significativamente más bajos en las mujeres con preeclampsia que en las mujeres con embarazos normales ya en las semanas 13 – 16, encontrándose la mayor diferencia de estos niveles cinco semanas antes del inicio de la enfermedad, coincidiendo esto con el aumento en los niveles de sFlt1 (Levine *et al*, 2004). Aproximadamente cinco semanas antes del inicio de la preeclampsia, la concentración media de PIGF en las mujeres que más adelante presentarán la patología, es similar a la concentración media de PIGF en los controles a término, pero en las mujeres que presentarán la enfermedad, estos niveles seguirán bajando (Levine *et al*, 2004).

Las mujeres que tienen concentraciones bajas de PIGF durante las etapas tempranas de la gestación, tienen un riesgo mucho mayor de presentar preeclampsia de inicio temprano (Levine *et al*, 2004).

Así como en el caso del sFlt1, el PIGF disminuye más en los casos en que la enfermedad se manifiesta antes (< 37 semanas) y en los casos de un recién nacido pequeño para su edad gestacional (Levine *et al*, 2004), sugiriendo que la angiogénesis defectuosa pueda ser especialmente importante en estos casos.

El paralelo aumento de los niveles de sFlt1 y la disminución de los niveles de PIGF y VEGF libres, puede sugerir que la disminución de estos factores se podría atribuir en parte, a la interacción producida entre el sFlt1 y estos factores angiogénicos.

Los efectos *in vitro* de sFlt1 incluyen vasoconstricción y disfunción endotelial, similar a los efectos del plasma de mujeres con preeclampsia (Maynard *et al*, 2003). El suero de pacientes preeclámplicas, inhibe la formación del tubo de células endoteliales en cultivo. Al suministrar el sFlt1 a ratas, se produce hipertensión, proteinuria y endoteliosis

glomerular (Luft, 2006). La teoría del exceso sFlt1 ciertamente no ofrece un cuadro completo de preeclampsia. Hay varios elementos que siguen siendo inexplicables. No se ha reportado coagulación, falla en la función hepática, o anomalías en el cerebro (eclampsia) en animales tratados con sFlt1.

Aunque sFlt1 es producido en cantidades pequeñas por otros tejidos (células endoteliales y monocitos), la placenta parece ser la principal fuente de sFlt1 que circula durante el embarazo, según lo evidenciado por la caída dramática de su concentración después de la extracción de la placenta (Maynard *et al*, 2003).

La sobre-expresión de sFlt1 en ratas conduce a hipertensión, proteinuria y endoteliosis glomerular, que constituyen las manifestaciones clásicas de la preeclampsia (Maynard *et al*, 2003). Sin embargo, los animales tratados con sFlt1 no desarrollan la hemólisis y la trombocitopenia, características observadas en el síndrome de HELLP, un subtipo de preeclampsia severa, además, la preeclampsia presenta una gran cantidad de signos clínicos, que varía en su presentación, características y resultados. Es difícil concebir cómo un factor puede explicar el espectro entero, por lo tanto, se presume que otros factores solubles derivados de la placenta pueden actuar en conjunto con sFlt1 para causar la disfunción endotelial y conducir a la preeclampsia severa (Venkatesha *et al*, 2006).

Uno de estos otros factores es la endoglina soluble (sEng), proteína de 65 kDa, que es la variante libre de la endoglina (Eng) o CD105, proteína de 180 kDa (Gougos, 1990), que es un receptor de membrana para el factor transformante del crecimiento  $\beta 1$  y  $\beta 3$  (TGF- $\beta 1$  y TGF- $\beta 3$ ) (Luft, 2006).

La Eng se expresa altamente en las membranas de las células que conforman el endotelio vascular y también en las membranas de los sinciotrofoblastos (Gougos, 1990).

Este factor (sEng) es un co-receptor para el TGF, e inhibe la señal de éste al endotelio vascular (Venkatesha *et al*, 2006). En los estudios que se han realizado no se ha encontrado grandes diferencias en los niveles de TGF entre las mujeres con preeclampsia y las con embarazos normales, pero se cree que la sEng actúa a nivel local.

Según estudios recientes, éste factor (sEng) se encuentra en mayor cantidad en las mujeres con preeclampsia en una relación de cuatro es a uno en comparación con los embarazos normales, sin embargo la relación sEng/Eng no tiene diferencias significativas

entre las mujeres con la enfermedad y las con embarazos normales, lo que sugiere que el receptor de membrana aumenta proporcionalmente con el receptor soluble en la preeclampsia (Venkatesha *et al*, 2006). En el mismo estudio se comparó las concentraciones en el suero de sEng entre embarazos normales y mujeres no embarazadas y se encontró que las concentraciones en los embarazos normales eran el doble (antes del término) y triple (a término), en comparación con las mujeres no embarazadas, lo que sugiere que la sEng cumple alguna función en el embarazo normal. También se encontró que al comparar embarazos normales de edad gestacional comparable con mujeres con preeclampsia suave, preeclampsia severa y con síndrome de HELLP, las concentraciones de sEng eran tres, cinco y décuplas partes más altas respectivamente, que en los embarazos normales.

Según algunos autores, la sEng comienza a aumentar en las mujeres con preeclampsia de inicio temprano (antes de la semana 37 de gestación) entre las 17 y 20 semanas de gestación y se hace más notoria la diferencia entre las semanas 33 y 36. En las mujeres con preeclampsia más tardía (después de la semana 37 de gestación) los niveles de sEng comienzan a aumentar levemente alrededor de las semanas 25 a 28 y presentan un incremento más marcado también entre las semanas 33 y 36 (Levine *et al*, 2006). El aumento en las concentraciones de sEng se correlaciona con el aumento en las concentraciones de sFlt1, excepto en el síndrome de HELLP, donde el aumento en las concentraciones de sEng es mucho mayor que el aumento en las concentraciones de sFlt1 (Venkatesha *et al*, 2006). En muestras obtenidas 48 horas después de parto se observa una disminución de un 70% en los niveles de sEng, esto sugiere que el origen de la sEng es placentario. Sin embargo, no hay que dejar de considerar otras fuentes como la el sistema vascular materno.

La sEng inhibe la formación de los tubos capilares *in vitro* al igual que el sFlt1 induce permeabilidad e hipertensión vascular *in vivo* (Venkatesha *et al*, 2006). Los efectos de la sEng en ratas preñadas son amplificados por la coadministración de sFlt1, conduciendo a preeclampsia severa, incluyendo el síndrome de HELLP y la restricción del crecimiento fetal. De igual modo se observan sus efectos al ser administrados en ratas no gestantes, por lo que su acción no está condicionada a la existencia de una placenta o preñez, sino que pueden actuar directamente sobre el endotelio materno (Venkatesha *et al*,

2006). Así, sEng y sFlt1, dos proteínas antiangiogénicas que funcionan con mecanismos separados, pueden combinarse para producir disfunción endotelial y preeclampsia severa (Levine *et al*, 2006).

Al Igual que el sFlt1 aún no se conoce como se genera la sEng y los mecanismos que regulan esta producción (Luft, 2006).

Cuando la preeclampsia amenaza ocasionar complicaciones maternas severas, se realiza a menudo la interrupción del embarazo para preservar la salud materna. Aunque las terapias antihipertensivas ayudan a bajar la presión arterial y el sulfato de magnesio es eficaz en la profilaxis de las convulsiones, el parto sigue siendo el único tratamiento definitivo (Maynard *et al*, 2005). Se cree que la terapia con anticuerpos que neutralicen al sFlt1 y a la sEng puede ser beneficiosa para el tratamiento de la preeclampsia (Venkatesha *et al*, 2006).

## **2.6 Perspectivas Acerca del Uso de Factores Relacionados con Angiogénesis y Estrés Oxidativo en la Predicción Precoz de la Preeclampsia**

Durante la preeclampsia clínica y antes de su inicio, se ha observado la disminución de las concentraciones de PIGF y VEGF libres en la circulación (Maynard *et al*, 2003). Por su parte, niveles elevados de sFlt1 se correlacionan con la severidad de la preeclampsia y la proximidad al inicio de la hipertensión o de la proteinuria (Levine *et al*, 2006). Todos estos cambios ocurren antes y son más pronunciados en las mujeres que desarrollan preeclampsia en comparación con controles normotensos y pueden ayudar a predecir la enfermedad.

El aumento de los niveles circulantes de sEng y la relación de sFlt1/PIGF pueden predecir la presentación de la preeclampsia cada una por separado. Estas observaciones en conjunto (niveles elevados de sEng y el aumento de la relación sFlt1/PIGF) predicen aún mejor la aparición de preeclampsia (Levine *et al*, 2006).

La determinación de un solo marcador bioquímico o variable hemodinámica, es poco probable que sea capaz de predecir en forma óptima la preeclampsia, pues, esta indudablemente tiene un origen multifactorial. Una combinación de pruebas, donde se evalúen varios biomarcadores es probable que proporcione una buena predicción. La mejor prueba de discriminación en la actualidad es el Doppler de arteria uterina, que es capaz de predecir al 40% de las preeclampsias en el segundo trimestre de la gestación. Sin embargo,

cuando se quiere detectar las condiciones severas o de inicio precoz la capacidad de predicción se eleva al 80% (Parra *et al*, 2005). Los futuros exámenes podrían incluir el uso combinado de marcadores bioquímicos y Doppler de arteria uterina (Raijmakers *et al*, 2004).

### **3. HIPÓTESIS**

La alteración de la concentración plasmática de los factores antiangiogénicos, factores angiogénicos y de estrés oxidativo en el primer trimestre de la gestación son útiles como marcadores predictores de preeclampsia.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo General:**

Predecir la ocurrencia de preeclampsia sobre la base de la medición de marcadores bioquímicos relacionados con angiogénesis y estrés oxidativo.

#### **4.2. Objetivos Específicos:**

1. Determinar el papel predictor de preeclampsia del factor angiogénico PIGF y de los factores antiangiogénicos sFlt-1 y sEng en el plasma de mujeres embarazadas entre 11-14 semanas de gestación.

2. Determinar el papel predictor de la preeclampsia de los marcadores de estrés oxidativo, como el MDA, capacidad antioxidante total (FRAP: “ferric reducing ability of plasma”) y niveles de ácido úrico, en plasma de mujeres embarazadas entre 11-14 semanas de gestación.

3. Determinar si existe correlación entre los distintos factores de vasculogénesis, estrés oxidativo y factores clínicos en las mujeres embarazadas incorporadas en el estudio.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Diseño del Protocolo**

Este es un estudio anidado 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. Para los fines de este estudio se formaron dos grupos: grupo con preeclampsia y grupo de controles normotensos.

Las pacientes preeclámplicas se definieron cuando su presión arterial sistólica fue mayor o igual a 140 mm Hg y diastólica de 90 mm Hg, en dos mediciones separadas por 6 horas, después de las 20 semanas de gestación y asociada a proteinuria sobre 300 mg/24 horas.

Todas las pacientes ingresaron al protocolo entre las 11-14 semanas de gestación, al momento de realizar el Doppler de arteria uterina por vía transvaginal y concedieron donar una muestra de sangre para estudios futuros.

Para algunas de las determinaciones no se tiene la misma cantidad de observaciones (N), ya que no se dispuso de suficiente cantidad de muestra para poder obtener todas las mediciones.

#### **5.1.1. Obtención muestra:**

Las muestras de sangre se obtuvieron cuando las mujeres entraron en el estudio entre las 11-14 semanas de gestación. Las muestras de sangre se centrifugaron y el plasma fue almacenado a  $-80^{\circ}$  C, para sus análisis posteriores.

Después de aplicar los criterios de exclusión e inclusión a pacientes con resultado perinatal completo, se obtuvieron 175 muestras de sangre, de ellas 32 correspondieron a preeclámplicas y 143 a controles.

#### **5.2. Criterios de Inclusión:**

Todas las mujeres embarazadas entre 11-14 semanas que hayan accedido al Doppler de arteria uterina y que hayan accedido a donar una muestra de sangre.

### **5.3. Criterios de Exclusión:**

Se excluyeron todas las embarazadas con patologías crónicas como diabetes mellitus, lupus eritematoso, hipertensión arterial crónica, trombofilia, etc. Además, se excluyeron las mujeres que presentaron fetos con malformaciones congénitas.

### **5.4. Variables sanguíneas:**

#### **5.4.1. Técnicas analíticas y bioquímicas a aplicar:**

##### **5.4.1.1. Variables relacionados con angiogénesis.**

###### **5.4.1.1.1 sFlt1, sEng y PlGF**

Los valores plasmáticos de sFlt1, sEng y PlGF se determinaron utilizando una técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) con un kit comercial (RandD System, Mineapolis, USA). Las muestras de plasma fueron leídas a 450 y 540 nm. en un lector de microplacas.

##### **5.4.1.2. Variables relacionados con estrés oxidativo.**

###### **5.4.1.2.1 Estrés oxidativo: MDA.**

Las concentraciones plasmáticas de MDA fueron medidas usando la técnica del ácido tiobarbitúrico, que mide la lipoperoxidación a través de la cuantificación de uno de sus productos estables como es el MDA, el cual reacciona con ácido tiobarbitúrico para formar un producto mediante calentamiento a 90°C durante 1 hora. Este compuesto se puede separar y medir por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a detección fluorométrica con detección de excitación a una longitud de onda de 532 nm y emisión a 553 nm.

#### **5.4.1.2.2. Capacidad antioxidante del plasma**

Se utilizó el método FRAP (“ferric reducing ability of plasma”) que mide la capacidad del plasma para reducir el hierro férrico a ferroso, siguiendo la cinética a 593 nm (Benzie y Strain, 1996).

Debido a la importancia de la contribución de los niveles de ácido úrico al FRAP, también se procedió a medir la uricemia. Estas concentraciones plasmáticas de ácido úrico se determinarán mediante colorimetría con un kit enzimático (Uric Acid LiquiColor® Test, Human, Wiesbaden, Alemania). Las muestras de plasma fueron leídas en un espectrofotómetro a 520 nm.

#### **5.4.1.3. Variables clínicas**

Se registraron las siguientes variables: edad, paridad, consumo de tabaco, índice de masa corporal (IMC, Kg/m<sup>2</sup>), antecedentes de preeclampsia.

### **5.5 Métodos Estadísticos**

#### **Comparaciones y correlaciones entre las variables:**

Se determinó la normalidad de las variables continuas a través de métodos estándares (Kolmogorov-Smirnov) y posteriormente se determinó las diferencias de las medias o medianas en base a pruebas estadísticas paramétricas (t student) o no paramétricas (Mann-Whitney U test). Las variables categóricas fueron analizadas a través de Chi cuadrado o test exacto de Fisher, según correspondió. Se tomó como diferencia significativa  $p \leq 0.05$ . Se realizó además, un análisis de correlación de variables continuas a través de la correlación de Pearson. También se realizó un análisis de regresión logística múltiple y curva de ROC para determinar la capacidad predictiva de preeclampsia de las distintas variables bioquímicas.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Variables Clínicas

En la Tabla I se observan los resultados relacionados con los parámetros clínicos analizados entre ambos grupos de estudio. No se observaron diferencias significativas entre las mujeres que desarrollaron preeclampsia y sus controles en el consumo de tabaco y el consumo de alcohol, como tampoco lo hubo en los porcentajes de mujeres primíparas y en la edad de las mujeres. Sin embargo, el índice de masa corporal (IMC) en las mujeres que desarrollaron preeclampsia fue significativamente mayor que en los controles (Tabla I).

**Tabla I.** Parámetros clínicos de las mujeres que desarrollaron preeclampsia y sus controles.

	Preeclampsia (n=32)	Control (n=143)
Fumadoras (n, %)	1 (3,1)	11 (7,7)
Consumo de Alcohol (n, %)	1 (3,1)	6 (4,2)
Primíparas (n, %)	13 (40,6)	63 (44,1)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27,4 ± 5,4*	24,6 ± 4,0
Edad Materna (años)	31,3 ± 7,6	28,4 ± 6,1

Variables continuas expresadas en promedios ± DE; IMC, índice masa corporal; \* p = 0,0009

### 6.2. Factores relacionados con el estrés oxidativo

Dentro de las mediciones realizadas de los factores relacionados con el estrés oxidativo (MDA, FRAP y Acido Úrico), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias del grupo que desarrolló preeclampsia y el grupo control (Tabla II).

**Tabla II.** Factores relacionados con estrés oxidativo en el plasma de mujeres que desarrollaron preeclampsia y sus controles entre 11-14 semanas de gestación.

<b>Factores</b>	<b>Preeclampsia (n=27)</b>	<b>Control (n=68)</b>
MDA ( $\mu\text{M/L}$ )	2,0 $\pm$ 1,6	1,9 $\pm$ 1,3
FRAP ( $\mu\text{M/L}$ )	351,0 $\pm$ 126,2	340,6 $\pm$ 104,2
Ac. Úrico (mg/dL)	4,1 $\pm$ 2,1	4,4 $\pm$ 2,2

Variables son expresadas como promedio  $\pm$  DE; MDA, (malondialdehído); FRAP “ferric reducing ability of plasma”.

### 6.3. Factores Relacionados con Vasculogénesis.

Al evaluar los factores relacionados con vasculogénesis, no se encontró diferencias significativas de los niveles de sEng entre las mujeres que desarrollaron preeclampsia y sus controles, pero, se observó un aumento significativo de sFlt1 y una disminución significativa de PlGF (Tabla III).

**Tabla III.** Factores relacionados con vasculogénesis en el plasma de mujeres que desarrollaron preeclampsia y sus controles entre 11-14 semanas de gestación.

	<b>Preeclampsia</b>		<b>Control</b>		<b>P</b>
	<b>N</b>	<b>Media <math>\pm</math> DE</b>	<b>N</b>	<b>Media <math>\pm</math> DE</b>	
sFlt1 (pg/mL)	23	1845,1 $\pm$ 1066,1	93	1393,0 $\pm$ 812,3	<b>0,05</b>
PlGF (pg/mL)	26	22,6 $\pm$ 24,2	105	40,3 $\pm$ 39,3	<b>0,0015</b>
sEng (ng/mL)	18	7,3 $\pm$ 1,8	49	8,6 $\pm$ 5,6	1

sFlt1, “soluble fms-like tyrosine kinase 1”; PlGF, “placental growth factor”; sEng, “soluble endoglin”.

### 6.4. Regresión Logística Múltiple.

El análisis multivariado de los factores significativos encontrados en este estudio mostró que solamente dos marcadores bioquímicos (sFlt1 y PlGF) y uno clínico (IMC) son

independientes y significativamente predictores de la aparición de preeclampsia a las 11-14 semanas de gestación (Tabla IV).

**Tabla IV.** Factores predictores significativos de preeclampsia a través de un análisis multivariado entre 11-14 semanas de gestación.

Predictor	Odds Ratio	P	[95% Intervalo Confianza]	
IMC	1,18	0,02	1,03	1,35
sFlt1	1,00	0,01	1,01	1,02
PIGF	0,96	0,01	0,93	0,99

IMC, índice masa corporal; sFlt1, “soluble fms-like tyrosine kinase 1”; PIGF, “placental growth factor”.

### 6.5. Curva de ROC.

Finalmente, para evaluar la sensibilidad y especificidad de una prueba que combine los parámetros anteriormente evaluados como predictores significativos de preeclampsia, se utilizó una curva de ROC, curva que proporciona una representación global de la exactitud diagnóstica.

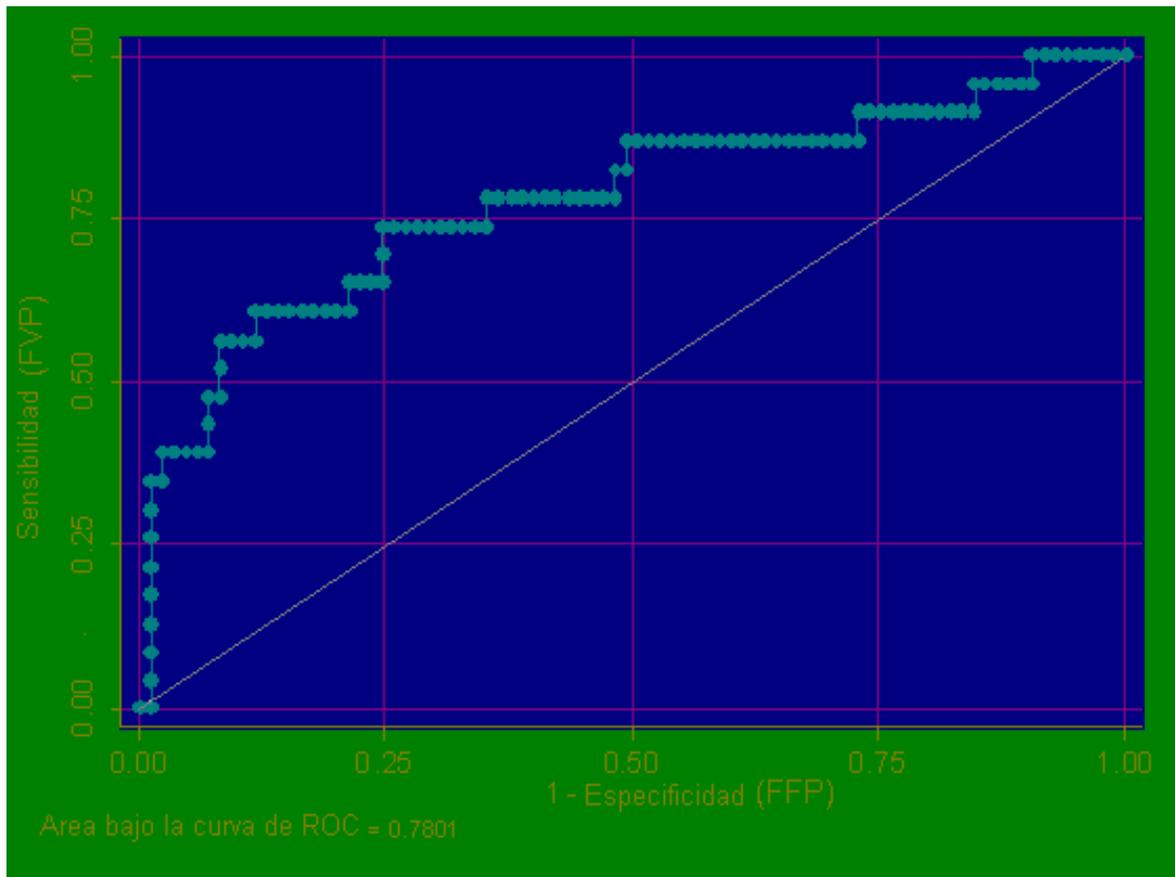
La curva ROC es necesariamente creciente, propiedad que refleja el compromiso existente entre sensibilidad y especificidad: si se modifica el valor de corte para obtener mayor sensibilidad, sólo puede hacerse a expensas de disminuir al mismo tiempo la especificidad. Si la prueba no permitiera discriminar entre grupos, la curva ROC sería la diagonal que une los vértices inferior izquierdo y superior derecho. La exactitud de la prueba aumenta a medida que la curva se desplaza desde la diagonal hacia el vértice superior izquierdo.

La representación obtenida tiene forma aproximada de escalera. Esto, ya que para cada variación mínima del valor de corte que produzca cambios en sensibilidad o especificidad, al menos un caso pasa a ser considerado bien como verdadero positivo, lo que se corresponde con un trazo vertical, o bien como falso positivo, lo que da lugar a un trazo horizontal.

Al realizar el análisis de la curva de ROC, dio como resultado que el área bajo la curva fue de 0,78 (este valor es un índice de la exactitud global de la prueba) y un intervalo de confianza del 95% (0,66 – 0,90) (Gráfico 1).

La exactitud máxima de la prueba correspondería a un valor del área bajo la curva de 1 y la mínima a un valor de 0.5 (si fuera menor de 0.5 debería invertirse el criterio de positividad de la prueba).

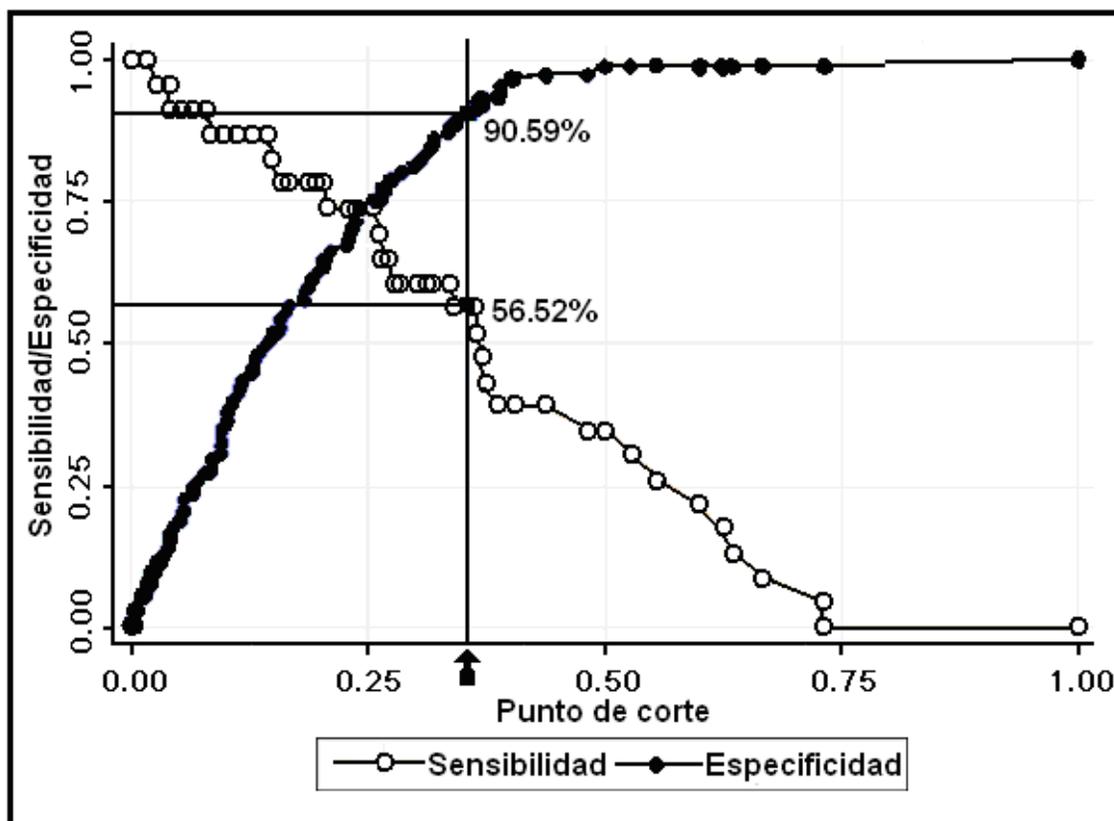
**Gráfico 4.** Curva de ROC en base a los parámetros predictores independientes de preeclampsia entre 11-14 semanas.



En base a la curva de ROC, se determinó la mejor capacidad de predicción en la convergencia de una sensibilidad de 56,5% y una especificidad (1- fracción de falsos positivos) de 90,6%. Con estos niveles de sensibilidad y especificidad, se puede clasificar

correctamente al 83,3% de la población sometida a la prueba diagnóstica (ver en anexo informe detallado de sensibilidad y especificidad).

**Gráfico 5.** Determinación de la sensibilidad y especificidad en base a los parámetros predictores de preeclampsia entre 11-14 semanas de gestación.



La flecha indica el punto de corte escogido para lograr una sensibilidad de 56,5% y una especificidad de 90,6%.

## 7. DISCUSIÓN

A través de esta investigación se han recopilado antecedentes acerca del poder predictivo que puede o pudiesen tener algunas variables clínicas, biomarcadores de estrés oxidativo y algunos factores relacionados con la angiogénesis, sobre la presentación de la preeclampsia.

Dentro de las variables clínicas medidas se tiene el consumo de cigarrillos, del cual la bibliografía describe un presunto rol protector (Lain *et al*, 2003), gracias a sus efectos pro-angiogénicos (Heeschen *et al*, 2001). El papel protector del tabaco es epidemiológico, y bioquímicamente estaría avalado por estudios que lo relacionan con una disminución del sFlt1. Sin embargo, en este estudio no se encontró esa diferencia, probablemente debido a un escaso número de cigarrillos que consumieron durante el embarazo. **En el futuro podrían realizarse estudios que incluyesen la estratificación de los grupos que consumen cigarrillos según la cantidad de éstos que consuman para aclarar mejor este punto.**

Tampoco se encontró diferencias entre la edad de la madre ni su paridad. Existen evidencias epidemiológicas e inmunológicas que muestran que la preeclampsia estaría aumentada en edades extremas y en primigestas (Levine *et al*, 2006). Sin embargo, este estudio tampoco demostró diferencias entre ambos grupos en esta población chilena. Este hallazgo pudiese estar relacionado con una muestra pequeña de pacientes y que en general en Chile y el resto del mundo, las mujeres tienden a postergar la maternidad a edades mayores y tener no más de dos hijos. Por lo tanto, los extremos de edad y paridad se disminuyen.

La diferencia del Índice de Masa Corporal (IMC) entre ambos grupos resultó ser significativa, lo que corrobora que el sobrepeso y/o obesidad (medida por el IMC) es un factor importante que influye directamente en la presentación de la preeclampsia, o indirectamente por la influencia que tiene sobre la aparición de otras enfermedades que favorezcan la aparición de la preeclampsia, como por ejemplo enfermedades cardíacas o diabetes mellitus (Levine *et al*, 2006).

Dentro de los factores relacionados con el estrés oxidativo, no se encontraron diferencias entre ambos grupos. Este resultado se puede explicar, porque alrededor de las semanas 10 a 12 de gestación es el momento crucial en el que se establece la circulación

placentaria completa (Hustin y Schaaps, 1987; Kliman, 2000) y por lo tanto, la presión parcial de oxígeno en la zona de invasión trofoblástica pasa de unos 20 mm Hg a unos 50 mm Hg (Rodesch *et al*, 1992; Jauniaux *et al*, 2000), siendo este cambio un punto crítico para comenzar a generar el estrés oxidativo y por consiguiente aumentar los biomarcadores de estrés oxidativo como el MDA y a su vez comienza a disminuir la capacidad antioxidante del plasma. Sin embargo, aunque hipotéticamente hubiese sido esperable observar un aumento precoz del estrés oxidativo en las mujeres que desarrollarán preeclampsia al compararlas con sus controles, este no se observó y su explicación puede deberse a que el fenómeno descrito anteriormente sucede fisiológicamente en ambos grupos y por lo tanto, entre las 11 y 14 semanas (semanas en las que se tomaron las muestras en este estudio) aún no se observa la diferencia que se manifiesta en las semanas posteriores, según lo descrito en otras investigaciones. (Hubel *et al*, 1989; Kumar y Das, 2000; McKinney *et al*, 2000; Barden *et al*, 2001).

En este estudio se encontró precozmente en la gestación un aumento significativo de sFlt1 y disminución de PlGF, estado considerado como antiangiogénico, lo cual también se ha demostrado en otros estudios (Maynard *et al*, 2003; Levine *et al*, 2004; Levine *et al*, 2006). Levine en el 2004 describió que en los casos de preeclampsia los niveles de sFlt1 comienzan a aumentar a partir de la semana 21-24, sin embargo, este estudio encontró dicha diferencia precozmente en la gestación entre las 11 y 14 semanas. Conjuntamente con el hallazgo anterior y en concordancia con otros autores, la concentración plasmática del PlGF en las mujeres que desarrollaron preeclampsia también se encontró disminuida (Maynard *et al*, 2003; Levine *et al*, 2004; Levine *et al*, 2006), aunque al igual que en el caso del sFlt1 de forma más temprana que en otros estudios (entre las 11 y 14 semanas de gestación). El hecho que en este estudio se encuentre la diferencia de los niveles plasmáticos de los factores en cuestión de manera más temprana (entre las 11 y 14 semanas de gestación) en comparación con otras publicaciones, se podría deber a una mayor presencia de preeclampsias severas en nuestra población de estudio, pues esta condición se ha asociado con una temprana y mayor diferencia de estos factores al compararlos con los niveles en las preeclampsias moderadas o leves (Levine *et al*, 2004).

Por otro lado, como se expuso anteriormente, la sEng aumenta en las mujeres con preeclampsia alrededor de las semanas 25-28 en los casos de inicio tardío y alrededor de las

semanas 17-20 en los casos de inicio temprano (Levine *et al*, 2006), o sea más tarde que el momento de la toma de las muestras del presente estudio (11-14 semanas), por lo tanto y concomitantemente con lo publicado en la literatura internacional (Levine *et al*, 2006), no se encontró aumentado su nivel al analizar los datos de este estudio. Además, se describe la sEng se combina con el sFlt1 a través de mecanismos separados para producir preeclampsia severa, lo que hace pensar que no debería encontrarse presente en todos los casos de preeclampsia. Una opción podría ser correlacionarlo solo con los casos más severos de la enfermedad, ya que al hacerlo con todos los casos su media disminuye, enmascarando su real participación por los casos menos severos.

Este estudio demostró que la combinación de un marcador clínico (IMC) y dos marcadores bioquímicos (sFlt1 y PIGF) son capaces de predecir en el primer trimestre de la gestación a más de la mitad de las mujeres que desarrollarán preeclampsia, con solo un 10% de falsos positivos. Esta información está de acuerdo con publicaciones recientes que señalan una alta capacidad predictora de la combinación de marcadores bioquímicos, clínicos y Doppler de arteria uterina en la predicción precoz de preeclampsia (Raijmakers *et al*, 2004; Parra *et al*, 2005; Levine *et al*, 2006).

Mediciones en conjunto como niveles elevados de sEng y el aumento de la relación sFlt1 / PIGF, predicen aún mejor la aparición de la preeclampsia (Levine *et al*, 2006).

La mejor prueba de diagnóstico en la actualidad es el Doppler de arteria uterina, que es capaz de predecir al 40% de las preeclampsias. Sin embargo, la capacidad de predicción se eleva al 80%, cuando se quiere detectar las condiciones severas o de inicio precoz (Parra *et al*, 2005)

## **8. CONCLUSIÓN**

Este estudio demuestra que factores relacionados con la angiogénesis y la homeostasis vascular participarían en la génesis de la preeclampsia y que el estrés oxidativo sólo sería una consecuencia patológica tardía de los fenómenos de hipoxia-reoxigenación que ocurren en forma exagerada cuando existe una pobre placentación durante la primera mitad del embarazo.

Por otro lado, un modelo de combinación de marcadores bioquímicos y clínicos, como los demostrados en este estudio (sFlt-1, PIGF e IMC), y probablemente adicionando la evaluación de la hemodinamia del territorio útero-placentaria, a través del Doppler de arteria uterina, podrían ser los mejores predictores precoces de esta importante enfermedad del embarazo humano.

## ANEXO

### Informe detallado de sensibilidad y especificidad (fragmento)

Punto de Corte	Sensibilidad	Especificidad	Correctamente Clasificados	LR+	LR-
( >= .2860585 )	60.87%	80.00%	75.93%	3.0435	0.4891
( >= .2984664 )	60.87%	81.18%	76.85%	3.2337	0.4820
( >= .3068978 )	60.87%	82.35%	77.78%	3.4493	0.4752
( >= .3110054 )	60.87%	83.53%	78.70%	3.6957	0.4685
( >= .3161364 )	60.87%	84.71%	79.63%	3.9799	0.4620
( >= .3204712 )	60.87%	85.88%	80.56%	4.3116	0.4556
( >= .3348924 )	60.87%	87.06%	81.48%	4.7036	0.4495
( >= .3385678 )	60.87%	88.24%	82.41%	5.1739	0.4435
( >= .3404278 )	56.52%	88.24%	81.48%	4.8043	0.4928
( >= .3439647 )	56.52%	89.41%	82.41%	5.3382	0.4863
<b>( &gt;= .3595759 )</b>	<b>56.52%</b>	<b>90.59%</b>	<b>83.33%</b>	<b>6.0054</b>	<b>0.4800</b>
( >= .3633659 )	56.52%	91.76%	84.26%	6.8634	0.4738
( >= .3651129 )	52.17%	91.76%	83.33%	6.3354	0.5212
( >= .3690054 )	47.83%	91.76%	82.41%	5.8075	0.5686
( >= .3693575 )	47.83%	92.94%	83.33%	6.7754	0.5614
( >= .3715821 )	43.48%	92.94%	82.41%	6.1594	0.6081
( >= .3862282 )	39.13%	92.94%	81.48%	5.5435	0.6549
( >= .3873971 )	39.13%	94.12%	82.41%	6.6522	0.6467
( >= .3897045 )	39.13%	95.29%	83.33%	8.3152	0.6388
( >= .4010555 )	39.13%	96.47%	84.26%	11.0870	0.6310
( >= .4383382 )	39.13%	97.65%	85.19%	16.6304	0.6234

## 9. BIBLIOGRAFÍA

**Abramovici, D.; Friedman, S.; Mercer, B.; Audibert, F.; Kao, L.; Sibai, B.** 1999. Neonatal outcome in severe preeclampsia at 24 to 36 weeks' gestation: does the HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) syndrome matter?. *Am J Obstet Gynecol* 180:221–225.

**Barden, A.; Ritchie, J.; Walters, B.; Michael, C.; Rivera, J.; Mori, T.; Croft, K.; Beilin, L.** 2001. Study of plasma factors associated with neutrophil activation and lipid peroxidation in preeclampsia. *Hypertension* 38: 803– 808.

**Benzie I., Strain J.** 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.

**Brosens, I.** 1988. The utero-placental vessels at term—The distribution and extent of physiological changes. *Troph Res* 3:61–67.

**Brosens, J.; Pijnenborg, R.; Brosens, I.** 2002. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 187:1416–1423.

**Brown, M.; Lindheimer, M.; De Swiet, M.; Van Assche, A.; Moutquin, J.** 2001. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy* 20: IX-XIV.

**Burton, G.; Watson, A.; Hempstock, J.; Skepper, J.; Jauniaux, E.** 2002. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2954–2959.

**Burton, G.; Hempstock, J.; Jauniaux, E.** 2003. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed Online* 6:84–96.

**Burton, G.; Hung, T.** 2003. Hypoxia-reoxygenation; a potential source of placental oxidative stress in normal pregnancy and preeclampsia. *Fetal Maternal Med Rev* 14:97–117.

**Burton, G.; Jauniaux, E.** 2004. Placental Oxidative Stress: From Miscarriage to Preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 11(6):342-352.

**Carmeliet, P.; Moons, L.; Luttun, A.; Vincenti, V.; Compernelle, V.; De Mol, M.; Wu, Y.; Bono, F.; Devy, L.; Beck, H.; Scholz, D.; Acker, T.; Dipalma, T.; Dewerchin, M.; Noel, A.; Stalmans, I.; Barra, A.; Blacher, S.; Vandendriessche, T.; Ponten, A.; Eriksson, U.; Plate, K.; Foidart, J.; Schaper, W.; Charnock-Jones, D.; Hicklin, D.; Herbert, J.; Collen, D.; Persico, M.** 2001. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7:575–583.

- Endemann, D.; Schiffrin, E.** 2004. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15: 1983–1992.
- Esser, S.; Wolburg, K.; Wolburg, H.; Breier, G.; Kurzchalia, T.; Risau, W.** 1998. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations *in vitro*. *J Cell Biol* 140:947–959.
- Friedman, S.; Schiff, E.; Kao, L.; Sibai, B.** 1995. Neonatal outcome after preterm delivery for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 172:1785–1788.
- Gougos, A.; Letarte, M.** 1990. Primary structure of endoglin, an RGDcontaining glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265: 8361–8364.
- Heeschen, C.; Jang, J.; Weis, M.; Pathak, A.; Kaji, S.; Hu, R.; Tsao, P.; Johnson, F.; Cooke, J.** 2001. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 7:833–839.
- Hubel, C.; Roberts, J.; Taylor, R.; Musci, T.; Rogers, G.; Mclaughlin, M.** 1989. Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 161:1025–1034.
- Hubel, C.** 1999. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 222–235.
- Hustin, J.; Schaaps, J.** 1987. Echographic and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 157:162–168.
- Jauniaux, E.; Watson, A.; Hempstock, J.; Bao, Y.; Skepper, J.; Burton, G.** 2000. Onset of maternal arterial bloodflow and placental oxidative stress; a possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 157:2111–2122.
- Kharb, S.** 2000. Vitamin E and C in preeclampsia. *Eur J Obstet Reprod Biol* 93: 37– 39.
- Kliman, H.** 2000. Uteroplacental blood flow. The story of decidulaisation, menstruation and trophoblast invasion. *Am J Pathol* 157:1759–1768.
- Kumar, C.; Das, U.** 2000. Lipid peroxides, anti-oxidants and nitric oxide in patients with pre-eclampsia and essential hypertension. *Med Sci Monit* 6: 901– 907.
- Lain, K.; Wilson, J.; Crombleholme, W.; Ness, R.; Roberts, J.** 2003. Smoking during pregnancy is associated with alterations in markers of endothelial function. *Am J Obstet Gynecol* 189:1196–1201.

**Levine, R.; Maynard, S.; Qian, C.; Lim, K.; England, L.; Yu, K.; Schisterman, E.; Thadhani, R.; Sachs, B.; Epstein, F.; Sibai, B.; Sukhatme, V.; Karumanchi, S.** 2004. Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. *N. Engl. J. Med* 350:672-683.

**Levine, R.; Lam, C.; Qian, C.; Yu, K.; Maynard, S.; Sachs, B.; Sibai, B.; Epstein, F.; Romero, R.; Thadhani, R.; Karumanchi, S.** 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N. Engl. J. Med* 355:992–1005.

**Liochev, S.; Fridovich, I.** 1997. How does superoxide dismutase protect against tumor necrosis factor: a hypothesis informed by effect of superoxide on “free” iron. *Free Radic Biol Med* 23: 668– 671.

**Luft, F.** 2006. Soluble endoglin (sEng) joins the soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt) receptor as a preeclampsia molecule. *Nephrol. Dial. Transplant* 21:3052-3054.

**Luscher, T.; Barton, M.** 1997. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 20 (11 Suppl 2): II3– II10.

**Luttun, A.; Tjwa, M.; Moons, L.; Wu, Y.; Angelillo-Scherrer, A.; Liao, F.; Nagy, J.; Hooper, A.; Priller, J.; De Klerck, B.; Compennolle, V.; Daci, E.; Bohlen, P.; Dewerchin, M.; Herbert, J.; Fava, R.; Matthys, P.; Carmeliet, G.; Collen, D.; Dvorak, H.; Hicklin, D.; Carmeliet, P.** 2002. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 8:831–840.

**Luttun, A.; Carmeliet, P.** 2003. Soluble VEGF receptor Flt1: the elusive preeclampsia factor discovered? *J Clin Invest* 111: 600– 602.

**Madazli, R.; Benian, A.; Gumustas, K.; Uzun, H.; Ocak, V.; Aksu, F.** 1999. Lipid peroxidation and antioxidant in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 85: 205– 208.

**Madazli, R.; Benian, A.; Aydin, S.; Uzun, H. Y Tolun, N.** 2002. The plasma and placental levels of malondialdehyde, glutathione and superoxide dismutase in preeclampsia. *J Obstet Gynaecol* 22: 477– 480.

**Martin, C.; Mcgaughey, H.; Kaiser, I.; Donner, M.; Ramsey, E.** 1964. Intermittent functioning of the uteroplacental arteries. *Am J Obstet Gynecol* 90:819–23.

**Masuda, Y.; Shimizu, A.; Mori, T.; Ishiwata, T.; Kitamura, H.; Ohashi, R.; Ishizaki, M.; Asano, G.; Sugisaki, Y.; Yamanaka, N.** 2001. Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol* 159:599–608.

**Maynard, S.; Min, J.; Merchan, J.; Lim, K.; Li, J.; Mondal, S.; Libermann, T.; Morgan, J.; Sellke, F.; Stillman, I.; Epstein, F.; Sukhatme, V.; Karumanchi, S.** 2003.

Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 111:649– 658.

**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* 57:1R-7R.

**Mckinney, E.; Shouri, R.; Hunt, R.; Ahokas, R.; Sibai, B.** (2000). Plasma, urinary, and salivary 8-epi-prostaglandin f2alpha levels in normotensive and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 183: 874– 877.

**Meekins, J.; Pijnenborg, R.; Hanssens, M.; Mcfadyen. I.; Van Asshe, A.** 1994. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 101:669–674.

**Mohindra, A.; Kabi, B.; Kaul, N.; Trivedi, S.** 2002. Vitamin E and carotene status in pre-eclamptic pregnant women from India. *Panminerva Med* 44: 261– 264.

**Myatt, L.; Cui, X.** 2004. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 122: 369–382.

**Noris, M.; Todeschini, M.; Cassis, P.; Pasta, F.; Cappellini, A.; Bonazzola, S.; Macconi, D.; Maucci, R.; Porrati, F.; Benigni, A.; Picciolo, C.; Remuzzi, G.** 2004. L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. *Hypertension* 43:614–622.

**Ostendorf, T.; Kunter, U.; Eitner, F.; Loos, A.; Regele, H.; Kerjaschki, D.; Henninger, D.; Janjic, N.; Floege, J.** 1999. VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest* 104:913–923.

**Panburana, P.; Phuapradit, W.; Puchaiwatananon, O.** 2000. Antioxidants nutrients and lipid peroxide levels in Thai preeclamptic pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res* 26: 377–381.

**Parra, M.; Rodrigo, R.; Barja, P.; Bosco, C.; Fernández, V.; Muñoz, H.; Soto-Chacón, E.** 2005. Screening test for preeclampsia through assessment of uteroplacental blood flow and biochemical markers of oxidative stress and endothelial dysfunction. *Am. J. Obstet. Gynecol* 193: 1486–1491.

**Pijnenborg, R.; Anthony, J.; Davey, D.; Rees, A.; Tiltman, A.; Vercruyse, L.; Van Assche, A.** 1991. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 98:648–655.

**Raijmakers, M.; Dechend, R.; Poston, L.** 2004. Oxidative Stress and Preeclampsia: Rationale for Antioxidant Clinical Trials. *Hypertension* 44:374-380.

- Redman, C.; Sargent, I.** 2000. Placental debris, oxidative stress and preeclampsia. *Placenta* 21:597–602.
- Redman, C.; Sargent, I.** 2005. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 308:1592–1594.
- Roelofsen, A.; Van Pampus, M.; Aarnoudse, J.** 2003. The HELLP-syndrome;maternal-fetal outcome and follow up of infants. *J Perinat Med* 31:201–208.
- Rodesch, F.; Simon, P.; Donner, C.; Jauniaux, E.** 1992. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 80:283–285.
- Rodrigo, R.; Parra, M.; Bosco, C.; Fernández, V.; Barja, P.; Guajardo, J.; Messina, R.** 2005. Pathophysiological basis for the prophylaxis of preeclampsia through early supplementation with antioxidant vitamins. *Pharmacology & Therapeutics* 107:177 – 197
- Sattar, N.; Greer, I.** 2002. Pregnancy complications and maternal cardiovascular risk: opportunities for intervention and screening? *BMJ* 325:157–160.
- Schaaps, J.; Hustin, J.** 1988. In vivo aspect of the maternal-trophoblastic border during the first trimester of gestation. *Troph Res* 3:39–48.
- Serdar, Z.; Gur, E.; Develioglu, O.; Colakogullari, M.; Dirican, M.** 2002. Placental and decidual lipid peroxidation and antioxidant defenses in preeclampsia. *Lipid peroxidation in preeclampsia. Pathophysiology* 9: 21.
- Sibai, B.; Taslimi, M.; Abdella, T.; Brooks, T.; Spinnato, J.; Anderson, G.** 1985. Maternal and perinatal outcome of conservative management of severe preeclampsia in midtrimester. *Am J Obstet Gynecol* 152:32–37
- Sibai, B.; Dekker, G.; Kupferminc, M.** 2005. Preeclampsia. *Lancet* 365:785-799.
- Sies, H.** 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69: 965– 968.
- Staff, A.; Halvorsen, B.; Ranheim, T.; Henriksen, T.** 1999. Elevated level of free 8-iso-prostaglandin F2alpha in the deciduas basalis of women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 181(5 Pt 1): 1211 –1215.
- Torry, D.; Mukherjea, D.; Arroyo, J.; Torry, R.** 2003. Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig* 10:178-188.
- Venkatesha, S.; Toporsian, M.; Lam, C.; Hanai, J.; Mammoto, T.; Kim, Y.; Bdolah, Y.; Lim, K.; Yuan, H.; Libermann, T.; Stillman, I.; Roberts, D.; D’amore, P.; Epstein, F.; Sellke, F.; Romero, R.; Sukhatme, V.; Letarte, M.; Karumanchi, S.** 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 12:642-649.

**Villar, K.; Say, L.; Gülmezoglu, A.; Merialdi, M.; Lindheimer, M.; Betran, A.; Piaggio, G.** 2003. Eclampsia and preeclampsia: a health problem for 2000 years. In: Critchley H, MacLean AB, Poston L, Walker JJ, eds. *Pre-eclampsia*. London: RCOG Press 189–207.

**Walker, J.** 2000. Pre-eclampsia. *Lancet* 356:1260–1265

**Walsh, S.; Vaughan, J.; Wang, Y.; Roberts, L.** 2000. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *FASEB J* 14:1289–1296.

**Wiznitzer, A.; Furman, B.; Mazor, M.; Reece, E.** 1999. The role of prostanoids in the development of diabetic embryopathy. *Semen Reprod Endocrinol* 17:175–181.

**Zhang, C.; Williams, M.; King, I.; Dashow, E.; Sorensen, T.; Frederick, I.; Thompson M.; Luthy D.** 2002. Vitamin C and the risk of preeclampsia— results from dietary questionnaire and plasma assay. *Epidemiology* 13: 409– 416.

**Zhou, Y.; Damsky, C.; Fisher, S.** 1997. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype: one cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 99:2152-2164.