

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

MARCADORES BIOQUIMICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO,
DISFUNCION ENDOTELIAL Y ANGIOGENESIS COMO
PREDICTORES DE PREECLAMPSIA

JUAN RAMIREZ ESTRADA

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

PROFESOR GUIA: Prof. Dr. RAMÓN RODRIGO SALINAS
Financiamiento: FONDECYT N°1050482

SANTIAGO, CHILE
2007

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

**MARCADORES BIOQUIMICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO,
DISFUNCION ENDOTELIAL Y ANGIOGENESIS COMO
PREDICTORES DE PREECLAMPSIA**

JUAN CARLOS RAMIREZ ESTRADA

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: RAMÓN RODRIGO SALINAS
PROFESOR CONSEJERO	: MONICA DE LOS REYES
PROFESOR CONSEJERO	: MARCO GALLEGUILLOS

SANTIAGO, CHILE
2007

INDICE

	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	3
1 INTRODUCCIÓN	5
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Generalidades	7
2.2 Características de la preeclampsia	7
2.3 Mecanismos etiopatogénicos en la preeclampsia	8
2.3.1 Reguladores moleculares	9
2.3.2 Pseudovasculogénesis	10
2.3.3 Alteración de la perfusión placentaria	12
2.3.4 Disfunción endotelial.....	15
2.4 Papel del estrés oxidativo en la fisiopatología de la preeclampsia	19
2.5 Efecto del estrés oxidativo sobre biomoléculas	25
2.5.1 Lipoperoxidación	26
2.5.2 Daño oxidativo de las proteínas	27
2.6 Predictores de preeclampsia	27
2.6.1 Capacidad antioxidante del plasma	27
2.6.2 Acido úrico.....	28
2.6.3 Moléculas de adhesión	28
2.6.4 Malondialdehido.....	29
2.6.5 VEGF, PlGF y sFlt-1.....	29
2.7 Factores de riesgo	31
2.7.1 Historia clínica y embarazo Actual.....	31
2.7.2 Presión arterial	32
2.8 Diagnóstico de preeclapmsia.....	32
2.8.1 Doppler de las arterias uterinas y predicción de PE.....	33

2.8.2 Proteinuria	34
2.9 Profilaxis en preeclampsia.....	34
2.9.1 Manejo de la hipertensión en preeclampsia	36
2.9.2 Monitoreo de la embarazada.....	36
2.9.3 Terapia antihipertensiva.....	36
2.9.4 Terapia anticonvulsivante.....	36
2.9.5 Manejo del feto	37
2.9.6 Cuidado post-parto	37
3 HIPÓTESIS	38
4 OBJETIVOS	
4.1 Objetivo general	38
4.2 Objetivos específicos.....	38
5 MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1 Diseño	39
5.2 Tamaño muestral	39
6 TÉCNICAS ANALÍTICAS Y BIOQUÍMICAS APLICADAS	
6.1 Capacidad antioxidante del plasma: FRAP y ácido úrico	40
6.1.1 FRAP	41
6.1.2 Ácido úrico.....	42
6.2 Estrés oxidativo: MDA.....	43
6.3.1 Relación PAI-1/PAI-2	44
6.3.2 Moléculas de adhesión: ICAM-1 y VCAM-1	44
6.4 Angiogénesis.....	45
6.4.1 Factor antiangiogénico: fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1).....	45
6.4.2 Factor de crecimiento placentario (PIGF).....	45
7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45

8 RESULTADOS	46
8.1 Variables bioquímicas de estrés oxidativo	46
8.2 Variables bioquímicas de disfunción endotelial	48
8.3 Variables bioquímicas de angiogénesis	50
9 DISCUSIÓN	55
10 CONCLUSION	59
11 BIBLIOGRAFÍA.....	60

RESUMEN

La preeclampsia (PE) es una de las complicaciones más frecuentes del embarazo, siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad materna y perinatal.

A pesar de la importancia de este síndrome, el conocimiento que se tiene sobre su etiopatogenia es limitado. Sin embargo, existen diversas teorías que incluyen la participación de factores genéticos, nutricionales, vasculares y autoinmunes. Existe evidencia que indica que el estrés oxidativo de la placenta está involucrado en la fisiopatología de la PE y se le ha propuesto como promotor de disfunción de células endoteliales y de un desarrollo insuficiente de la placenta, por una disminución de la angiogénesis normal, ambos característicos en los casos de PE.

El presente estudio incluyó 220 muestras sanguíneas obtenidas de 1051 pacientes con control perinatal completo, que acudieron a la Unidad de Medicina Fetal del Hospital Clínico de la Universidad de Chile con 11-14 semanas de gestación entre los meses de Agosto 2004 y Marzo 2006. Las pacientes resultantes después de aplicar los criterios de exclusión detallados más adelante, se separaron en 3 grupos: preeclámpticas (32), pacientes con restricciones de crecimiento fetal (45) y el grupo control (143). Las determinaciones incluyeron: concentración de marcadores de estrés oxidativo (ácido úrico y MDA), marcadores de disfunción endotelial (PAI-1, PAI-2, ICAM, VCAM) y marcadores de actividad angiogénica (sFlt1, PlGF) en plasma de mujeres embarazadas durante el primer tercio de la gestación. Para esto se utilizaron las técnicas de HPLC, espectrofotometría, ELISA y FRAP. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$) y prueba de correlación de Pearson ($p < 0,05$). Se incluyó un control obtenido de forma aleatoria por cada paciente con patología.

Los resultados mostraron que el promedio para sFlt1 en el grupo de pacientes con PE ($1846,05 \pm 222,30$ nM/ml) fue estadísticamente diferente del grupo control ($1176,44 \pm 131,61$ nM/ml) ($p = 0,016$). Para las demás variables no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Al aumentar los niveles séricos de sFlt1, los niveles séricos

de FRAP disminuyen ($r = -0,56$; $p = 0,002$), lo que indica que existe una relación inversa entre estas 2 variables. Las demás variables no presentaron correlación estadísticamente válida en esta edad gestacional. De esto se deduce que existe asociación entre la concentración plasmática de esta variable y la presentación de la enfermedad.

Se concluye que de las variables medidas precozmente, la única que se encuentra asociada a la presentación de la enfermedad en este estado de gestación precoz es sFlt1. Con esto se confirma la participación de esta molécula en la patogénesis de la PE, lo cual deja abierto el tema a nuevos estudios que se realicen en etapas tempranas de gestación y que comprendan tratamientos posibles de realizar en una etapa temprana con miras a la prevención de la enfermedad.

SUMMARY

Preeclampsia (PE) is one of the most frequent complications of the pregnancy, being one of the main causes of maternal and perinatal morbi-mortality. In spite of the importance of this syndrome, the knowledge that we have of its pathogenesis is limited. Nevertheless, there are many theories about this disease, which includes the participation of genetic, diet, vascular and autoimmune factors. There is evidence that supports that oxidative stress in the placenta is involved in the genesis of the PE and has been proposed like promoter of endothelial dysfunction and an insufficient placental development, because it causes a decrease in the angiogenesis, both characteristic in PE.

This study included 220 blood samples, obtained from 1051 patients with complete perinatal outcome, who went to the Fetal Medicine Unit of the Clinical Hospital of the University of Chile between 11-14 weeks of pregnancy since August, 2004 until March, 2006. The patients after applying the exclusion criteria were separated into 3 groups: preeclamptics (32), fetal growth restriction (45) and control (143). The blood measurements performed in this study were: concentration of oxidative stress markers (acid úrico and MDA), endothelial dysfunction markers (PAI-1, PAI-2, ICAM, VCAM) and of angiogenic activity markers (sFlt1, PlGF) in plasma of pregnant women during the first third of pregnancy. The techniques used were: HPLC, spectrophotometry, ELISA and FRAP. For the statistical analysis we performed a Student t test ($p \leq 0.05$) and Pearson correlation ($p \leq 0.05$). One control by each patient with pathology was taken randomly.

It was observed that the sFlt1 average of the preeclamptic women ($1846,05 \pm 222,30$ nM/ml) was statistically different from the control ($1176,44 \pm 131,61$ nM/ml) ($p = 0,016$). Statistically significant differences for the other variables between the groups were not observed. The sFlt1 serum concentrations were inversely correlated with the FRAP serum concentrations ($r = -0,56$; $p = 0,002$). The other variables do not present statistically valid correlation, measured to this gestational age. Therefore we deduced that there is an association between the serum concentration of this variable and the presentation of the disease.

With this study we could deduce that of the variables measured between the 12 and 14 weeks of gestation, the only one that is associate to the presentation of PE is sFlt1 serum concentrations. This findings leaves the subject open to new studies that are made in this stage of the gestation, which include earliest treatments with projection to the disease prevention.

1 INTRODUCCIÓN

La preeclampsia (PE) es una de las complicaciones más frecuentes del embarazo. La incidencia de PE, tanto en Chile como en el resto del mundo, es variable, alcanzando entre el 3 y el 5 % de las embarazadas en nuestro país (Villar *et al.*, 2003). Es una de las afecciones más comunes de las embarazadas y una de las principales causas mundiales de mortalidad materna y perinatal (Mutter y Karumanchi, 2007), en especial aquellas denominadas severas, que alcanzan aproximadamente el 50% del total de casos (Lurba *et al.*, 2004). El cuadro clínico se caracteriza por hipertensión arterial y proteinuria, en muchas ocasiones acompañándose de edema, manifestaciones que pueden desaparecer luego del parto. El síndrome también puede evolucionar al 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 se asocia también a una mayor frecuencia de restricción del crecimiento fetal (RCF) y a partos prematuros (Redman y Sargent, 2005).

A pesar de la importancia de este síndrome, el conocimiento que se tiene sobre su etiopatogenia es limitado. Sin embargo, existen diversas teorías que incluyen la participación de factores genéticos, nutricionales, vasculares y autoinmunes. Entre estos factores son de importancia la disfunción endotelial y el estrés oxidativo. Existe evidencia que indica que el estrés oxidativo de la placenta está involucrado en la fisiopatología de la PE y se le ha propuesto como promotor de disfunción de células endoteliales y de un desarrollo insuficiente de la placenta, debido a una disminución de la angiogénesis, ambos característicos en los casos de PE (Gupta *et al.*, 2005)

Al no contar con el conocimiento suficiente acerca de la etiopatogenia de este síndrome, no se ha podido implementar un tratamiento efectivo para enfrentarlo. Sin embargo, frente a la presentación de PE, se realizan tratamientos sintomáticos para estabilizar a la madre. Actualmente, a nivel mundial, sólo se conoce como tratamiento efectivo la interrupción del embarazo, ya sea de forma electiva o de urgencia. Tampoco se ha demostrado un método predictor precoz de la enfermedad. El método de diagnóstico de

PE más aceptado en la práctica clínica es la medición de la resistencia al flujo sanguíneo de las arterias uterinas a través de la ecografía Doppler. Sin embargo, este diagnóstico es posible realizarlo en un periodo tardío del proceso patológico de la PE (Parra *et al.*, 2004).

En el presente estudio se evaluó el estado de estrés oxidativo midiendo algunas variables fisiológicas relacionadas. Además, se midieron variables relacionadas con disfunción endotelial y angiogénesis en el plasma de mujeres embarazadas.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades

La preeclampsia (PE) es un trastorno sistémico potencialmente peligroso que se da en algunas mujeres embarazadas. Es la mayor causa de morbilidad y mortalidad materna y perinatal. Sin embargo, la patogenia no está claramente establecida (Kim *et al.*, 2004). Se caracteriza por hipertensión arterial, proteinuria y comúnmente cursa con edema. Además, se encuentra muy asociado a restricción del crecimiento fetal y parto prematuro inducido (Parra *et al.*, 2004). Esto último, debido a que el único tratamiento conocido en la actualidad frente a la aparición de alguna de las manifestaciones de este síndrome, es la interrupción del embarazo. También se ha informado que este síndrome puede causar abortos espontáneos (Wang *et al.*, 2004).

Es un síndrome complejo de etiología aún indeterminada, diagnosticado generalmente durante la segunda mitad del embarazo, después de la vigésima semana de gestación. Su signología desaparece después del parto. (Davison *et al.*, 2004).

2.2 Características de la preeclampsia

Los signos de este síndrome son fundamentalmente hipertensión (sobre 140/90 mm de Hg), proteinuria (sobre 300 mg/24hrs) con o sin presencia de edema (Davison *et al.*, 2004).

También existen hallazgos comunes y constantes en los pacientes que desarrollan PE, tales como invasión superficial del citotrofoblasto endovascular de las arterias espirales, una exagerada respuesta inflamatoria e inapropiada activación de células endoteliales (Serrano *et al.*, 2002).

2.3 Mecanismos etiopatogénicos en 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 vellosos. Estas células, en su mayor parte permanecen en los compartimientos fetales, formando las vellosidades flotantes, estructuras irrigadas por la sangre materna en el espacio intervillositario (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 en su acción de invadir y transformarse (Fig. 1). 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 ya no están revestidas por sus propias células endoteliales, sino que por células trofoblásticas invasoras modificadas. Así, resulta fácil suponer que la disfunción de estas células trofoblásticas puede producir los problemas de características vasculares en la PE (Redman y Sargent, 2005).

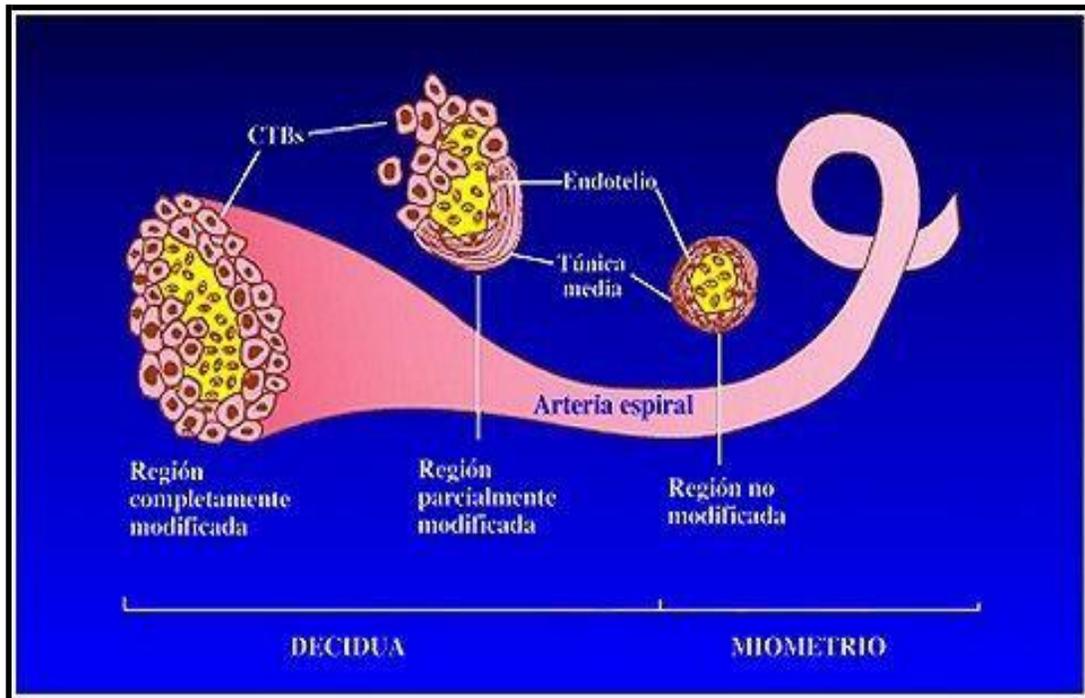


Figura 1. Modificación tisular del endotelio vascular (Redman y Sargent, 2005).

Resulta de interés el hecho de que las células epiteliales fetales, en particular de la placenta, sean las que invaden la pared uterina y se transforman, de epiteliales a endoteliales, lo que sin duda indica que existe una regulación específica para que esto ocurra, ya sea por el ambiente extracelular o por señales celulares de origen genético (Qiao *et al.*, 2005).

2.3.1 Reguladores moleculares

En los últimos años se han estudiado varios reguladores moleculares de este proceso, como son: factores de transcripción considerados como reguladores generales, metaloproteinasas y moléculas de adhesión, las que se relacionan con el crecimiento tumoral y con el fenotipo invasor ya mencionado (Kim *et al.*, 2004, Maynard *et al.*, 2005; y Chen *et al.*, 2006). Las células que poseen el fenotipo vascular materno, tienen un genotipo diferente al de las células endoteliales maternas, dado que son hemialogénicas, es decir, que la mitad de su genotipo lo aporta el padre, a pesar de lo cual no las rechaza la madre. En estudios de invasión se observa que si se inhibe la metaloproteinasas-9 (MMP9) con un

anticuerpo monoclonal antiMMP9 se inhiben en alto grado la invasión y la transformación vascular. Se estableció la existencia de correlación entre la expresión MMP-9, la presentación de PE y la restricción del crecimiento fetal, y se piensa que podría jugar un papel importante en la génesis de la patología (Qiao *et al.*, 2005).

En la interfaz materno-fetal, se encontró que las células presentan supresión de la expresión de las E-caderinas, moléculas de adhesión epitelial que mantienen las células unidas entre sí. En cambio, presentan estimulación de moléculas de adhesión que sólo se expresan en las células vasculares. Así, estas moléculas se constituyen en un marcador del momento en que las células se transforman del fenotipo epitelial al vascular. También se ha descrito un aumento en la expresión de otro tipo de molécula de adhesión, integrina alfa-1, que fija las células a la pared vascular subyacente (Krauss *et al.*, 2002; Qiao *et al.*, 2005).

Al observar las moléculas de adhesión epitelial de la pared uterina en mujeres con PE grave, se pudo detectar que las células retienen su calidad epitelial y no adquieren el fenotipo vascular. Esto permitió concluir que existe una falla en la expresión de las moléculas de adhesión celular y sugiere una anomalía en la vía invasora (Qiao *et al.*, 2005).

2.3.2 Pseudovasculogénesis

Se denomina así al proceso por el cual las células trofoblásticas se transforman en células de tipo vascular. Actualmente existe mucho interés en saber cómo se regula este mecanismo (Germain, 2001).

A este respecto, Marks *et al.* (2006), en estudios *in vitro*, ha encontrado que existe un efecto de la tensión de oxígeno sobre la diferenciación de las células. La integrina alfa-1, que es una molécula de adhesión vascular no se expresa con una tensión de oxígeno de 2%, pero si en un ambiente con una tensión de oxígeno de un 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.

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 (Germain, 2001). Pero aún queda mucho por estudiar de este aspecto fisiológico de la PE.

Si bien la etiopatogenia de este síndrome no se conoce completamente se postula que el origen de la PE es multifactorial, resultando de la interacción de factores intrínsecos de la placenta con factores propios de la madre, incluyendo factores genéticos y constitutivos (Lala y Chakraborty, 2003). En la PE se ha observado una inadecuada adaptación hemodinámica, en la cual factores maternos, tales como la predisposición genética, una inadecuada adaptación inmunológica al embarazo y enfermedad vascular preexistente se encuentran asociadas a esta (Claussen *et al.*, 2000).

Existen diversas hipótesis que incluyen la participación de factores genéticos, nutricionales, vasculares y autoinmunes. Entre estas, la más aceptada es la toxémica, que indica que por una alteración en la migración del trofoblasto extraveloso 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 (Claussen *et al.*, 2000). En relación a esta alteración en la circulación, tanto en la sangre como en el citotrofoblasto y en el extracto placentario de mujeres con PE, se ha encontrado una disminución en los niveles óxido nítrico (NO), conocido por su propiedad vasodilatadora. La endotelina 1 (ET-1), un potente vasoconstrictor, se encuentra aumentado cuando la enfermedad es clínicamente evidente. Además, Aure *et al.* (2005) descubrieron que existe un estado de hipercoagulabilidad materna que se debe a la activación difusa de células endoteliales y que es caracterizado por una menor expresión de varias proteínas anticoagulantes como antitrombina III, proteínas C y S, así como también por una mayor expresión de proteínas procoagulantes, como el Factor Tisular, el factor de

Von Willebran, el activador de plaquetas, la fibronectina celular, la tromboglobulina beta y el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) (Aure *et al.*, 2005).

2.3.3 Alteración de la perfusión placentaria

El indicio patológico más tempranamente visto en este síndrome se encuentra en la placenta, la cual se caracteriza por una pobre migración trofoblástica, asociada a una mala remodelación de la arteria espiral y consecuentemente a una inadecuada perfusión placentaria. Esto puede resultar en injuria fetal, lo que se manifiesta como una restricción del crecimiento fetal y en una cascada de eventos poco caracterizados actualmente que conducen a la presentación del síndrome PE. Sin embargo, para que se presente la PE debe existir una susceptibilidad por parte de la madre a presentarla, sin la cual, las injurias se manifiestan sólo en el feto. Esta susceptibilidad materna está dada por cambios específicos de la gestación combinados con factores constitutivos de la madre, ya sean genéticos o medioambientales (Lala y Chakraborty, 2003).

Durante un embarazo normal, la remodelación arterial del útero se caracteriza por cambios estructurales, incluyendo la desintegración de la túnica media y lámina elástica interna de las arterias espirales, y reemplazo de su endotelio por células del trofoblasto extravelositario que expresan un fenotipo endotelial. Estos cambios estructurales ocurren a lo largo de las arterias que irrigan el endometrio y gran parte del miometrio. Dentro de estos cambios está la conversión de las capas musculares de las arterias de fuertes y elásticas a flácidas y distendibles, lo que implica una perfusión adecuada para las exigencias del feto (Pijnenborg *et al.*, 1996). Esta invasión progresiva de células trofoblásticas transforma a las arterias espirales útero-placentarias de alta resistencia en vasos de baja resistencia a la circulación (fig. 2). Existen estudios histológicos que muestran que el proceso de remodelación vascular incompleto en las arterias espirales del útero, tendría como resultado una elevada resistencia al flujo sanguíneo en la circulación uterina materna (Khong *et al.*, 1986), lo cual puede ser detectado de manera no invasiva por doppler ultrasónico (Campbell, 1986). En una inadecuada migración del trofoblasto, el proceso se restringe y como resultado se mantiene cierta vasoreactividad de las arterias

espirales, planteándose que un mecanismo de isquemia y reperfusión pueda causar apoptosis y necrosis (Hung *et al.*, 1999)

Durante la fase de reperfusión, las especies reactivas de oxígeno (ROS) son generados en las mitocondrias a través de la acción de enzimas como la xantina oxidasa, que se encuentra aumentada en la PE. Un desbalance entre la producción y depuración de radicales libres de oxígeno, conduce a pérdidas en la homeostasis del calcio (Ca^{2+}). El incremento del Ca^{2+} actúa sinérgicamente con la oxidación de las proteínas en el interior de la membrana de la mitocondria y promueve la apertura de los poros de permeabilidad transitoria (PPT). Con esto se produce una alteración de la homeostasis iónica y necrosis primaria, lo que conduce a pérdida de la integridad de las microvellosidades, contribuyendo a la destrucción y posterior eliminación de fragmentos del sinciotrofoblasto al torrente sanguíneo, lo que a su vez podría provocar o exacerbar una respuesta inflamatoria materna (Hung *et al.*, 1999). Redman y Sargent (2000) propusieron que el estrés oxidativo puede estimular la apoptosis en el sinciotrofoblasto e incrementar la destrucción de fragmentos de microvellosidades, promoviendo un incremento en la respuesta inflamatoria sistémica y un estado de disfunción endotelial en la madre.

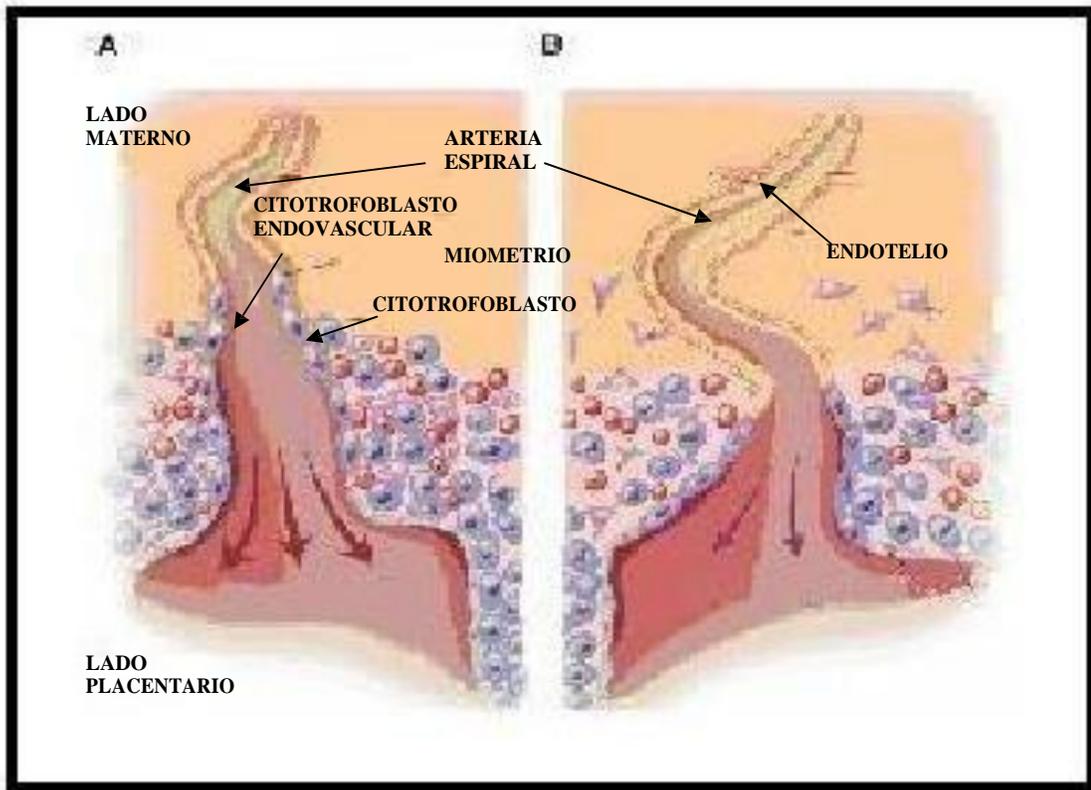


Figura 2. Modificado de Redman y Sargent, 2005. En la figura se muestra la disminución de la invasión trofoblástica de la arteria espiral uterina. Se aprecia una placentación normal (A) con la invasión de células del trofoblasto extravelositario debido a lo cual aumenta el diámetro de la arteria en espiral. 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.

Se ha sugerido que la reducción de la perfusión placentaria, por si sola, no es suficiente para que se produzca PE. La anormal placentación debe interactuar con los factores maternos para que se genere el síndrome. Alteraciones placentarias idénticas a las vistas en PE, han sido reportadas con restricción del crecimiento fetal intrauterino y partos prematuros, sin que se presente el síndrome PE, 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 PE. Además, no todas las mujeres que cursan con pobre perfusión placentaria desarrollan PE, por lo tanto, la respuesta materna debe ser el factor decisivo en el desarrollo de esta enfermedad sistémica (Walker, 2000)

A medida que avanza el embarazo, los procesos de isquemia y reperfusión, consecuencia de una inadecuada implantación o migración trofoblástica, pueden intensificarse por aumento del consumo de oxígeno por parte del feto y de la placenta, lo que lleva a mayor estrés oxidativo, mayor respuesta inflamatoria y mayor activación endotelial. Se ha visto que la hipoxia localizada dentro de la placenta de embarazadas puede ser responsable también de los cambios en la expresión de citoquinas, como el factor de necrosis tumoral alfa y la interleucina 1, los cuales también aumentan en la medida que evoluciona el embarazo, es decir, cuando el proceso de hipoxia a nivel de la placenta es mayor (Aure *et al.*, 2005).

2.3.4 Disfunción endotelial

Repetidamente se ha sugerido que la PE deriva de una respuesta inflamatoria sistémica que incluye un sustantivo componente de disfunción de células endoteliales (Poston, 2006). Este evento patológico ocurre después de la invasión anormal de trofoblasto que conduce a isquemia y subsecuentemente a la liberación de un factor aún no conocido que produce daño endotelial (Higgins *et al.*, 1998). La activación endotelial definida como la adquisición de nuevas propiedades antigénicas y funcionales de la célula endotelial por exposición a estímulos inflamatorios, regula la respuesta vascular fisiológica que puede ser inadecuada o sobre regulada en condiciones patológicas culminando con disfunción endotelial. Esta respuesta se inicia con la expresión de proteínas de superficie celular que median la adhesión de células inflamatorias. Se ha propuesto que la isquemia placentaria es un evento que se produce tempranamente y que conduce a la producción placentaria de un factor o una serie de factores solubles que causan una alteración de la activación endotelial materna, resultando en los hallazgos clínicos de hipertensión, proteinuria y edema (Maynard *et al.*, 2005; Hladunewich *et al.*, 2007).

Una disfunción endotelial generalizada podría explicar gran parte de los aspectos clínicos de la PE: la hipertensión arterial por alteración del control endotelial del tono vascular, la proteinuria por un aumento de la permeabilidad glomerular, la coagulopatía como resultado de la expresión anormal de los factores procoagulantes y la disfunción

hepática secundaria a la isquemia (Roberts, 1998). Los resultados de muchos estudios sustentan la teoría de una disfunción endotelial como el origen de las lesiones maternas en la PE. Ha sido reportado un aumento de los niveles circulantes de fibronectina, del factor VIII y de la trombomodulina, todos marcadores de lesión endotelial (Friedman *et al.*, 1995). La vasodilatación inducida por el flujo ha sido encontrada alterada en los vasos de las pacientes con PE lo cual sugiere una disfunción endotelial (Cokell y Poston, 1997). Una disminución de la producción de las moléculas vasodilatadoras derivadas del endotelio como la prostaciclina, un aumento de los niveles de la endotelina y una reactivación acentuada a la angiotensina II sugieren igualmente una disfunción endotelial (Mills *et al.*, 1999). Por otro lado estudios recientes han mostrado que existe una fuerte respuesta inflamatoria sistémica materna en las pacientes que cursan con PE. Aunque esta respuesta ha sido descrita en el lecho vascular placentario, es una actividad inmunológica sistémica mucho más amplia. Estos cambios podrían explicar la manifestación clínica de la enfermedad, incluyendo la disfunción de células endoteliales (Redman *et al.*, 1999; Poston *et al.*, 2006; Hladunewich *et al.*, 2007).

En la PE se ha identificado un incremento de los niveles plasmáticos de moléculas de adhesión endotelial, las que incluyen E-selectina, molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (Zimmerman *et al.*, 1999). Además se ha confirmado que un factor placentario soluble llamado fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1), un antagonista proteico del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del factor de crecimiento placentario (PIGF), está aumentado en PE, disminuyendo después del parto (fig. 3). También se ha demostrado que el incremento en los niveles plasmáticos de sFlt1 en pacientes con PE está asociado a la disminución de los niveles plasmáticos de de VEGF y PIGF, resultando en una disfunción endotelial que *in vitro* puede solucionarse por la administración exógena de los factores deficientes (Poston *et al.*, 2006; Hladunewich *et al.*, 2007; Mutter y Karumanchi, 2007). Adicionalmente, el VEGF y el PIGF produce relajación microvascular de las arteriolas renales de la rata, lo que puede ser bloqueado por la administración de sFlt1. Por otro lado, entrega un antecedente importante el saber que la administración de sFlt1 a ratas embarazadas induce hipertensión,

proteinuria y endoteliosis glomerular, clásica lesión de PE. Estas observaciones sugieren que el exceso de sFlt1 circulante contribuye a la patogenia de la PE (Maynard *et al.*, 2005).

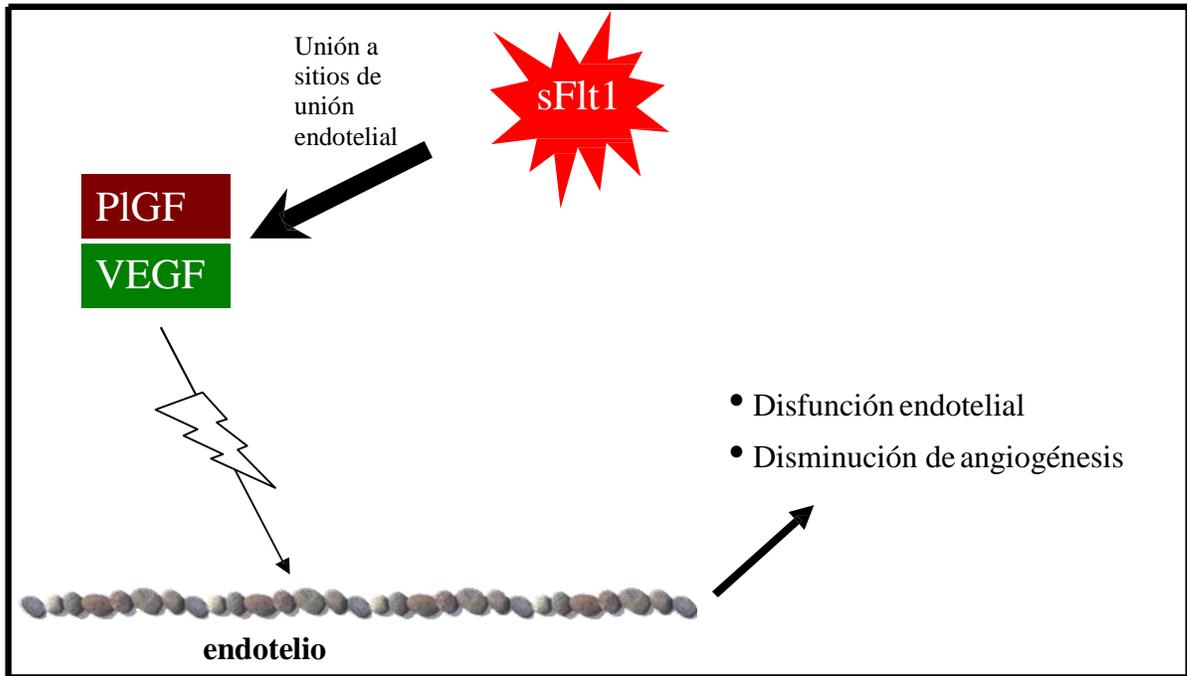


Figura 3. Bloqueo de la interacción Plgf-endotelio y VEGF-endotelio. En el esquema se explica la acción de sFlt1, esta sustancia de origen proteico que según se ha dicho podría estar implicada en la génesis de la PE, al bloquear la unión de PlGF y VEGF con el endotelio, produciéndose como consecuencia la disfunción endotelial y la disminución de angiogénesis en la placenta.

Recientemente se ha propuesto como responsable de la disfunción endotelial una respuesta inflamatoria sistémica excesiva de la madre. Este proceso inflamatorio es la adhesión de leucocitos a las células endoteliales, seguida de una trasmigración de estas células al tejido perivascular. Dicha adhesión esta regulada por la interacción de moléculas de adhesión y sus receptores en estas células (Poston, 2006). Dentro de estas moléculas de adhesión se han identificado algunas como son: molécula de adhesión vascular celular - 1 (VCAM-1), molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y E-selectina (Kim *et al.*, 2004)

La liberación de formas solubles de estas moléculas de adhesión al torrente sanguíneo podría ser indicativo de disfunción endotelial. Interesantemente, varios estudios han reportado que los niveles séricos de las moléculas de adhesión mencionadas

anteriormente se encuentran altos en mujeres embarazadas que cursan con PE, de hecho, estos niveles séricos anormales de las moléculas de adhesión podrían utilizarse como marcadores de PE (Krauss *et al.*, 1997). Sin embargo, hay varios estudios que no concuerdan con esto, en los que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los niveles séricos de moléculas de adhesión entre las mujeres con PE y las sanas (Lyll *et al.*, 1999; Chaiworapongsa *et al.*, 2002).

La magnitud de este daño endotelial se correlaciona con la elevación de los niveles de VCAM-1 encontrados en biopsias de placenta de mujeres con PE y eclampsia. Los niveles de VCAM-1 están aumentados 3 a 15 semanas antes de iniciarse los síntomas de la enfermedad en mujeres con factores de riesgo para PE, lo que sugiere que esta variable puede tener valor predictivo (Krauss *et al.*, 1997). Es de importancia mencionar que el remodelado vascular del trofoblasto culmina en la semana 20 de gestación, momento a partir del cual aparecen los síntomas. La activación endotelial expresada por elevación de los niveles de moléculas de adhesión debería comenzar a evidenciarse alrededor de esta fecha (Clausen *et al.*, 2000).

La presencia de un factor denominado X, al parecer, modula la función celular, que posteriormente lleva a daño endotelial, aunque las evidencias sugieren que se debe a la presencia de la interacción de varios factores. Entre los posibles candidatos propuestos como factor X están: las células del sinciotrofoblasto, el estrés oxidativo, citoquinas como el TNF alfa, interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) y los isoprostanos. Estos últimos son importantes marcadores agudos de estrés oxidativo, además de ser potentes vasoconstrictores (Chambers *et al.*, 2001).

2.4 Papel del estrés oxidativo en la fisiopatología de la preeclampsia

Se puede definir el estrés oxidativo como un desbalance entre los mecanismos de producción de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) y del nitrógeno (óxido nítrico y peroxinitrito) y las defensas antioxidantes, con un predominio de la formación de los radicales libres por sobre los

mecanismos de depuración de éstos. Los radicales libres son sustancias químicas que contienen uno o más electrones desapareados. Debido a esto, reaccionan con moléculas quitándoles o cediéndoles un electrón sin necesidad de que existan receptores para ello en dichas moléculas (Gutteridge y Halliwell, 2000). Estas especies químicas se están produciendo en forma permanente en el organismo en condiciones normales; incluso cumplen también funciones beneficiosas como las que realizan en procesos metabólicos (reacciones de óxido-reducción, carboxilación e hidroxilación), o bien en el proceso de la fagocitosis por células de las series monocito/macrófago o polimorfonucleares neutrófilos (Rodrigo y Rivera, 2003), pero como se dijo antes es con el desbalance entre producción y depuración que se genera daño biomolecular.

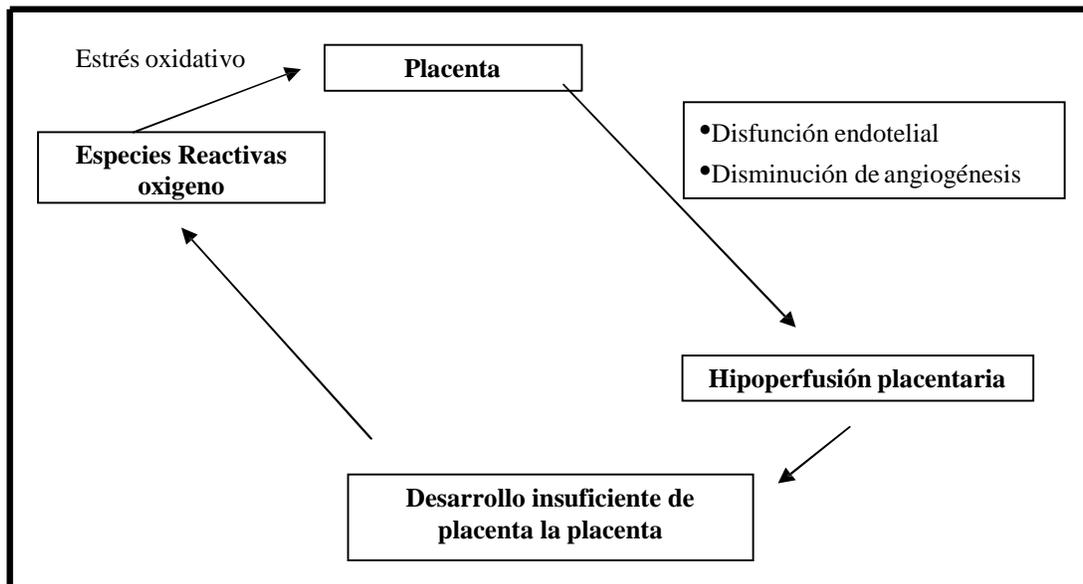


Figura 4: Círculo vicioso de la preeclampsia

En la figura 4 se esquematiza el círculo vicioso que se genera en la fisiopatogenia de la PE, en que actúan las ROS sobre la placenta, se desencadena la disfunción endotelial, lo que deriva en alteración en la angiogénesis y alteración en la migración del citotrofoblasto. Con esto existe un mal desarrollo de la placenta y una hipoxia de la misma, al tener menor irrigación sanguínea que no satisface las demandas de oxígeno. Esto lleva a una mayor generación de especies reactivas de oxígeno, las cuales actúan nuevamente sobre la placenta, cerrando el círculo.

Las ROS son resultado de los procesos fisiológicos propios del organismo, como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio, o bien son generadas por factores ambientales como la contaminación ambiental, el tabaco, los aditivos químicos en los alimentos procesados y los pesticidas. Son moléculas extremadamente reactivas, debido a que en el orbital más externo de su estructura tienen uno o más electrones sin aparear. Esta inestabilidad les confiere una avidéz física por la captura de un electrón de cualquier otra molécula de su entorno, ocasionando que la estructura afectada quede inestable (Fig. 5). De esta forma se pueden establecer reacciones en cadena por medio de varios transportadores que se oxidan y se reducen secuencialmente. El daño es transmitido por medio de los transportadores (moléculas atacadas por ROS que quedan inestables electrónicamente), que incluso pueden ser moléculas circulantes (Velásquez *et al.*, 2004). Las ROS se pueden formar por fuentes exógenas o endógenas. Un ejemplo de las segundas se observa en los sistemas biológicos, los cuales necesitan el oxígeno para su metabolismo energético. En el metabolismo mitocondrial son generados en forma sucesiva, el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Las principales estructuras subcelulares de generación de ROS incluyen principalmente las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, la membrana nuclear, la citoplasmática y la del retículo endoplásmico. Una vez que el radical se genera tiene una vida media de microsegundos, corto lapso de tiempo en el que es capaz de interactuar con las biomoléculas cercanas (Velásquez *et al.*, 2004) y dar inicio a la cadena de reacciones que causa del daño en las biomoléculas. Los lípidos representan el grupo más susceptible debido a la presencia de dobles enlaces en su estructura, además de constituir de manera fundamental la estructura celular más expuesta, como es la membrana celular (Velásquez *et al.*, 2004).

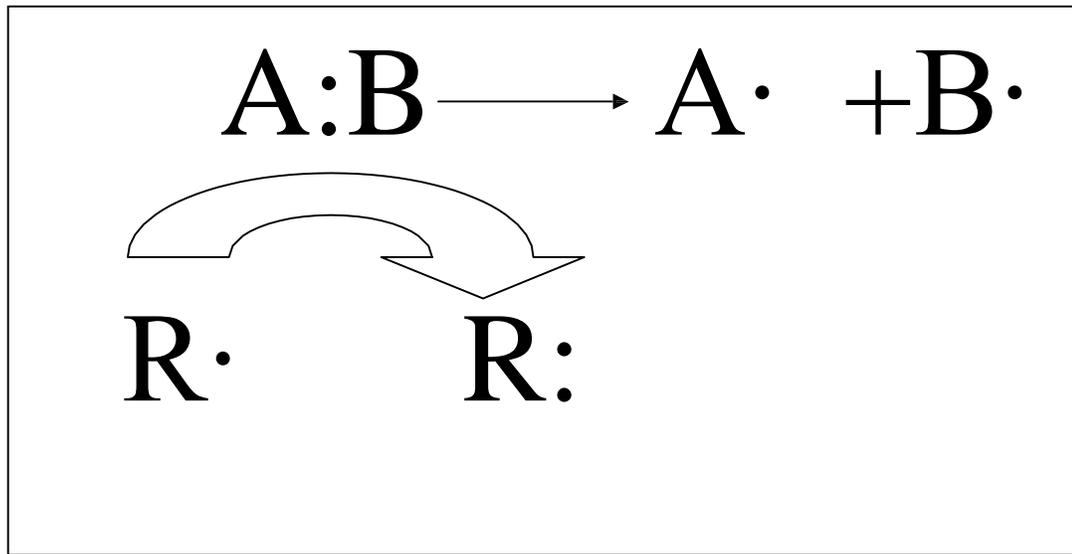


Figura 5: Se muestra la interacción del radical libre (R) con la biomolécula (AB). Donde el radical libre extrae un electrón desde la molécula estabilizándose con 2 electrones, generando a su vez 2 moléculas inestables con un electrón desapareado (A· y B·).

Las ROS juegan un papel fisiológico clave en la homeostasis, como es el caso de óxido nítrico sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa. El óxido nítrico participa en la relajación muscular, el control del tono vascular y varias otras funciones que dependen de la guanosina monofosfato cíclica (GMPc). El radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) formado por la NADPH oxidasa controla la producción de eritropoyetina, participa en el control de la ventilación, en la relajación del músculo liso y en la transmisión de señales de varios receptores de membrana que activan funciones inmunes. En general, los radicales libres derivados de especies reactivas de oxígeno intervienen en la respuesta del estrés oxidativo (bombardeo persistente de biomoléculas por radicales de oxígeno reactivo) y mantienen la homeostasis redox (Velásquez *et al.*, 2004).

Los radicales libres son generados y utilizados por células como los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y fibroblastos para eliminar organismos extraños como bacterias y virus. Pero el incremento de estos radicales conduce a un deterioro celular que se refleja de manera muy pronunciada durante la vejez, etapa en que se presentan varias

enfermedades asociadas al daño oxidativo, entendiéndose éste como destrucción de moléculas producida por radicales libres derivados de oxígeno.

Las células han desarrollado mecanismos que las protegen del efecto nocivo de los radicales libres con base en un complejo sistema de defensa constituido por agentes antioxidantes. Así, cuando se incrementa la producción de radicales libres, estos mecanismos se activan para controlar y estabilizar el ambiente redox intra o extracelular. (Rodríguez *et al.*, 2001; Velásquez *et al.*, 2004).

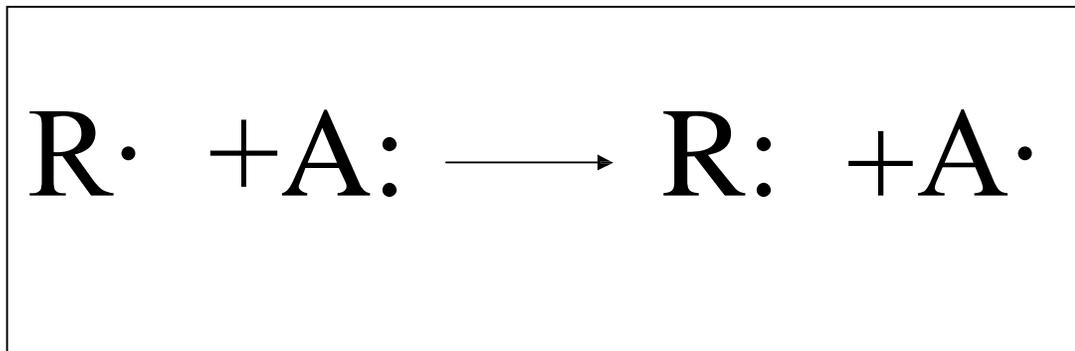


Figura 6: interacción entre la molécula antioxidante (A:) y el radical libre (R·) donde el antioxidante cede un electrón para neutralizar al radical libre (R:). La molécula antioxidante después de ceder su electrón se transforma en un radical libre de baja reactividad (A·).

La siguiente es la clasificación de los mecanismos antioxidantes realizada a partir de una modificación de los estudios de Velásquez *et al.* (2004) y Rodríguez *et al.* (2001). Estas defensas se efectúan en 4 niveles:

Primer nivel: consiste en sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial responsable de más del 90 % de la reducción del oxígeno en el organismo humano (Rodríguez *et al.*, 2001; Velásquez *et al.*, 2004).

Segundo nivel: lo constituyen enzimas especializadas en neutralizar el radical anión superóxido. Está dado por un grupo de enzimas especializadas en neutralizar el peróxido de hidrógeno (Rodríguez *et al.*, 2001; Velásquez *et al.*, 2004). Entre ellas está la catalasa, que se encuentra en los peroxisomas y que catalizan la reacción de dismutación siguiente:



También en los mamíferos, la glutatión-peroxidasa (enzima citoplasmática que contiene selenio), es la más importante y cataliza la reacción siguiente:



GSH = glutatión reducido

GSSG = glutatión oxidado

Tercer nivel: el radical hidroxilo puede ser neutralizado por la vitamina E, que es un antioxidante efectivo y que por su naturaleza hidrofóbica se encuentra en las membranas biológicas donde su protección es particularmente importante. También la vitamina C es un agente reductor o donador de electrones y reacciona rápidamente con el radical hidroxilo (Rodríguez *et al.*, 2001; Velásquez *et al.*, 2004).

Cuarto nivel: Una vez producido el daño molecular, existe un último nivel de defensa que consiste en la reparación. Está demostrado que los radicales libres son capaces de provocar rupturas de la cadena de DNA y aún de inducir mutagénesis, pero existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten restablecer la información genética, como son las endonucleasas y las exonucleasas (Rodríguez *et al.*, 2001; Velásquez *et al.*, 2004).

Las sustancias antioxidantes se pueden definir como aquellas sustancias que, presentes en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas),

retardan o previenen la oxidación. Al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico (Velásquez *et al.*, 2004). En algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Las sustancias antioxidantes se pueden dividir en 2 grupos principales según su origen: exógenos o antioxidantes que provienen de la dieta o los suplementos, y endógenos que son sintetizados por la célula (Fig. 7) (Rodríguez *et al.*, 2001)

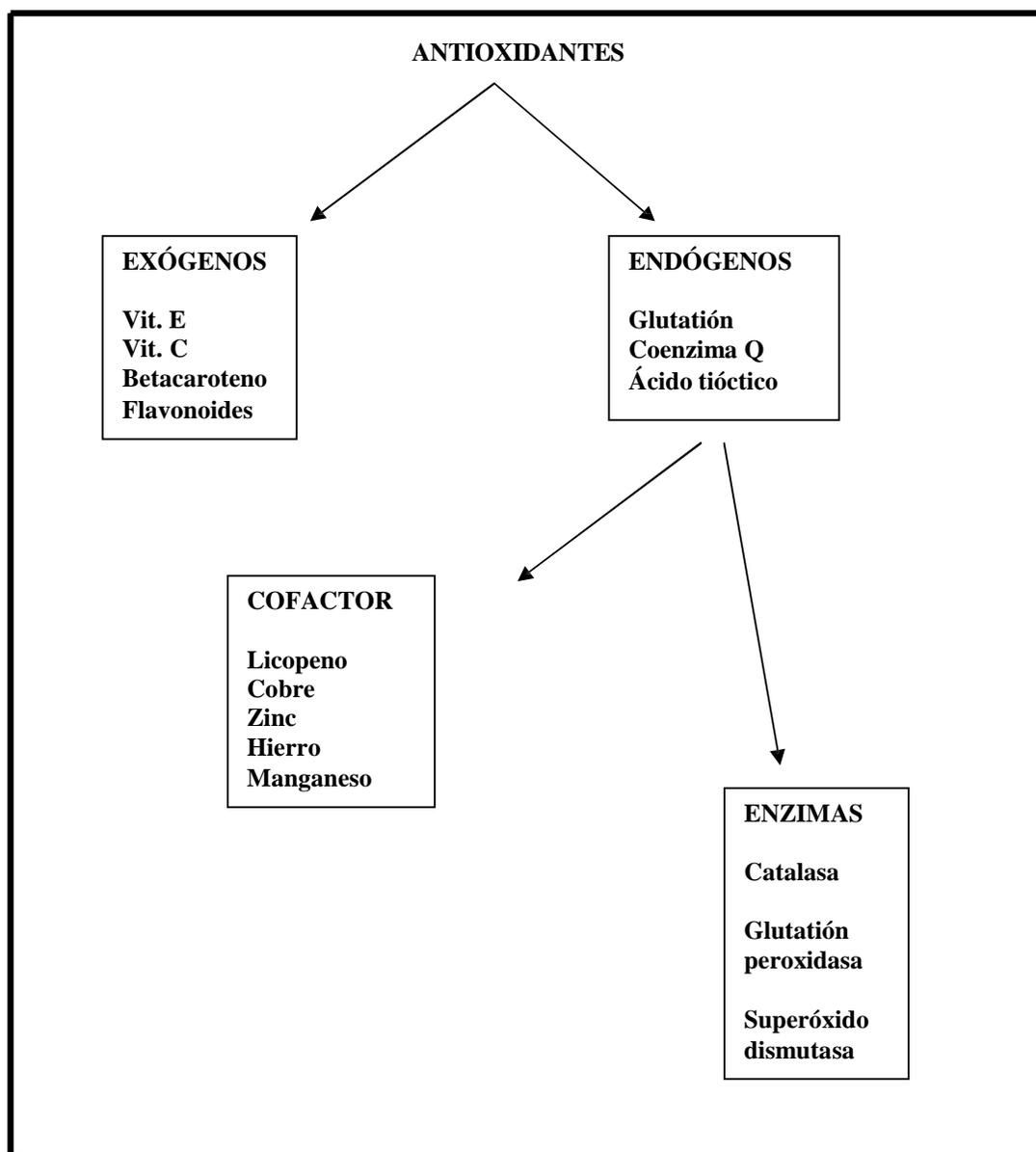


Figura 7: Clasificación de los antioxidantes. Modificado de Rodríguez *et al.*, 2001.

Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinadas ROS o hacia un grupo de estas. La vitamina E, el betacaroteno y el licopeno actúan en el medio liposoluble de la célula y su absorción y transporte están muy vinculados con el de los lípidos. Así, la vitamina E es considerada el más importante protector de las moléculas lipídicas (Rodríguez *et al.*, 2001; Velásquez *et al.*, 2004).

- ♦ Vitamina C: neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales hidroxilos, captura anión superóxido y regenera la forma reducida de vitamina E. (Rodríguez *et al.*, 2001).
- ♦ Vitamina E: neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales libres hidroxilos, neutraliza peróxidos y captura anión superóxido (Rodríguez *et al.*, 2001).
- ♦ Betacaroteno: neutraliza el oxígeno singlete (Rodríguez *et al.*, 2001).
- ♦ También es necesaria la incorporación al organismo de ciertos oligoelementos como el cobre, hierro, cinc, selenio y manganeso, pues forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes (Rodríguez *et al.*, 2001).

2.5 Efecto del estrés oxidativo sobre biomoléculas:

En este síndrome existe un compromiso importante de las funciones hepática y renal, debido al daño que producen, principalmente, los radicales libres sobre las biomoléculas.

El compromiso hepático en la PE es muy variable, pero comúnmente es causa de dolor abdominal, uno de los síntomas más comunes de la enfermedad. La inflamación del hígado es el resultado del edema focalizado y la obstrucción del flujo sanguíneo en los sinusoides hepáticos. También puede ocurrir hemorragia subcapsular, lo que podría evolucionar a ruptura de la cápsula. Con un compromiso sustancial del tejido hepático se

producen anomalías en la coagulación, que resultan de la disfunción hepática y no de una coagulación intravascular diseminada, que es una complicación poco frecuente en las mujeres con PE (Chan y Gerscovich, 1999).

Por otro lado, la función renal generalmente es mantenida en la PE, hasta una etapa tardía. En una gestación normal, hay un aumento en la depuración de creatinina, lo que conduce a una disminución de los niveles séricos de creatinina y urea. Si en una etapa temprana de la PE hay un aumento de creatinina sérica debe sospecharse de una enfermedad renal concomitante. La mayoría de los casos de falla renal aguda producidos en PE y que no son una enfermedad concomitante de presentación anterior, se producen por necrosis tubular aguda y la mayoría se recupera sin tener secuelas a largo plazo. Sin embargo un 4% de las pacientes con PE, cursan con falla renal aguda producto de necrosis cortical aguda, lo que es causa de falla renal permanente (Naqvi *et al.*, 1996).

2.5.1 Lipoperoxidación

Por la alta inestabilidad atómica de las ROS, éstas colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo esta molécula su función específica en la célula. Si se trata de los lípidos (ácidos grasos poliinsaturados principalmente), se dañan las estructuras ricas en ellos como son las membranas celulares y las lipoproteínas. Al afectar este proceso de oxidación a las membranas celulares, se altera la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular. La oxidación lipídica por los radicales libres, comprende una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina. Este proceso es conocido como peroxidación lipídica o lipoperoxidación, que genera numerosos subproductos, dentro de ellos el F-2 isoprostano y malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos de evaluar el estrés oxidativo (Rodríguez *et al.*, 2001).

Se ha observado un incremento en la peroxidación lipídica de placentas de mujeres que han presentado PE, indicando que esta es la mayor fuente de estrés oxidativo durante el

embarazo. Los granulocitos de la decidua son activados y producen citoquinas, proteasas y ROS. Cuando las ROS no son eliminados por mecanismos o sustancias antioxidantes, la formación de peróxidos lipídicos es inducida de manera exagerada (Aure *et al.*, 2005). Como resultado de la lipoperoxidación producida por las ROS, en mujeres con PE se ha observado un aumento significativo de malondialdehído a nivel sanguíneo (Chamy *et al.*, 2006).

2.5.2 Daño oxidativo de las proteínas

En caso de las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos impidiendo así el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc.) (Rodríguez *et al.*, 2001). Este daño molecular en las proteínas resulta muy importante dada la naturaleza proteica de tantas estructuras o parte de ellas que desempeñan un papel fundamental en el funcionamiento de un organismo.

2.6 Predictores de preeclampsia

Existen muchas sustancias que han sido estudiadas y relacionadas con la presentación de PE a distintas edades gestacionales, pero hasta el momento no hay certeza absoluta de alguna que se registre tan tempranamente que permita su uso para prevenir de manera segura la patología (Parra *et al.*, 2004). Sin embargo vale la pena señalar las variables siguientes dado su papel en las vías metabólicas que determinan la enfermedad.

2.6.1 Capacidad antioxidante del plasma

Se ha observado que el potencial antioxidante del plasma está disminuido en la PE (Aksoy *et al.*, 2003) y es así que la capacidad antioxidante total del plasma expresado como FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) podría servir como marcador bioquímico para

diferenciar la condición de las mujeres con embarazos normales y pacientes con PE (Zusterzeel *et al.*, 2001). Lo que se busca en este estudio es establecer si se puede utilizar una medición temprana de esta variable como predictor de la presentación de la enfermedad.

2.6.2 Acido úrico

En una gestación normal, las concentraciones sanguíneas de ácido úrico disminuyen, a causa de un incremento en su excreción renal. En pacientes con PE puede haber un incremento en las concentraciones sanguíneas de ácido úrico, lo que está correlacionado con un mal pronóstico en la enfermedad para la madre y el feto. Este incremento se debe principalmente a la disminución de la excreción renal de esta sustancia y a la mayor producción de ésta por parte de los tejidos isquémicos que se encuentran bajo estrés oxidativo. Esta variable resulta ser un marcador particularmente sensible del progreso de la enfermedad y sus riesgos (Walker, 2000). De manera experimental, la determinación de ácido úrico durante el embarazo es un factor pronóstico para eclampsia y restricción del crecimiento fetal (Méndez *et al.*, 2000). Esto da como pauta determinar los niveles de ácido úrico en fases más tempranas en pacientes con factores de riesgo de PE, para poder aplicar medidas preventivas

2.6.3 Moléculas de adhesión

También resulta importante la incorporación de las moléculas de adhesión a este grupo de posibles predictores de PE, ya que existen numerosos estudios que han correlacionado la presentación de PE en sus diferentes grados con el aumento de expresión de algunas de estas moléculas. Está ampliamente aceptado que los mecanismos patogénicos responsables de la PE pueden estar relacionados al daño del endotelio, por la liberación de compuestos vasoactivos (Takacs *et al.*, 2001). La incapacidad de invadir normalmente y de formar asociaciones por parte de las células trofoblásticas, llevó a pensar que las moléculas de adhesión celular cumplían un papel importante en este fenómeno (Krauss *et al.*, 2002). Al observar las moléculas de adherencia epitelial de la pared uterina en mujeres con una PE

grave, se pudo detectar que las células retienen su calidad epitelial y no adquieren el fenotipo vascular. Esto permite concluir que existe una falla en la expresión de las moléculas de adhesión celular y sugiere una falla en la vía invasora. Esta falla de la transformación involucra a muchas moléculas de adhesión. Dentro de este grupo las moléculas más estudiadas han sido el ICAM-1 y el VCAM-1, encontrándose su expresión aumentada en mujeres que cursan con PE. Sin embargo, apremia saber si la expresión aumenta tempranamente en mujeres que cursarán con PE en etapas más avanzadas de la gestación (Freeman *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006 y Marks *et al.*, 2006).

2.6.4 Malondialdehido

Dado que el estrés oxidativo ha sido fuertemente postulado por varios autores como el causante principal de la PE (Chan y Gerscovich *et al.*, 1999; Aure *et al.*, 2005 y Redman y Sargent, 2005), es importante destacar algún marcador de éste. En el presente estudio se medirá malondialdehido, producto directo de la oxidación de lípidos, como marcador de la magnitud del estrés oxidativo sufrido por las pacientes para evaluar si existe o no asociación con la presentación de enfermedad.

2.6.5 VEGF, PlGF y sFlt-1

El VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) es un mitógeno específico de las células endoteliales que desempeña un papel clave en la promoción de la angiogénesis. Las actividades del VEGF son mediadas por su interacción con dos receptores tirosina quinasa de alta afinidad: KDR (Kinase-insert region) y el Flt-1 los cuales son selectivamente expresados sobre las células endoteliales. La unión alternativa del Flt-1 origina la expresión de una proteína endógena secretada llamada sFlt-1, la cual no tiene dominio citoplasmático y transmembranario, pero conserva el dominio de unión al ligando, VEGF (Dvorak, 2002) (Fig. 8).

Los estudios *in vitro* confirman que un exceso de sFlt-1 produce un estado anti-angiogénico en el suero de mujeres enfermas de PE, que puede corregirse con el aporte exógeno de VEGF y del PlGF (Maynard *et al.*, 2005).

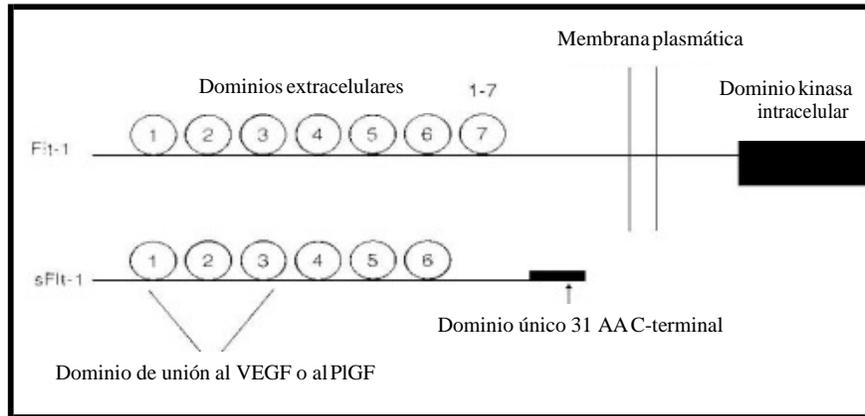


Fig. 8: Estructura de las proteínas Flt-1 y sFlt-1 en los siete dominios de la inmunoglobulina-like (IgG) que están implicadas en la unión al VEGF o al PlGF. La proteína sFlt-1 tiene un dominio único 31 AA C-terminal derivado de un pasaje alternativo y no tiene dominio transmembranario y citoplasmático. De esta manera, el sFlt-1 puede antagonizar el VEGF circulante y unirse a él y así impedir la interacción del VEGF con sus receptores naturales. sFlt-1 se une y antagoniza también el PlGF, otro miembro de la familia del VEGF producido principalmente por la placenta (Karumanchi y Lam, 2004).

Un exceso de sFlt-1 aislado, administrado a ratas preñadas, induce albuminuria, hipertensión y lesiones histológicas renales de endoteliosis glomerular. Para que esto suceda, es necesaria la neutralización del VEGF y del PlGF circulante con la consiguiente inducción de disfunción endotelial. Además, niveles disminuidos de VEGF y de PlGF libres se han encontrado al mismo tiempo que niveles aumentados de sFlt-1 en la circulación de las pacientes en los momentos de los primeros síntomas (Maynard *et al.*, 2005). Recientemente, se ha encontrado niveles circulantes disminuidos del VEGF y del PlGF libres, mucho antes de la aparición de los primeros signos clínicos (Poliotti *et al.*, 2003). Por otro lado, el VEGF estimula la angiogénesis y la vasodilatación produciendo NO y prostaciclina, moléculas cuyos niveles están disminuidos en la PE (He *et al.*, 1999). Además un numeroso grupo de pacientes cancerosos que reciben antagonistas del VEGF desarrollan hipertensión y proteinuria (Yang *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que un

exceso de sFlt-1 al neutralizar al VEGF y al PlGF, podría jugar un papel central en la patogenia de la PE. Sin embargo quedan algunas preguntas por responder. Los mecanismos precisos que conducen a una producción excesiva de sFlt-1 por la placenta no son conocidos, el papel del sFlt-1 en el desarrollo normal de la placenta y en la pseudo-vasculogénesis no está claro. No se han reportado anomalías de la coagulación, anomalías cerebrales (eclampsia) o hepáticas en los animales tratados con sFlt-1. La relación del sFlt-1 con los factores de riesgo de la PE no es clara (Karumanchi y Lam, 2004).

Dadas las evidencias encontradas que indican una posible patogenia de origen vascular, otra molécula que resulta de interés mencionar es la endoglina soluble. Los niveles elevados de endoglina soluble y de sFlt1 elevan el riesgo de desarrollar PE. La endoglina soluble empieza a acumularse en la sangre dos o tres meses antes de que la mujer desarrolle PE. En las que sufren PE pre-término, los niveles comienzan a subir entre las semanas 17 y 20 de gestación. Sin embargo, en las que padecen el trastorno en las etapas finales, los niveles de endoglina soluble se elevan entre las semanas 25 y 28 (Levine *et al.*, 2006).

Tanto las mujeres con PE a término como con hipertensión gestacional muestran elevaciones simultáneas de endoglina soluble y de sFlt1, y disminución de los niveles de PlGF (Levine *et al.*, 2006). Los antecedentes bibliográficos citados hacen un marcador de interés para medir precozmente el sFlt1, la endoglina, el PlGF y el VEGF.

2.7 Factores de riesgo

2.7.1 Historia clínica y embarazo Actual

Se piensa que la PE podría tener un componente hereditario importante, pero varios grupos han sido estudiados sin mostrar 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). Entre los factores de riesgo más importantes de mujeres que presentan PE se encuentran: obesidad, hipertensión arterial crónica, historial de PE, antecedentes familiares de PE y gestaciones múltiples. En relación a los factores de riesgo, se ha propuesto que una de las causas que posiblemente desencadene la respuesta inflamatoria en la PE es el estrés oxidativo, y la coexistencia de 2 eventos fisiopatológicos que se expresen a través de la activación del endotelio y se caractericen por un aumento del estrés oxidativo, como por ejemplo la obesidad y el embarazo o la hipertensión arterial crónica y el embarazo podrían intensificar la respuesta del endotelio a la agresión, la cual se manifestaría clínicamente con hipertensión arterial, edema y proteinuria (Aure *et al.*, 2005).

Los antecedentes familiares se relacionan con un alto riesgo de padecer la enfermedad, lo que apunta a factores genéticos que predisponen a la misma. Las mujeres con historial clínico de PE, tienen un 13,1 % de riesgo de presentar PE en el segundo embarazo (Arngrimsson *et al.*, 1994)

2.7.2 Presión Arterial

Se considera que existe hipertensión cuando se encuentran cifras tensionales sobre los 140/90 mm Hg en tomas consecutivas con un intervalo de 6 horas, o en tres tomas aisladas después de permanecer en un ambiente tranquilo; sentada durante 5 minutos, sin fumar o ingerir café por lo menos 30 minutos antes, en pacientes con 18 años o más; cifras igual o mayor de 138/88 mm Hg en pacientes entre 16 y 17 años tomadas en iguales condiciones ó 136/86 mm Hg en pacientes entre 13 y 15 años (Gómez, 1999).

2.8 Diagnóstico de preeclampsia

El diagnóstico de este síndrome es eminentemente clínico, siendo la hipertensión el signo más común, pudiendo estar acompañado de otros signos, tales como edema, convulsiones, dolor abdominal y malestar general. Dado que la PE es diagnosticada por la

presencia de hipertensión y proteinuria, el resto de los signos clínicos varía desde cuadros moderados, con bajo compromiso sistémico hasta cuadros que llegan a la falla multiorgánica. Cuan extenso sea el desarrollo de la enfermedad depende de varios factores, los cuales pueden ser de origen genético o medioambientales (Walker, 2000). La clasificación de la severidad del cuadro está basada en el valor de la presión sanguínea y la presencia de proteinuria, pero en el futuro se espera que la caracterización de la enfermedad se realice tomando en cuenta el resto de los signos clínicos (Martin *et al.*, 1999)

Los valores de presión sanguínea y proteinuria pueden usarse como indicadores para la posible hospitalización anticipada de la madre para monitorear su estado (Walker, 1993).

El compromiso hepático puede ser determinado por ultrasonografía, que se realiza ante la sospecha de hematoma o hemorragia subcapsular hepática. Además se ha demostrado que las concentraciones séricas de alanina aminotransferasa y la aspartato aminotransferasa son un buen indicador del compromiso hepático, las cuales incrementan en PE (Saphier y Repke, 1998)

Dado que la función renal se mantiene normal hasta una etapa tardía de la PE hay una concentración de creatinina baja en sangre. Pero en una etapa tardía, el aumento de esta variable en sangre indica un compromiso mayor de la función renal e implica un mal pronóstico para la madre. Esta falla renal aguda en PE actualmente es poco frecuente en los países desarrollados y la mayoría están asociados a hemorragia o sepsis (Stratta *et al.*, 1996).

2.8.1 Doppler de las arterias uterinas y predicción de preeclampsia

Hasta el día de hoy sólo se puede estimar el riesgo que tiene una embarazada de sufrir PE, por medio de una ecografía doppler de la arteria uterina, la cual revela una disminución del flujo sanguíneo de esta arteria, desde la semana 22 de gestación. Sin embargo, existen estudios acerca de los niveles plasmáticos de la proteína placentaria 13 (PP13) como predictor más temprano de PE, pero la prueba de ELISA empleada en su

medición aun está en etapa de ensayo y no se tiene una fecha definida de su lanzamiento al mercado (Berrios, ejecutiva Perkin-Elmer Chile, comunicación personal)

2.8.2 Proteinuria

En la PE, la excreción proteica urinaria sobrepasa los 300 mg en 24 horas. Esto está asociado generalmente con un hallazgo patológico clásico denominado glomeruloendoteliosis, el cual no es permanente, recuperándose después del parto. La presencia de proteinuria confirma el diagnóstico de PE y el incremento del riesgo para la madre y el feto (Brown, 1995).

La pérdida de proteínas séricas y el incremento en la permeabilidad vascular lleva a una disminución del volumen intravascular y a la producción de edema tisular. Todos los órganos pueden ser afectados, incluidos el hígado (produciéndose dolor abdominal), el cerebro (dolor de cabeza y convulsiones) y los pulmones (dificultad respiratoria). También se produce edema periférico, pero su presentación es muy variable y no constituye una herramienta diagnóstica efectiva. La disminución del volumen sanguíneo puede llevar a un incremento en la concentración de hemoglobina materna, lo cual está asociado con un incremento en el riesgo de restricción del crecimiento intrauterino (Brown, 1995).

2.9 Profilaxis en preeclampsia

El rol de la dieta y el potencial beneficio como terapia del suplemento de micronutrientes no ha sido estudiado a fondo. Sin embargo existen unos pocos estudios que han arrojado conclusiones interesantes, como por ejemplo que la restricción de sodio no es útil. Así también, la administración de calcio o ácidos grasos en mujeres desde mediados de la gestación no es efectivo como terapia para reducir el riesgo de PE. También parece ser inútil la suplementación de zinc o magnesio con el mismo fin. La terapia con vitamina C y E es prometedora según algunos autores, pero debe ser probada con estudios a gran escala. Aún no está claro si esta suplementación es sólo una reposición de nutrición adecuada para el embarazo, o es una terapia farmacológica como tal (Roberts *et al.*, 2003).

La evidencia acumulada a lo largo de numerosos estudios apunta a que el estrés oxidativo es el principal evento fisiopatológico en la producción de PE. Además se ha encontrado que los antioxidantes como vitamina E, C y carotenoides están disminuidos en pacientes con PE. Con esto resulta lógico pensar en el suplemento de sustancias antioxidantes como terapia preventiva de las embarazadas (Chan y Gerscovich *et al.*, 1999; Aure *et al.*, 2005 y Redman y Sargent., 2005). Sin embargo, en contraposición tenemos estudios que no han encontrado diferencias significativas entre pacientes que se han tratado con vitaminas antioxidantes y los que no han recibido ningún tratamiento (Poston, 2006).

La vitamina C es parte importante del poder antioxidante del plasma, por lo que se ha sugerido que el suplemento en mujeres con riesgo de PE podría influenciar la susceptibilidad del endotelio vascular al daño oxidativo (Khrab, 2000). Además se ha encontrado que la concentración de vitamina C en plasma esta estrechamente relacionada con el peso y tamaño del feto (Lee *et al.*, 2004), lo que sugiere que la suplementación de esta vitamina también podría servir de profilaxis para la restricción de crecimiento fetal.

Estudios retrospectivos sugieren que la aspirina reduce la incidencia y severidad de la PE. Es importante señalar que las drogas bloqueadoras de la agregación plaquetaria, en este caso la aspirina, en tratamientos prologados a bajas dosis, solo tienen un efecto benéfico moderado a pequeño cuando se usa en la prevención de la PE. Duley *et al.* (2007) concluyó en su estudio que la aspirina debería usarse con mucha anticipación a la migración del trofoblasto y en altas dosis, las cuales no son recomendables hasta que se realicen nuevos estudios relacionados (Duley *et al.*, 2007).

La suplementación de calcio en mujeres embarazadas parece funcionar, pero solamente tiene efecto cuando existe una deficiencia previa de este. No así cuando se suplemente en mujeres que tienen niveles plasmáticos normales (Roberts *et al.*, 2003).

El calcio y el ácido linoleico en conjunto pueden aumentar las concentraciones de ácido araquidónico, precursor natural de las prostaglandinas vasoactivas (Pg I2, Pg E2), por

esto se puede pensar hipotéticamente que esta combinación elevaría los niveles de estas prostaglandinas vasodilatadoras. El uso del calcio ha demostrado hasta 52% de reducción de la enfermedad, por lo cual, de acuerdo con los resultados obtenidos por Herrera *et al.* (1996), se pudo comprobar que la combinación con el ácido linoleico mejora el efecto preventivo del calcio sobre la PE.

2.9.1 Manejo de la hipertensión en preeclampsia

Los pasos a seguir que se presentan a continuación para el manejo de la hipertensión en el embarazo comprenden el monitoreo del paciente, sus posibles tratamientos y manejo fetal (Walker, 2000).

2.9.2 Monitoreo de la embarazada

Comprende el monitoreo de la mujer para establecer el riesgo o signos de hipertensión en la clínica prenatal. Se realizan chequeos regulares de presión sanguínea y análisis de orina, recuentos plaquetarios y análisis para determinar la función hepática (alanina y aspartato aminotransferasa).

2.9.3 Terapia antihipertensiva

Se debe considerar el uso de tratamiento antihipertensivo si la presión está sobre 160/110 mm Hg. y además se debe continuar con el monitoreo de la madre y el feto.

2.9.4 Terapia anticonvulsivante

Si ocurren convulsiones se utiliza sulfato de magnesio intravenoso o intramuscular. Y en casos de PE severa se debe considerar la administración de sulfato de magnesio como tratamiento preventivo.

2.9.5 Manejo del feto

Se administran esteroides de manera profiláctica si la gestación dura menos de 34 semanas, Se realiza la determinación de peso fetal por medio de ultrasonografía. Por medio de doppler ultrasonográfico se determina la velocidad del flujo sanguíneo en el cordón umbilical. Se realizan exámenes ultrasonográficos para monitorear el volumen de líquido. El parto debe realizarse en el día de mejor evaluación y con el mejor método posible.

2.9.6 Cuidado post-parto

Se debe monitorear y mantener un equilibrio de fluidos, usar diuréticos si se estima necesario por una sospecha de edema pulmonar. Disminuir las dosis de agentes antihipertensivos adecuadamente y suspender la terapia antihipertensiva después de que el paciente se encuentre estable por al menos 48 horas. Posteriormente se debe evaluar el impacto de la enfermedad en el futuro, ya sea en el feto o en la madre y los posibles manejos posteriores.

3 HIPÓTESIS

Las mujeres que cursaron con PE, durante el primer trimestre del embarazo exhibirán variables bioquímicas plasmáticas que reflejan mayor nivel de estrés oxidativo y de activación endotelial, pero menor actividad angiogénica, en comparación con mujeres con embarazos normales. Por lo que la determinación precoz de estas variables se puede utilizar en la predicción del desarrollo de la enfermedad.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Establecer la asociación entre marcadores bioquímicos de estrés oxidativo, disfunción endotelial y angiogénesis con la presentación de PE para determinar la factibilidad de su uso en la predicción de esta patología.

4.2 Objetivos específicos

- ♦ Determinar la capacidad antioxidante del plasma materno y los niveles de ácido úrico en las mujeres embarazadas.
- ♦ Conocer la concentración de marcadores de estrés oxidativo (ácido úrico y MDA), marcadores de disfunción endotelial (PAI-1, PAI-2, ICAM, VCAM) y marcadores de actividad angiogénica (sFlt1, PlGF) en plasma de mujeres embarazadas durante el primer tercio de la gestación.
- ♦ Establecer la asociación entre las variables medidas y la presentación de PE.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño

Se realizó un estudio que incluyó 220 muestras de sangre obtenidas de 1051 pacientes con resultado perinatal completo entre las 11-14 semanas de gestación que acudieron a la Unidad de Medicina Fetal del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, entre los meses de Agosto del 2004 y Marzo del 2006. Se les tomó muestras de sangre en el primer tercio de gestación, la cual se centrifugó para obtener plasma y suero, los que posteriormente se almacenaron a -80° C. Con estas muestras se determinaron variables bioquímicas plasmáticas de estrés oxidativo, disfunción endotelial y angiogénesis (malondialdehído, capacidad antioxidante del plasma, ácido úrico, PAI1/PAI2, sFlt1, PIGF, ICAM-1 y VCAM-1). Fueron descartadas del estudio aquellas mujeres que presentaban patologías como: hipertensión crónica, nefropatías, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, obesidad, dislipidemia, antecedentes de alcoholismo o tabaquismo, debido a que estas patologías de por sí generan un estrés oxidativo; además se eliminaron aquellas mujeres que presentaban embarazos múltiples por la misma razón y las que presentaron enfermedades mentales, por razones éticas. De las 1050 pacientes atendidas, después de aplicar los criterios de exclusión se muestrearon 220, las cuales se separaron en 3 grupos: pacientes con PE (32), pacientes con restricciones de crecimiento fetal (45) y pacientes sanas de control (143). Para el análisis estadístico se tomó un control aleatoriamente por cada paciente conpatología.

5.2 Tamaño muestral

El tamaño muestral calculado fue de 60 pacientes, 30 para el grupo de mujeres preeclámpticas y 30 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 winepscope 2.0 (Snedecor y Cochran, 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

Finalmente para el análisis estadístico se utilizaron la totalidad de las mujeres con PE (32) y se tomó un control por cada una.

6 TÉCNICAS ANALÍTICAS Y BIOQUÍMICAS APLICADAS

6.1 Capacidad antioxidante del plasma: FRAP y ácido úrico

Los compuestos reductores del plasma (antioxidantes), reducen el hierro férrico o ferroso y este último da una reacción de coloración que permite medirlo por medio de una técnica espectrofotométrica a 593 nm., expresado en la variable FRAP (ferric reducing ability of plasma) en μM (Benzie y Strain, 1996).

Las concentraciones plasmáticas de ácido úrico se determinaron mediante colorimetría con un kit enzimático (Uric Acid LiquiColor® Test). Las muestras de plasma fueron leídas en un espectrofotómetro a 520 nm.

6.1.1 FRAP:

Reactivos utilizados

Solución FRAP: Se preparó mezclando 15 mL de Tampón acetato pH 3,6 + 1,5 mL de solución TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) y 1,5 mL de cloruro férrico. Posteriormente se preincubó en baño termorregulado a 37°C durante 2 min.

Procedimiento:

Los tubos blancos que contenían 750 µL de solución FRAP y 100 µL de agua bidestilada, se incubaron en baño termorregulado a 37°C durante 2 minutos, al igual que los tubos de muestra que contenían 750 µL de solución FRAP y 75 µL de agua bidestilada. Se incubó en baño termorregulado a 37°C durante 2 min.

El tubo blanco se agitó antes de transferir la mezcla a una cubeta de 1 mL y se realizó un barrido (“scan blank”) hasta estabilizar la absorbancia del blanco en un valor cercano a cero a 593 nm.

Al tubo muestra se le agregó 25 µL de plasma o estándar, se agitó y transfirió a una cubeta de 1 mL. Después de 60 seg. y se registraron las lecturas a 593 nm.

6.1.2 Acido úrico:

Para la determinación de ácido úrico plasmático se utilizó el kit colorimétrico comercial Liquicolor®.

Se tomó 20 µl de plasma + 20 µl de suero fisiológico y se le agregó 1 ml de reactivo liquicolor, después se agitó e incubó por 5 minutos a 37°C. Posteriormente se leyó a 520 nm dentro de los siguientes 15 minutos.

6.2 Estrés oxidativo: Malondialdehido (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)

Tampon 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 uM, 0.24 uM, 0.48 uM, 1.2 uM, 2.4 uM, 4.8 uM.

Derivatización:

Se efectuó la siguiente mezcla en tubo de ensayo (volumen total 1 ml)
250 uL de ácido metafosfórico 1,22 M.
450 uL de agua HPLC
50 uL de muestra, estándar (MDA) o agua (blanco)
250 uL de ácido tiobarbitúrico (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 uL de muestra, estándar o blanco con 360 uL de metanol HPLC y 40 uL 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 Disfunción endotelial:

6.3.1 Relación PAI-1/PAI-2

Las concentraciones plasmáticas de inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y su homólogo 2 (PAI-2) se determinaron utilizando una técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) con un kit comercial. Las muestras de plasma fueron leídas a 420 nm y 450 nm respectivamente, en un lector de microplacas. Las determinaciones de PAI-1 y PAI-2 se realizaron por separado con sus respectivos kit comerciales (R&D System, Mineapolis, USA) y posteriormente se estableció la relación PAI-1/PAI-2 con los valores obtenidos.

6.3.2 Moléculas de adhesión: ICAM-1 y VCAM-1

Las concentraciones plasmáticas de ICAM-1 se determinaron utilizando una técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) con un kit comercial (R&D System, Mineapolis, USA). Las muestras de plasma fueron leídas a 450 y 620 nm, en un lector de microplacas.

Las concentraciones plasmáticas de VCAM-1 se determinaron utilizando una técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) con un kit comercial (R&D System, Mineapolis, USA). Las muestras de plasma fueron leídas a 450 y 540 nm, en un lector de microplacas.

6.4 Angiogénesis

6.4.1 Factor antiangiogénico: fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1)

Las concentraciones plasmáticas de sFlt1 se determinaron utilizando una técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) con un kit comercial (R&D System, Mineapolis, USA). Las muestras de plasma fueron leídas a 450 y 540 nm, en un lector de microplacas.

6.4.2 Factor de crecimiento placentario (PIGF)

Las concentraciones plasmáticas de PIGF se determinaron utilizando una técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) con un kit comercial (R&D System, Mineapolis, USA). Las muestras de plasma fueron leídas a 450 y 540 nm, en un lector de microplacas.

7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se procesaron con el programa computacional estadístico Infostat Profesional versión 2004d.1. Los resultados obtenidos se expresaron como promedios \pm error estándar de la media. Se realizó una prueba t de Student ($p < 0,05$) con el fin de establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medias

de cada grupo, para cada una de las variables medidas. Por medio de un prueba de correlación de Pearson ($p < 0,05$), se estableció la dependencia o independencia de las variables que resultaron con diferencias estadísticamente significativas en la prueba de t, con respecto a las demás variables medidas.

8 RESULTADOS

De las pacientes muestreadas se seleccionaron todas las PE (32). Los controles (32) fueron obtenidos aleatoriamente de las 143 pacientes sanas muestreadas seleccionando la siguiente paciente normal al "caso índice" de manera que la relación entre pacientes con PE y control fuera 1:1

El Promedio de edad en el total de mujeres muestreadas fue de 29,2 años. En el grupo de mujeres con PE el promedio de edad fue de 31,3 años, mientras que el promedio de edad materna para el grupo control fue 28,1 años

El promedio de gestaciones a la fecha para el total de embarazadas muestreadas fue de 2,05 gestaciones, mientras que los promedios para los grupos control y preeclámpticas fueron 2,04 y 2,46 respectivamente.

La edad gestacional promedio para el total de las mujeres muestreadas fue 38 ,1 semanas. El promedio para el grupo de mujeres que presentaron PE fue de 35,72 semanas. Mientras que promedio de la edad gestacional en el grupo control fue 38,79 semanas.

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

De las 32 pacientes con PE, 9 tuvieron a sus hijos por parto normal de tipo vaginal, mientras que el resto (23) debió someterse a cesárea para llevar a término el embarazo. Todos los neonatos en este grupo nacieron vivos.

8.1 Variables bioquímicas de estrés oxidativo

Los niveles promedios obtenidos para la capacidad antioxidante del plasma en el grupo de mujeres control fue de $356,95 \pm 23,77 \mu\text{mol/L}$ y el promedio para el grupo preeclámptico fue $350,97 \pm 24,29 \mu\text{mol/L}$. Entre ellos no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Por otro lado, el promedio de ácido úrico plasmático en el grupo control fue $4,20 \pm 0,32 \mu\text{mol/L}$, mientras que el grupo de mujeres con PE obtuvo un promedio de $4,13 \pm 0,4 \mu\text{mol/L}$. Entre ellos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Estos resultados se expresan gráficamente a continuación (figs. 9-10).

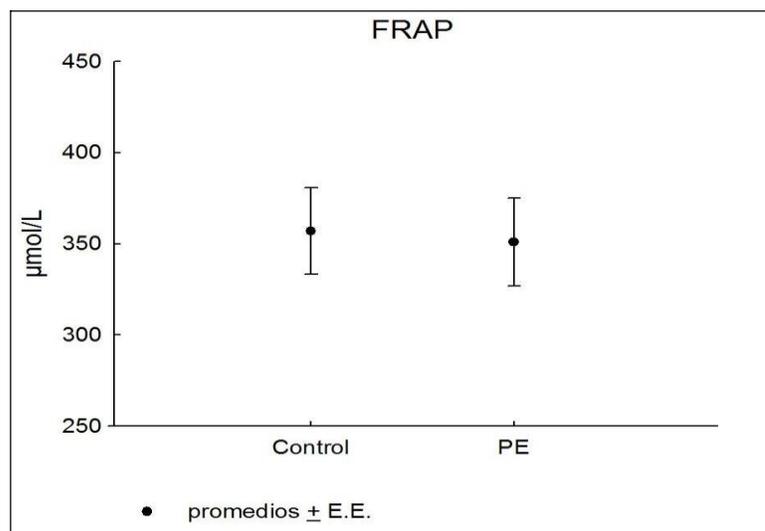


Fig. 9. En la figura se grafican los promedios \pm E.E. de los grupos control y PE para la variable FRAP.

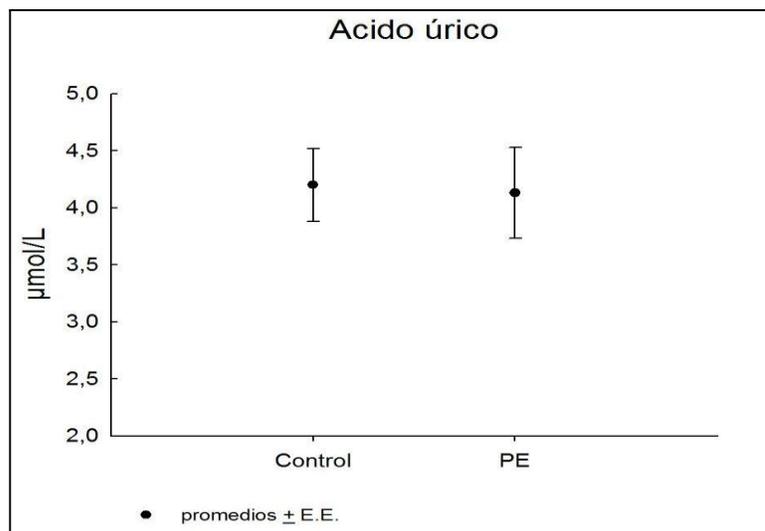


Fig. 10. En la figura se grafican los promedios \pm E.E. de los grupos control y PE para la variable Ácido úrico.

El nivel promedio de MDA en el grupo de mujeres embarazadas sanas (control), fue de $1,55 \pm 0,2$ nmoles/ml, mientras que el promedio del grupo de mujeres preeclámpticas fue $1,97 \pm 0,39$ nM/ml. Entre ellos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). A continuación se presentan estos resultados en forma gráfica (Fig. 11).

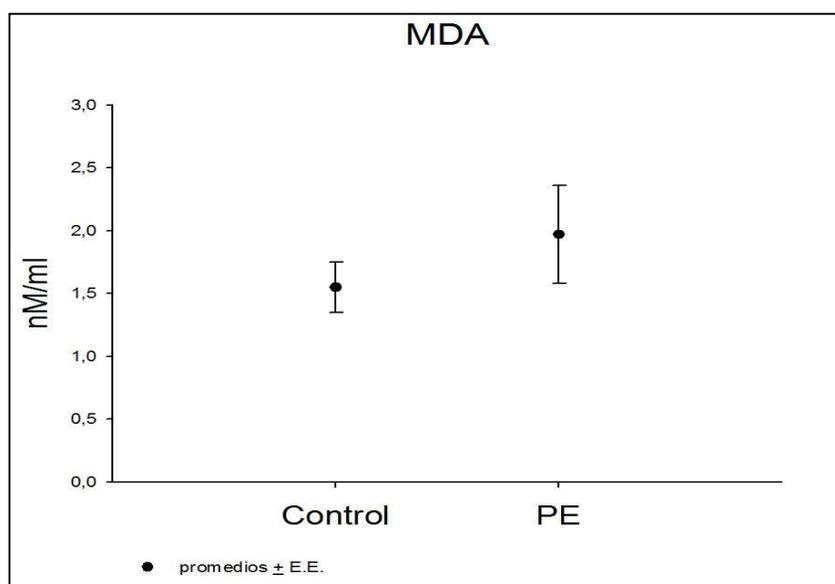


Fig. 11. En la figura se grafican los promedios \pm E.E. de los grupos control y PE para la variable MDA.

8.2 Variables bioquímicas de disfunción endotelial

El promedio de la relación PAI1/PAI2, para las mujeres del grupo control fue $4,04 \pm 0,83$ nM/ml, mientras que el promedio del grupo de mujeres preeclámpticas fue $2,87 \pm 0,47$ nM/ml (Fig. 12). Entre ellos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

El promedio de ICAM-1 para el grupo de mujeres control fue $222,91 \pm 16,72$ nM/ml y para el grupo de mujeres preeclámpticas fue $239,31 \pm 13,62$ nM/ml, mientras que el promedio de VCAM-1 en las mujeres sanas (control) fue $565,40 \pm 39,25$ nM/ml y el promedio del grupo preeclámpticas fue $538,16 \pm 35,96$ nM/ml. A continuación se muestran

de manera gráfica los respectivos resultados de estas variables (Fig. 13-14). Entre ellos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

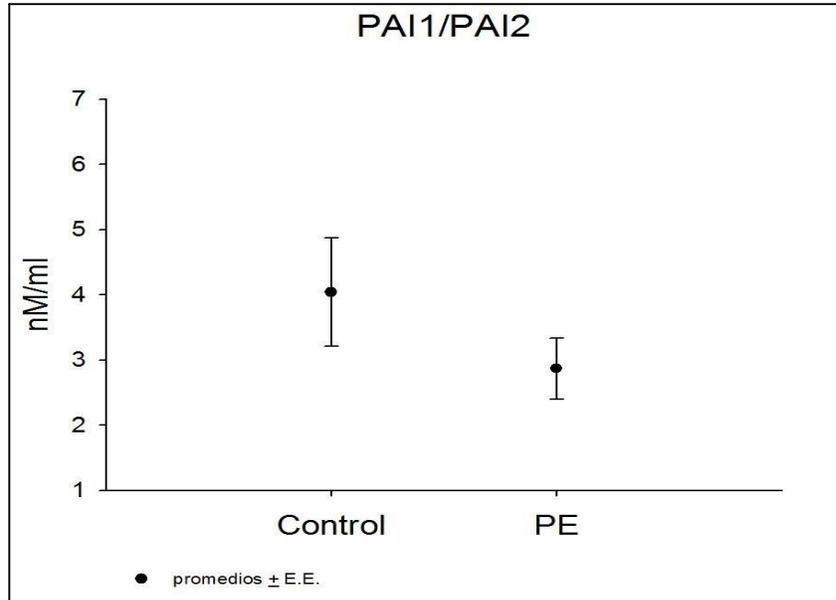


Fig. 12. En la figura se grafican los promedios \pm E.E. de los grupos control y PE para la relación PAI1/PAI2.

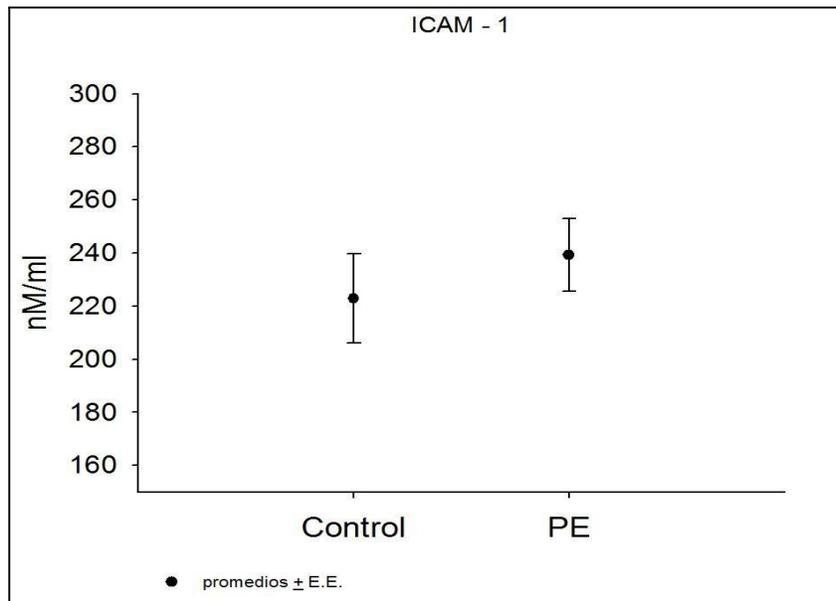


Fig. 13. En la figura se grafican los promedios \pm E.E. de los grupos control y PE para la variable ICAM-1.

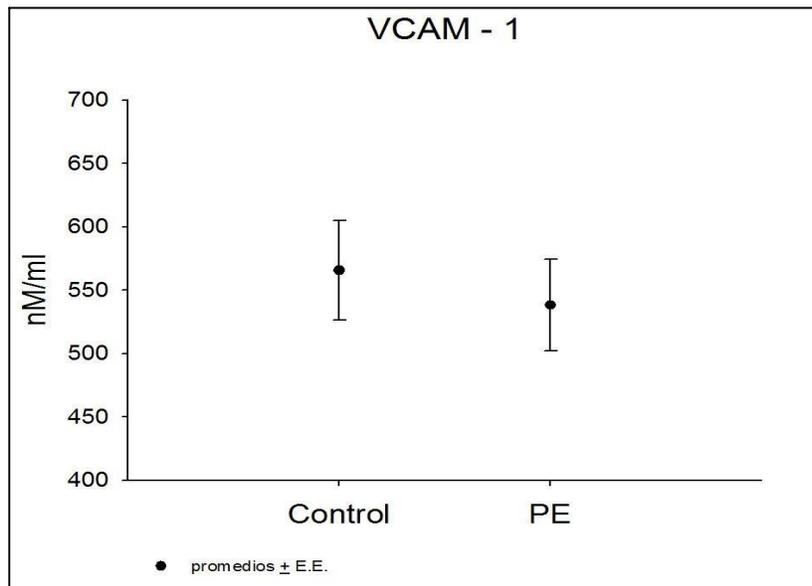


Fig. 14. En la figura se grafican los promedios \pm E.E. de los grupos control y PE para la variable VCAM-1.

8.3 Variables bioquímicas de angiogénesis

Los resultados para estas variables se presentan a continuación en la figura 15. Los promedios de sFlt1 en plasma para los grupos de mujeres sanas y con PE fueron $1176,44 \pm 131,61$ nM/ml y $1846,05 \pm 222,30$ nM/ml respectivamente. Entre estos se estableció diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Mientras que el promedio para PlGF del grupo control fue $29,56 \pm 4,28$ nM/ml y para el grupo de preeclámpticas fue $22,56 \pm 4,74$ nM/ml (Fig. 15-16). Entre los dos últimos valores no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$).

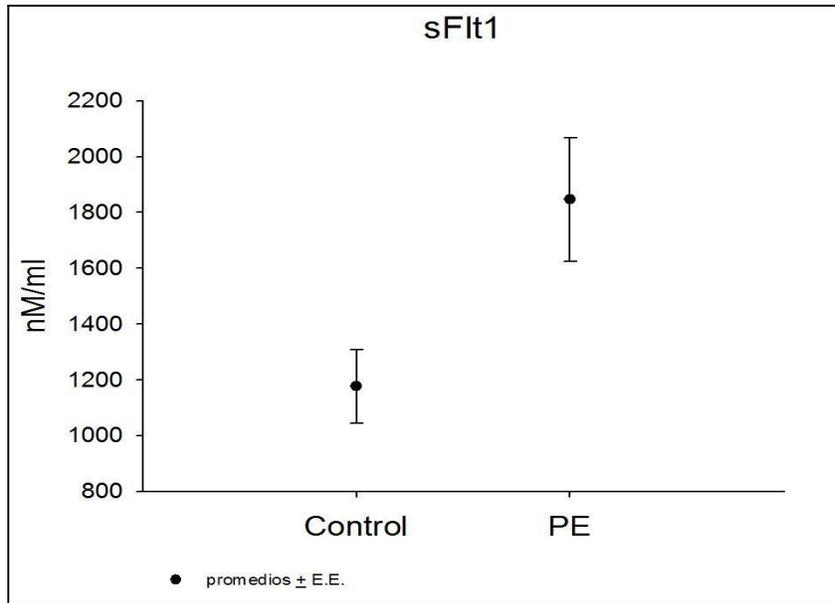


Fig. 16. En la figura se grafican los promedios \pm E.E. de los grupos control y PE para la variable sFlt1.

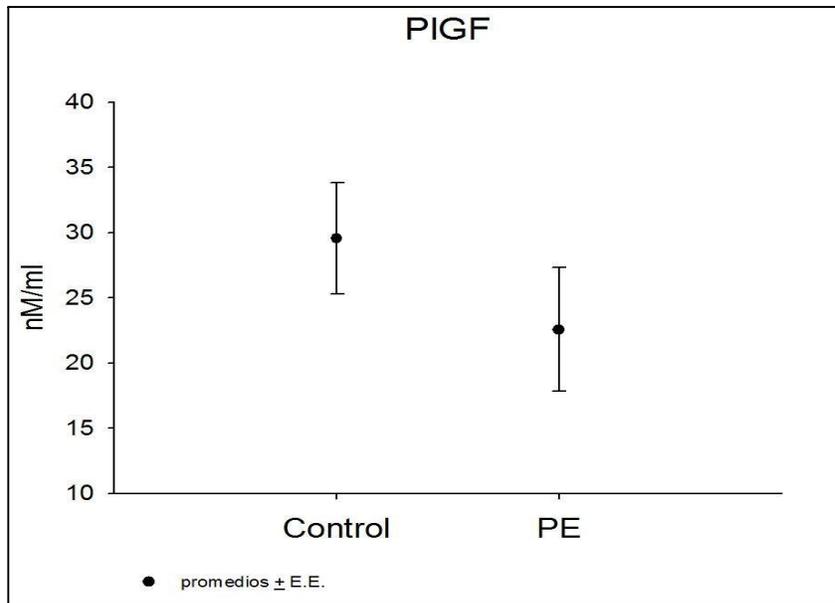


Fig. 15. En la figura se grafican los promedios \pm E.E. de los grupos control y PE para la variable Plgf.

Se sometieron los datos obtenidos a una prueba de t para establecer asociación entre los marcadores medidos y PE ($p \leq 0,05$). Los resultados de esta prueba se resumen en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Estadística descriptiva de las variables estimadoras de estrés oxidativo medidas (media \pm error estándar) por grupos (control; preeclámpticas) y resultados de prueba de t de Student (t y p).

Marcador	Media \pm E.E. control	Media \pm E.E. PE	t	p
MDA	1,55 \pm 0,2	1,97 \pm 0,39	-0,98	0,338
FRAP	356,95 \pm 23,77	350,97 \pm 24,29	0,18	0,861
Ac. Urico	4,2 \pm 0,32	4,13 \pm 0,4	0,14	0,888

Se deduce de los resultados obtenidos, que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre las medias de las variables expuestas en tabla 1 entre los grupos control y PE medidos a esta edad gestacional.

Tabla 2. Estadística descriptiva de las variables estimadoras de disfunción endotelial medidas (media \pm error estándar) por grupos (control; preeclámpticas) y resultados de prueba de t de Student (t y p).

Marcador	Media \pm E.E. control	Media \pm E.E. PE	t	p
PAI-1/PAI-2	4,04 \pm 0,83	2,87 \pm 0,47	1,35	0,185
ICAM-1	222,91 \pm 16,72	239,31 \pm 13,62	-0,76	0,454
VCAM-1	565,40 \pm 39,25	538,16 \pm 35,96	0,51	0,613

De los resultados mostrados en la tabla número 2, se deduce que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre las medias de las variables medidas entre los grupos control y preeclámpticas medidos a esta edad gestacional.

Tabla 3. Estadística descriptiva de las variables estimadoras de angiogénesis medidas (media \pm error estándar) por grupos (control; preeclámpticas) y resultados de prueba de t de Student (t y p).

Marcador	Media \pm E.E. control	Media \pm E.E. PE	t	p
sFlt1	1176,44 \pm 131,61	1846,05 \pm 222,30	-2,54	0,016
Plgf	29,56 \pm 4,28	22,56 \pm 4,74	1,10	0,278

De la tabla se desprende que el promedio para sFlt1 del grupo de pacientes con PE (1846,05 \pm 222,30) es estadísticamente diferente del grupo control (1176,44 \pm 131,61) ($p = 0,016$). De esto se deduce que existe asociación entre la concentración plasmática de esta variable y la presentación de la enfermedad. Para la concentración plasmática de Plgf no se encontró diferencias significativas entre sus promedios a esta edad gestacional.

Dada la diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de los niveles séricos de sFlt1 de los dos grupos (control y PE), se realizó una prueba de correlación de Pearson entre sFlt1 y las otras variables medidas. Los resultados respectivos se expresan en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de prueba correlación de Pearson entre sFlt1 y las demás variables medidas ($p \leq 0,05$).

	SFlt1 (r)	p
sFlt1	1	-
MDA	-0,19	0,320
FRAP	-0,56	0,002
Ac. Urico	-0,12	0,530
Plgf	-0,03	0,870
ICAM-1	-0,11	0,590
VCAM-1	-0,21	0,280
PAI-1/PAI-2	-0,08	0,460

De los resultados obtenidos se desprende que al aumentar los niveles séricos de sFlt1, los niveles séricos de FRAP disminuyen en la razón que indica el coeficiente de correlación obtenido ($r = -0,56$; $p = 0,002$). Las demás variables no presentan correlación estadísticamente válida medidas en este periodo de tiempo.

9 DISCUSIÓN

En este estudio se buscó la relación entre algunas variables sanguíneas, consideradas importantes en la fisiopatología de la PE, entre si y con la presentación de la enfermedad. Así se analizaron variables relacionadas al estrés oxidativo (capacidad antioxidante del plasma, ácido úrico y malondialdehído), que según lo exponen Redman y Sargent en sus estudios (2000 y 2005) podrían ser los factores desencadenantes de la patología. También se analizaron variables relacionadas a la disfunción endotelial (relación PAI1/PAI2, ICAM-1, VCAM-1), que según varios autores está presente en la patología, sin estar claro aún si es una causa o una consecuencia de la PE (Higgins *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004; Maynard *et al.*, 2005). Además, se analizaron variables relacionadas con el proceso de angiogénesis (sFlt1, PlGF), principalmente el que se produce en la placenta en condiciones normales del embarazo a partir de las 20 semanas de gestación, dirigido a suplir las demandas de un feto en desarrollo.

El aumento de las especies reactivas de oxígeno por sobre las defensas antioxidantes tanto endógenas como exógenas, trae como consecuencia daño sobre las biomoléculas, siendo los fosfolípidos de membrana los más susceptibles. El daño oxidativo producido sobre lípidos, conocido como lipoperoxidación, se puede conocer, mediante la medición de biomarcadores presentes en el glóbulo rojo o en plasma, como el malondialdehído (MDA) y medición de niveles plasmáticos de F₂-isoprostanos. Así en este estudio se utilizó la medición de MDA plasmático por el método de HPLC para estimar el daño biomolecular directo sobre las membranas plasmáticas producido por la acción de los radicales libres. A este respecto, como se puede apreciar en los resultados de nuestras mediciones, los promedios de los grupos control y PE no difieren entre si estadísticamente hablando, lo que coincide con los hallazgos encontrados por varios autores en sus estudios acerca del tema (Bowen *et al.*, 2001; Diedrich *et al.*, 2001; Regan *et al.*, 2001 y Lurba *et al.*, 2004). Sin embargo, existen numerosos estudios en que sí se presenta una diferencia significativa entre los promedios de los grupos, con lo cual se logra establecer una asociación cuantitativa entre la variable medida y la presentación de la enfermedad. En resumen, con respecto a la medición de malondialdehído en plasma

como variable asociada a la presentación de PE se encontró resultados contradictorios con numerosos estudios a favor de la asociación y otros que no encuentran diferencias significativas (Gratacos *et al.*, 1998; Takacs *et al.*, 2001; Yoneyama *et al.*, 2002; Aydin *et al.*, 2004; Moretti *et al.*, 2004 y Atamer *et al.*, 2005). Se piensa que esto se puede deber a la medición temprana de la variable en cuestión, dado que entre las semanas de gestación que se extrajeron las muestras sanguíneas (11-14) aun el feto no inicia el periodo de mayor necesidad de oxígeno, el que si se incrementa a partir de la semana 20 aproximadamente, y más aun durante el último tercio de gestación.

Además, se utilizó la medición de la capacidad antioxidante del plasma por el método FRAP para establecer una relación indirecta entre estas sustancias antioxidantes del plasma con las especies reactivas de oxígeno. A este los promedios del grupo de mujeres con PE y del grupo control no presentaron diferencias significativas. Con respecto a la determinación de ácido úrico se encontró levemente más alto en las mujeres del grupo control, lo cual se contradice con los hallazgos de Walker (2000), quien propone que en las preeclámpticas disminuye la excreción renal de ácido úrico y, por lo tanto debería encontrarse aumentado en éstas. Es posible que esta diferencia en los resultados entre otros autores y nuestro estudio este dada por la misma razón citada en el párrafo anterior, ya que todos los otros autores han realizado mediciones desde el segundo tercio de gestación en adelante, incluso en mujeres que ya cursaban con la patología, mientras que en el presente estudio las muestras fueron tomadas precozmente y evidentemente en esta etapa aún no se produce la disminución de la excreción renal de ácido úrico que menciona Walker (2000).

Por otro lado, abordando la patología desde su patogenia vascular, se midieron variables para estimar el grado de disfunción endotelial producida en las pacientes (ICAM-1, VCAM-1 y relación PAI1/PAI2). A este respecto, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y preeclámpticas, por lo que se deduce que no existiría asociación entre las variables medidas en este periodo de la gestación y la presentación de la patología. Sin embargo, como en la mayoría de aspectos fisiopatológicos de la PE, hay contradicciones entre distintos autores, algunos que relacionan las variables

con la patología y otros que no (Takacs *et al.*, 2001; Krauss *et al.*, 2002; Freeman *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006 y Marks *et al.*, 2006). Pero se debe hacer la salvedad que este estudio abarca la gestación en una etapa mucho más temprana que los demás autores, ya que el objetivo es predecir la enfermedad y no evaluar las variables una vez desencadenada la patología. Es así que mientras en el presente estudio se midieron las variables entre las 11 y 14 semanas de gestación, cuando aún no se ha manifestado la enfermedad, los demás autores citados lo hacen desde la semana 20 en adelante, incluso después de la presentación de la patología. Siempre desde el punto de vista de la disfunción endotelial en la PE, se midió la relación PAI1/PAI2, la que resultó sin diferencias significativas entre los dos grupos. En un estudio similar, Estelles *et al.* (1989), encontraron que los valores plasmáticos de PAI1 se encontraban incrementados, mientras que los niveles de PAI2 se encontraban normales, medidos en relación a los valores obtenidos en embarazadas normales. De esto se puede inferir que la relación PAI1/PAI2 aumentó en las mujeres con PE. A diferencia del estudio objeto de la presente tesis, Estelles *et al.* (1989), seleccionó solo preeclámpticas severas en el último tercio de gestación, lo que podría explicar la diferencia de resultados presentada entre su estudio y el presente, que fue realizado en el primer tercio de gestación. Con esto se podría decir que se hace necesario un estudio que abarque distintos estados de gestación para intentar dilucidar en que punto estas variables comienzan a cambiar de manera de poder relacionarlas con la enfermedad.

Resultó de gran interés la determinación de sFlt1 y PIGF, dado que la primera bloquea la interacción de VEGF y PIGF con el endotelio, disminuyendo así la actividad angiogénica y por consiguiente produciendo una pobre placentación. Esto se reflejó claramente en los resultados obtenidos en el análisis estadístico con respecto a sFlt1, ya que se estableció una diferencia estadísticamente significativa entre el promedio de los 2 grupos estudiados, como se dijo en el ítem de resultados de la presente tesis. Por otro lado, no se encontró diferencia estadísticamente significativa para el caso de PIGF. Los resultados obtenidos para sFlt1 difieren con los obtenidos por diversos autores en etapas más avanzadas de gestación (Polliotti *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Karumanchi y Lam, 2004; Maynard *et al.*, 2005 y Levine *et al.*, 2006), pero los resultados del presente estudio son los registrados más precozmente hasta este momento, lo que podría implicar una utilidad

predictiva y posteriormente terapéutica para la patología. Es por ello que este estudio se continuará en el futuro, utilizando la variable asociada a la enfermedad (sFlt1).

Además será interesante estudiar dentro del mismo contexto la proteína PP-13, que se asoció recientemente a la enfermedad (Nicolaidis *et al.*, 2006) y cuyo test de ELISA no estuvo disponible comercialmente para este estudio. Por otro lado en la continuación de esta investigación esta contemplado incorporar una variable terapéutica correspondiente a sustancias antioxidantes.

10 CONCLUSION

Como ya se ha expuesto en la presente memoria de título, existen numerosos estudios que relacionan las variables medidas con la presentación de PE. Sin embargo, estas asociaciones se establecen en su mayoría desde el segundo tercio de gestación en adelante. Se ha logrado establecer la asociación entre los niveles de sFlt plasmáticos y la presentación de la enfermedad, en una etapa temprana de gestación (12 semanas). Esto condice con las teorías que indican la génesis vascular de la patología. Sin embargo, no se pueden descartar que las otras variables relacionadas con estrés oxidativo, disfunción endotelial y angiogénesis estén relacionadas con la patogenia de la enfermedad, más aún cuando las evidencias apuntan fuertemente a que antes de la disfunción endotelial y la disminución de angiogénesis existe un estrés oxidativo que afecta la placenta en su formación. A pesar de que las asociaciones obtenidas entre las variables medidas y PE en etapas avanzadas de la gestación son estadísticamente válidas, no han servido como predictores con la anticipación suficiente para lograr implementar un tratamiento efectivo y temprano para la patología, debido a lo avanzado de la gestación y del mecanismo que da origen a la PE al momento de pesquisar dicha asociación.

Con este estudio se pudo establecer que de las variables medidas precozmente la única que se encuentra asociada a la presentación de la enfermedad en este estado de gestación precoz es la sFlt1, lo cual deja abierto el tema a nuevos estudios que se realicen en etapas tempranas de gestación y que comprendan tratamientos posibles de realizar en una etapa temprana con miras a la prevención de la enfermedad.

11 BIBLIOGRAFÍA

- ♦ **AKSOY, H.; TAYSI, S.; ALTINKAYNAK, K.; BAKAN, E.; BAKAN, N. y KUMTEPE, Y.** 2003. Antioxidant potencial and transferrin, ceruloplasmin, and lipid peroxidation levels in women with preeclampsia. *J. Investing. Med.* 51: 284-287.
- ♦ **ARNGRIMSSON, R.; CONNOR, J.; GEIRSSON, R.; BRENECKE, S. y COOPER, D.** 1994. Is genetic susceptibility for pre-eclampsia and eclampsia associated with implantation failure and fetal demise?. *Lancet.* 343: 1643-1644.
- ♦ **ATAMER, Y.; KOCYIGIT, Y. y YOKUS, B.** 2005. Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia. *Eur. J. Obstet Gynecol Reprod. Biol.* 119: 60-66.
- ♦ **AURE, G.; LARES, M. y OBREGON, O.** 2005. Evaluación de molécula-1 de adhesión vascular como indicador de activación endotelial en preeclampsia en la semana 20 de gestación. *R.F.M.* 28: 162-169.
- ♦ **AYDIN, S.; BENIAN, A. y MADAZLI, R.** 2004. Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectine, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 113: 21-25.
- ♦ **BENZIE I. y STRAIN J.** 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70-76.
- ♦ **BOWEN, R.; MOODLEY, J. y DUTTON, M.** 2001. Oxidative stress in preeclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 80: 719-725.
- ♦ **BROUGHTON, P.** 1999. What is the place of genetics in the pathogenesis of preeclampsia?. *Biol. Neonato.* 76: 325-330.

- ♦ **BROWN, M.** 1995. The physiology of pre-eclampsia. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22: 781-791.

- ♦ **CAMPBELL, D.** 1986. Clinical experiences and a review of chlormethiazole in the management of pre-eclampsia and eclampsia. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* 329: 175-181.

- ♦ **CHAIWORAPONGSA, T.; ROMERO, R.; YOSHIMATSU, J.; ESPINOZA, J.; KIM, Y.; PARK, K.; KALACHE, K.; EDWIN, S.; BUJOLD, E. y GOMEZ, R.** 2002. Soluble adhesion molecule profile in normal pregnancy and pre-eclampsia. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 12: 19-27.

- ♦ **CHAMBERS, J.; FUSI, L.; MALIK, I.; HASKARD, D.; DE SWIET, M. y KOONER, J.** 2001. Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia. *J.A.M.A.* 285: 1607-1612.

- ♦ **CHAMY, V.; LEPE, J.; CATALAN, A.; RETAMAL, D.; ESCOBAR, J. y MADRID, E.** 2006. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biol. Res.* 39: 229-236.

- ♦ **CHAN, A. y GERSCOVICH, E.** 1999. Imaging of subcapsular hepatic and renal hematomas in pregnancy complicated by preeclampsia and the HELLP syndrome. *J. Clin. Ultrasound.* 27: 35-40.

- ♦ **CHEN, Q.; STONE, P.; McCOWAN, L. y CHAMLEY, L.** 2006. Phagocytosis of necrotic but not apoptotic trophoblast induces endothelial cell activation. *Hypertension* 47: 116-121.

- ♦ **CLAUSEN, T.; DJUROVIC, S.; BROSSTAD, F.; BERG, K. y HENRIKSEN, T.** 2000. Altered circulating levels of adhesion molecules at 18 weeks' gestation among

women with eventual preeclampsia: indicators of disturbed placentation in absence of evidence of endothelial dysfunction?. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182: 321-325.

- ♦ **COKELL, A. y POSTON, L.** 1997. Flow-mediated vasodilatation is enhanced in normal pregnancy but reduced en preeclampsia. *Hypertension* 30: 247-51.
- ♦ **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.
- ♦ **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.
- ♦ **DULEY, L.; HENDERSON-SMART, D.; MEHER, S. y KING J.** 2007. Antiplatelet agents for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2: CD004659.
- ♦ **DVORAK, H.** 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 20: 4368-4380.
- ♦ **ESTELLES, A.; GILABERT, J.; AZNAR, J.; LOSKUTOFF, D. y SCHLEEF, R.** 1989. Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen inhibitors in normal pregnancy and patients with severe preeclampsia. *Blood* 74: 1332-1338.
- ♦ **FREEMAN, D.; MCMANUS, F.; BROWN, E.; CHERRY, L.; NORRIE, J.; RAMSAY, J.; CLARK, P.; WALKER, I.; SATTAR, N. y GREER, I.** 2004. Short and long term changes in plasma inflammatory markers associated with preeclampsia. *Hypertension* 44: 708-714.

- ♦ **FRIEDMAN, S.; SCHIFF, E.; EMEIS, J.; DEKKER, A. y SIBAI, B .** 1995. Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe preeclampsia, *Am. Obstet. Gynecol.* 172: 202-203.

- ♦ **GERMAIN, A.** 2001. ¿Podemos Prevenir Eficazmente la Preeclampsia?. [Online]<www.medwave.cl/congresos/interamericanohipertension/4.act?tpl=im_ficha_congresos.tpl> Medwave, Edición septiembre.24/03/2007.

- ♦ **GOMEZ, E.** 1999. Trastornos hipertensivos durante el embarazo. *Rev. Cubana Obstet. Ginecol.* 26: 99-114.

- ♦ **GRATACOS, E.; CASALS, E. y DEULOFEU, R.** 1998. Lipid and vitamins E patterns in pregnant women with different types of hipertension in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178: 1072-1076.

- ♦ **GUPTA, S.; AGARWAL, A. y SHARMA, R.** 2005. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet. Gynecol. Surv.* 60: 807-16.

- ♦ **GUTTERIDGE, J.M. y HALLIWELL, B.** 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899:136-147.

- ♦ **HE, H.; VENEMA, V.; GU, X.; VENEMA, R.; MARRERO, M. y CALDWEL, R.** 1999. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src, *J. Biol. Chem.* 274: 25130-25135.

- ♦ **HERRERA, J.; CÁCERES, D.; ARÉVALO, C.; GRACIA, B. y HURTADO, H.** 1996. Calcio-ácido linoleico en la prevención de la preeclampsia y la hipertensión arterial inducida por el embarazo. *Colombia Médica.* 27: 125-33.

- ♦ **HLADUNEWICH, M.; KARUMANCHI, S. y LAFAYETTE, R.** 2007. pathophysiology of the clinical manifestations of preeclampsia. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2: 543-549.

- ♦ **HIGGINS, J.; PAPAYIANNI, A.; BRADY, H.; DARLING, M. y WALSHE, J.** 1998. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 in pre-eclampsia, gestational hypertension, and normal pregnancy: evidence of selective dysregulation of vascular cell adhesion molecule-1 homeostasis in pre-eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 179: 464-469.

- ♦ **HUNG, J.; NG, H.; PAN, Y.; YANG, M. y SHU, L** 1999. Color doppler waveforms of maternal cervical internal carotid arteries in normotensive and preeclamptic gravidas. *J. Ultrasound. Med.* 18: 125-133.

- ♦ **KARUMANCHI, S. y LAM, C.** 2004. Mécanismes impliqués dans la pré-éclampsie: progrès récents. In: Lesavre P, Druke T, Legendre P, Niaudet P, editors. *Actualités Néphrologiques de l'Hopital Necker Jean Hamburger.* Paris: Flammarion Médecine-Sciences: 167-176.

- ♦ **KHONG, T.; DE WOLF, F.; ROBERTSON, W. y BROSENS, I.** 1986. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 93: 1049-1059.

- ♦ **KHRAB, S.** 2000. Total free radical trapping antioxidant potential in pre-eclampsia. *International J. Gynecol. Obstet.* 69: 23-26.

- ♦ **KIM, S.; RYU, H.; YANG, J.; KIM, H.; LIM, H.; SHIN, J. WOO, H., PARK, S.; KIM, Y.; KIM, J. y CHO, E.** 2004. Maternal serum levels of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in Preeclampsia. *J. Korean Med. Sci.* 19: 688-692.

- ♦ **KRAUSS, T.; KUHN, W.; LACOMA, C. y AGUSTIN, H.** 1997. Circulating endothelial cell adhesion molecules as diagnostic markers for the early identification of pregnant women at risk for development of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177: 443-449.

- ♦ **KRAUSS, T.; EMONS, G.; KUHN, W. y AGUNTIN, H.** 2002. Predictive value of routine circulating soluble endothelial cell adhesion molecule measurements during pregnancy. *Clin. Chem.* 48: 91418–91425.

- ♦ **LALA, P. y CHAKRABORTY, C.** 2003. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to Pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta.* 24. 575–587.

- ♦ **LEE, B.; HONG, Y.; LEE, K.; KIM, W.; CHANG, N.; PARK, E.; PARK, H. y HANN, H.** 2004. Influence of maternal serum levels of vitamins C and E during the second trimester on birth weight and length. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58: 1365–1371.

- ♦ **LEVINE, R.; LAM, C.; QIAN, C.; YU, K.; MAYNARD, S.; SACHS, B.; SIBAI, B.; EPSTEIN, F.; ROMERO, R.; THADHANI, R. y KARUMANCHI, S.** 2006. CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 355: 992-1005.

- ♦ **LURBA, E.; GRATACOS, E. y MARTIN-GALLAN, P.** 2004. A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy. *Free Radic. Biol. Med.* 37: 557-570.

- ♦ **LYALL, F.; HAYMAN, R.; ASHWORTH, J.; DUFFIE, E. y BAKER, P.** 1999. Relationship of cell adhesion molecule expression to endothelium-dependent relaxation in normal pregnancy and pregnancies complicated with preeclampsia or fetal growth restriction. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 6: 196-201.

- ♦ **MARKS, L.; ZAMUDIO, S.; COUSINS, F.; DUFFIE, E. y LYALL, F.** 2006. Endothelial activation and cell adhesion molecule concentrations in pregnant women living at high altitude. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 13: 399-403.

- ♦ **MARTÍN, J.; MESEGUER, M.; CABALLERO-CAMPO P.; HERRER R.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. y SIMÓN, C.** 1999. Expression of ezrin, a membrane-cytoskeletal linker, in human endometrial epithelial cells. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 6: 666.

- ♦ **MAYNARD, S.; VENKATESHA, S.; THADHANI, R y KARUMANCHI, S.** 2005. Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. *Pediatr Res.* 57: 1R-7R.

- ♦ **MÉNDEZ, F.; SALCEDA, M.; CASTILLO, M.; GARCÍA, O. y SARABIA, N.** 2000. Valor pronóstico del ácido úrico en pacientes preeclámpticas. *Bol. Clin. Hosp. Infant. Edo. Son;* 17: 6-9.

- ♦ **MILLS J.; DERSIMONIAN, R.; RAYMOND E.; MORROW J.; ROBERTS L. y CLEMENS, J.** 1999. Prostacyclin and thromboxane changes predating clinical onset of preeclampsia: a multicenter prospective study. *J.A.M.A.* 282: 356-362.

- ♦ **MORETTI, M.; PHILLIPS, M. y ABOUZEID, A.** 2004. Increased breath markers of oxidative stress in normal pregnancy and preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190: 1184-1190.

- ♦ **MUTTER, W. y KARUMANCHI, S.** 2007. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvascular research.* *Microvasc. Res.* (Article in Press).

- ♦ **NAQVI, R.; AKHTAR, F.; AHMED, E.; SHAIKH, R.; AHMED, Z.; NAQVI, A. y RIZVI, A.** 1996. Acute renal failure of obstetrical origin during 1994 at one center. *Ren. Fail.* 18: 681-683.

- ♦ **NICOLAIDES, K.; BINDRA, R.; TURAN, O.; CHEFETZ, I.; SAMMAR, M.; MEIRI, H.; TAL, J. y CUCKLE, S.** 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.

- ♦ **PARRA, M.; RODRIGO, R.; BARJA, P.; BOSCO, C.; FERNANDEZ, V; MUÑOZ, H. y SOTO-CHACON, E.** 2004. 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.; LUYTEN, C.; VERCRUYSSSE, L. y VAN ASSCHE, F.** 1996. Attachment and differentiation in vitro of trophoblast from normal and preeclamptic human placentas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175: 30-36.

- ♦ **POLLIOTTI B.; FRAY A.; SALLER D.; MOONEY, R.; COX, C. y MILLER R.** 2003. Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 101: 1266-1274.

- ♦ **POSTON, L.; BRILEY, A.; SEED, P.; KELLY, F. y SHENNAN, A.** 2006. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia: randomised placebo-controlled trial. *The Lancet.* 367: 1145-1154.

- ♦ **POSTON, L.** 2006. Endothelial dysfunction in Pre-eclampsia. *Pharmacol. Rep.* 58: 69-74.

- ♦ **QIAO, C.; WANG, C.; SHANG, T. y LIN, Q.** 2005. Clinical significance of KiSS-1 and matrix metalloproteinase-9 expression in trophoblasts of women with preeclampsia and their relation to perinatal outcome of neonates. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.*40: 585-590.

- ♦ **REDMAN, C.; SACKS, G. y SARGENT, I.**1999. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180: 499–506.

- ♦ **REDMAN, C. y SARGENT, I.** 2000. Placental debris, oxidative stress and preeclampsia. *Placenta.* 21: 597-602.

- ♦ **REDMAN C. y SARGENT, I.** 2005.Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science* 308: 1592-1594.

- ♦ **REGAN, C.; LEVINE, R. y BAIRD, D.** 2001. No evidence for lipid peroxidation in severe preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185: 572-578.

- ♦ **ROBERTS, J.** 1998. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 16: 5-15.

- ♦ **ROBERTS, J.; BALK, J.; BODNAR, L. BELIZAN, J.; BERGEL, E. y MARTINEZ, A.** 2003. Nutrien involvement in preeclampsia. *J. Nutr.* 133: 1684-1692.

- ♦ **RODRIGO, R. y RIVERA, G.** 2003. Papel del estrés oxidativo y de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles (Monografía). Laboratorio de fisiopatología renal; programa de farmacología molecular y clínica; instituto de ciencias biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. pp. 1-27.

- ♦ **RODRIGUEZ, J.; MENENDEZ, J. y TRUJILLO, Y.** 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Cub. Med. Mil.* 30: 15-20.

- ♦ **SAPHIER, C. y REPKE, J.** 1998. Hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP) syndrome: a review of diagnosis and management. *Semin. Perinatol.* 22: 118-133.

- ♦ **SERRANO, N.; PEZ, M.; MARTINEZ, M.; CASAS, J.; GIL, L. y NAVARRO, A.** 2002. Bases genéticas y moleculares de la preeclampsia. *MedUNAB.* 5: 185-192.

- ♦ **SNEDECOR, G. y COCHRAN, W.** 1986. *Statistical method.* 7ª edition. The Iowa state university press. 503 pp. ISBN: 8138-1560-6.

- ♦ **STRATTA, P.; BESSO, L.; CANAVESE, C.; GRILL, A.; TODROS, T.; BENEDETTO, C.; HOLLO, S y SEGOLONI, G.** 1996. Is pregnancy-related acute renal failure a disappearing clinical entity?. *Ren. Fail.* 18: 575-584.

- ♦ **TAKACS, P.; KAUMA, S. y SHOLLEY, M.** 2001. Increased circulating lipid peroxides in severe preeclampsia activate NF-KappaB and upregulate ICAM-1 in vascular endothelial cells. *F.A.S.E.B. J.* 15: 279-281.

- ♦ **VELASQUEZ, M.; PRIETO, B. y CONTRERAS, R.** 2004. El envejecimiento y los radicales libre. *Ciencias.* 75: 36-43.

- ♦ **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. Nutr.* 133: 1606-1625.

- ♦ **WALKER, J.** 1993. Day-care obstetrics. *Br. J. Hosp. Med.* 50: 225–226.

- ♦ **WALKER, J.** 2000. Pre-eclampsia. *The Lancet* 356: 1260–1265.

- ♦ **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.

- ♦ **YANG, J.; HAWORTH, L.; SHERRY, R.; HWU, P.; SCHWARTZENTRUBER D. y TOPALIAN, S.** 2003. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N. Engl. J. Med.* 349: 427-434.

- ♦ **YONEYAMA, Y.; SAWA, R. y SUZUKI, S.** 2002. Relationship between plasma malondialdehyde levels and adenosine deaminase activities in preeclampsia. *Clin. Chim. Acta.* 322: 169-173.

- ♦ **YOUNG, I. y TRIMBLE, E.** 1991. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Ann. Clin. Biochem.* 28: 504-508

- ♦ **ZIMMERMAN, G.; ALBERTINE, K.; CARVETH ,H.; GILL ,E.; GRISSOM ,C.; ORME, J.; PRESCOTT, S.; TOPHAM, M.; HOIDAL, J.; IMAIZUMI, T.; MALONEY, C.; MCINTYRE, T. y MICHAEL, T.** 1999. Endothelial Activation in ARDS. University of Utah Special Center of Research in ARDS, University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City, UT. <www.chestjournal.org/cgi/content/full/116/sup_pl_1/18S> [ON LINE]. 20/05/2006.

- ♦ **ZUSTERZEEL, P.; WANTEN, G.; PETERS, W.; MERKUS, H. y STEEGERS, E.** 2001. Neutrophil oxygen radical production in pre-eclampsia with HELLP syndrome. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Biol.* 99: 213-218.