



**Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla**

Centro Interdisciplinario de Posgrados

Investigación y Consultoría

Departamento de Ciencias de la Salud

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

ANÁLISIS PRELIMINAR DE FACTORES  
SOLUBLES COMO MARCADORES DE  
EXPRESIÓN GÉNICA EN PACIENTES CON  
PREECLAMPSIA

Tesis que para obtener el Grado de Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta

María Magdalena Tinajero Esquivel

**Puebla, México.**

**26 de Noviembre de 2010**



**UPAEP – Secretaría General**

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

**Tesis Digitales Restricciones de uso:**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

***A mis padres, con toda mi admiración y respeto, mi eterno agradecimiento por su apoyo incondicional a través de mi recorrido por este mundo.***

***A Karol, por ser el motor de vida que me impulsa a seguir adelante.***

***A ti, en espera de tu llegada...***

# ***ÍNDICE GENERAL***

<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5-6</b>
<b>CAPÍTULO 1. PROPÓSITO Y ORGANIZACIÓN.....</b>	<b>7-8</b>
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
1.2 PROPÓSITO DE LA INVESTIGACIÓN	
1.3 OBJETIVO GENERAL	
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
1.5 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	
<b>CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>9-23</b>
2.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA PREECLAMPSIA	
2.1.1 MECANISMOS ANGIOGÉNICOS Y PLACENTACIÓN	
2.1.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	
2.2 ASPECTOS HEREDITARIOS DE LA PREECLAMPSIA	
2.2.1 GENES Y PREECLAMPSIA	
2.3 INMUNOLOGÍA Y PREECLAMPSIA	
2.4 ESTUDIOS PREDICTIVOS PARA PREECLAMPSIA	
<b>CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>24-28</b>
3.1 ENFOQUE DE LA INVESTIGACIÓN	
3.2 HIPÓTESIS	
3.3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	
3.4 SELECCIÓN DE LA MUESTRA	
3.4.1 TAMAÑO DE LA MUESTRA	
3.4.2 TIPO DE MUESTREO	
3.4.3 SELECCIÓN DE LA MUESTRA	
3.5 RECOLECCIÓN DE DATOS	
3.5.1 SELECCIÓN DEL INSTRUMENTO	
3.5.2 APLICACIÓN DEL INSTRUMENTO	
3.6 ANÁLISIS DE DATOS	
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....</b>	<b>29-32</b>
<b>CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>34-41</b>

## RESUMEN

La preeclampsia es la primera causa de mortalidad materna en México, es la primera causa de mortalidad en Puebla, México, la mayor causa de morbilidad materna y perinatal y además tiene consecuencias médicas y sociales con impacto económico de gran relevancia. La etiología de la preeclampsia permanece incierta y los mecanismos patogénéticos que tratan de explicarla son debatidos con diversas hipótesis que incluyen la predisposición genética y existen muchas teorías acerca de los posibles genes candidatos. Un hecho importante es que la preeclampsia ocurre solo en presencia de la placenta y remite dramáticamente después del alumbramiento. Las vías moleculares responsables de la angiogénesis normal y del remodelamiento vascular en la placenta todavía no son bien comprendidas. Recientemente se ha reportado que la falla en la regulación del gen Flt-1 con aumento en el sFlt-1 en mujeres embarazadas puede contribuir a la etiología de la preeclampsia.

Los resultados de este estudio permitirán determinar si sFlt-1 puede ser un marcador de expresión génica en pacientes con preeclampsia y esto favorecerá el diagnóstico oportuno así como el establecimiento de nuevos tratamientos para disminuir la morbilidad y mortalidad en estas pacientes

## **ABSTRACT**

Preeclampsia is the first cause of maternal mortality in Mexico, it is the first cause of maternal mortality in Puebla, Mexico, the major cause of maternal and perinatal morbidity and it has social and medical consequences with a relevant economical impact. The etiology of preeclampsia remains unclear and the underlying pathogenetic mechanisms are much debated with various hypotheses including genetic predisposition. There are many theories about the possible candidate genes responsible of preeclampsia. A very important fact is that preeclampsia occurs only in the presence of a placenta and remits dramatically after the placenta has been delivered. The molecular pathways responsible for normal angiogenesis and vascular remodeling in the placenta are still poorly understood. Recently, it was reported that the misregulation of Flt-1 gene with increase in sFlt-1 in pregnant women can contribute to the etiology of preeclampsia.

The results of this study will be permit to determine if sFlt-1 may be used as a marker of gene expression in patients with preeclampsia. With this result it will be possible to diminish the morbidity and mortality in patients with preeclampsia and in their babies through the early diagnosis and the implementation of new approaches in the management of preeclampsia with the consequent impact in the economic indicators.

## INTRODUCCIÓN

El periodo de tiempo que transcurre desde que la mujer sabe que está embarazada hasta el momento del parto es una de las transiciones fisiológicas y psicológicas más importantes que experimenta a lo largo de su vida. Durante estos meses, el obstetra, el médico familiar o la partera empírica juegan un papel más importante que el de procuradores de salud. Su papel durante este periodo de tiempo no incluye exclusivamente el cuidado de la salud de la madre y del feto, la conducta intervencionista y la influencia sobre los cambios del estilo de vida sino también la ayuda y apoyo a estas pacientes que tienen cambios psicológicos propios de la gestación.

Los trastornos hipertensivos son la causa médica más común de complicaciones del embarazo y afectan el 5-10% de todas las gestaciones; sin embargo, en países en vías de desarrollo esta cifra es tres veces mayor. Estos trastornos son responsables de aproximadamente el 16% de la mortalidad materna en países desarrollados. La clasificación de los trastornos hipertensivos en el embarazo incluye la hipertensión crónica, la hipertensión gestacional y la preeclampsia. Aproximadamente 30% de los trastornos hipertensivos del embarazo son debidos a hipertensión gestacional. El espectro de enfermedades oscila desde la presión arterial elevada ligeramente con mínima significancia clínica hasta la hipertensión severa con disfunción multisistémica.

La incidencia de la enfermedad depende de muchos parámetros demográficos, que incluyen edad materna, raza y condiciones médicas asociadas. En el IMSS H.G.R. 36 Puebla, se registran aproximadamente 400 casos de preeclampsia por año. La comprensión del proceso que lleva a la enfermedad y el impacto de los trastornos hipertensivos en el embarazo son de primordial importancia ya que

esos trastornos prevalecen como una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad materna y perinatal a nivel mundial.

## **CAPÍTULO 1. PROPÓSITO Y ORGANIZACIÓN**

### **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La preeclampsia es la segunda causa de muerte materna a nivel mundial y la primera causa de mortalidad materna en nuestro país.

De acuerdo a los reportes de la literatura, el sFlt-1 juega un papel importante en la fisiopatología de la preeclampsia por lo que resulta importante analizar si los factores solubles pueden ser marcadores de interés para el diagnóstico oportuno de preeclampsia disminuyendo así la morbilidad y mortalidad femenina generadas por esta patología. Esto nos lleva a la siguiente pregunta de investigación:

¿El sFlt-1 es un marcador de expresión génica en pacientes con preeclampsia?

### **1.2 PROPÓSITO DE LA INVESTIGACIÓN**

En este trabajo se analiza en forma preliminar si el sFlt-1 es un marcador de expresión génica en pacientes con embarazo complicado con preeclampsia en comparación con pacientes embarazadas sin preeclampsia.

### **1.3 OBJETIVO GENERAL**

Analizar si el sFlt-1 es un marcador de expresión génica en pacientes con preeclampsia.

### **1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Comparar la expresión de sFlt-1 en sangre periférica en pacientes con preeclampsia y en pacientes sin preeclampsia

## **1.5 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

La preeclampsia es un problema de salud pública en nuestro país; es la primera causa mortalidad materna en México con repercusiones médicas y socioeconómicas. Los resultados de este estudio permitirán determinar si Flt-1 es un marcador de expresión génica en pacientes con preeclampsia lo que hará posible disminuir la morbilidad y mortalidad de estas pacientes al poder implementar un diagnóstico oportuno de la enfermedad.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA PREECLAMPSIA**

La preeclampsia es una enfermedad multisistémica compleja definida por la presencia de hipertensión y proteinuria <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>. La comprensión del proceso que lleva a la enfermedad y el impacto de los trastornos hipertensivos en el embarazo son de primordial importancia ya que esos trastornos prevalecen como una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad materna y perinatal a nivel mundial. <sup>(3)</sup>

#### **2.1.1 MECANISMOS ANGIOGÉNICOS Y PLACENTACIÓN**

La placenta es un órgano importante en los embarazos normales, sus células especializadas (citotrofoblasto) se diferencian en varias sub-poblaciones celulares que juegan un papel primordial en la dirección del crecimiento y desarrollo fetales. Una de estas líneas celulares citotrofoblásticas adquiere propiedades semejantes a las de un tumor, dando a estas células la capacidad de invadir la decidua y el miometrio, permitiendo así la relación entre útero y placenta. Estas células también adoptan un fenotipo vascular que les permite penetrar e invadir los vasos uterinos y es este proceso el que permite canalizar la sangre materna hacia el resto de la placenta. En el embarazo complicado por preeclampsia, que está caracterizado por el inicio súbito de hipertensión arterial materna, proteinuria y edema, la invasión citotrofoblástica es escasa y la transformación vascular es incompleta.

Estos hallazgos, junto con evidencias recientes en modelos animales, sugieren que la preeclampsia es un proceso asociado a defectos de placentación, con deficiencia de producción de sustancias vasculogénicas y angiogénicas que

confieren a la circulación materna el potencial para producir al menos la triada principal de los signos clínicos de este síndrome <sup>(4)</sup> <sup>(5)</sup>. Las vías moleculares responsables de la angiogénesis normal y de la remodelación vascular en la placenta aún no están bien estudiadas ni comprendidas completamente. Recientemente se ha reportado que la alteración en la regulación del gen Flt-1 en mujeres embarazadas puede contribuir a la etiología de la preeclampsia. <sup>(6)</sup>

El trofoblasto juega un papel primordial en la implantación y en la placentación. Ambos procesos ocurren como consecuencia de una comunicación estrecha entre los tejidos maternos y los tejidos fetales, favorecida por sus ligandos y receptores de membrana así como por la liberación de hormonas y factores locales. Durante la implantación del blastocisto, comienza la generación de líneas trofoblásticas especializadas, conocidas como trofoblasto veloso y extraveloso y que están determinadas por los intercambios de información entre madre y feto y que terminan con la adhesión del cuerpo placentario a la pared uterina.

La placentación fisiológica se caracteriza por la invasión de las arterias espirales uterinas por las células del trofoblasto extraveloso. Debido a esta invasión, la estructura de las arterias es cambiada por material fibrinoide amorfo y por células trofoblásticas endovasculares. Esta transformación establece un sistema de baja resistencia y de alta capacidad de perfusión de las arterias hacia el espacio intervilloso incluyendo el árbol de vellosidades. La fisiología normal del embarazo depende tanto de la progresión ordenada de los cambios estructurales y funcionales del trofoblasto veloso y extraveloso así como de todos aquellos procesos que conllevan a diferentes tipos de complicaciones de gravedad variable, incluida la pérdida de la gestación y el desarrollo de enfermedades maternas concomitantes.

Lunghi et al <sup>(7)</sup> describieron los mecanismos que regulan la diferenciación, proliferación, migración e invasividad del trofoblasto así como las alteraciones en

estos mecanismos que pueden llevar al desarrollo de condiciones patológicas. Además, con base en la creciente evidencia de que los propios cambios inflamatorios y el balance oxidativo son necesarios para lograr una gestación exitosa, explican los mecanismos a través de los cuales los factores solubles son capaces de influenciar estos procesos y cómo pueden ser de utilidad en la prevención y el tratamiento de los trastornos del embarazo. Por ejemplo, la administración de glucocorticoides antes de la concepción o durante la gestación para preparar y mantener un ambiente adecuado para la implantación, placentación y crecimiento fetal, parece representar una nueva estrategia ante la batalla de la pérdida gestacional, aunque definitivamente son necesarias más investigaciones.

### **2.1.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL**

Evidencias recientes adjudican al estrés oxidativo un papel en la etiología de la preeclampsia. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), particularmente los aniones superóxido, favorecen la activación de células endoteliales a través de diferentes vías. El daño celular inducido por oxidantes genera la activación de la enzima nuclear poli ADP ribosa polimerasa (PARP) que inicia la disfunción endotelial en varias condiciones fisiopatológicas.

IP Crocker et al <sup>(8)</sup> estudiaron y describieron cómo la pérdida de la función endotelial en la preeclampsia es dependiente de la actividad de la PARP: en las arterias del miometrio, la inhibición de la PARP bloquea la disminución de las respuestas dependientes de endotelio después de la exposición a plasma de mujeres con preeclampsia. En cultivos celulares endoteliales, el plasma de mujeres con preeclampsia induce estrés oxidativo medible y provoca un incremento en la actividad de la PARP así como reducción del ATP celular; estos resultados sugieren que la actividad de la PARP juega un papel patogénico importante en el desarrollo de la disfunción endotelial en la preeclampsia y

promueve a la inhibición de la PARP como una terapia potencial para este padecimiento.

Cindrova-Davies et al <sup>(9)</sup> concluyeron que el estrés oxidativo es un potente inductor de la síntesis y liberación placentaria de factores pro-inflamatorios y que la mayoría de estos efectos son mediados a través de la MPAK p38 (proteína cinasa activada por mitógenos) y por las vías del factor nuclear  $\kappa$ B, que pueden ser bloqueadas en forma efectiva por las vitaminas C y E in vitro.

Tjoa et al <sup>(10)</sup> dieron la primera evidencia de un enlace mecanístico y cuantitativo entre la necrosis/apoptosis placentaria y la liberación de células libres de DNA, confirmando así que la concentración de células libres de DNA en suero/plasma maternos puede actuar como un marcador de la buena diferenciación trofoblástica durante la gestación.

Otros autores refieren lo siguiente: El polimorfismo eNOS Glu298Asp no se ha asociado con un riesgo incrementado para preeclampsia <sup>(11)</sup>. Concentraciones pequeñas de óxido nítrico protegen las vellosidades coriónicas del daño inducido por la hipoxia/re-oxigenación y fundamenta el uso racional de dosis miméticas bajas de óxido nítrico en el tratamiento y/o prevención de la preeclampsia <sup>(12)</sup>.

## **2.2 ASPECTOS HEREDITARIOS DE LA PREECLAMPSIA**

El riesgo de preeclampsia se incrementa cuando existen antecedentes de preeclampsia en gestaciones previas, Diabetes Mellitus, gestaciones múltiples, nuliparidad, historia familiar de preeclampsia, índice de masa corporal elevado antes del embarazo o durante ésta, hipertensión arterial previa al embarazo así como a la presencia de anticuerpos antifosfolípido. Estos factores de riesgo son importantes pues los riesgos relativos son 3 veces mayores para nulíparas y 9

veces mayores para pacientes con anticuerpos antifosfolípido. Gran parte del gremio médico emplea gran parte de su tiempo en el tamizaje y detección oportuna de otros problemas de la gestación que tienen una incidencia menor que la preeclampsia sin considerar que ésta tienen mayores repercusiones en las cifras de morbilidad y mortalidad materna y fetal<sup>(13) (14) (1)</sup>.

La naturaleza familiar de la preeclampsia fue referida por primera vez en 1968 por Chesley et al.; desde entonces, se han publicado varias series de estudios que confirman la presencia de un factor familiar que adjudica un riesgo incrementado para padecer preeclampsia de 2-5 veces en familiares en primer grado de mujeres afectadas<sup>(15)</sup>. El riesgo de recurrencia en embarazos subsecuentes varía de 7.5% a 65% dependiendo del tamaño de la muestra y de la severidad de la enfermedad en el primer embarazo. Avances recientes en la comprensión de la fisiopatología de la preeclampsia han generado nuevas incertidumbres en el campo de la investigación sobre esta enfermedad pero las bases genéticas exactas permanecen sin esclarecerse. Se ha sugerido que puede tener fundamento mendeliano, poligénico / multifactorial o mitocondrial. Existen estudios de más de 50 genes candidatos pero todos ellos tienen resultados inconsistentes. También hay estudios en gemelos que han mostrado discordancia entre gemelos monocigóticos. Es por ello que se piensa que la susceptibilidad para preeclampsia debe ser el resultado de interacciones complejas entre los genotipos fetal y paterno, entre diferentes genes maternos, entre factores ambientales y entre factores maternos que predispongan al padecimiento.<sup>(16)</sup>

La susceptibilidad materna a la preeclampsia puede transmitirse de madre a hija. Es muy poco lo que se sabe respecto a la capacidad del feto para producir la cascada de eventos que conducen a la preeclampsia y acerca de la posibilidad de la transmisión de esta predisposición a través del padre o de la madre<sup>(17)</sup>. Hombres y mujeres que fueron productos de embarazos con preeclampsia contribuyen con un incremento en el riesgo de preeclampsia en la siguiente

generación. El riesgo es elevado a través de mujeres afectadas, probablemente porque estas mujeres poseen genes de susceptibilidad para preeclampsia y además transmiten factores de riesgo independientes a su feto. El riesgo a través de padres que fueron producto de embarazos con preeclampsia es bajo, presumiblemente porque los padres transmiten solo factores de riesgo fetales. Otros patrones familiares son consistentes con riesgos genéticos independientes en la madre y en el feto y las asociaciones parecen ser más estrechas para las formas clínicas más severas de preeclampsia <sup>(18)</sup>.

Gran número de estudios han reportado asociación de genes con preeclampsia pero al querer replicar estos resultados se han encontrado muchas inconsistencias. El estudio de colaboración sobre Genética de la Preeclampsia (GOPEC) ha tratado de identificar factores genéticos en familias inglesas afectadas por la preeclampsia y concluyó que ninguna de las variantes genéticas estudiadas confiere una elevación de riesgo para la enfermedad <sup>(19)</sup>.

Vaiman et al <sup>(20)</sup> investigaron la relaciones que podían existir entre los efectos de la baja presión de oxígeno y la activación de los genes activados por hipoxia en el primer trimestre, desarrollo placentario y patologías propias de la placenta que se desarrollan a lo largo de la gestación y demostraron que los genes candidatos para preeclampsia también son genes altamente expresados bajo condiciones de hipoxia y que estos genes pueden ser sinténicos y conservados interespecies, sugiriendo que el mantenimiento de estos clústeres génicos es necesario para garantizar un desarrollo placentario normal en mamíferos.

El análisis transcripcional de sangre materna total y de los RNAm fetales y placentarios circulantes en la sangre de la mujer embarazada identificó un set único de genes fetales con diversidad biológica que ha generado un gran número de estudios sobre sus aplicaciones clínicas <sup>(21)</sup>. Mütze et al <sup>(15)</sup> dirigieron los estudios de genes candidato y de ligamiento para preeclampsia y discutieron la

influencia de los genes maternos y fetales así como su interacción y la posibilidad de impronta genómica en este padecimiento. Ellos concluyeron que sus datos no permiten determinar uno o varios genes para susceptibilidad a preeclampsia pero que existen genes placentarios como ACVR2 y STOX1 así como genes involucrados en la regulación de la angiogénesis como ENG, PIGF, VEGF y Flt1 que parecen ser prometedores para futuras investigaciones.

### **2.2.1 GENES Y PREECLAMPSIA**

**ACVR2:** Receptor tipo 2 de la Activina A, localizado en 2q22. La Activina A es el subtipo de activina predominante en el embarazo y sus niveles séricos se encuentran elevados en mujeres con preeclampsia, probablemente como resultado de una regulación deficiente de la Activina A en la placenta <sup>(22)</sup>. La alteración en la expresión de ACVR2 y sus efectos sobre la función de la Activina A puede afectar el proceso de invasión trofoblástica y de remodelación de las arterias espirales incidiendo así en la aparición de las características fisiopatológicas principales de la preeclampsia <sup>(23)</sup>.

**STOX 1:** Es un gen que codifica para un factor de transcripción que se expresa en el trofoblasto extraveloso poliploide; ha sido identificado como un gen candidato promotor para preeclampsia <sup>(24)</sup>. Se han detectado cinco mutaciones diferentes e idénticas de sentido erróneo (missen mutations) que co-segregan con el fenotipo de preeclampsia en hermanas afectadas. La preeclampsia solo se ha desarrollado en caso de herencia matrilineal por lo que estos hallazgos sugieren que la patogénesis de la preeclampsia puede estar ligada a genes con impronta maternamente expresados <sup>(25)</sup>. Para apoyar esta hipótesis existe un reporte reciente sobre la modificación epigenética de los inhibidores placentarios de la serina proteasa (SERPINs) <sup>(26)</sup>. La asociación de STOX 1 con preeclampsia no ha podido ser confirmada en tres estudios publicados en 2007 <sup>(27) (28) (29)</sup>.

**PROTEÍNA Z:** Es una proteína plasmática K dependiente, juega un papel importante en la regulación de la cascada de coagulación. La preeclampsia se ha asociado con una disminución significativa en la concentración media plasmática de proteína Z respecto a mujeres con embarazos sin preeclampsia y se ha observado un alto índice de deficiencia de proteína Z en pacientes con preeclampsia y óbitos<sup>(30) (23)</sup>

**ANGIOTENSINÓGENO (AGT):** El polimorfismo más común en el gen de angiotensinógeno es el M235T en el exón 2<sup>(31)</sup>. Se ha reportado que este alelo M235T está asociado con la remodelación normal de las arterias espirales. Lévesque et al encontraron un riesgo incrementado para desarrollar preeclampsia si las pacientes poseían el alelo con el polimorfismo T174M y si poseían un haplotipo específico que involucraba los polimorfismos T174M y M235T<sup>(32)</sup>.

**VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial), PlGF (factor de crecimiento placentario) y sFlt-1 (Factor soluble semejante a tirosina-cinasa 1) o sVEGFR-1 (Receptor 1 del factor soluble de crecimiento endotelial vascular):** El defecto placentario primario en la preeclampsia es que la invasión trofoblástica deficiente hacia la decidua condiciona una transformación vascular incompleta y una perfusión útero placentaria inadecuada. Las células placentarias secretan una isoforma soluble de Flt-1 generada a través de splicing alternativo del RNAm del sFlt-1 también llamado sVEGFR-1 que puede contribuir a la patogénesis de la preeclampsia porque sFlt-1 actúa antagonizando dos moléculas proangiogénicas que son VEGF y PlGF y/o impidiendo la invasión trofoblástica.<sup>(33)</sup>

Las anomalías en el equilibrio angiogénico se han propuesto como factores determinantes para el desencadenamiento de la cascada que lleva a proteinuria, hipertensión y disfunción endotelial. Evidencia reciente fortalece la hipótesis de que el balance angiogénico es crucial para la diferenciación y la invasión del citotrofoblasto. La placentación anormal y la hipoxia concomitante

pueden entonces provocar mayor producción de sFlt-1 generándose un ciclo vicioso de su producción<sup>(34)</sup>. Es entonces que se ha sugerido que parte de este exceso en la circulación de sFlt-1 puede provenir de la placenta, es decir, que el gen Flt-1 puede estar expresado diferencialmente en placentas de mujeres sanas y en placentas de mujeres con preeclampsia.<sup>(35)</sup>

Los niveles maternos de sFlt-1 tienen correlación con la severidad de la preeclampsia mientras que, de manera opuesta, en comparación con mujeres con embarazos sin preeclampsia, o con síntomas leves de preeclampsia, las cuantificaciones de VEGF y PIGF activos están disminuidas en pacientes con síntomas severos de preeclampsia. Las alteraciones en sFlt-1 y en PIGF son más evidentes en pacientes con preeclampsia de inicio temprano que en pacientes con preeclampsia de inicio tardío. Sin embargo, se ha demostrado que el aumento en los niveles de sFlt-1 está también asociado con retraso del crecimiento intrauterino (RCIU). La elevación de sFlt-1 es evidente en sangre periférica en el segundo trimestre pero no en el primero en aquellas mujeres destinadas a padecer preeclampsia, mientras que los niveles de PIGF y VEGF sí se encuentran alterados al final del primer trimestre de la gestación en estas pacientes.

Kim et al<sup>(36)</sup> no encontraron diferencias entre los alelos o las frecuencias genotípicas entre pacientes con preeclampsia y pacientes con embarazos normales. Aunque limitado por un tamaño de muestra pequeño, su estudio sugiere que los polimorfismos de repetidos d(TG)<sub>n</sub> en el gen Flt-1 no están asociados con el desarrollo de preeclampsia en embarazadas coreanas.

Sin embargo, siguiendo al desarrollo del desbalance de los factores angiogénicos después de las 25 semanas de gestación en mujeres con recurrencia de preeclampsia, la relación sFlt-1/PIGF se ha utilizado como un marcador confiable para el riesgo global de preeclampsia. Esto es tan cierto que sFlt-1 y PIGF han sido elegidos por los laboratorios Roche como un dúo-test de

tamizaje para preeclampsia en el segundo trimestre en Europa y se espera que muy pronto reciba la aprobación de la FDA <sup>(37)</sup>.

**ENDOGLINA (ENG)**: Es un co-receptor de los factores de crecimiento transformante  $\beta 1$  y  $\beta 2$  (TGF  $\beta 1$  y TGF  $\beta 2$ ) y se encuentra up-regulated en placentas de mujeres con preeclampsia, liberando endoglina soluble (sEng) en la circulación materna <sup>(38)</sup> <sup>(39)</sup>. Interesantemente, la sEng en humanos comienza a elevarse 2-3 meses antes del inicio de la preeclampsia, acompañada de un incremento en el índice sFlt-1/PIGF <sup>(38)</sup> además de que los polimorfismos del gen Eng se han asociado con hipertensión arterial pulmonar <sup>(40)</sup>. Es por ello que el papel de las alteraciones genéticas en el gen ENG en preeclampsia no ha sido bien dilucidado. .

**CXCL10/IP-10** (Interferon- $\gamma$  inducible protein (CXCL10/IP-10): Es un miembro de la familia de quimoquinas CXC con propiedades pro-inflamatorias y anti-angiogénicas. La preeclampsia se ha asociado con elevación sérica de las concentraciones de la IP-10, por lo que la elevación en sangre de esta proteína en mujeres con preeclampsia puede representar otra característica bioquímica de un estado pro-inflamatorio o de inflamación intravascular o una contribución para la generación de este estado. Dada la evidencia de que la IP-10 tiene propiedades anti-angiogénicas y que éste es un hallazgo en preeclampsia, Gotsch et al <sup>(41)</sup> propusieron que las concentraciones séricas elevadas de IP-10 en suero materno pueden contribuir a la generación de un estado anti-angiogénico en conjunto con sVEGFR-1 y la endoglina.

## **2.3 INMUNOLOGÍA Y PREECLAMPSIA**

Ya se han obtenido algunos resultados respecto a las investigaciones en el área de inmunogenética (HLA), estrés oxidativo y metabolismo de lípidos.

Existen reportes que sustentan que las causas de la placentación superficial en la mala adaptación inmune que reduce las concentraciones de los factores de crecimiento angiogénicos y que incrementan los desechos placentarios en la circulación materna con la subsecuente respuesta inflamatoria materna <sup>(2)</sup>. Hay evidencia de que la preeclampsia tiene bases inmunológicas; los datos clínicos, epidemiológicos e histológicos sugieren muchas similitudes interesantes entre la preeclampsia y la enfermedad de injerto contra huésped. Algunos autores sugieren que la preeclampsia es un desorden de 3 estadios en donde la patología primaria comienza con una respuesta inmune materna excesiva o atípica. Esto podría impedir el proceso de placentación y conducir a estrés oxidativo crónico en la placenta y finalmente a la difusión de disfunción celular endotelial materna <sup>(42)</sup>.

Los únicos antígenos de histocompatibilidad polimórficos conocidos en el trofoblasto fetal son las moléculas HLA-C. Hiby et al <sup>(43)</sup> encontraron que una combinación del genotipo materno AA con un grupo HLA-C2 en el feto es significativamente asociada con preeclampsia. Esto significa que si el feto expresa el alotipo C2, será en detrimento de la placentación para la madre que tenga inactivos los receptores KIR (killer immunoglobulin receptors). Luego entonces, las interacciones entre los KIR maternos y el trofoblasto no tienen una función inmune pero sí juega un papel fisiológico relacionado con el proceso de placentación. .

Hylenius S, et al <sup>(44)</sup> sugirieron que la combinación de los genotipos HLA-G madre-hijo pueden influenciar el riesgo para desarrollar preeclampsia y que la expresión de los genotipos HLA-G tiene una influencia significativa en el desarrollo de preeclampsia. Lynch et al <sup>(45)</sup> generaron la hipótesis de que la preeclampsia es secundaria a una secuencia de eventos en la gestación temprana y que la

activación del producto Bb del complemento es un marcador temprano de estos eventos.

Senna et al<sup>(46)</sup> evaluaron los niveles de la adrenomedulina plasmática (AM) en mujeres con embarazos normales y en mujeres con preeclampsia concluyendo que la presencia de niveles elevados de AM en la mujer con preeclampsia además de la correlación positiva significativa entre la adrenomedulina plasmática y la presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, severidad de la preeclampsia y proteinuria confirman la participación de la adrenomedulina en la patogénesis de la hipertensión en la preeclampsia.

Hung et al<sup>(47)</sup> demostraron in vitro que la perfusión intermitente de la placenta, después de la reducción de la invasión trofoblástica, ocasiona incremento en la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), y que esto contribuye a la activación de las células endoteliales maternas que caracterizan a la preeclampsia.

Van Rijn et al<sup>(48)</sup> observaron una asociación del receptor común TLR4 (Toll like receptor 4), las variantes génicas de NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2) y el fenotipo pro-inflamatorio con historia de preeclampsia de inicio temprano y síndrome de HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets), sugiriendo el involucro del sistema inmune innato materno en los trastornos hipertensivos severos del embarazo.

Kusanovic et al<sup>(49)</sup> determinaron que la gestación normal está asociada con una elevación en las concentraciones séricas de sCD30 a diferencia de la concentración encontrada en mujeres no gestantes; las pacientes con preeclampsia y aquellas cuyos bebés son pequeños para la edad gestacional tienen concentraciones séricas de sCD30 más bajas que las mujeres con embarazos normales. Estos hallazgos son consistentes con el hecho de que la gestación normal está caracterizada por una respuesta inmune guiada por Th2 y

que la preeclampsia y el retraso del crecimiento intrauterino están asociados a una respuesta por Th1, probablemente secundaria a reducción de la respuesta por Th2.

La Granulysin un nuevo biomarcador de toda la inmunidad celular, es secretado por las células asesinas naturales y por los linfocitos T citotóxicos, y está asociada con el rechazo injerto VS huésped. Las mujeres japonesas con concentraciones elevadas de Granulysin tienen un riesgo 2.9 veces mayor para padecer preeclampsia en comparación con mujeres con niveles bajos de Granulysin; estos datos dan evidencia de el estado inmune mediado por Th1 asociado a preeclampsia <sup>(50)</sup>.

Wieser et al <sup>(51)</sup> describieron que los PPARs (peroxisome proliferators-activated receptors) están involucrados en la invasión trofoblástica, en el desarrollo placentario, en el parto y en enfermedades propias del embarazo, específicamente la preeclampsia. El papel del sistema PPAR en el embarazo bajo condiciones fisiológicas y patológicas no ha sido bien definido debido al desconocimiento acerca de los ligandos endógenos para PPAR.

La investigación sobre ligandos farmacológicos está fundamentada en la identificación de ligandos fisiológicos. Algunas alteraciones inflamatorias, angiogénicas y metabólicas parcialmente caracterizadas en enfermedades relacionadas a la gestación sugieren que estos agonistas sintéticos de PPAR pueden ser potencialmente útiles en estos padecimientos.

Sin embargo, algunos estudios clínicos y experimentales han reportado efectos colaterales adversos de estos ligandos PPAR incluyendo progresión de cáncer e incremento en el índice de ataques cardíacos. Se encuentran en desarrollo nuevas generaciones de moduladores de PPAR y prometen ser específicos para receptor y esperanzadoramente, podrán activar únicamente un subconjunto de genes blanco o vías metabólicas que reducirían así los efectos indeseables. El

papel potencial de los PPARs en la regulación de la inflamación y de la angiogénesis es intrigante y garantiza la necesidad de futuros estudios.

## **2.4 ESTUDIOS PREDICTIVOS PARA PREECLAMPSIA**

La ultrasonografía Doppler de las arterias uterinas es una técnica prometedora para la evaluación de complicaciones perinatales <sup>(52)</sup>; las alteraciones en las formas de la onda en la arteria uterina son más sugerentes de preeclampsia que la restricción del crecimiento intrauterino. El índice de pulsabilidad, solo o combinado con muescas es el mejor índice predictivo con Doppler y estos índices pueden ser utilizados en la práctica clínica <sup>(53)</sup>.

Espinoza et al <sup>(54)</sup>, determinaron el papel del uso combinado de la velocimetría Doppler de arterias uterinas (UADV), concentraciones de PIGF en plasma materno y concentraciones de sVEGFR-1 en el segundo trimestre de la gestación para la identificación de pacientes con riesgo de preeclampsia severa y/o de inicio temprano y concluyeron que la combinación de una UADV anormal y concentraciones plasmáticas de PIGF <280 pg/mL en el segundo trimestre se asociaban con un riesgo elevado para el desarrollo de preeclampsia con inicio temprana o en forma severa en poblaciones de bajo riesgo. Se requieren más investigaciones para determinar el tiempo ideal para realizar la UADV y la combinación ideal de esta tecnología con otras pruebas de tamizaje prenatal con la intención de mejorar el bienestar del binomio madre-hijo.

Existen estudios sobre la Visfatina (fosforibosiltransferasa de nicotinamida) que es una adipocina secretada por el tejido adiposo que está involucrada en la biosíntesis de dinucleótidos de adenina nicotinamida para catalizar la condensación de la nicotinamida con el 5-fosforibosil1-pirofosfato para obtener

mononucleótidos de nicotinamida. Una publicación reciente de Hu et al demostró que los niveles plasmáticos maternos de visfatina fueron significativamente bajos en mujeres con preeclampsia leve y aún más bajos en mujeres con preeclampsia severa <sup>(55)</sup>. Sin embargo, exactamente lo opuesto fue reportado por Fasshauer et al. <sup>(56)</sup>, indicando que se requieren más investigaciones y estudios más grandes para poder evaluar el papel potencial de la visfatina como un marcador para preeclampsia <sup>(57)</sup>.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1 ENFOQUE DE LA INVESTIGACIÓN**

Este es un estudio observacional, prospectivo y transversal.

#### **3.2 HIPÓTESIS**

H<sub>0</sub>: sFlt-1 es un marcador de expresión génica en pacientes con preeclampsia.

H<sub>1</sub>: sFlt-1 no es un marcador de expresión génica en pacientes con preeclampsia

#### **3.3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

Se realizó un estudio observacional en el que participaron 30 mujeres embarazadas, 15 de ellas complicadas con preeclampsia (diagnóstico realizado con base en cifras de tensión arterial superiores a 140/90 mmHg y proteinuria en el examen general de orina) que condicionó la interrupción del embarazo y 15 pacientes con embarazos normoevolutivos (grupo control) con evento obstétrico (parto o cesárea) inmediatamente después del evento obstétrico de las pacientes con preeclampsia.

Previa firma de consentimiento válidamente informado, a cada paciente se le tomó una muestra de 10 ml. de sangre periférica de la vena antecubital. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas y el suero fue separado y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su análisis posterior.

Las muestras de suero se utilizaron para determinar los niveles de sFlt-1 con el kit de Quantikine (Human Soluble VEGF R1/Flt-1 Immunoassay, R&D Systems) utilizando la técnica de inmunoensayo enzimático. Los estándares, suministrados por el fabricante, y las muestras de suero se pipetearon en los pozos de una microplaca revestidos por un anticuerpo monoclonal específico contra VEGFR1; así cualquier VEGF presente en el suero fue inmovilizado en el pozo. Después de lavar los pozos para retirar cualquier residuo y se añadió una enzima ligada a un anticuerpo policlonal específico para VEGFR1. Se realizó un nuevo lavado para eliminar remanentes del complejo enzima-anticuerpo y se añadió una solución sustrato desarrollándose color en forma proporcional a la cantidad de VEGFR1 que hubiese quedado fijada en el pozo en el primer paso. La reacción colorimétrica se detuvo y la intensidad del color se midió con ayuda de un lector de densidad óptica (fotómetro) a 450 nm. La concentración de VEGFR1 en las muestras se determinó comparando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar.

En todas las muestras se realizó análisis western blot para sFlt-1 y Flt-1. Después de la electroforesis las proteínas fueron transferidas a membranas de difluorido polivinilideno. Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas por incubación en buffer salino Tris al 0.1% y Tween 20 durante 60 minutos. Las membranas fueron incubadas con una dilución 1:200 de anticuerpo antisoluble específico de VEGFR-1 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) o con una dilución 1:100 de anticuerpo monoclonal específico anti-Flt-1 (Abcam, ab9540, Cambridge, MA). Después de su incubación durante la noche, las membranas fueron lavadas con TBST (Tris-buffered-saline-Tween a  $4^{\circ}\text{C}$ ) e incubadas durante

60 minutos a temperatura ambiente en una dilución 1:10000 de peroxidasa horseradish conjugada IgG anti-rabbit (Santa Cruz, CA). Se les dio un nuevo lavado con TBST y posteriormente fueron expuestas a un agente quimioluminiscente (enhanced chemiluminescence: Amersham Pharmacia Biotech, Oackwille, Ontario, Canada). Todas las pruebas fueron revisadas en forma similar utilizando la tinción de Ponceau.

Los resultados fueron analizados con la prueba exacta de Fisher.

### 3.4 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

El universo de estudio fueron todas las mujeres embarazadas, la población de estudio fueron todas las mujeres embarazadas con seguridad social en el IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) y con diagnóstico de preeclampsia.

#### 3.4.1 TAMAÑO DE LA MUESTRA

$$n = \frac{pq N \delta^2}{E^2(N-1) + \delta^2 pq}$$

$$n = \frac{(16) (0.5) (30) (2)^2}{(0.06)^2 (30-1) + (2)^2 (16) (0.5)}$$

$$n = \frac{960}{32.1044}$$

n= 30 pacientes en dos grupos.

Donde:  $N$  = elementos del universo de estudio = 30.

$\delta$  = nivel de confidencialidad (2 a 3 sigmas) = 2

$E$  = error máximo permitido = 0.06 (6%).

$p$  = proporción de prevalencia del fenómeno en estudio = 16%

$q$  = 0.5

### **3.4.2 TIPO DE MUESTREO**

Consecutivo.

### **3.4.3 SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

Selección sistemática

## **3.5 RECOLECCIÓN DE DATOS**

### **3.5.1 SELECCIÓN DEL INSTRUMENTO**

La hoja de recolección de datos fue realizada por la investigadora ex profeso para este fin.

### **3.5.2 APLICACIÓN DEL INSTRUMENTO**

La captura de resultados la realizó la investigadora

### **3.6 ANÁLISIS DE DATOS**

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism. Para medir el azar se utilizó la prueba exacta de Fisher. La significancia fue definida como un valor de  $p < 0.05$ .

#### 4. RESULTADOS

<b>MUESTRA</b>	<b>Densidades ópticas(OD)</b>
1	12 OD
2	11 OD
3	6 OD
4	5 OD
5	12 OD
6	11 OD
7	27 OD
8	11 OD
9	11 OD
10	12 OD
11	12 OD
12	19 OD
13	11 OD
14	12 OD
15	13 OD
16	11 OD
17	15 OD
18	11 OD
19	17 OD
20	14 OD
21	23 OD
22	12 OD
23	12 OD
24	13 OD

25	11 OD
26	11 OD
27	32 OD
28	12 OD
29	11 OD
30	12 OD

**TABLA 1. Valores de sFTL-1 expresados en OD. Las pacientes 1-15 pertenecen al grupo de embarazadas sin preeclampsia y las pacientes 16-30 conforman el grupo de embarazadas complicadas con preeclampsia. El valor de corte para el primer grupo fue de 11 OD (control con mujer no embarazada) y para el segundo grupo de 13 OD (control con mujer fallecida con eclampsia)**

	PREECLAMPSIA	SANAS	TOTAL
SI (expresión de sFlt-1)	6	3	9
NO (expresión de sFlt-1)	9	12	21
TOTAL	15	15	30

**TABLA 2.**

**Expresión de sFlt-1 en pacientes y controles con punto de corte de 13 OD**

Se realizó prueba exacta de Fisher obteniendo un valor de p de 0.4270, considerada no significativa.

El riesgo relativo fue de 1.556 (0.7909-3.060) con un intervalo de confianza de 95%) utilizando la aproximación de Katz.

	PREECLAMPSIA	SANAS	TOTAL
SI (expresión de sFlt-1)	15	13	28
NO (expresión de sFlt-1)	0	2	2
TOTAL	15	15	30

**TABLA 3.**

**Expresión de sFlt-1 en pacientes y controles con punto de corte de 11 OD**

Con la prueba exacta de Fisher se obtuvo un valor de p de 0.4828, considerado no significativo

El riesgo relativo fue infinito en sus valores con intervalo de confianza de 95% utilizando la aproximación de Katz.

	PREECLAMPSIA	SANAS	TOTAL
SI (expresión de sFlt-1)	10	8	18
NO (expresión de sFlt-1)	5	7	12
TOTAL	15	15	30

**TABLA 3.**

**Expresión de sFlt-1 en pacientes y controles con punto de corte de 12 OD**

Con la prueba exacta de Fisher se obtuvo un valor de 0.7104, considerado no significativo.

El riesgo relativo fue de 1.333 (0.6070-2.929) con un intervalo de confianza de 95% usando la aproximación de Katz.

## 5. DISCUSIÓN

En la literatura se ha demostrado que los niveles séricos maternos de sFlt-1 muestran una correlación positiva con la severidad de la preeclampsia y que las alteraciones en sFlt-1 y PIGF son más evidentes en aquellas pacientes con preeclampsia de inicio temprano en comparación con las pacientes que presentan preeclampsia en forma tardía.

Las anomalías en el balance angiogénico han sido propuestas como determinantes importantes en la cascada molecular que conduce a la presencia de proteinuria, hipertensión y disfunción endotelial tal y como lo menciona Bdolah Y et al que emitieron la hipótesis de que este balance es crucial para la diferenciación e invasión del citotrofoblasto.

La placentación anormal y la hipoxia consecutiva a este evento pueden ocasionar mayor producción placentaria de sFlt-1 en forma cíclica como lo proponen Sood et al. Tal vez esto pueda explicar los cambios fisiopatológicos que se presentan en las mujeres con preeclampsia y permitirá determinar en estadios tempranos la presencia de la enfermedad y en un futuro será posible descubrir un gen responsable de la preeclampsia ya que si se encuentra la molécula responsable del inicio del síndrome de preeclampsia, será muy fácil encontrar el gen etiológico.

Aunque algunos autores han reportado que los niveles elevados de sFlt-1 se asocian con retraso del crecimiento intrauterino, en este estudio no se realizó el análisis de los recién nacidos.

El incremento en los niveles de sFlt-1 es evidente en el segundo trimestre y los niveles de PIGF y VEGF sí presentan alteraciones al final del primer trimestre. Al igual de Kim et al, en este estudio no encontramos diferencias en la expresión de

sFLT-1 entre las pacientes con preeclampsia y las pacientes con embarazos normales, limitados tal vez por el tamaño de la muestra o por el tejido utilizado.

Sin embargo, existe evidencia científica de que existe aumento estadísticamente significativo de los niveles séricos de sFlt-1 en pacientes con preeclampsia (no fue el motivo de este estudio) y expresión génica cuando se ha utilizado tejido placentario. Es importante recalcar que el índice sFlt-1/PlGF ha sido reportado por Grill et al como un marcador confiable para riesgo de preeclampsia por lo que en Europa, sFlt-1 y PlGF ya han sido comercializados por los laboratorios Roche como una prueba de tamizaje para preeclampsia en el 2º trimestre y se espera que pronto obtenga la aprobación de la FDA.

Por ello tendremos que seguir investigando estos y otros marcadores séricos que puedan facilitar el diagnóstico oportuno de la preeclampsia que representa un problema de salud pública en nuestro país. La determinación de marcadores séricos para la preeclampsia en forma temprana permitirá la disminución de la morbilidad y mortalidad materna y perinatal lo que seguramente impactará también los indicadores económicos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. *Risk factors fo pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies.* **Duckitt K, . Harrington D.** 2 de March de 2005, BMJ.
2. *Immunology and genetic of preeclampsia.* **Serrano.** 2-4, June-December de 2006, Clinical & Developmental Immunology, Vol. 13, págs. 197-201.
3. **Gibbs, Ronald S.** *DANFORTH'S Obstetrics and Ginecology.* Philadelphia, PA US : Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
4. *Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface.* **Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, et al.** 2004, J Clin. Invest., Vol. 114, págs. 744-754.
5. *The placental problem: Linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia.* **Fisher.** 2004, Reproductive Biology and Endocrinology, Vol. 2, págs. 53-.
6. *Dinucleotide repeat polymorphism in Fms-like tyrosine kinase-1 is not associated with preeclampsia.* **Kim SY, Lim JH, Yang JH, Kim MY, Han JY, et al.** 2008, BMC Medical Genetics, Vol. 9, págs. 68-73.
7. *Control of human trophoblast function.* **Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F.** 6, 2007, Reproductive Biology and Endocrinology, Vol. 5.
8. *Excessive stimulation of poly(ADP-ribosyl)ation contributes to endothelial dysfunction in pre-eclampsia.* **Crocker IP, Kenny LC, Thornton WA, Szabo C, Baker PN.** 2005, British Journal of Pharmacology, Vol. 144, págs. 772-780.
9. *Nuclear Factor  $\kappa$ B, p38, and Stress-Activated Protein Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways REgulate Proinflammatory Cytokines and Apoptosis in Human Placental Explants in Response to Oxidative Stress. Effects of Antioxidant Vitamins.* **Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones S, Burton GJ.** 2007, Am J Pathol, Vol. 170, págs. 1511-1520.

10. *Trophoblastic Oxidative Stress and the Release of Cell-Free Feto-Placental DNA.* **Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ.** 2006, Am J Pathol, Vol. 169, págs. 400-404.
11. *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) and development of pre-eclampsia: a case-control study and a meta-analysis.* **Yu CKH, Casas JP, Savvidou MD, Sahemey MP, Nicolaides KH et al.** 7, 2006, BMJ Pregnancy and Childbirth, Vol. 6.
12. *Glyceril Trinitrate Inhibits Hypoxia/Reoxygenation-Induced Apoptosis in the Syncytiotrophoblast of the Human Placenta.* **Belkacemi L, Bainbridge SA, Dickinson MA, Smith GN, Graham CH.** 2007, Am J Pathol, Vol. 170, págs. 909-920.
13. *Pre-eclampsia matters.* 2005, BMJ, Vol. 330, págs. 549-550.
14. *Prepregnancy cardiovascular risk factors as predictors of pre-eclampsia: population based cohort study.* **Magnussen EB, Vatten LJ, Lund-Nilsen TI, Salvesen KA, Smith GD et al.** 2007, BMJ, Vol. 335, págs. 978-85.
15. *Genes and the preeclampsia syndrome.* **Mütze S, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Werner R.** 2008, J. Perinat. Med., Vol. 36, págs. 38-58.
16. *The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community.* **Milne F, Redman C, Walker J, Baker P, Bradley J, et al.** 2005, BMJ, Vol. 330, págs. 576-580.
17. *Paternal contribution to the risk for pre-eclampsia.* **Zusterzeel PLM, te Morsche R, Raijmakers MTM, Peters WHM, Steegers EAP.** 2002, J Med Genet, Vol. 39, págs. 44-4.
18. *Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort.* **Skjaerven R, Vatten LJ, Wilcox AJ, Ronning T, Irgens LM, et al.** 15 de October de 2005, BMJ, Vol. 331, págs. 877-879.
19. *Disentangling Fetal and Maternal Susceptibility for Pre-Eclampsia: A British Multicenter Candidate-Gene Study.* **GOPEC.** 2005, Am J. Hum. Genet. , Vol. 77, págs. 127-131.

20. *Hypoxia-activated genes from early placenta are elevated in Preeclampsia, but not in intra-Uterine Growth Retardation.* **Vaiman D, Mondon F, Garcés-Durán A, Mignot TM, Robert B, et al.** 11, 2005, BMC Genomics, Vol. 6.

21. *Gene expression analysis in pregnant women and their infants identifies unique fetal biomarkers that circulate in maternal blood.* **Maron JL, Johnson KL, Slonim D, Lai CQ, Ramoni M, et al.** 10, October de 2007, The Journal of Clinical Investigation, Vol. 117.

22. *Objective prioritization of positional candidate genes at a quantitative trait locus for pre-eclampsia on 2q22.* **Moses EK, Fitzpatrick E, Freed KA, Dyer TD, Forrest S, Elliot K, et al.** 2006, Mol Hum Reprod, Vol. 12, págs. 505-512.

23. *Preeclampsia is associated with low concentrations of protein Z.* **Erez O, Hoppensteadt D, Romero R, Espinoza J, Goncalves L, Nien JK, Kusanovic JP, Fareed J, Gotsch F, Pineles B, Chaiworapongsa T.** 9, September de 2007, J Matern Fetal Neonatal Med, Vol. 20, págs. 661-667.

24. *Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family.* **van Dijk M, Mulders J, Poutsma A, Konst AA, Lachmeijer AM, Dekker GA, et al.** 2005, Nat Genet, Vol. 37, págs. 514-519.

25. *The parent-of-origin effect of 10q22 in pre-eclamptic females coincides with two regions clustered for genes with down regulated expression in androgenetic placentas.* **Oudejans CB, Mulders J, Lachmeijer AM, van DM, Konst AA, Westerman BA, et al.** 2004, Mol Hum Reprod, Vol. 10, págs. 589-598.

26. *Expressional and epigenetic alterations of placental serine protease inhibitors: SERPINA3 is a potential marker of preeclampsia.* **Chelbi ST, Mondon F, Jammes H, Buffat C, Mignot TM, Tost J, et al.** 49, 2007, Hypertension, págs. 76-83.

27. *STOX 1 is not imprinted and is not likely to be involved in preeclampsia.* **Iglesias-Platas I, Monk D, Jebbink J, Bulmer M, Boer K, van der PJ, et al.** 2007, Nat Genet, Vol. 39, págs. 279-280.

28. *Evaluation of STOX1 as a preeclampsia candidate gene in a population-wide sample.* **Kivinen K, Peterson H, Hiltunen L, Laivuori H, Heino S, Tiala I, et al.** 2007, Eur J Hum Genet.

29. *Activin A and activin receptors in gestational tissue from preeclamptic pregnancies.* **Manuelpillai U, Schneider-Kolsky M, Dole A, Wallace EM.** 2001, J Endocrinol, Vol. 171, págs. 57-64.
30. *Anti-protein Z antibodies in women with pathologic pregnancies.* **Gris JC, Amadio C, Mercier E, Lavigne-Lissalde G, De'chaud H, et al.** 12, 15 de June de 2003, BLOOD, Vol. 101.
31. *Hypertension-related gene polymorphism in pre-eclampsia, eclampsia and gestational hypertension in Black South African women.* **Roberts CB, Rom L, Moodley J, Pegoraro RJ.** 2004, J Hypertens, Vol. 22, págs. 945-948.
32. *Implication of an AGT haplotype in a multigene association study with pregnancy hypertension.* **Lévesque S, Moutquin JM, Lindsay C, Roy MC, Rousseau F.** 2004, Hypertension, Vol. 43, págs. 71-78.
33. *Thrombin Regulates Soluble fms-Like Tyrosine Kinase.1 (sFlt-1) Expression in First Trimester Decidua. Implications for Preeclampsia.* **Lockwood CJ, Toti P, Arcuri F, Norwitz E, Funai EF, et al.** 2007, Am J Pathol, Vol. 170, págs. 1398-1405.
34. *Recent Advances in Understanding of Preeclampsia.* **Bdolah Y, Karumanchi SA, Sachs BP.** 5, 2005, Croat Med J, Vol. 46, págs. 728-736.
35. *Gene expression patterns in human placenta.* **Sood R, Zehnder L, Druzin ML, Brown PO.** 14, 4 de Abril de 2006, PNAS, Vol. 103.
36. *Dinucleotide repeat polymorphism in Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) gene is not associated with preeclampsia.* **Kim SY, Lim JH, Yang JH, Kim MY, Han JY, Ahn HK, Choi JS, Park SY, Kim MJ, Ryu HM.** 2008, BMC Med Genet, Vol. 9, pp. 68-.
37. *Potential markers of preeclampsia – a review.* **Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dällenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, Lapaire O.** 7, 2009, Reproductive Biology and Endocrinology, pp. 70-84.
38. *Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia.* **Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al.** 2004, N Engl J Med, Vol. 350, págs. 672-683.

39. *Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia.* **Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, et al.** 355, 2006, N Engl J Med, págs. 992-1005.

40. *Association between endoglin gene polymorphism and systemic sclerosis related pulmonary arterial hypertension.* **Wipff J, Kahan A, Hachulla E, Sibilia J, Cabane J, Meyer O, et al.** s.l. : Oxford, 2006, Rheumatology.

41. *A MISSING LINK BETWEEN INFLAMMATION AND ANTI-ANGIOGENESIS I PREECLAMPSIA?* **Gotsch F, Romero R, Friel L, Kusanovic P, Espinoza J, et al.** 11, November 2007, J Matern Fetal Neonatal Med, Vol. 20, pp. 777-792.

42. *Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution.* **Jauniaux E, Poston L, Burton GJ.** 6, 2006, Hum Reprod Update, Vol. 12, págs. 747-755.

43. *Combinations of Maternal KIR and Fetal HLA-C Genes Influence the Risk of Preeclampsia and Reproductive Success.* **Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy MO, Redman CW, Carrington M, et al.** 8, 18 de October de 2004, The Journal of Experimental Medicine, Vol. 200, págs. 957-965.

44. *Association between HLA-G genotype and risk of preeclampsia: a case-control study using family triads.* **Hyllenius S, Andersen AMN, Melbye M, Hviid TVF.** 4, 2004, Molecular Human Reproduction, Vol. 10, págs. 237-246.

45. *Alternative complement pathway activation fragment Bb in early pregnancy as a predictor of preeclampsia.* **Lynch AM, Murphy JR, Byers T, Gibbs RS, Neville MC, et al.** 2008 April, Am J Obstet Gynecol, pp. 198(4): 385.e1-385.e9.

46. *Study of Plasma Adrenomedullin Level In Normal Pregnancy and Preeclampsia.* **Senna AA, Zedan M, Abd El Salam GE, El Mashad AI.** 2, 2008, Medscape J Med, Vol. 10, págs. 29-.

47. *Secretion of Tumor Necrosis Factor\_ from Human Placental Tissues induced by Hypoxia-Reoxygenation Causes Endothelial Cell Activation in Vitro A Potential Mediator of the inflammatory Response in Preeclampsia.* **Hung TH, Charnock-Jones S, Skepper JN, Burton GJ.** 2004, Am J Pathol, Vol. 164, págs. 1049-1061.

48. *Maternal TLR4 and NOD2 Gene Variants, Pro-Inflammatory Phenotype and Susceptibility to Early-Onset Preeclampsia and HELLP Syndrome.* **van Rjin BB, Franx A, Steegers EAP, de Groot CJM, Bertina RM et al.** 4, PLoS ONE, Vol. 3, pág. e1865.

49. *Maternal serum Soluble CD30 Is Increased in Normal Pregnancy, but Decreased in Preeclampsia and Small for Gestational Age Pregnancies.* **Kusanovic JP, Romero R, Hassam SS, Gotsch F, Edwin S, et al.** 12, December de 2007, J Matern Fetal Neonatal Med., Vol. 20, págs. 867-878.

50. *Plasma Granulysin Concentrations and Preeclampsia Risk.* **Qiu C, Saito S, Sakai M, Ogawa K, Nagata K, et al.** 10, October de 2006, Clin Biochem, Vol. 39, págs. 1016-1021.

51. *PPAR Action in Human Placental Development and Pregnancy and Its Complications.* **Wieser F, Waite L, Depoix C, Taylor RN.** 2008, Hindawi Publishing Corporation PPAR Research, Vol. 2008. ID 527048.

52. *How useful is uterine artery Doppler ultrasonography in predicting pre-eclampsia and intrauterine growth restriction?* **McLeod.** 6, 11 de March de 2008, CMAJ, Vol. 178.

53. *Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis.* **Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BWJ, van der Post JAM, et al.** 6, 2008, CMAJ, Vol. 178, págs. 701-11.

54. *Identification of Patients at Risk of Early Onset and/or Severe Preeclampsia With the Use of Uterine Artery Doppler Velocimetry and Placental Growth Factor.* **Espinoza J, Romero R, Nien JK, Gomez R, Kusanovic JP, et al.** 4, April de 2007, Am J Obstet Gynecol, Vol. 196, págs. 326.e1-326.13.

55. *Serum visfatin levels in late pregnancy and pre-eclampsia.* **Hu W, Wang Z, Wang H, Huang H, Dong M.** 2008, Acta Obstet Gynecol Scand, Vol. 87, págs. 413-418.

56. *Serum levels of the adipokine visfatin are increased in preeclampsia.* **Fasshauer M, Waldeyer T, Seeger J, Schrey S, Ebert T, Kratzsch J, Lossner U, Bluher M, Stumvoll M, Faber R, Stepan H.** 2007, Clin Endocrinol (Oxf).

57. *Potential markers of preeclampsia – a review.* **Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dällenbach R.** 2009, *Reproductive Biology and Endocrinology*, Vol. 7, pp. 70-87.