

DEPARTAMENT DE PEDIATRIA, OBSTETRICIA I  
GINECOLOGIA

LA HIPOXIA FETAL VALORADA MEDIANTE MÉTODOS  
OBJETIVOS Y SU RELACIÓN CON EL FACTOR DE  
CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) EN  
GESTACIONES GEMELARES.

NEREA RUIZ SACEDÓN

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 25 de juny de 2008 davant un tribunal format per:

- Dr. Lorenzo Abad Martínez
- Dr. Alfonso Herruzo Nalda
- Dr. Carlos Simón Valles
- Dr. Vicente Serra Serra

Va ser dirigida per:

Dr. Alfredo Perales Marín

Dra. Reyes Balanzá Chancosa

©Copyright: Servei de Publicacions  
Nerea Ruiz Sacedón

---

Dipòsit legal: V-4102-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-8086-4

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

**Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Pediatría, Obstetricia y  
Ginecología**



**La hipoxia fetal valorada mediante métodos  
objetivos y su relación con el Factor de  
Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) en  
gestaciones gemelares**

**TESIS DOCTORAL**

**PRESENTADA POR:**

**Nerea Ruiz Sacedón**

**DIRIGIDA POR:**

**Dr. Alfredo Perales Marín**

**Dra. Reyes Balanzá Chancosa**

**Valencia, 2008**



Alfredo Perales Marín, Jefe de Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Maternal “ La Fe” de Valencia y Profesor Asociado de Obstetricia y Ginecología de la Universitat de València y Reyes Balanza Choncosa, Jefe Clínico del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: *La hipoxia fetal valorada mediante métodos objetivos y su relación con el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) en gestaciones gemelares* ha sido realizado por Dña. Nerea Ruiz Sacedón bajo nuestra dirección. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia a de del 2008.

Fdo. Alfredo Perales Marín

Fdo. Reyes Balanza Choncosa



**A mis Padres**



## **Agradecimientos**

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado de alguna forma en la elaboración de esta Tesis y sin las cuales no me habría sido posible.

A mis directores de Tesis, el Prof. Alfredo Perales y a la Dra. Reyes Balanza, por su apoyo constante, su paciencia y sobre todo por estar ahí siempre que os he necesitado. Muchas gracias de corazón.

Al Prof. Antonio Pellicer por enseñarme a disfrutar de la investigación y sobre todo por la confianza que ha mostrado en mí todos estos años.

A mi familia, en especial a mis padres y a mi hermano Mikel, por creer en mí y sobre todo por lo que cada día me vais enseñando.

A Pablo Aguar, por tu amistad, comprensión y paciencia diaria. Sin tu apoyo esto no hubiera sido posible.

A Dolores Borrás e Isabel Alonso, por su gran ayuda en este trabajo. Espero que esto sea sólo el comienzo.

A Susana Martínez y Pilar Alamá, amigas y compañeras, por vuestro apoyo incondicional cuando esta parecía no tener fin, por estar ahí siempre y levantarme el ánimo en los momentos que más lo necesitaba.

A M<sup>a</sup> José Vila y Daniel Izquierdo, por escucharme en mis malos momentos y sobre todo por haberme enseñado a ver las cosas con otros ojos.

A todos mis amigos, y en especial a Reyes, Salva y Nacho, por todos los estupendos momentos que me hacéis disfrutar y sobre todo por poder contar siempre con vosotros.

A todos mis compañeros del H.U. Dr. Peset, por vuestro interés en esta tesis, por apoyarme y tenerme siempre en mente cuando un “gemelar” asomaba por la puerta. Muchísimas gracias a todos, no cambiéis nunca.

El presente trabajo de tesis doctoral forma parte del proyecto de investigación “ La hipoxia fetal valorada mediante métodos objetivos y su relación con el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)”, que ha sido subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencias con referencia nº: “FISS” Exp. PI030059”.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 LA PLACENTA HUMANA</b>	
1.1.1 Desarrollo placentario.....	7
1.1.2 Anatomía placentaria.....	11
1.1.3 Circulación placentaria.....	13
1.1.4 Fisiología de la unidad feto-placentaria.....	21
1.1.5 Funciones de la placenta.....	25
<b>1.2 ANGIOGÉNESIS Y VASCULOGÉNESIS PLACENTARIA</b>	
1.2.1 Introducción.....	31
1.2.2 Factores reguladores de la angiogénesis.....	36
1.2.3 Sistema VEGF.....	46
1.2.4 Sistema VEGF e hipoxia fetal.....	49
<b>1.3 OXIGENACIÓN FETAL</b>	
1.3.1. Introducción.....	51
1.3.2 Marcadores de bienestar fetal anteparto.....	53
1.3.3. Marcadores de bienestar fetal intraparto.....	59
1.3.4. Test de APGAR.....	64

1.4 GESTACIÓN GEMELAR	
1.4.1 Introducción.....	66
1.4.2 Tipos de gestaciones gemelares.....	68
1.4.3 Diagnostico.....	73
1.4.4 Complicaciones fetales y maternas.....	78
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....</b>	<b>89</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>93</b>
3.1 Objetivo principal.....	95
3.2 Objetivos secundarios.....	95
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>97</b>
4.1 Diseño del estudio.....	99
4.2 Valoración del bienestar fetal.....	103
4.3 Determinaciones analíticas.....	106
4.4 Variables epidemiológicas.....	115
4.5 Análisis estadístico.....	117
<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1 Gestaciones gemelares concordantes vs discrepantes ponderalmente.....	121

5.1.1 Variables epidemiológicas.....	121
5.1.2 Discrepancia ponderal y bienestar fetal anteparto e intraparto.....	126
5.1.3 Gestaciones gemelares discrepantes y sistema VEGF materno-fetal.....	139
5.2 Estudio de la asociación de la onda de velocidad de flujo en los vasos maternos y fetales.....	147
5.2.1 Bienestar fetal anteparto.....	147
5.2.2 Bienestar fetal intraparto.....	149
5.3 Sistema VEGF materno – fetal.....	153
5.4 Sistema VEGF materno y bienestar fetal.....	156
5.5 Sistema VEGF fetal y bienestar fetal.....	158
5.6 Sistema VEGF placentario y bienestar fetal.....	161
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>163</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>195</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>199</b>



# **1. INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 LA PLACENTA HUMANA

La placenta es un órgano muy especializado y esencial en el embarazo de los mamíferos superiores. Tiene importantes y complejas funciones, entre las que destaca el transporte e intercambio de nutrientes, la función endocrina y la inmunológica.

Para llevar a cabo todas estas funciones de manera eficaz requiere un desarrollo gradual, tanto de la circulación fetal como de la materna, que sea capaz de satisfacer la demanda creciente de nutrientes ocasionada por el crecimiento fetal y su metabolismo.

### 1.1.1 DESARROLLO PLACENTARIO

En el desarrollo de la placenta podemos distinguir dos periodos fundamentales (Morrish y cols., 1998):

#### A. Periodo prevelloso

Se extiende desde el noveno hasta el decimotercer día del embarazo.

Tras la fecundación, la capa celular que limita el blastocisto, llamada trofoectodermo, se diferencia en dos capas celulares: una interna o citotrofoblasto y una externa o sincitiotrofoblasto.

El sincitiotrofoblasto es muy invasivo, penetra en el estroma decidual uterino e invade el endometrio gracias a su actividad proteolítica: se produce la implantación del blastocisto en la mucosa uterina.

Durante la misma se produce la perforación de los capilares y se forman lagunas sanguíneas que se fusionan entre sí y van aumentando progresivamente de tamaño, creando un espacio que se convertirá en la cámara intervellosa.

#### B. Período vellosos:

Se desarrolla entre el decimotercer día y el vigesimoprimeros.

Con la fusión de las lagunas sanguíneas se forma el espacio intervelloso, que se sitúa entre columnas de sincitiotrofoblasto.

Las células procedentes del citotrofoblasto proliferan en el espesor de las columnas de sincitiotrofoblasto, que se dirigen desde la capa coriónica hasta la capa basal.

Posteriormente, en el eje de las columnas formadas, prolifera tejido conjuntivo que procede del mesoblasto

extraembrionario y forma los capilares sanguíneos. Estas son las denominadas vellosidades primarias.

En la parte distal de las vellosidades primarias, próxima a la decidua, sólo se encuentran células de citotrofoblasto. Estas se adhieren a la decidua en la placa basal formando las columnas de fijación. La proliferación lateral de estas células permite que las columnas se unan para formar una capa continua alrededor del huevo.

La división del sincitiotrofoblasto, origina una capa interna o sincitiotrofoblasto definitivo, y otra capa externa que forma la capa fibrinoide de Nitabuch.

Durante el primer trimestre existen un número pequeño de vellosidades con diámetros relativamente grandes que se encuentran formadas por epitelio, estroma y capilares sanguíneos.

A medida que avanza la gestación, el número de las vellosidades aumenta y su calibre disminuye; el citotrofoblasto va desapareciendo.

Pasados los primeros 21 días y hasta el 4<sup>o</sup> mes de gestación se forma el corión frondoso a partir de la proliferación de las vellosidades. Se produce la regresión del citotrofoblasto.

Los troncos vellositarios primarios, en las proximidades de la capa coriónica, aumentan de grosor transformándose en troncos de primer orden.

De estas, se forman ramas que constituyen las vellosidades de segundo orden, de las que a su vez se forman las de tercer orden.

Estas últimas, se dirigen hacia la capa basal a la que se unen, formando las coronas de implantación, para nuevamente dirigirse hacia el espacio intervelloso en el que se ramifican y se dividen.

Por lo tanto, cada cotiledón fetal queda constituido por un tronco vellositario con sus ramificaciones, existiendo más de 45 cotiledones fetales.

La placenta queda dividida en cotiledones por los tabiques formados por la proliferación de la decidua hacia los espacios intervelloso, que no llegan a ponerse en contacto con la capa coriónica.

Al finalizar el proceso, la placenta adquiere finalmente su forma definitiva, manteniendo su estructura hasta el final del embarazo, aunque aumenta de tamaño progresivamente.

### 1.1.2 ANATOMÍA PLACENTARIA

El sistema de comunicación materno fetal se establece, en la especie humana, por medio de la placentación hemocorioendotelial, que consta de tres elementos básicos:

- La sangre materna (*hemo*), que baña de forma directa el sincitiotrofoblasto
- El corion o placenta, que es donde se produce el intercambio
- La pared *endotelial* de los capilares fetales que atraviesan el espacio intervelloso.

La placenta madura tiene una forma discoidal con un diámetro máximo de 15 - 20 cm, un espesor de 1.5 a 2.5 cm y un peso medio de 500 gramos, que se extiende sobre una cuarta parte de la cavidad uterina (Cunningham y cols., 1996).

Distinguimos dos caras placentarias ( Fig.1):

- Una materna, que se adhiere al útero y que está constituida, al final del embarazo, por un número variable (10 - 38) de áreas convexas un poco elevadas que se denominan “cotiledones placentarios”. Estos están separados por septos o tabiques compuestos por tejido fibroso con escasos vasos. La mayor parte de los vasos están confinados en las bases de los septos y no llegan por lo general hasta la placa coriónica por lo que la partición que producen es sólo parcial.

- Una cara fetal, orientada hacia la cavidad amniótica y tapizada por el amnios, una membrana lisa, delgada y brillante, por debajo del cual tienen su recorrido los vasos del cordón umbilical, el cual se inserta en dicha cara.

El nexo de unión entre el feto y la placenta es el cordón umbilical.

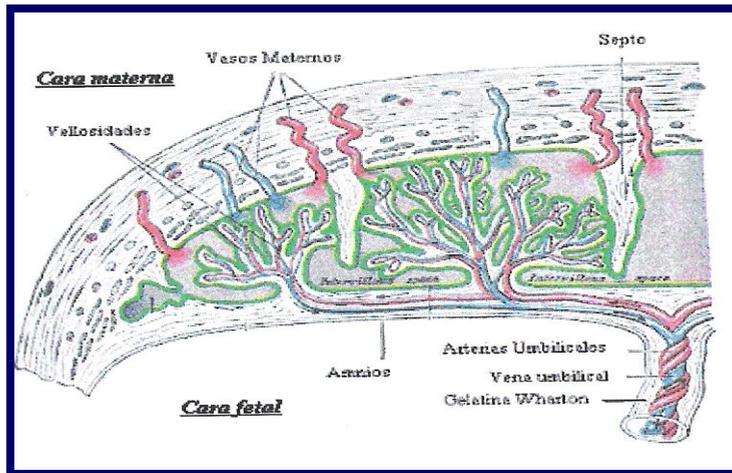
El cordón umbilical está constituido por dos arterias y una vena que poseen musculatura propia y que están rodeados por un tejido mesenquimatoso, que forma la gelatina de Wharton. Las arterias umbilicales conducen la sangre fetal hasta la placenta, donde se oxigena y se producen los intercambios de nutrientes. La sangre oxigenada retorna al feto por la vena umbilical.

El cordón se encuentra tapizado por amnios que, junto a la gelatina de Wharton, protege los vasos umbilicales para favorecer la circulación sanguínea a través de los mismos.

Al final del embarazo su longitud media es de 50 cm y tiene un diámetro entre 1 y 2,5 cm.

Así, la placenta constituye un tejido de interfase y es la principal vía de comunicación entre el feto y la madre. Por todo ello, se considera al feto y a la placenta como integrantes de una unidad funcional: la “unidad feto-placentaria”.

Fig.1 Anatomía placentaria. Corte transversal de la placenta.



### 1.1.3 CIRCULACIÓN PLACENTARIA

La placenta representa el punto donde se unen íntimamente el lecho capilar fetal y la sangre materna.

#### 1.1.3.1 Circulación materno-placentaria

A nivel materno, las arterias uterinas se dividen en las arterias arciformes, y estas originan de forma secundaria las arterias radiadas que atraviesan el miometrio antes de transformarse en las arterias espirales a la altura del endometrio. De las arterias basales que irrigan el endometrio profundo también nacen arterias radiadas.

En la circulación maternoplacentaria la sangre materna atraviesa el miometrio por las arterias espirales

uteroplacentarias, remodeladas por las células trofoblásticas, y entra en la cámara intervillosa.

Durante este trayecto baña la superficie externa microvellosa de las vellosidades coriónicas permitiendo el intercambio materno fetal.

La sangre es impulsada hacia la placa coriónica por el pico de presión arterial, va hacia el centro del cotiledón fetal, y se dispersa desde el espacio intervilloso hacia la perifería del cotiledón y hacia la superficie del corion. Desde ahí es drenada por venas de los tabiques y base decidual hacia los plexos venosos miometriales e ingresa en las venas uterinas desde donde retorna a la circulación materna sistémica ( Carbillon y cols., 2001).

Mediante microscopio electrónico se ha confirmado la arquitectura vascular placentaria ya descrita por Habashi y cols (1983), revelando además que la superficie de los vasos coriónicos está cubierta por microvellosidades correspondientes a la barrera en forma de cepillo que se observa en las preparaciones histológicas convencionales.

### 1.1.3.2. La circulación feto-placentaria

La circulación fetal comporta tres vasos importantes: dos arterias y una vena umbilicales.

En la circulación fetoplacentaria las arterias umbilicales llevan la sangre desoxigenada desde el feto hasta la placenta.

Al llegar a la lámina coriónica las arterias se ramifican y la perforan. Inmediatamente antes o después de entrar en la placa coriónica, las dos arterias umbilicales se unen mediante una anastomosis transversal que se conoce como “anastomosis de Hirtl”.

Tras perforar la placa coriónica, penetran en las vellosidades de primer orden, de las que salen las ramas para las vellosidades de segundo orden y, de estas, para las de tercer orden.

La sangre con un contenido de oxígeno ( $O_2$ ) significativamente alto, tras el intercambio con la sangre materna, regresa de la placenta al feto a través de la vena umbilical única.

La presión a nivel de las arterias umbilicales es superior al de los capilares de las vellosidades, y en estos, a su vez, más alta que la de la vena umbilical, lo que asegura el sentido de la sangre.

En la unión entre el cordón umbilical y la placenta, los vasos umbilicales se ramifican repetidas veces por debajo del amnios y de nuevo dentro de las vellosidades en división para formar, por último, redes capilares en las divisiones terminales.

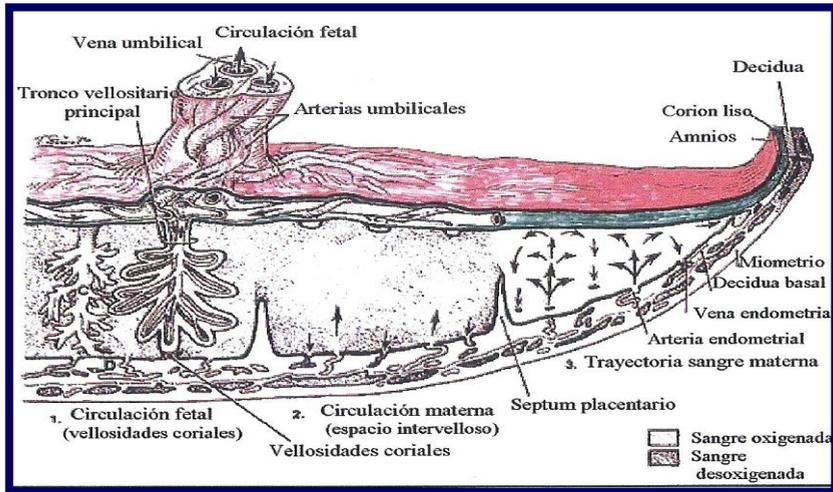
Las ramas de los vasos umbilicales que recorren la superficie fetal de la placenta o placa coriónica se denominan vasos placentarios o coriónicos.

Los vasos superficiales de la placenta constituyen ramificaciones de los vasos umbilicales y tienen un curso muy predecible en la superficie coriónica. En general, una rama arterial está acompañada por una rama venosa, y cada par terminal de vasos irriga un cotiledón fetal.

El número de vasos perforantes terminales determina el número de cotiledones. Es importante que exista una relación 1:1 entre la arteria y la vena del cotiledón.

Las arterias superficiales o coriónicas pueden reconocerse porque siempre cruzan por encima de las venas. Esta disposición resulta de gran utilidad para la identificación de la arteria y vena coriónicas siendo este criterio de mayor utilidad para la identificación que los criterios histológicos.

Fig. 2 Circulación placentaria



No hay anastomosis entre los vasos superficiales, y por este motivo nunca se desarrollan tales conexiones entre vasos vellosos; cada distrito está aislado de los otros. Existe una disminución del músculo liso de la pared de los vasos y un aumento de su calibre conforme estas arterias penetran a través de la placa basal.

La homeostasis fetal depende de una circulación materno-fetal eficiente que se lleva a cabo a través del fenómeno de la placentación.

### 1.1.3.3. La placentación

El fenómeno de la placentación humana se caracteriza por un complejo proceso de interacción entre los tejidos maternos y fetales, donde se han visto implicadas gran cantidad de proteínas.

El mecanismo que controla el proceso de invasión trofoblástica no es del todo conocido, en parte por la dificultad de obtener verdaderas biopsias placentarias.

Se produce por la infiltración que el trofoblasto realiza sobre estructuras maternas. El trofoblasto se comporta, aunque de manera limitada, como un tumor invasivo. Esta invasión del endometrio materno por las células del trofoblasto determina la remodelación de las arterias uterinas, que se caracterizan por estar muy dilatadas y ser insensibles a los agentes vasoconstrictores al final del primer trimestre.

Durante este proceso, además, las células del trofoblasto sufren una transformación profunda que les confiere un fenotipo endotelial. Esta invasión es condición indispensable para el establecimiento de una circulación materno-fetal adecuada. (Jaffe y cols., 2001).

En el mecanismo de regulación de la invasión trofoblástica se han visto implicadas enzimas proteolíticas inducidas y reguladas por factores de crecimiento, factores de crecimiento

del endotelio vascular (VEGFs) y factores de crecimiento placentario (PIGFs), agentes vasoactivos entre los que se encuentran la endotelina, el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO), moléculas de adhesión celular, metaloproteinasas y diversas citoquinas.

Recientemente se han visto implicadas las células Natural Killer (NK) uterinas que podrían jugar un papel importante en el correcto balance celular durante la invasión trofoblástica ( Lyall y cols., 2005; Ferré y cols., 2001, Pijnenborg y cols., 2006).

La comprensión de las características de la placentación en sus etapas iniciales tiene gran importancia. Así sabemos que en el embarazo humano, el blastocisto se fija al epitelio endometrial en al 5º - 6º día; luego se implanta, para lo cual rompe el epitelio y se incrusta en el estroma del endometrio.

Posteriormente, los citotrofbastos invaden la decidua, proliferan a partir del extremo de las vellosidades y forman columnas de citotrofbastos que se extienden lateralmente para formar una cubierta trofoblástica que engloba al blastocisto. Los citotrofbastos endovasculares migran en sentido ascendente por las arterias espirales uterinas, en dos oleadas. Esta invasión trofoblástica se acompaña de una degeneración del epitelio vascular y de la pérdida de tejido musculoelástico, lo cual convierte a la arteria en un tubo flácido, con los trofbastos perivasculares alojados en su pared.

Como consecuencia de ello las arterias uterinas pueden expandirse a medida que progresa el embarazo, lo cual permite el enorme aumento del flujo sanguíneo materno, necesario para que continúe el crecimiento de la placenta y el feto.

La invasión del segmento endometrial de las arterias espirales ocurre hacia las 6 - 8 semanas, y es seguida por una segunda oleada de trofoblastos que invaden el segmento miometrial de dichas arterias hacia la 16 -20 semanas de gestación. Esta invasión de la decidua materna y de las arterias uterinas por parte del citotrofoblasto es esencial para el éxito del embarazo (Espinosa y cols., 2006).

La confirmación de que las células que invaden las arterias espirales uterinas tienen un origen trofoblástico surgió de los trabajos de Kaufmann y Stark en 1971. Posteriormente Brosens y cols., definieron la función del trofoblasto extraveloso en la remodelación de la vascularización uterina (Brosen y cols., 2002).

Estos mismos autores establecieron que si se produce una ausencia de transformación o una transformación incompleta de las arterias espirales, se produce un desarrollo anómalo de la placenta que reduce su perfusión e inicia una cascada de daño endotelial y liberación de estímulos vasoconstrictores, con consecuencias negativas para el desarrollo fetal y manifestación clínica materna de hipertensión, afectación hepática y renal.

Por lo que tanto la preeclampsia como los retrasos de crecimiento intrauterino pueden ser producto de una placentación anómala ( Lyall y cols., 2005).

Un fallo más completo de la placentación puede intervenir en ciertos casos de abortos espontáneos ( Ball y cols., 2006).

A la inversa, una invasión trofoblástica hiperactiva puede hallarse implicada en implantaciones anómalas placentarias, como la placenta acreta, que se acompañan de un mayor riesgo de hemorragias maternas.

Dado que los fenómenos cruciales de la placentación parecen intervenir en la invasión de los tejidos maternos, se ha dirigido la atención investigadora hacia los mecanismos mediante los cuales la decidua podría limitar o promover dicha invasión.

#### 1.1.4 FISIOLOGÍA DE LA UNIDAD FETO-PLACENTARIA

La placenta, para llevar a cabo sus funciones de manera eficaz, necesita un desarrollo gradual tanto de la circulación materna como de la fetal que sea capaz de satisfacer la demanda creciente de nutrientes ocasionada por el crecimiento fetal y su metabolismo.

La placenta no patológica tiene una gran reserva funcional debido a la gran cantidad de flujo sanguíneo que recibe y a la extensa superficie disponible para el intercambio entre las circulaciones materna y fetal.

El desarrollo normal del feto depende en gran medida del mantenimiento de un flujo adecuado. Los aportes al feto de las sustancias esenciales, incluyendo el  $O_2$ , están más limitados por el aporte sanguíneo que por la difusión y el transporte placentario.

Se sabe que con las contracciones del miometrio se producen reducciones temporales del flujo uterino que no tienen repercusión en el feto. Sin embargo, si se producen reducciones más prolongadas y pronunciadas del aporte sanguíneo pueden producir hipoxia fetal y muerte intrauterina.

El gasto cardíaco fetal y la presión vascular a nivel de la aorta son los mecanismos fundamentales que controlan el flujo sanguíneo a través de la circulación fetal desde la placenta sana.

Las arteriolas placentarias presentan una baja resistencia vascular y los cambios en el flujo materno se compensan, fundamentalmente, por las variaciones reflejas en la tensión arterial aórtica fetal más que por alteraciones en la resistencia vascular placentaria.

Se conoce relativamente poco acerca de la cuantía exacta del flujo sanguíneo que atraviesa la circulación placentaria del ser humano, fundamentalmente por los problemas éticos que conlleva su estudio. No obstante, no existe ninguna duda de que el flujo es considerable en la gestación a término; Castle y Mackenzie lo han establecido en 500 ml / min.

La proporción del gasto cardíaco materno que va a perfundir el útero y la cámara intervellosa aumenta de forma progresiva a lo largo de la gestación y puede alcanzar, al final del embarazo, el 20-25% de dicho gasto cardíaco materno.

En la parte fetal el flujo es muy alto (entre el 30 y el 50% del gasto cardíaco), la resistencia vascular es baja y la presión arterial media es de cerca de 30 mmHg.

La tensión arterial materna uterina hace que la sangre pase a través de unas 80 a 100 arterias espirales en forma pulsátil a los senos placentarios, donde la presión arterial cae a valores cercanos a los 10-15 mmHg antes de drenar a la circulación venosa.

El factor determinante del flujo sanguíneo en la circulación materna y en los vasos placentarios, es la presión arterial materna debido a que las arterias uterinas espirales tienen una resistencia reducida durante la gestación, con lo que se comportan como vasos conductores pasivos. Como ya se ha mencionado, estos vasos carecen de regulación local y

nerviosa del tono como consecuencia de la destrucción del músculo liso y tejido elástico por las células del trofoblasto.

La existencia de una tensión arterial materna dentro de los límites de la normalidad se produce fundamentalmente por la disminución de la resistencia periférica que ocurre durante la gestación. Si ésta no se produjera, otros cambios cardiovasculares como la expansión del volúmen plasmático y los incrementos del gasto cardíaco y actividad del sistema renina angiotensina aldosterona incrementarían la tensión arterial materna (Boura y cols., 1994).

Durante la gestación, de manera fisiológica, los vasos maternos se dilatan y disminuyen su sensibilidad a los efectos vasoconstrictores de la angiotensina II y de los estímulos simpáticos, efecto en el que parecen implicados el aumento de los niveles de estrógenos y el aumento de la producción de autacoides vasodilatadores como la prostaglandina 2 (PGI<sub>2</sub>) y el NO.

En resumen, el flujo sanguíneo inadecuado a la placenta se asocia con un crecimiento intrauterino retardado (CIR) fetal. El aumento normal de este flujo se consigue gracias a una combinación de características anatómicas de la placenta y también de cambios en los sistemas cardiovasculares materno y fetal.

Es necesario resaltar el hecho de que el control del tono vasomotor en la circulación feto-placentaria no depende de estímulos nerviosos, ya que la placenta carece de inervación autónoma. Por lo tanto, la resistencia vascular debe ser fundamentalmente controlada por factores humorales y mecanismos autocrinos y paracrinos.

Han sido detectadas diversas sustancias en la circulación placentaria que pueden afectar al tono vascular feto-placentario de forma directa o indirecta entre las que encontramos: noradrenalina y adrenalina, histamina, acetilcolina, bradiquinina, serotonina, PGI<sub>2</sub> y tromboxano 2, leucotrienos, angiotensina II y endotelina. La placenta humana es capaz de actuar sobre muchas de estas sustancias y modificar su actividad.

#### 1.1.5 FUNCIONES DE LA PLACENTA

Tradicionalmente se describen cuatro funciones básicas placentarias:

##### 1. Función de barrera y de intercambio materno-fetal.

En la función de barrera placentaria no sólo se contempla la separación de las sangres materna y fetal, sino también la regulación de la transferencia de sustancias a través de la misma, permitiendo el paso de unas e impidiendo el paso de

otras. Los componentes celulares de la barrera placentaria, por tanto, se implican en el transporte de las sustancias.

Una de las funciones principales de la placenta es la de transferir  $O_2$  y una gran variedad de principios nutritivos desde la madre al feto y, al contrario, transportar dióxido de carbono ( $CO_2$ ) y otros productos del metabolismo desde el feto a la madre.

Los intercambios placentarios se rigen por factores físicos como la superficie de la membrana de intercambio (que se valora en 11-13  $m^2$  a término), el grosor de la membrana (2-5  $\mu m$ ), el volumen circulatorio materno en la cámara intervellosa (se calcula en 500-600 ml/min al final del embarazo), la presión hidrostática en la cámara intervellosa (30-50 mmHg), la presión existente en los capilares fetales (30-35 mmHg) y las diferencias entre las presiones osmóticas materna y fetal (más elevada en el lado materno). Cualquier variación de alguno de estos factores modificará el grado de los intercambios maternofetales.

La placenta presenta diversos tipos de transporte:

- a. Difusión pasiva o simple: se trata de una permeabilidad libre, en ambos sentidos, que obedece a la ley de Fick. Esta difusión se produce para el agua y la mayoría de los electrolitos (sodio, potasio, cloro, yodo, hierro....)

- b. Difusión facilitada: es un transporte pasivo facilitado por un transportador. Es saturable, específico y se realiza según un gradiente electroquímico, que no consume energía. Se produce para la glucosa y los lactatos.
  
- c. Transporte activo: la transferencia se realiza contracorriente por lo que requiere gasto energético y transportadores. Es saturable, más o menos específico y se altera cuando el suministro de energía es deficiente. Siguen este mecanismo los aminoácidos, el cobre, tiamina, piridoxina, vitamina B12, vitamina C, vitamina A (previa transformación a caroteno) riboflavina y vitaminas D, E y K en escasa cantidad.
  
- d. Pinocitosis para los anticuerpos Inmunoglobulina G, los fosfolípidos y las lipoproteínas.
  
- e. Paso a través de soluciones de continuidad de la membrana placentaria. Se produce generalmente en determinadas situaciones patológicas como la placenta previa o el desprendimiento placentario.

## 2. Función respiratoria

En cuanto a los gases, la placenta se constituye en el primer pulmón fetal, aunque su capacidad es menor que la de este órgano. El índice de difusión de gases por unidad de peso

placentario es aproximadamente del 20% respecto la del pulmón.

Una diferencia evidente es que el intercambio gaseoso en la placenta se produce entre dos fases líquidas: sangre materna de la cámara hemática y sangre de los capilares vellositarios.

La sangre que penetra en el espacio intervilloso tiene una presión de  $O_2$  superior a la que existe en la sangre de los capilares vellositarios, por lo que se establece un gradiente de presión parcial de  $O_2$ . A medida que el  $O_2$  disuelto en el plasma pasa desde el lado materno hacia el fetal, la hemoglobina (Hb) va liberando dicho gas para mantener esa diferencia de presión. En consecuencia, tanto el  $O_2$  como el  $CO_2$  atraviesa la barrera placentaria por un mecanismo de difusión simple. La sangre materna transfiere  $O_2$  a la sangre de los capilares vellositarios, al tiempo que el feto le trasporta  $CO_2$  y otros metabolitos que originan un descenso transitorio de pH en la sangre del lecho materno.

La captación de  $O_2$  en la sangre fetal es mayor que la de la sangre materna debido a que posee las siguientes características:

- La concentración de Hb en los eritrocitos fetales es superior a la de los maternos.

- La Hb fetal tiene mayor capacidad para captar  $O_2$ , por lo que la curva de disociación del  $O_2$  está desviada hacia la izquierda respecto a la de la sangre materna.

- La sangre materna transfiere  $O_2$  a la sangre fetal, al mismo tiempo que el feto elimina  $CO_2$  hacia la madre. Esto ocasiona una disminución transitoria de pH en la sangre materna que produce una liberación del  $O_2$  materno para captar el  $CO_2$  procedente del feto, y así poder mantener elevada la  $pO_2$  en el lado materno. Por tanto, es el paso de  $CO_2$  desde el lado fetal al materno lo que favorece la transferencia de  $O_2$  al feto (Efecto Borh).

En el lado fetal, en cambio, hay una elevación transitoria del pH y un desplazamiento de la curva de disociación de  $O_2$  hacia la izquierda ( al contrario que en el lado materno, que se desplaza hacia la derecha), lo que determina la velocidad de paso de  $O_2$  desde la madre al feto. Esto se denomina “doble efecto Borh”, característico de la placenta.

- El poder de difusión del  $CO_2$  es 20 veces superior al del  $O_2$  y se transfiere a través de la placenta en forma de gas. La captación de  $O_2$  por parte de la Hb fetal lleva consigo la liberación simultánea de  $CO_2$  (Efecto Haldane).

### 3. Función endocrina:

La placenta sintetiza una elevada cantidad de moléculas de las cuales ya en la década de los 80 se conocían un gran número (Osathanohoh y cols., 1984).

#### -Hormonas:

Gonadotropina coriónica humana, lactógeno placentario humano, coriotropina coriónica humana,  $\beta$ -endorfina, tirotrófina coriónica humana, hormona folículo-estimulante coriónica humana, hormona uterotrópica placentaria humana, esteroides, principalmente estriol, aunque también estradiol y estrona.

#### -Factores de liberación y factor de crecimiento nervioso:

De la hormona luteinizante coriónica humana, de tirotrófina coriónica humana y de crecimiento nervioso humano.

-Enzimas: cistoaminopeptidasa u oxitocinasa, diaminoxidasa y fosfatasa alcalina termoestable.

- Miscelánea: somatostatina y proteína plasmática asociada al embarazo.

El desarrollo de nuevas técnicas ha permitido en estos últimos años un mejor aislamiento de sustancias que se asocian a la vasculogénesis y angiogénesis placentaria así

como a la actividad contráctil de los vasos placentarios entre los que encontramos los factores de crecimiento del endotelio vascular y placentario que explicaremos más ampliamente en el siguiente punto.

## **1.2 VASCULOGÉNESIS Y ANGIOGÉNESIS PLACENTARIA**

### **1.2.1 INTRODUCCIÓN**

La angiogénesis es uno de los procesos biológicos más importantes ya que es necesaria para la función fisiológica de muchos órganos, tanto en situaciones normales como patológicas.

En algunas enfermedades, como la isquemia, este proceso puede utilizarse para restaurar la función de los órganos afectados, mientras que en procesos cancerígenos donde existe una angiogénesis incrementada de forma aberrante, esta puede ser terapéuticamente bloqueada para prevenir o frenar la progresión de la enfermedad.

La angiogénesis fisiológica juega un papel importante en una gran variedad de procesos como son la curación de las fracturas de hueso, la formación del cuerpo lúteo, el crecimiento endometrial, la implantación del embrión y en la placentación. Por otra parte la angiogénesis patológica está implicada en el crecimiento metastático de los tumores y otros

enfermedades como la artritis reumatoide, retinopatías, inflamaciones crónicas y psoriasis (Folkman y cols., 1992).

Definimos la angiogénesis terapéutica, como el uso de agentes biológicos o material bioactivo para estimular el crecimiento de los nuevos vasos, la cual es utilizada en procesos isquémicos cardíacos, en la enfermedad cerebrovascular o en las fracturas de hueso (Hockel y cols., 1993; Thompson y cols., 2000).

Por otra parte, cualquier mecanismo o sustancia capaz de inhibir el proceso de angiogénesis podría ser de gran utilidad para el tratamiento de las neoplasias.

En el embarazo, para el desarrollo de feto y placenta, se requiere la formación de vasos sanguíneos y es en este momento cuando los procesos angiogénicos adquieren una importancia capital.

El nacimiento de un recién nacido (RN) a término sano depende fundamentalmente de un desarrollo placentario normal, que permita un aporte de  $O_2$  y nutrientes adecuado desde la madre al feto.

Cualquier alteración en el desarrollo y función placentaria y en el aporte vascular uterino es responsable de una gran variedad de complicaciones obstétricas que abarcan desde un

aborto temprano y muerte fetal en el segundo trimestre de gestación hasta una preeclampsia y CIR.

La investigación sobre el perfil de transcripción implicado en la angiogénesis placentaria en el transcurso de gestaciones normales y anormales ha proporcionado una visión más amplia sobre los factores reguladores implicados en el desarrollo de los vasos sanguíneos placentarios, desarrollo y diferenciación del árbol veloso placentario y crecimiento fetal (Padavala y cols., 2006).

Un embrión implantado requiere un aporte sanguíneo para su crecimiento, esto quiere decir que es necesario la formación de vasos sanguíneos entre el ovum y la decidua que tendrán como función principal el aporte de O<sub>2</sub> y nutrientes al feto y la eliminación de los productos de degradación del mismo.

La vascularización de las vellosidades placentarias comienza alrededor del día 21 tras la concepción, mediante la formación de vasos sanguíneos que tiene lugar mediante dos procesos diferentes, mediados ambos, por factores paracrinos de crecimiento (Folkman y Klagsbrun, 1987)

#### A. VASCULOGÉNESIS:

Es el proceso durante el cual se lleva a cabo la formación de nuevos vasos sanguíneos gracias a la diferenciación de las células endoteliales progenitoras (angioblastos).

Tiene lugar, fundamentalmente, durante el primer trimestre de desarrollo fetal y consiste en tres pasos importantes (Flamme y cols., 1997):

- a. Inducción de los hemangioblastos y angioblastos (a través de factores de crecimiento de los fibroblastos)
- b. Formación de los vasos primordiales (principalmente mediante factores de crecimiento vascular endotelial y sus receptores)
- c. Transición de vasculogénesis a angiogénesis

Durante estos primeros estadios se ha visto que el Factor de Crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se expresa fuertemente en las células vellositarias del citotrofoblasto y posteriormente en las células de Hofbauer (macrófagos), mientras que sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 se encuentran en las células precursoras de la vasculogénesis y angiogénesis.

## **B. ANGIOGENESIS:**

Este segundo proceso consiste en el desarrollo de vasos nuevos a partir de otros ya preexistentes. Se han descrito dos entidades diferentes durante el proceso de angiogénesis (Folkman y cols., 1992):

- Angiogénesis ramificada: los vasos sanguíneos crecen en número.
- Angiogénesis no ramificada: los vasos sanguíneos crecen en tamaño.

Como ha sido comentado anteriormente, sabemos que la vascularización placentaria va aumentando desde el inicio hasta el final de la gestación tanto en número como en densidad. Estos cambios van acompañados de un incremento exponencial en el flujo sanguíneo tanto en la arteria umbilical como en la arteria uterina y por el aumento de la expresión placentaria de factores angiogénicos, como el VEGF, el PlGF y sus receptores.

El desarrollo de nuevas técnicas ha permitido en estos últimos años un mejor aislamiento de sustancias implicadas en los procesos de vasculogénesis y angiogénesis placentaria, tanto estimuladoras como inhibitoras, entre las cuales debe existir un buen equilibrio para el correcto desarrollo de estos procesos.

En general, el proceso de angiogénesis se inicia por factores de crecimiento tales como el VEGF, el PlGF y el Factor básico de Crecimiento Fibroblástico (bFGF) (Folkman y cols., 1987).

Estos factores de crecimiento tienen como funciones: aumentar la permeabilidad de los vasos y estimular la

degradación proteolítica de la matriz extracelular (lamina basal y reticular) mediante proteasas específicas (colagenasas y activadores del plasminógeno), causando la proliferación de las células endoteliales.

El proceso se completa por la migración quimiotáctica de las células endoteliales, la invasión de la matriz extracelular, formación de la luz del vaso, y maduración funcional del endotelio (reclutamiento de pericitos y células del músculo liso) (Reynolds y cols., 1992; Risau y cols., 1997).

El proceso angiogénico de proliferación y migración de las células endoteliales es facilitado por las células de adhesión molecular, concretamente la alfa V integrinas, vitronectina y fibrinógeno. Todos ellos median la adherencia y ramificación en la matriz, asegurando de ese modo la supervivencia de la célula.

In Vitro, el bloqueo de estas integrinas mediante antagonistas de alta afinidad, producen una inhibición efectiva de la neovascularización (Brooks y cols., 1994; Hammes y cols., 1996).

### 1.2.2 FACTORES REGULADORES DE LA ANGIOGÉNESIS

La presencia y acción de estos factores angiogénicos juegan un papel crucial en el inicio y regulación del proceso de

angiogénesis; así, cualquier desbalance en su expresión conduce a una situación patológica.

Entre los factores reguladores de la angiogénesis encontramos gran cantidad de sustancias: citoquinas, hormonas y factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular (laminina, fibronectina) y sus receptores (integrinas alfa V), metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y sus inhibidores tisulares (TIMPs) así como sus reguladores, otras proteasas (uroquinas, activador del plasminógeno), fibrina, células inflamatorias y pericitos.

Además, existen unos factores muy importantes estimuladores de la angiogénesis entre los que destacan:

- Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)
- Factor de Crecimiento Placentario (PIGF)
- Factor básico de Crecimiento Trofoblástico ( b-FGF)
- Angiopoyetina 1 y 2 (Ang1 y 2)

#### A. Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

La familia VEGF está formada por 5 componentes: el VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D y el PIGF (Klagsbrung y cols., 1996; Ferrara y cols., 2000).

El VEGF es una glicoproteína dimérica de 34 a 45 Kdal. Es una citoquina multifuncional aislada a partir de las proteínas secretadas en las pequeñas venas hiperpermeables a macromoléculas que rodean los tumores (Senger y cols., 1983).

Una revisión realizada de estudios, tanto in vivo como in vitro, apunta que el VEGF actúa como regulador de la angiogénesis tanto en procesos fisiológicos como en patológicos. Está implicado en el inicio y mantenimiento de la angiogénesis durante el desarrollo embrionario (Millauer y cols., 1993), en los tejidos adultos que precisan angiogénesis cíclica como el endometrio (Charnock-Jones y cols., 1993; Torry y cols., 1996) y en el cuerpo lúteo en formación en mujeres en edad reproductiva (Ravindranath y cols., 1992).

Este factor de crecimiento está implicado en procesos patológicos que cursan con angiogénesis como el desarrollo de la vascularización de tumores (Kim y cols., 1993).

El VEGF es el principal regulador de la angiogénesis durante el crecimiento placentario y embriogénesis.

Algunos estudios encuentran que el VEGF y sus receptores, están asociados con la angiogénesis que se produce durante el desarrollo de los ventrículos cerebrales, de los glomérulos renales y en los tejidos placentarios al final del embarazo en ratones (Breier y cols., 1997; Dumont y cols.,

1995). Otros estudios han visto que embriones de ratones carentes del gen del VEGF mueren intraútero por un mal desarrollo cardiovascular (Carmeliet y cols., 1996).

En modelos in vivo ejerce una fuerte respuesta angiogénica (Folkman y cols., 1987) y es un potente mediador para la permeabilidad capilar por lo que también se conoce como factor de permeabilidad vascular (VPF) (Senger y cols., 1983).

El transcrito primario del gen VEGF humano deriva de un único gen que contiene 8 exones separados por otros tantos intrones (Tischer y cols., 1991).

El “corte” alternativo de los exones 6 y 7 del transcrito primario por una zona común, da lugar a 6 isoformas diferentes que contienen 121, 145, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos (Tischer y cols., 1991; Houck y cols., 1991).

La forma activa del VEGF es un homodímero y las diferentes isoformas aparentemente presentan la misma actividad biológica a la hora de inducir proliferación celular (Houck y cols., 1991).

El VEGF<sub>121</sub> y el VEGF<sub>165</sub> son los más ampliamente expresados y son los principales reguladores en la proliferación y migración de las células endoteliales, al igual que de la permeabilidad vascular.

La isoforma de 121 aminoácidos es más soluble, no se une a la heparina y es secretada de forma libre de las células productoras. Mientras que las más grandes tienen, debido a los dominios presentes en los exones 6 y 7, una gran afinidad por los proteoglicanos de la superficie celular.

Por esta razón se ha sugerido que las isoformas más cortas serían las encargadas de desplazarse hacia los focos de lesión tisular, donde es necesaria la neoformación de vasos para la reparación del tejido.

En la mayoría de las situaciones, la isoforma 165 aminoácidos es la más abundante (Soker y cols., 1996; Soker y cols., 1997; Ferrara y cols., 1997), siendo también más potente a la hora de estimular la proliferación de las células endoteliales que el VEGF<sub>121</sub>.

Se sabe que el VEGF-A es un potente factor mitógeno y de supervivencia para las células endoteliales. Es, por tanto, responsable del inicio tanto del proceso de vasculogénesis como del de angiogénesis. Actúa de forma paracrina induciendo la proliferación, migración y crecimiento de las células endoteliales para la formación de estructuras vasculares tubulares.

Durante la gestación el VEGF es fundamental para el correcto desarrollo de feto y placenta.

La expresión del VEGF está regulada por diferentes factores: hipoxia, NO, citoquinas y regulación hormonal. El aporte reducido de O<sub>2</sub> en los tejidos supone un estímulo para la liberación de los factores angiogénicos como el VEGF y éste se correlaciona con el estímulo de la angiogénesis in vivo (Shweiki y cols., 1992).

Algunas citoquinas o factores de crecimiento como el Transforming Growth Factor (TGF) (Frank y cols., 1995), Interleuquina-1 (IL-1) (Li y cols., 1995), Interleuquina-6 (IL-6) (Cohen y cols., 1996), PGIE2 ( Ben-Av y cols., 1995) inducen el aumento del VEGF en diferentes líneas celulares.

Por otro lado, el NO participa en la respuesta neovascular y muchos mecanismos celulares relacionados y necesarios para la angiogénesis. El NO puede ser desencadenado por agentes vasoactivos mediante mecanismos autocrinos y paracrinos (Davies y cols., 1995).

Como se ha mencionado anteriormente, el VEGF es el factor angiogénico por excelencia y éste incrementa el NO de manera dosis - tiempo dependiente en el endotelio vascular. Un hecho claro de que el NO podría ser un mediador del VEGF, es que los inhibidores de la NO sintetasa bloquean el efecto del VEGF en los capilares (Morbideilli y cols., 1996; Whelan Vlahos y cols., 2000).

Se ha visto que el VEGF sería un estímulo para la liberación de NO, lo que mediaría la vasodilatación VEGF inducida (Grover y cols., 2002; Itho y cols., 2002) ya que la adición de L-Nitro Arginina metil ester (L-NAME), inhibidor de la NO sintetasa, reduce la relajación vascular uterina promovida por VEGF en ratas con baja ingesta proteica (Itho y cols., 2002) e inhibe la vasodilatación pulmonar fetal (Grover y cols., 2002).

## B. Factor de Crecimiento Placentario (PIGF)

El PIGF es un miembro de la familia de los factores de crecimiento endotelial y comparte alrededor de un 50% de homología estructural con el VEGF.

Su síntesis se localiza tanto en el trofoblasto veloso como en el extraveloso (Shore y cols., 1997). Los niveles de RNAm y su proteína a nivel placentario aumentan durante toda la gestación siendo sus niveles superiores al final de la misma (Kaufmann y cols., 2004).

Al contrario que el VEGF cuya expresión aumenta con la hipoxia, la expresión del PIGF aumenta con la presencia de O<sub>2</sub> (Ahmed y cols., 2000) y únicamente se une al receptor VEGFR-1, responsable de la formación de tubos vasculares.

El predominio del VEGF con respecto al PIGF durante el primer trimestre, se altera llegado el tercer trimestre donde los niveles de PIGF son superiores.

El cambio gradual en los niveles de ambos factores de crecimiento podría explicar el cambio en el tipo de proceso angiogénico (ramificado - no ramificado) (Koufmann y cols., 2004).

### C. Factor de Crecimiento Fibroblástico (b-FGF)

Los factores de crecimiento fibroblástico representan una familia de factores de crecimiento compuesta por al menos 18 miembros diferentes.

Los dos factores más importantes son el FGF-1 (ácido FGF) y el FGF-2 (básico FGF), que presentan una homología estructural superior al 50%.

Ambos tienen como función principal estimular la proliferación, modular la función de las células endoteliales e inhibir la apoptosis (muerte celular programada) y la quimiotaxis y ejercen sus funciones mediante la unión a sus receptores de membrana tirosin-quinasa existiendo receptores de alta y baja afinidad por el FGF. Los de alta afinidad están representados por los receptores FGF 1-4, son receptores tirosin-quinasa y responsables de realizar las funciones señaladas. Si embargo, los de baja afinidad, están involucrados en el secuestro y

estabilización de los ligandos, y muchos de ellos son proteoglicanos heparán sulfatos (HSPG).

El FGF-2 es un potente mitógeno expresado durante el proceso de embriogénesis y en los tejidos fetales (Arany y cols., 1998).

#### D. Angiopoyetinas 1 y 2 (Ang 1 y 2)

Las angiopoyetinas (Ang-1 y Ang-2) están implicadas en la formación vascular durante la vasculogénesis (Kingdom y cols., 2000).

La Ang-1 se expresa tanto en el cito como en el sinciotrofoblasto, mientras que la Ang-2 y su receptor Tie-2 se expresan predominantemente en el citotrofoblasto (Dunk y cols., 2000).

Tanto la Ang-1 como la Ang-2 ejercen sus funciones mediante la unión al receptor Tie-2, induciendo su fosforilación durante el desarrollo embrionario. El receptor Tie-1 no tiene un ligando conocido.

Las angiopoyetinas tienen como función principal estabilizar y remodelar el plexo capilar primario, para la supervivencia de las células endoteliales (Sato y cols., 1995; Suri y cols., 1998; Hayes y cols., 1999).

La Ang-1 juega un papel crucial en la maduración y estabilización de los vasos sanguíneos y en la supervivencia de las células endoteliales. Posee un débil efecto mitogénico de las células endoteliales encargándose fundamentalmente de la maduración endotelial y de la estabilización vascular alrededor de los tejidos.

La Ang 2, antagonista natural de la Ang-1 en las células endoteliales, actúa de forma complementaria al VEGF, bloqueando dicha estabilización y maduración vascular, permitiendo que dichos vasos permanezcan en un estado de mayor plasticidad para hacer frente a la señal del VEGF-A para seguir creciendo (Demir y cols., 2006).

#### D. Factores inhibidores de la angiogénesis

Los dos inhibidores más potentes de la angiogénesis son la angiostatina y la trombospondina (TPS).

La angiostatina es un fragmento proteolítico del plasminógeno, el cual tiene acción fuertemente antiproliferativa en las células endoteliales y también inhibe el crecimiento de tumores primarios en los ratones (Jung y cols., 2003; O'Reilly y cols., 1994).

La TSP, se libera a partir de trombina de las células de las plaquetas activadas y es producida por muchas células incluyendo las células endoteliales, del músculo liso,

macrófagos, neutrófilos y fibroblastos. La TSP soluble, tiene acción antiproliferativa de las células endoteliales, modula la adhesión de las células endoteliales y tiene efecto antiqumiotáctico, mientras que la TPS unida puede actuar como promotor angiogénico (Di Petro y cols., 1993).

### 1.2.3 SISTEMA VEGF

El sistema VEGF, incluye el VEGF a nivel de RNAm, proteína y circulante así como sus ligandos y receptores. Este sistema, como ya hemos comentado anteriormente, juega un papel importante en el proceso de angiogénesis (Veikkola y cols., 1999).

Las acciones de aumento de permeabilidad promovidas por el VEGF sobre las células endoteliales son directas (Hippenstiel y cols., 1998) y vienen reguladas por la presencia de dos receptores específicos expresados fundamentalmente en el endotelio vascular (Shibuya y cols., 2001).

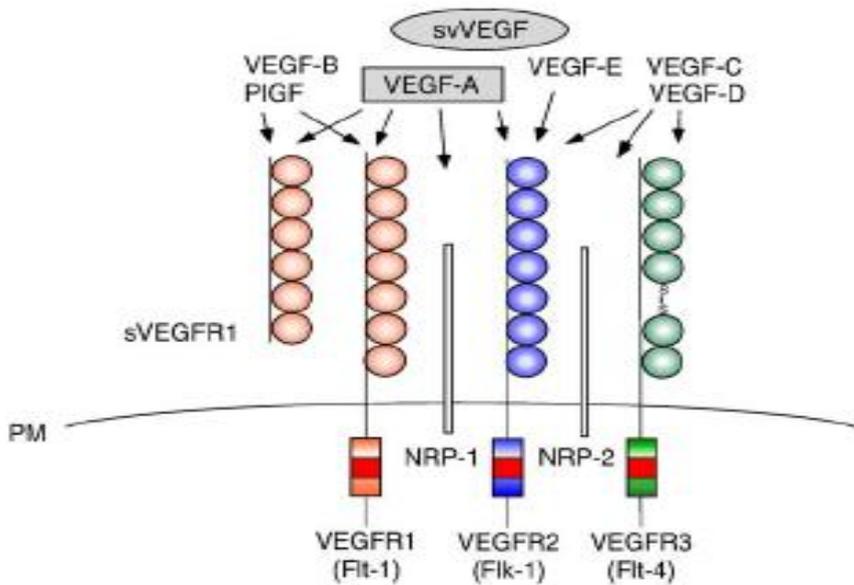
Dichos receptores son:

a. El receptor de VEGF nº1 (VEGFR1), también llamado Flt-1. Posee una forma soluble que se detecta en suero durante el embarazo denominado sVEGFR1 o sFlt-1

b. El receptor nº2 (VEGFR2), también llamado Flk-1 o KDR (siendo el KDR en nombre que recibe el receptor en humanos y Flk-1 el nombre que recibe en roedores)

c. VEGFR3 (Flt-4), Neuropilina 1 (NP-1) y Neuroepitelina 2 (NP-2).

Figura 3. Sistema VEGF



La expresión del VEGFR1 es especialmente preponderante en el endotelio arterial (Peters y cols., 1993) mientras que el VEGFR2 está aumentado en densidad en capilares, venas y venulas (Millauer y cols., 1993).

El VEGFR1, que tiene mayor afinidad por el VEGF que VEGFR2, desempeña principalmente funciones de morfogénesis y estructuración de las células endoteliales (Fong y cols., 1995), mientras que el VEGFR2 está implicado

principalmente en la mitogénesis (Shalaby y cols., 1995; Gille y cols., 2001), y tiene una actividad antiapoptótica.

En el endotelio vascular el sFlt-1 actúa como inhibidor de las acciones del VEGF, secuestrando el ligando (Ferrara y cols., 1997).

El VEGFR-2 es el mayor transductor del VEGF en las células endoteliales y media la proliferación celular, la migración y la permeabilidad endotelial, mientras que el VEGFR-1 es típicamente considerado como el mediador de la migración celular (Neufeld y cols., 1999).

La disrupción de ambos receptores resulta en la formación y desarrollo vascular, que conlleva a una alteración en la función de los vasos sanguíneos.

La NP-1 y 2 han sido recientemente identificados en las células endoteliales y son capaces de unirse al VEGF<sub>165</sub> pero no al VEGF<sub>121</sub> (Soker y cols., 1996; Gluzman-Poltorak y cols., 2000).

A diferencia del VEGFR1 y 2, el NP-1 y 2 no poseen un dominio tirosin-kinasa por lo que no son capaces, por ellos mismos, de inducir respuestas celulares, sin embargo se ha visto que desempeñan un papel importante en el proceso de angiogénesis. La disrupción del gen NP-1 resulta letal para el embrión debido a un fallo en el desarrollo cardiovascular, de la

misma manera que lo produce su sobreexpresión (Kitsukawa y cols., 1997).

#### 1.2.4 SISTEMA VEGF E HIPOXIA FETAL

La hipoxia fetal aguda o crónica, es un factor de riesgo que se asocia a la mortalidad y morbilidad perinatal.

Para evitar la agresión de la hipoxia, el feto recurre a tres mecanismo de defensa fundamentalmente:

- Redistribución de la masa circulante a favor de los órganos vitales (cerebro, corazón y suprarrenales)
- Disminución del consumo de O<sub>2</sub>
- Glucólisis anaerobia

Estas situaciones las podemos objetivar con el estudio Doppler en vasos umbilicales y cerebral media, y con la toma del Equilibrio Ácido-Base (EAB) de sangre de cordón al nacimiento.

Estudios recientes en animales y humanos, señalan que la hipoxia es un potente inductor de la expresión, síntesis y secreción del VEGF (Ahmed y cols., 2000).

Conocemos dos patologías en gestaciones humanas, preeclampsia y CIR, que constituyen modelos de hipoxia debidos a insuficiencia placentaria.

En ambas situaciones, parece existir una alteración de la invasión trofoblástica de las arterias espirales (Meekins y cols., 1994; Kadyrov y cols., 2006). También se ha visto que este fenómeno ocurre en gestaciones gemelares que presentan discrepancia ponderal entre los fetos (Matijevic y cols., 2002).

Se han realizado múltiples estudios que asocian dichas patología con el sistema VEGF. En humanos y en situaciones que condicionan hipoxia, no existe unanimidad en cuanto a los resultados.

Así pues, para algunos autores en la preeclampsia el VEGF se encuentra aumentado respecto a gestaciones normales (Helske y cols., 2001; Bosio y cols., 2001; Simmons y cols., 2000), sin embargo alguno lo encuentra disminuido (Zhou y cols., 2002).

En casos afectos de CIR, se observan mayores discrepancias, así está aumentado (Helske y cols., 2001), no cambia (Lash y cols., 2001) o está disminuido (Regnault y cols., 2002).

## 1.3. OXIGENACIÓN FETAL

### 1.3.1 INTRODUCCIÓN

El proceso de oxigenación se define como el transporte de  $O_2$  molecular procedente del aire a los tejidos del organismo.

En el feto, primero el  $O_2$  tiene que pasar a la placenta, posteriormente se une de forma reversible a la hemoglobina fetal para posteriormente ser utilizada para el crecimiento y el metabolismo fetal.

Cuando existe un aporte de  $O_2$  insuficiente, el ciclo de Krebs no puede funcionar y el piruvato se convierte en ácido láctico. Este entra en la sangre, produciéndose una acidosis metabólica, a no ser que se metabolice o excrete.

La hipoxia fetal, deficiencia de  $O_2$  en los tejidos, revierte el metabolismo de aeróbico a anaeróbico, que produce menos energía y más ácidos. Si el déficit de  $O_2$  no se corrige se produce la muerte fetal.

La hipoxia puede producirse por tres mecanismos diferentes (Peebles y cols., 2004):

- Reducción en la perfusión placentaria que ocasiona secundariamente un descenso en el  $O_2$  de los vasos

sanguíneos arteriales fetales debido a un descenso de  $pO_2$  (hipoxia hipoxémica) (Gagnon y cols., 2003).

- Disminución del  $O_2$  en la sangre arterial debido a la disminución en la concentraciones de Hb fetal (hipoxia anémica).

- Reducción del aporte sanguíneo a los tejidos fetales (hipoxia isquémica).

La hipoxia fetal aguda o crónica es un factor de riesgo que se asocia a la mortalidad y morbilidad fetal. Entre las diferentes manifestaciones de las secuelas de la de la hipoxia, se han asociado diferentes tipos de daño neurológico: parálisis cerebral, retraso mental, epilepsia y alteraciones de la conducta y el aprendizaje (Salihagic-Kadic y cols., 2006).

El CIR, la hipertensión inducida por la gestación y la gestación múltiple se asocian a un 50% de prematuridad y riesgo de hipoxia.

Por lo tanto es crítico para la objetivación de la hipoxia el conocimiento del EAB y cuando esto no sea posible, la redistribución del flujo sanguíneo, posibilitados por la toma del EAB en los vasos umbilicales al nacimiento y el estudio Doppler, onda de velocidad de flujo (OVF) de la arteria umbilical y arteria cerebral media del feto intraútero.

El control cardiovascular fetal en situaciones normal o de hipoxia está regulado por el sistema nervioso, hormonas y autacoides.

Un flujo sanguíneo fetal adecuado refleja una buena nutrición y oxigenación del feto. El índice de resistencia (IR) a nivel de las arterias umbilicales aumenta o disminuye en función del número de arteriolas funcionales propias de las vellosidades terciarias, así, si disminuye el número de arteriolas aumenta el IR en las arterias umbilicales (Giles y cols., 1985).

Se han descrito varios métodos anteparto, intraparto y postparto para valorar el estado de bienestar fetal, que se describen a continuación.

Es importante tener en cuenta que el mejor método para el control fetal es aquel que es capaz de detectar los fetos comprometidos con el menor número de intervenciones obstétricas innecesarias, como el número de cesáreas.

### 1.3.2 MARCADORES DE BIENESTAR FETAL ANTEPARTO

#### *a. Marcadores biofísicos*

Dentro de los marcadores de bienestar fetal anteparto tenemos fundamentalmente los marcadores biofísicos.

Dentro de estos se incluyen los movimientos fetales, el registro cardiotocográfico (no estresante y estresante), el perfil biofísico y la ultrasonografía Doppler. Este último permite conocer la vascularización fetal y los procesos de redistribución sanguínea fetal en casos de hipoxia fetal.

A pesar de los grandes avances en el control obstétrico y manejo neonatal para la reducción de la asfixia fetal, la tasa de parálisis cerebral permanece igual (Hankins y cols., 2003).

La acidosis metabólica ocurre en aproximadamente el 2% de todos los nacimientos, siendo el 90% recién nacidos normales.

Centrándonos en los casos en los que se desarrolla parálisis cerebral se ha establecido que el 10% de los casos son debidos a eventos que ocurren después del nacimiento, el 10-20% son debidos a eventos que suceden intraparto y el 70% restante suponen el gran reto para los obstetras y neonatólogos (Hankins y cols., 2003; ACOG, 2003)

Dentro de los marcadores de bienestar fetal anteparto encontramos, como ya he comentado anteriormente, los movimientos fetales, el perfil biofísico, el registro cardiotocográfico (no estresante y estresante) y la ultrasonografía Doppler. Únicamente voy a hacer mención a este último, ya que es el único de interés dentro de nuestro trabajo de investigación.

La ecografía Doppler es un método no invasivo que nos sirve para el estudio hemodinámico tanto del sector uteroplacentario como fetal con la finalidad de identificar los fetos que están realizando una redistribución del flujo en respuesta a un insulto hipóxico (Gudmundsson y cols., 2001).

Cuando existe un compromiso en la nutrición fetal se produce, en primera instancia, un daño placentario y finalmente se produce un compromiso fetal. El daño placentario se asocia a un aumento de las resistencias al flujo en la arteria umbilical que es posible medir mediante la determinación de las OVF empleando la ecografía Doppler (Joern y cols., 1997)

Las OVF son el fiel reflejo del gasto / rendimiento cardiaco, la complianza vascular y la resistencia al flujo sanguíneo en un punto determinado de los vasos sanguíneos.

Así podemos estudiar si el feto está realizando algún mecanismo de compensación frente a la hipoxia, como el fenómeno llamado de “centralización circulatoria” (Cheema y cols., 2006).

El Doppler de las arterias umbilicales reflejan la resistencia a nivel placentario. Las velocidades de flujo diastólicas bajas suelen deberse a aumentos de las resistencias placentarias, siendo la expresión de una dificultad en el intercambio materno-fetal que puede ser causante de hipoxemia (Viero y cols., 2004).

Por el contrario, los cambios en el flujo de los vasos fetales son la expresión de los diferentes fenómenos adaptativos del feto a la hipoxemia.

De los diferentes estudios randomizados sobre la utilidad del Doppler en los vasos umbilicales (A Umb) y arteria cerebral media (ACM) fetal, se deduce que no es una buena prueba de cribado en las gestaciones de bajo riesgo, siendo de gran utilidad en las gestaciones de alto riesgo ya que se ha visto que reduce la mortalidad perinatal (Stringini y cols., 1997).

Existe una relación significativa entre la oxigenación de la sangre, la acidosis láctica sistémica (determinada mediante cordocentesis) y el aumento de los valores en índices de pulsatilidad (IP) en la arterias umbilicales.

La redistribución del flujo puede ser evaluado mediante el cociente cerebro-placentario (Ccp) (razón entre el IP en la ACM y el IP en la AU). Se sabe que este cociente es el indicador más preciso que existe para valorar la redistribución sanguínea fetal que acontece durante la hipoxia. Refleja al mismo tiempo los cambios hemodinámicos que se producen en el cerebro y en la placenta (Bahado-Singh y cols., 1999; Jaim y cols., 2004).

Durante una gestación normal, la resistencia cerebro vascular es superior a la resistencia placentaria por los que el Ccp es superior a 1. En situaciones de hipoxia donde se produce una redistribución del flujo sanguíneo dicho cociente

disminuye debido a que se produce una disminución de las resistencias ( vasodilatación ) a nivel cerebral para facilitar la irrigación cerebral.

Se ha visto que los fetos que presentan un CIR el Ccp es un indicador útil para detectar hipoxia fetal (Habek y cols., 2004; Makhseed y cols., 2000), al igual que para detectar posibles complicaciones en las gestaciones gemelares (Gaziano y cols., 2001).

La evaluación mediante ecografía Doppler de los vasos de la circulación fetal juegan un papel importante en el screening para detectar una placentación anómala y las complicaciones derivadas de la misma, como son la preeclampsia, el CIR y la muerte fetal (Soregaroli y cols.,2002; Zeeman y cols., 2003).

Por otra parte, varios estudios ha puesto de manifiesto una alteración en la circulación en los vasos uterinos en situaciones en las que existe una preeclampsia o fetos CIR. En ambas situaciones, parece existir una alteración de la invasión trofoblástica de las arterias uterinas espirales, pudiendo ser objetivado mediante el aumento de las resistencias en el Doppler de arterias uterinas (A Ut) (Ganapathy y cols., 2006; Papageorghiou y cols., 2005).

Su empleo en gestaciones gemelares ha sido menos estudiado, aunque existen estudios donde se ha visto que el

valor predictivo negativo es menor para la detección de sus complicaciones (Geipel y cols., 2002).

Se ha visto por otra parte, como hemos comentado, que un VEGF aumentado se asocia en gestantes a un aumento de las resistencias periféricas y a una mayor expresión de VEGF a nivel placentario con mayor resistencia de flujo sanguíneo en arterias uterinas (Crispi y cols., 2006).

En definitiva, evaluar la circulación fetal y de los vasos uterinos es esencial para conocer la fisiopatología de una gran parte de gestaciones patológicas y su manejo clínico.

#### *b. Marcadores bioquímicos*

Se han realizado múltiples estudios que estudian marcadores bioquímicos, bien en sangre materna (ej. estriol, leptina), fetal (ej. endotelina 1) líquido amniótico (ej. eritropoyetina) o en placenta (ej. VEGF), con el fin de poder detectar un estado de insuficiencia placentaria que ocasionaría una hipoxia fetal anteparto (Arabin y cols., 1995; Lepercq y cols., 2003; Ostlund y cols., 2000; Teramo y cols., 2004; Ahmed y cols., 2000).

A pesar de ello, de momento, ninguno ha sido capaz por él mismo de diagnosticar de forma precisa un estado de hipoxia fetal anteparto.

### 1.3.3 MARCADORES DE BIENESTAR FETAL INTRAPARTO

#### *a. Marcadores biofísicos*

Los métodos de control fetal intraparto tienen como objetivo principal la detección de forma indirecta de los estados de hipoxia fetal que acontecen durante el trabajo de parto.

La monitorización fetal durante el parto se basa fundamentalmente en el control de la frecuencia cardiaca fetal mediante el empleo de una técnica simple, continua y no invasiva.

Su objetivo principal durante el parto es el poder alertar a los obstetras con sus diferentes patrones de un posible situación de hipoxia fetal.

Su estimación sensibilidad alcanza el 85%, sin embargo tiene como principal inconveniente su alta tasa de falsos positivos, lo que nos lleva a falsos diagnósticos de sufrimiento o asfixia fetal.

Todo esto hace necesario otros métodos de detección del estado de oxigenación fetal, como son la pulsioximetría fetal o el pH de calota fetal, con la finalidad de reducir el intervencionismo, abdominal o vaginal, para tratar el supuesto sufrimiento fetal.

*b. Marcadores bioquímicos*

**- Estudio del equilibrio ácido base fetal: pH calota fetal**

El estudio del equilibrio ácido base fetal mediante la obtención de una micromuestra de sangre de la calota fetal fue introducido por Saling en los años 60 del siglo pasado; y hasta hace unos años era el único método capaz de valorar realmente el estado de acidosis fetal intraparto (Brestscher y Saling ,1967).

Sin embargo, su medición a diferencia del registro cardiotocográfico, es invasiva, no continúa y requiere múltiples mediciones a lo largo del parto.

El valor normal de pH durante el parto es superior a 7,20 UI; todo valor inferior al mismo es considerado como un estado de acidosis fetal. Es obvio, que cuanto menor sea el pH, más acidótico estará el feto y más comprometida será su situación.

Durante el parto, se producen una serie de variaciones que repercuten en los medios internos maternos y fetales. El feto estabiliza su medio interno compensando, en las pausas intercontráctiles, los déficits en el intercambio que se presentan durante la contracción. Sin embargo durante el periodo expulsivo, cuando las contracciones son más frecuentes e

intensas, se produce una disminución progresiva de la reserva compensadora fetal.

Esto repercute en la disminución del pH fetal, produciéndose un incremento en la  $p\text{CO}_2$  y una disminución del exceso de bases.

Cuando se produce un compromiso fetal, el feto deja de recibir  $\text{O}_2$  y no es capaz de eliminar el  $\text{CO}_2$ , lo que con el tiempo lleva a una situación de acidosis que comporta una serie de modificaciones a nivel de los tejidos fetales que pueden provocar un sufrimiento fetal.

#### **- Análisis de gases en sangre del cordón umbilical: equilibrio ácido-base**

El análisis de gases en la sangre del cordón umbilical es hoy en día el indicador más fiable del estado de oxigenación fetal al nacer.

El diagnóstico de asfixia intraparto requiere la presencia de acidemia intensa en sangre de cordón ( $\text{pH} < 7$ ) y las cifras normales refutan el diagnóstico.

Es sabido que el metabolismo fetal normal produce dos tipos de ácidos: volátiles y no volátiles o fijos. El ácido volátil,

carbónico, es producido por la combustión de glucosa y ácidos grasos.

A nivel de los tejidos,  $\text{CO}_2$  ingresa en el eritrocito y mediante la enzima anhidrasa carbónica se combina con agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) para formar el ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). Este, se disocia en un ion hidrógeno o protón ( $\text{H}^+$ ) y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ).

El hidrógeno, es amortiguado por la hemoglobina y el  $\text{HCO}_3^-$  sale del eritrocito intercambiándose por cloruro. El eritrocito, pasa a la placenta, órgano de respiración fetal, donde ocurre la reacción opuesta. El  $\text{CO}_2$  formado difunde a través de la placenta para ser excretado por los pulmones maternos, y es facilitado por el gradiente feto-materno de  $\text{pCO}_2$ .

Los ácidos no volátiles o fijos, como el ácido láctico, el ácido úrico y los cetoácidos, se forman por la utilización de aminoácidos no sulfurados y la combustión incompleta de los carbohidratos y ácidos grasos.

El sistema renal fetal, debido a su inmadurez, no es capaz de excretar estos ácidos, por lo que difunden lentamente hacia la circulación materna para ser excretados por vía renal. La acumulación de estos ácidos puede acusar acidosis metabólica. La excreción fetal de ácidos fijos depende de la función placentaria y renal materna. Por lo tanto, cualquier trastorno prerrenal o renal, como la preeclampsia, hipertensión

crónica o la diabetes, pueden causar acidemia metabólica fetal no vinculada a la hipoxemia.

La acidemia en sangre de cordón producto de una acidemia materna puede no tener importancia clínica; por el contrario, la acidemia fetal causada por hipoxia fetal tiene importancia tanto clínica como legal; por lo que ante situaciones que hagan sospechar una acidosis metabólica de causa materna se debería realizar una determinación de gases sanguíneos venosos maternos.

El aporte de  $O_2$  y la salida del  $CO_2$  y los metabolitos ácidos por la placenta permiten al feto mantener un equilibrio ácido básico normal.

Hablamos de acidemia respiratoria cuando la acumulación de hidrogeniones es causada de manera principal por una mayor  $pCO_2$ .

La acidemia metabólica es cuando la acumulación de hidrogeniones depende sobre todo de un déficit de  $HCO_3$ .

La acidemia respiratoria fetal suele ocurrir ante un decremento súbito del riego uteroplacentario o umbilical.

El inicio agudo de insuficiencia uteroplacentaria puede producir acidemia respiratoria fetal si ocurre el parto de inmediato. La hiperestimulación, la hipotensión materna o

redistribución del gasto cardiaco por la anestesia regional, el desprendimiento placentario y la compresión del cordón pueden causar insuficiencia uteroplacentaria.

Si estos factores no se revierten, ocurre un metabolismo fetal rápido que ocasiona una acidosis metabólica fetal, que es la que se ha visto que está más directamente relacionada con la morbilidad neonatal (Andres y cols.,1999).

También puede ocurrir acidemia metabólica fetal por un trastorno metabólico o acumulativo. El CIR producto de una insuficiencia uteroplacentaria crónica a menudo se vincula con acidemia metabólica fetal.

La disminución de  $\text{HCO}_3$  y el aumento de  $\text{CO}_2$  producen acidemia respiratoria mixta (Ross y cols., 2002).

Con todo esto, es lógico que el estudio del pH y del EB en las vasos del cordón son el indicador más fiel del verdadero estado de oxigenación fetal (ACOG, 2006).

#### 1.3.4 TEST DE APGAR

Fue la doctora Virginia Apgar quien en la década de los 50 del siglo XX describió un test capaz de valorar el estado del recién nacido en el periodo postnatal inmediato (Apgar ,1953).

El apunte de Apgar es un método clínico que permite valorar al niño inmediatamente después del parto. Se realiza de rutina al 1° y 5° minuto de vida. Consiste en la valoración de cinco signos clínicos: frecuencia cardíaca, esfuerzo respiratorio, tono muscular, irritabilidad refleja y color.

Dicho test ha logrado mejorar la supervivencia y reducir la morbilidad de los RN ya que permite determinar inmediatamente la necesidad de cuidados especiales en los recién nacidos que nacen con puntuaciones bajas.

Una puntuación baja del test de Apgar al minuto de vida del recién nacido indica la necesidad de reanimación y se ha visto íntimamente relacionado con los valores de pH de cordón al nacimiento (Gordon y cols., 1985; Victory y cols., 2004; Hogan y cols., 2007).

Describimos a los RN como severamente deprimidos si obtienen valores del test de Apgar entre 0- 3, moderadamente deprimidos entre 4- 6 y vigorosos con una puntuación de Apgar  $\geq 7$ .

## Test de Apgar.

Signo	0	1	2
Frecuencia cardíaca	Ausente	<100 l/min	> 100l/min
Esfuerzo respiratorio	Ausente	Irregular, lento	Llanto vigoroso
Tono muscular	Flácido	Extremidades algo flexionadas	Movimientos activos
Respuesta estímulos	Sin respuesta	Muecas	Llanto
Coloración	Cianosis o palidez	Acrocianosis, tronco rosado	Rosáceo

## 1.4 GESTACIÓN GEMELAR

### 1.4.1 INTRODUCCIÓN

La gestación gemelar representa un pequeño porcentaje del total de gestaciones, estimando su incidencia aproximada en un 2-3%.

La importancia de las gestaciones gemelares radica en que son responsables de una proporción importante de complicaciones perinatales graves y, secundariamente, suponen un consumo considerable de recursos sanitarios

dadas sus importantes repercusiones médicas, psicológicas, económicas y sociales (Callahan y cols., 1994; Norwitz y cols., 2005).

En los últimos 20 años se ha producido un incremento considerable del número de gestaciones múltiples debido fundamentalmente a dos hechos:

- incremento de la maternidad en mujeres añosas. La añosidad en el momento de concebir produce un incremento pequeño pero considerable, de gestaciones múltiples ( Bortolus y cols., 1999).

- incremento en la utilización y el avance en las técnicas de reproducción asistida (TRA).

Se estima que aproximadamente el 40% de los embarazos múltiples provienen de Técnicas de Fecundación In Vitro (FIV) o similares, un 30% de inducciones de la ovulación, ya sea con o sin inseminación, siendo el 30% restante producto de gestaciones naturales (Levene y cols., 1992; Howard y cols., 2003).

La gestación múltiple se considera, actualmente, una de las complicaciones más importantes de los tratamientos de reproducción asistida, por las importantes repercusiones previamente mencionadas.

El diagnóstico precoz de una gestación gemelar, la identificación de su corionicidad mediante la ecografía precoz, una estrecha vigilancia fetal (sobre todo en gestaciones monocoriales) y un tratamiento adecuado, cuando es requerido, son las mejores estrategias para reducir la morbi-mortalidad perinatal.

#### 1.4.2 TIPOS DE GESTACIÓN GEMELAR

La gestación gemelar se clasifica según su cigosidad y corionicidad, aunque, como veremos más adelante, lo único que tiene relevancia respecto a los resultados perinatales es la corionicidad.

##### A. Según la cigosidad

Dependiendo de que la fecundación se realice sobre uno o varios óvulos o por uno o más espermatozoides distinguimos dos tipos de embarazos gemelares.

##### - Diczigotos o bivitelinos

El 80% de todos los embarazos gemelares pertenecen a este grupo. Se produce por la fecundación de dos óvulos por dos espermatozoides.

Tienen, por tanto, diferente carga genética, pueden ser de igual o diferente sexo y cada embrión desarrolla por separado sus membranas ovulares (amnios) y su placenta (corion); por eso siempre serán gestaciones gemelares bicoriales biamnióticas.

Su incidencia depende básicamente de factores genéticos y socio-económicos (raza, edad y paridad materna) y, en especial, del creciente uso de técnicas de reproducción asistida y de la utilización de fármacos inductores de la ovulación (Callahan y cols., 1994).

#### - Monocigotos o univitelinos

Suponen el 20% restante. Se produce por la fecundación de un único óvulo por un espermatozoide.

Ambos tienen la misma carga genética y por tanto el mismo sexo.

Su frecuencia es independiente de la raza, factores hereditarios, edad y paridad. Por lo que su incidencia prácticamente no ha sufrido variación.

#### B. Según la corionicidad.

El momento exacto de la división del cigoto tras la fecundación condiciona importantes diferencias, principalmente

respecto al tipo de placentación. Dependiendo de dicho momento los embriones estarán totalmente separados o compartirán estructuras. Así, existen diferentes tipos de embarazo gemelar.

- Bicorial-Biamniótico.

Se produce cuando el cigoto se divide antes del 4º día postfecundación. Se desarrollarán dos embriones separados, cada uno con su placenta y amnios. Representan el 20-30% de gestaciones gemelares.

- Monocorial-Biamniótico

La división ocurre entre el 4 y el 8º día, los embriones compartirán la placenta pero sus cavidades amnióticas serán independientes. El 70-80% de las gestaciones monozigótas se dividen en este momento.

- Monocorial-Monoamniótico

Cuando la división ocurre entre los días 8º y 12º. Los embriones compartirán tanto el amnios como la placenta. Son las menos frecuentes, alrededor del 1%, pero son responsables de importantes complicaciones obstétricas (Cordero y cols., 2006).

- Gemelos siameses

Si la división se produce después del día 12 post-fecundación, los embriones tendrán alguna o varias estructura comunes. Este fenómeno extremadamente raro (1/30.000 gestaciones) y de muy mal pronóstico.

Cualquier gestación gemelar, sea del tipo que sea, supone una mayor morbi-mortalidad tanto materna como fetal.

La mayor incidencia de complicaciones maternas deriva del aumento en el porcentaje de complicaciones obstétricas como hiperemesis gravídica, anemia, problemas nefrourológicos, preeclampsia, desprendimiento de placenta, diabetes gestacional (Seoud y cols., 1992).

Aunque, como hemos mencionada anteriormente las gestaciones gemelares únicamente representan el 2-3 % de los embarazos , acumulan el 10% de la morbilidad neonatal. Esto es debido, básicamente, a la alta frecuencia de complicaciones perinatales como parto prematuro, bajo peso al nacimiento, retraso de crecimiento fetal, mayor tasa de malformaciones congénitas... Estas complicaciones se presentan con mayor frecuencia en las gestaciones monocoriales (Leduc y cols., 2005).

El tipo de placentación tiene mucha importancia a la hora de evaluar la morbi-mortalidad perinatal ya que la corionicidad de la gestación marcará el pronóstico fetal (Dube y cols., 2002; Carroll y cols., 2005). Así los gemelos monocorionicos

presentan mayor morbimortalidad que los dicorionicos (Minakami y cols., 1999; Leduc y cols., 2005).

Esto se debe fundamentalmente a que existen diversas alteraciones que son características de las gestaciones monocorionicas, como son, el síndrome

de transfusión feto-fetal y la secuencia TRAP, que implican un peor resultado perinatal (Duncombe y cols., 2003)

Independientemente de estas dos patologías, las gestaciones monocoriales tienen mayor incidencia de parto pretérmino, de fetos con pesos inferiores al percentil 10, cuando la discrepancia entre ambos es igual o superior al 25% y de hemorragias intraventriculares grado 3 y 4 (Leduc y cols., 2005).

Es importante tener en cuenta la posibilidad de muerte fetal de uno de los dos gemelos. En este caso, el pronóstico del superviviente también dependerá de la corionicidad de la gestación, siendo peor para los gemelos monocoriales.

Como hemos comentado las complicaciones de las gestaciones monocoriales son superiores a las de las bicoriales.

Los gemelos monocoriales presentan 6 veces mayor porcentaje de pérdida fetal entre la semana 10-24 respecto a

los bicoriales (12% frente a 2%), mayor morbilidad siendo la más trágica la lesión cerebral (30% frente a 3%) y el doble de mortalidad perinatal (2.8% frente a 1.6%) (Bejar y cols.,1990; Sebire y cols., 1997).

Tabla 1. Clasificación de las gestaciones gemelares según zigosidad.

Zigosidad	Dizigótico	Monozigótico		
Incidencia	Variable	3-5 por 1000 partos		
Corionicidad	Bicorial biamniótico	Bicorial biamniótico	Monocorial biamniótico	Monocorial monoamniótico
División	No	< 4º día	4º-8º día	8º-12º día
Distribución	70%	30%		
		20-30%	70-80%	1%
Mortalidad perinatal	15/ 1000	30 / 1000	500 / 1000	

### 1.4.3 DIAGNÓSTICO

El objetivo principal de las técnicas de diagnóstico precoz de las gestaciones gemelares es fundamentalmente reducir la morbimortalidad perinatal.

El diagnóstico por ultrasonidos se ha convertido en el método de elección para el diagnóstico de certeza del embarazo múltiple.

La ecografía es una herramienta básica que ha permitido de manera precoz determinar el número de fetos, su tamaño y

viabilidad. Además permite conocer el tipo de cigosidad, número de vesículas vitelinas, número de amnios, localización placentaria, detección de alteraciones en el crecimiento fetal, de los volúmenes de líquido amniótico y el hallazgo de anastomosis vasculares anormales. Todo ello, como explicaré a continuación, es fundamental para conseguir el objetivo principal anteriormente comentado.

### **- Ecografía en I trimestre**

La ecografía del primer trimestre, que puede hacerse por vía transabdominal o transvaginal, se realiza entre las semanas 10-13 y permite establecer:

- a. Número de embriones
- b. Presencia de actividad cardíaca, a partir de la semana 6 de gestación
- c. La corionicidad, por el número de sacos gestacionales (Carroll y cols., 2002; Shetty y cols., 2005). Es posible desde la 5ª semana de gestación, donde cada saco aparece como una imagen econegativa con un halo hiperrrefringente a su alrededor que se localiza en el espesor del endometrio.

Si se trata de una gestación monocorial se observa una única placenta que puede tener o no una membrana divisoria dependiendo de si es (Vayssiere y cols., 1996):

- monoamniótica. Cuando existe dicha membrana

- biamniótica . Existen dos sacos vitelinos y se observa la membrana entre ellos, que está compuesta por dos capas de amnios y un espacio extracelómico único.

En las gestaciones bicoriales la membrana que separa los dos gemelos es de mayor grosor, ya que está compuesta por una capa de corion entre dos capas de amnios.

Para determinar la corionicidad será importante determinar:

- Sexo fetal: si los fetos poseen diferente sexo, por definición tendrán diferente carga genética y por lo tanto bicoriales.

Si tienen el mismo sexo, debemos buscar otros signos que nos indiquen la existencia de 1 o 2 placentas.

- Lugar de placentación: si los lechos placentarios se encuentran en zonas separadas se tratará de una gestación bicorial. En cambio si están en la misma zona debemos ayudarnos de otros hallazgos ecográficos.

- Signo del lambda y de la T invertida: se denomina signo lambda a la imagen que con dicho aspecto aparece en la zona de unión de las placentas diferentes y sus respectivos amnios. Indica siempre una gestación bicorial. Si se trata de una gestación monocorial la zona de inserción del amnios en el

corión forma un ángulo de 90° adoptando la forma de “T” (Sepúlveda y cols., 1996).

- Grosor de la membrana interfetal: si se trata de una gestación bicorial la membrana es gruesa y mide > 2mm, mientras que suele ser más fina si nos encontramos ante una gestación monocorial (Vayssiere y cols., 1996; Bracero y cols., 2003).

Por lo general, una gestación monocorial es biamniótica. Nos orientará hacia una gestación monoamniótica, al presencia de una única placenta y fetos del mismo sexo, las inserciones próximas del cordón, el enrollamiento visible de los cordones, la presencia de la misma cantidad de líquido amniótico en ambos sacos, movimientos fetales libres y la no visualización de la membrana divisoria en dos ecografías realizadas en intervalos separados al menos 12-15 horas.

El diagnóstico de una gestación monoamniótica conlleva un alto riesgo de accidentes de cordón y por tanto una alta morbimortalidad (Rodis y cols.,1997;Allen y cols.,2001)

d. Presencia o no de un aumento de la traslucencia nuchal

e. Diagnóstico de malformaciones graves. Las contenidas e las clases I y II de Rottem, que clasifica las anomalías fetales en función del desarrollo secuencial de las estructuras embrionarias (Rottem y cols., 1997).

## **- Ecografía en II y III trimestre**

La ecografía del segundo y tercer trimestre permite, además de realizar una valoración de todas las estructuras fetales, realizar un estudio dismorfológico para determinar la existencia o no de malformaciones de la clase III IV de Rottem (Rottem y cols., 1997), diagnosticar discrepancias de crecimiento entre los dos fetos y medir la longitud cervical mediante ecografía transvaginal para poder detectar factores de riesgo de parto pretérmino.

Los controles ecográficos en las gestaciones bicoriales difieren poco de las gestaciones únicas, aunque se suele adelantar la ecografía del tercer trimestre a las semanas 28-30 y realizar una nueva de control de crecimiento a las 35-36 semanas.

En las gestaciones monocoriales, al tener un riesgo fetal mayor, los controles ecográficos deben ser más frecuentes, con una periodicidad entre las exploraciones de 2 semanas.

## 1.4.4 COMPLICACIONES FETALES Y MATERNAS

### COMPLICACIONES FETALES

Los embarazos múltiples son clasificadas de alto riesgo obstétrico debido a que sus complicaciones se asocian con una incidencia elevada de morbilidad perinatal.

La mortalidad perinatal está aumentada alrededor de 5 a 10 veces más que en una gestación única.

La morbilidad está en torno al 50% y está asociada fundamentalmente a las gestaciones inferiores a 32 semanas y a los recién nacidos de menos de 1500gr, que son los que presentan mayor riesgo de muerte perinatal y de morbilidad a largo plazo.

Como ya he comentado anteriormente, el tipo de corionicidad es crucial a la hora de valorar el riesgo fetal.

El peor pronóstico perinatal lo tienen los embarazos gemelares monocoriales-monoamnióticos y el menor corresponde a los bicoriales-biamnióticos, teniendo los embarazos monocoriales-biamnióticos un pronóstico intermedio.

Tanto es así, que se estima que en torno al 30% de los neonatos de gestaciones monocoriales presentan signos

sugeres de lesión cerebral frente al 3% de las gestaciones bicoriales y la morbilidad neurológica en los gemelos monocoriales prematuros 7 veces superior que en los bicoriales a igual edad gestacional (Sebire y cols., 1997; Leduc y cols., 2005).

Dentro de las complicaciones de mayor relevancia en cuanto a mortalidad fetal cabe destacar:

### **- Alteraciones del crecimiento fetal**

El patrón de crecimiento varía entre las gestaciones simples y múltiples siendo, en estas últimas, más frecuentes las restricciones de crecimiento fetal llegando a multiplicar por 10 el riesgo de presentar retrasos de crecimiento fetal.

El riesgo de nacer con bajo peso (<2500gr) es 10 veces mayor en los embarazos gemelares que en los de feto único.

### **- Discrepancia ponderal**

La discrepancia ponderal o el tamaño desigual de los fetos, se define como una diferencia entre los pesos fetales superior al 20-25% utilizando el mayor feto como índice (Blickstein, 2004).

Esta complicación afecta al 15% de las gestaciones gemelares. Por lo tanto es un factor importante a tener en cuenta en el manejo de las gestaciones gemelares, ya que los

fetos que presentan dicha discrepancia pueden estar afectados de un CIR o de un síndrome de transfusión feto-fetal.

Por lo general, a medida que aumenta la diferencia de peso en un par de gemelos, la mortalidad perinatal se incrementa en forma proporcional, llegando a estimarse un incremento de mortalidad que se multiplica por 6 cuando la discordancia entre los fetos es superior al 25% (Hollier y cols., 1999; Branum y cols., 2003; Erkkola y cols., 1985). En un estudio realizado entre gemelos concordantes y discrepantes, Sonntag y cols., observan que los gemelos discrepantes tienen una morbi-mortalidad fetal aumentada con respecto a las gestaciones concordantes y concluyen que la discrepancia ponderal es por se un factor de riesgo en las gestaciones gemelares.

Generalmente, la restricción en el crecimiento de un feto se desarrolla al final del segundo y comienzos del tercer trimestre, y suele ser normalmente asimétrica. Las discordancias más tempranas normalmente son simétricas e indican un riesgo mayor, ya que cuanto más temprano se conoce la discordancia, más serias son las consecuencias.

Autores como Weissman y cols., encuentran una asociación entre la presencia de anomalías congénitas y la presencia de una discrepancia ponderal entre gemelos diagnosticada en el primer trimestre (Weissman y cols., 1994), mientras que Bartha y cols., observan una mayor tasa de CIR en estos gemelos (Bartha y cols., 2005).

La causa de la desigualdad de peso con frecuencia no está clara, pero la evidencia indica que la etiología de la discordancia es distinta en los gemelos monocoriónicos y dicoriónicos. Se cree que la discrepancia ponderal entre gemelos es debida tanto a causas intrínsecas, como los factores genéticos, como a factores extrínsecos entre los que se encuentran los factores uteroplacentarios ( Blickstein, 2002).

Sebire y cols, realizaron un estudio para determinar la influencia de la corionidad en la discrepancia ponderal y no observan diferencias significativas en la discrepancia ponderal entre gemelos ni al inicio de la gestación ni al nacimiento. Sin embargo, numeros autores encuentran una mayor morbimortalidad perinatal en los fetos discrepantes de las gestaciones monocoriales ( Victoria y cols., 2001).

En los gemelos monocoriónicos la causa fundamental de la discordancia ponderal es atribuida a las comunicaciones vasculares placentarias que comparten. Como se distribuyen la placenta de forma aleatoria puede originarse un desequilibrio hemodinámico entre ambos, originándose un retraso de crecimiento en el menos profundido. Así, la presión y la perfusión disminuidas del gemelo donante pueden hacer que su porción de placenta no crezca en la forma adecuada. Raramente, los gemelos monocoriónicos tiene un tamaño discordante por anomalías estructurales que tiene origen durante el proceso de gemelación.

La discrepancia ponderal en los gemelos dicoriónicos tiene diferentes etiologías. Una fuente de discordancia es que los fetos dicigóticos tienen un potencial genético de crecimiento distinto, en especial si son de sexos diferentes. También es posible que, dado que las placentas son separadas y requieren más espacio de implantación, una de las placentas puede tener un sitio de implantación subóptimo.

Hay más evidencia que apoya que la discordancia de gemelos bicoriónicos se debe a insuficiencia placentaria, mientras que la que se observa en los gemelos monocoriónicos discordantes se debe a un desequilibrio hemodinámico.

El empleo de la ecografía y del Doppler ha permitido el diagnóstico precoz y el manejo de las gestaciones gemelares discrepantes. Así Divon y cols., utilizan la combinación de ambos para el diagnóstico de las gestaciones gemelares discrepantes.

Autores como Kalish y cols., observan diferencias en la longitud craneo-caudal en el primer trimestre en los gemelos que presentan una discrepancia ponderal en el momento del nacimiento. Otros autores emplean para el diagnóstico de la discrepancia ponderal entre gemelos la medida del DBP ( Grumbach y cols., 1986) o de la CA (Klam y cols., 2005) de ambos gemelos a lo largo de la gestación.

Chittacharoen y cols., evalúan el papel del Doppler en las gestaciones gemelares discrepantes observando la utilidad en las mismas de la medición de las OVF en los vasos umbilicales.

Por otra parte, Gaziano y cols., estudian el empleo del Doppler en las gestaciones mono y bicoriales evidenciando que los fetos de menor tamaño en las gestaciones monocoriales presentan una redistribución vascular con mayor frecuencia que los fetos pequeños de las gestaciones bicoriales, y atribuyen este hecho a la existencia de conexiones vasculares placentarias.

#### **- Alteraciones cromosómicas y estructurales:**

La frecuencia de malformaciones congénitas es mayor en los embarazos gemelares que en los simples (2% mayores y 4% menores vs 1 y 2% respectivamente).

Esta alta incidencia se debe casi por entero a la alta incidencia de defectos estructurales de los gemelos monocigóticos.

Los gemelos dicigóticos pueden tener malformaciones del tipo de las de los fetos únicos.

Dentro de las gestaciones gemelares la gestación monocorial se asocia, por su génesis a partir de la división

anormal de un cigoto, a una incidencia de malformaciones muy superior a la de gestaciones bicoriales (3% frente 1%).

En el 80-85% de los casos, la malformación únicamente la presenta uno de los fetos.

### **- Aborto y pérdida fetal**

Se ha visto que el aborto espontáneo es más frecuente en gestaciones múltiples.

Centrándonos en las gestaciones gemelares, se estima una proporción de 18 a 1 entre los gemelos monocoriónicos y dicoriónicos, lo que señala a la cigosidad como un factor de riesgo para un aborto espontáneo.

La prevalencia de muerte de uno de los dos gemelos en la ecografía del primer trimestre (11-13 semanas) se estima en un 5% comparado con el 2% de las gestaciones únicas. Cuando uno de los gemelos está muerto el riesgo de aborto del otro gemelo está en torno al 24%.

Si se produce la muerte de uno de los gemelos a lo largo de la gestación, se puede desencadenar un parto pretérmino. Este proceso, se produce, probablemente, por la liberación de citoquinas y prostaglandinas al torrente circulatorio, lo que conlleva un riesgo de muerte o de secuelas del feto superviviente en torno al 5-10%.

Si se trata de un gestación monocorial conlleva un riesgo del 25% de muerte del segundo gemelo y de un 25% de la presencia de daño cerebral secundario a un desbalance cardiocirculatorio y una severa hipotensión en el feto superviviente ( Rao y cols., 2004).

### **- Parto pretérmino**

El parto pretérmino, definido como el parto que acontece antes de la semana 37 de gestación, como ya he comentado anteriormente, es la causa más importante de morbilidad perinatal en todo el mundo y es el responsable de la mayoría de los casos de muerte neonatal y de casi la mitad de los casos de discapacidad neurológica y parálisis cerebral.

Su incidencia se estima en torno al 10% del total de los partos, llegando a ser del 50% cuando nos referimos a las gestaciones múltiples.

El riesgo de parto prematuro es del 1% en gestaciones únicas, de 5% en gemelares dicoriales y del 10% en monocoriales.

Es importante distinguir entre el parto prematuro de origen iatrogénico (20-30%) cuya finalización es por una causa médica fetal o materna o está asociado a una ruptura prematura de membranas (30%), y el parto prematuro espontáneo que ocurre sin causa conocida (40-50%).

Parece que la edad materna y el aumento de patología materna son importantes en el desencadenamiento del parto prematuro de origen iatrogénico, y por lo tanto no son evitables. El objetivo será centrarse en las estrategias que nos conducen a la predicción, prevención y tratamiento del parto prematuro espontáneo.

Así, el uso de marcadores como la ecografía transvaginal para la medición de la longitud cervical y marcadores bioquímicos de prematuridad como la fibronectina fetal podrían ayudar a diferenciar a las pacientes que se beneficiarían de tratamientos uteroinhibidores, la utilización de corticoides y el traslado a un centro con unidades de cuidados intensivos neonatales.

#### **- Complicaciones específicas de gestaciones monocoriales**

Las gestaciones monocoriales tienen un riesgo sobreañadido de desarrollar algunas complicaciones prenatales específicas por el hecho de compartir la misma placenta.

Las dos más específicas son el Síndrome de transfusión feto-fetal y el Síndrome de perfusión arterial inversa (secuencia TRAP), que no voy a desarrollar debido a que dichas gestaciones no son el tema del presente estudio.

## COMPLICACIONES MATERNAS

En las gestaciones gemelares la morbilidad materna está aumentada 3 a 7 veces en comparación con los embarazos únicos.

En general, los cambios fisiológicos maternos son mayores e Iso embarazos múltiples que en las gestaciones con feto único.

Además, las pacientes con gestaciones gemelares tienen mayor riesgo de presentar determinadas complicaciones obstétricas entre las que destacan los trastornos hipertensivos del embarazo, la diabetes gestacional y las hemorragias ante (desprendimiento prematuro de placenta) y postparto.

Los trastornos hipertensivos del embarazo son la segunda causa de muerte materna después de los eventos tromboembólicos. Las gestaciones gemelares presentan una mayor incidencia de los trastornos hipertensivos.

La incidencia exacta es difícil de determinar, ya que estos embarazos suelen terminar pretérmino, antes de que pueda desarrollarse la preeclampsia, y porque en general las mujeres con embarazos gemelares son multíparas y añosas.

Varios estudios han visto que el embarazo gemelar trae consigo un aumento de riesgo de preeclampsia cuatro veces

superior, con independencia de la raza y la paridad, y que ésta tiende a desarrollarse antes y ser de mayor gravedad.

En la mayor parte de las ocasiones estas complicaciones son de poca gravedad y son controlables con relativa facilidad.

## **2. HIPÓTESIS**



## 2. HIPÓTESIS

Los fetos hipóxicos aumentan los niveles de VEGF aumentando la angiogénesis para compensar la hipoxia. La determinación del sistema VEGF en plasma materno puede ser un marcador bioquímico de compromiso fetal.

Así, las gestaciones gemelares discrepantes proporcionan un modelo ideal para el estudio de la relación del VEGF con la hipoxia fetal o los factores que interfieren en el crecimiento fetal, ya que se contaría con casos y controles (feto mayor y menor) para edad gestacional, y la placentas contarían con el mismo afluente (el flujo sanguíneo uterino materno) con contenido idéntico de O<sub>2</sub> y nutrientes.



### **3. OBJETIVOS**



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS PRINCIPALES**

Evaluar la importancia de la producción, secreción y expresión del sistema VEGF en gestaciones gemelares con fetos concordantes y en las que presentan una discrepancia ponderal, y valorar si el sistema VEGF materno podría ser un indicador de hipoxia fetal en dichas gestaciones.

#### **3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- a. Estudio de la asociación de los parámetros objetivos que nos informan del bienestar fetal anteparto (ECO-Doppler) e intraparto y su relación con el sistema VEGF.
- b. Aumentar el conocimiento del sistema VEGF en el binomio feto-materno, lo que ayudaría a comprender la interrelación y la adaptación fetal a procesos hipóxicos.
- c. Fisiopatología del sistema VEGF materno y fetal en la hipoxia fetal crónica.



## **4. MATERIAL Y MÉTODO**



## **4. MATERIAL Y MÉTODO**

### **4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

El presente trabajo es un estudio OBSERVACIONAL PROSPECTIVO, de CASOS-CONTROLES.

Las pacientes que formaban parte del estudio, se reclutaron entre las gestantes atendidas en los Servicios de Obstetricia y Ginecología de los Hospitales Universitarios Dr. Peset y La Fe, de Valencia.

Las pacientes eran incluidas en el estudio cuando acudían a la ecografía del primer trimestre realizada entre la semana 11-13 de gestación para la medición de la translucencia nuchal.

Se utilizaron los siguientes criterios para la selección de pacientes incluidas en el estudio:

Criterios de inclusión:

- Pacientes con gestaciones gemelares bicoriales-biamnióticas, obtenidas de forma espontánea o mediante TRA, sin ninguna patología de base.

Criterios de exclusión:

- Gestaciones únicas
- Gestaciones gemelares monocoriales bi o monoamnióticas
- Patología médica materna (HTA, DM insulínica independiente..)
- Patología obstétrica (preeclampsia, malformaciones fetales, cromosomopatías o muerte fetal de alguno de los gemelos)

A cada paciente se le realizaron tres extracciones sanguíneas a lo largo de la gestación, previa firma de un consentimiento informado, una en cada trimestre de la gestación, siendo la última determinación dentro de la semana del parto, para la posterior determinación del sistema VEGF: VEGF-A libre y total y su principal inhibidor, el sFlt-1.

De forma concomitante, y con el fin de explorar la asociación del sistema VEGF en las gestaciones gemelares y la hipoxia fetal, se realizó un estudio ecográfico mediante el empleo del ecógrafo Toshiba Aplio 50, para valorar las OVF en los vasos fetales: A.Umb y ACM de cada gemelo y en las A.Ut. de las gestantes.

Dicho análisis refleja en su conjunto la perfusión placentaria y la posible adaptación cardiovascular fetal a la hipoxia.

En dichas ecografías también se valoraba el crecimiento de cada par de gemelos con el fin de detectar y realizar el mismo protocolo de seguimiento en las gestaciones gemelares con discrepancia ponderal.

En el momento del parto se recogió sangre del cordón umbilical de cada uno de los fetos (arteria y vena umbilicales de cada RN) para el posterior estudio del sistema VEGF.

La discrepancia ponderal fue definida, en nuestro caso, como una diferencia ponderal  $\geq 25\%$  entre cada par de gemelos, aunque también analizamos los resultados empleando como punto de corte una discrepancia  $\geq$  de 20%.

Se seleccionaron para nuestro estudio un total de 72 gestaciones gemelares bicoriales biamnióticas, que cumplían en principio los criterios de inclusión descritos, en el periodo de tiempo transcurrido entre Octubre del 2003 y Octubre del 2005.

De ellas, 8 gestaciones gemelares fueron excluidas para el estudio. Dos por muerte de uno de los gemelos antes de la semana 16 y otro por alteración cromosómica de uno de los dos gemelos tras el cariotipo obtenido mediante amniocentesis (Síndrome de Edwards).

Tres fueron excluidas del estudio por desarrollar preeclampsia, definida como una TA > 140/90 mmHg asociado a proteinuria (> 300 mg) durante el tercer trimestre y dos por desarrollar una diabetes gestacional insulínica independiente.

Finalmente fueron incluidas en el estudio 64 gestaciones gemelares que quedaron distribuidas de la siguiente manera:

1. Utilizando como punto de corte una discrepancia ponderal entre gemelos  $\geq 25\%$ :

a) Grupo Control: 51 gestaciones gemelares bicoriales biamnióticas con un crecimiento simétrico de ambos gemelos a lo largo de la gestación.

b) Grupo Casos: constituido por 13 gestantes con discrepancia ponderal  $\geq 25\%$  entre gemelos.

2. Utilizando como punto de corte una discrepancia ponderal entre gemelos  $\geq 20\%$ :

a. Grupo Control: 43 gestaciones gemelares bicoriales biamnióticas con un crecimiento simétricos a lo largo de la gestación.

b. Grupo Casos: constituido por 21 gestantes con discrepancia ponderal  $\geq 20\%$ .

## 4.2. VALORACIÓN DEL ESTADO DE BIENESTAR FETAL

Para valorar el estado de bienestar fetal se han utilizado diferentes parámetros, indirectos y directos.

### 4.2.1 Estimación indirecta de bienestar fetal intraútero:

- OVF del promedio de las A Ut.: reflejan la perfusión de la placenta.

Las mediciones de las OVF en las arterias uterinas se han realizado colocando el transductor en forma para-sagital, a nivel de la unión cervico- ístmica, 2-3cm medial a la espina ilíaca antero-superior. En esta posición se busca la ubicación de ambas arterias uterinas a nivel de su nacimiento desde la división anterior de las respectivas arterias ilíacas internas. Para ello se ubica a la paciente en decúbito dorsal y se dispone el transductor de ultrasonido Doppler color en la pared uterina lateral baja, buscando medialmente la zona correspondiente.

- OVF en A.Umb.: nos permite valorar la resistencia de la circulación placentaria en el lado fetal. Dicha resistencia está aumentada en situaciones de hipoxia fetal.

En orden a minimizar errores, se deben visualizar al menos 5 ondas de velocidad de flujo pulsátil. El ángulo de insonación debe ser el mínimo posible para evitar la subestimación de valores.

- OVF de la ACM: sus parámetros nos dan información del estado de oxigenación fetal. Es sabido que dichos vasos fetales presenta una gran reactividad en respuesta al déficit de  $O_2$ .

Para medir las OVF se coloca el transductor en un plano estándar del diámetro biparietal (DBP), incluyendo el tálamo y el cavum del septum pelucidum. La ACM se ve pulsando a nivel de la ínsula. En esta posición se mueve el transductor hacia la base del cráneo, logrando una visión de los pedúnculos cerebrales. Obteniendo una imagen adecuada del Polígono de Willis, se investiga la ACM a un centímetro desde su nacimiento, como la principal rama en dirección ántero-lateral hacia el borde lateral de la órbita.

- Ccp es un indicador hemodinámico resumen del estado fetal, existiendo un cociente elevado cuando existe un fenómeno de redistribución vascular que es el fiel reflejo de la hipoxia fetal.

La determinación de las OVF en cualquier territorio materno (A Ut.) como fetal (A Umb. y ACM) se ha realizado estudiando dos parámetros velocimétricos: IR e IP

#### 4.2.2 Estimación directa del bienestar fetal:

- Peso fetal y placentario: informa si se trata de un feto eutrófico o no.

- Índices de Apgar al 1<sup>er</sup> y 5<sup>o</sup> minuto. Este último, es el que mejor se relaciona con la morbilidad neurológica del RN. Describimos a lo RN como severamente deprimidos a los que obtienen valores del test de Apgar a los 5 minutos entre 0 - 3, moderadamente deprimidos entre 4 - 6 y vigorosos con una puntuación del Test de Apgar  $\geq 7$ .

- EAB: incluye el pH , el exceso de bases (EB), la PO<sub>2</sub> y la PCO<sub>2</sub> de ambos vasos umbilicales.

La obtención de sangre de cordón umbilical se realizó pinzando doblemente el cordón umbilical de forma inmediata tras el nacimiento de los recién nacidos. La extracción se realizó de forma aséptica empleando jeringas preempaquetadas y heparinizadas (Arterial Blood Sampler 1x2mL PICO 50. Radiometer Copenhagen).

Se obtuvieron 2 tubos de sangre de cada vaso umbilical, arteria y vena. El primero de ellos para la valoración del estado de oxigenación fetal mediante la determinación del pH, EB, PO<sub>2</sub> y PCO<sub>2</sub> de ambos vasos umbilicales empleando un microanalizador de gases sanguíneos ABL510 Radiometer Copenhagen, y el segundo para la determinación del sistema VEGF.

### 4.3 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Las extracciones de sangre materna se realizaron durante toda la gestación, una primera determinación en el momento de la ecografía del primer trimestre, y el resto de determinaciones en el segundo y tercer trimestre coincidiendo con ecografías obstétricas. La última determinación se realizó la semana previa al parto o en el momento del mismo.

En el plasma de estas pacientes (ambos grupos) se determinó el VEGF circulante (libre y total), y el sFlt-1.

Así mismo, se obtuvo sangre de los vasos del cordón umbilical de cada recién nacido (arteria y vena) donde también se determinó el VEGF circulante (libre y total), y el sFlt-1.

La muestra de sangre, tanto materna como de los vasos fetales, fue obtenida de forma aséptica en tubos estériles (EDTA) de 5mL. La sangre recogida se centrifugó a 3500rpm durante 5 minutos (Spinchron™ DXL Centrifuge. Beckman Coulter), con el objetivo de separar el plasma de los elementos formes.

El plasma se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la posterior determinación del sistema VEGF.

Se obtuvo al mismo tiempo un fragmento placentario de algunas placentas, mediante disección con tijeras de uno de los

cotiledones placentarios para el análisis de la expresión del VEGF a nivel de RNAm, el sFlt-1 y el VEGFR-1.

Todos los fragmentos placentarios fueron congelados en un refrigerador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

#### **4.3.1. Determinación del VEGF y su receptor soluble (sFlt-1)**

Para la determinación cuantitativa de VEGF libre y el sFlt-1 se utilizó la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) en sándwich (Prepotech, Rocky Hill, NJ). El kit empleado para su cuantificación fue el de Bender MedSystems (Vienna, Austria) según instrucciones del fabricante.

Básicamente la técnica consiste en una reacción colorimétrica mediada por una reacción antígeno-anticuerpo entre el VEGF y el sFlt-1 y un anticuerpo específico contra los mismos.

Los estándares, suministrados por el fabricante, y las muestras del plasma a estudio se pipetea en pocillos de la placa, que están revestidos por un anticuerpo monoclonal específico contra el VEGF y el sFlt-1: así cualquier VEGF o sFlt-1 presente en el plasma es inmovilizado en el pocillo. Cada placa está compuesta por 40 pocillos; cada determinación fue

realizada por duplicado, realizándose determinaciones maternas y fetales dentro de la misma placa. De esta manera las muestras de las madres y sus hijos eran ensayadas en la misma placa.

Después de lavar los pocillos para eliminar cualquier sustancia que no haya sido fijada por el anticuerpo monoclonal se añade un anticuerpo policlonal unido a un enzima. Se vuelve a lavar y se añade una solución substrato desarrollándose color en forma proporcional a la cantidad de VEGF o sFlt-1 que haya quedado fijada en el pocillo en el primer paso.

La reacción colorimétrica es detenida y la intensidad del color se mide con ayuda de un lector de densidad óptica (fotómetro) a 450nm. Las concentraciones de VEGF y sFlt-1 en las muestras se determinan comparando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar.

El límite de detección de estos test fue de 32pg/ml.

Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron del 8 % y 10.7% para el sFlt-1 y del 5.9% y 17.7% para el VEGF libre.

La sensibilidad para el f-VEGF y sFlt-1 fue de 11pg/ml y 0.06ng/ml respectivamente.

Para la cuantificación del VEGF total se empleó el Kit Quantikine (R&D) (Mineapolis USA) según instrucciones del fabricante y siguiendo los mismos pasos previamente descritos.

Los valores de los tres componentes se expresaron en pg/ml.

#### **4.3.2. Expresión placentaria del VEGF**

Para poder determinar mediante PCR cuantitativa la expresión de ARNm del VEGF, sFlt-1 y VEGFR1 en el tejido placentario era necesaria la realización de dos procesos previos: la extracción del RNAm y su posterior retrotranscripción tal y como detallamos a continuación.

##### *a. Aislamiento del RNAm*

La extracción del RNA se realizó de acuerdo al método de Chomczynski y Sacchi (1987) con pequeñas modificaciones, con el uso de Trizol como reactivo.

Brevemente, cada tejido fue pesado y se añadió 500µl del reactivo TRizol/ 100mg de peso de tejido.

El RNA total fue separado del DNA y las proteínas al añadir 250µl de cloroformo, y luego fue precipitado con isopropanol ( toda la noche a -20 °C).

El precipitado fue lavado en dos ocasiones con etanol; secado al aire y resuspendido en agua tratada con dietilpirocarbonato al 75% (DEPC).

La cantidad de RNA fue cuantificada mediante espectrofotometría en un SmartSpect 3000 espectrofotómetro (Biorad, Barcelona, España).

*b. RT(Reverse Transcription) Transcripción reversa*

La transcripción reversa del RNA se llevó a cabo utilizando el KIT avanzado de transcripción inversa para PCR (CLONTECH Laboratorios, Palo Alto,CA ).

La formulación de la muestra se preparó de la siguiente manera:4µl de 5X tampón 1µl dedesoxiNTP (desoxinucleótidos) (10mM), 0.5µl del inhibidor recombinante de la ribonucleasa y 1µl de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Molowny se añadieron para reacción individual.

Se diluyó 1µg de cada muestra hasta un volúmen total de 12.5 µl agua preparada con DEPC y un µl de oligo (dT)18 (oligonucleótidos de 3 unión aleatoria a la cadena de ARNm y que sirven como molde para la enzima RT).

La mezcla fue calentada a 70°C, durante 2 minutos, y guardada en hielo hasta que la formulación (6.5µl) fue añadida.

Para cada transcripción inversa (RT), se preparó un volumen en blanco utilizando todos los reactivos excepto la muestra de RNA con el volumen equivalente de agua DEPC (12µl). El blanco de RT fue utilizado para preparar el blanco de

PCR que posteriormente se utilizará como control de contaminación de la PCR.

Una vez mezclados todos los componentes, las muestras fueron incubadas a 42°C durante una hora, calentadas a 94°C durante 5 minutos para parar la síntesis de DNAc y destruir la actividad de la desoxirribonucleasa.

El producto fue diluido a un volúmen final de 100µl con agua DEPC tratada y luego se almacenó a - 20°C hasta el análisis de la PCR.

### *c. PCR cuantitativa tiempo real*

Los cebadores para la PCR cuantitativo fueron diseñados utilizando el Primers Express Software. (Applied Biosystems, Warrington, UK) y se sintetizaron por Applied Biosystems, Barcelona, España.

Los cebadores del VEGF fueron diseñados para amplificar una región común de todas las isoformas del VEGF. La secuencia de cebadores utilizados para la amplificación es la que se muestra a continuación.

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizada para los estudios de RT-PCR

Transcript	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'
GADPH	AGA TCA TCA GCA ATG CCT CCT G	GCA TGG ACT GTC GTC ATG AGT C
VEGF	GGG CAG AAT CAT CAC GAA GTG	ATT GGA TGG CAG TAG CTG CG
sFlt-1	TTT CCC TGC AAG ATT CAG GC	TTG TTG CAG TGC TCA CCT CTG
VEGFR-1	CCT GCA AGA TTC AGG CAC CTAAT	GGT GGA ACT GCT GAT GGC C

Para amplificar las muestras de DNAc, las muestras de RT fueron diluidas hasta una concentración final de 12,5µg de DNAc/µl.

En cada reacción, un total de 4µl (50 µg DNAc) de cada tubo de RT fue mezclada con 12.5µl SYBR Green fórmula magistral (Applied Biosystems, Warrington, UK) que contenían nucleótidos, Taq DNA polimerasa, MgCl<sub>2</sub> y una reacción tamponada con SYBR Green; 1-3 µl de 0.5µM de cada cebador y el doble de agua destilada añadida hasta completar un volumen final de 25µl.

La PCR de tiempo real se realizó utilizando un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700 (Perkin

Elmer, Corp) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se utilizó una tapa caliente (105°C) para evitar la evaporación del líquido, un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos seguida de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

Cada muestra fue amplificada por duplicado para el VEGF, sFlt-1 y VEGFR1 o la GADPH dando lugar a cuatro reacciones por cada muestra.

De forma paralela, diluciones seriadas 10X en duplicado para VEGF, sFlt1 y VEGFR1 o la GADPH ADNc fueron realizadas con cada análisis como curva de calibración.

Los datos de cuantificación fueron analizados al inicio de la fase exponencial (18-25 ciclos, antes de la entrada en la fase de meseta cuando el producto satura la reacción química) con ABI PRISM 1.7. análisis software.

En último término, la fluorescencia debida a la distorsión generada por el ruido inespecífico fue normalizada para establecer la señal basal o umbral a partir de la cual las señales recibidas podían considerarse como positivas y por lo tanto cuantificables. Los duplicados que mostraban una variación superior al 5% fueron descartados.

Para validar la PCR a tiempo real, nos exigimos obtener curvas de estándar de calibración con un grado de correlación

superior al 95% ( $>0.95$ ) y valores de pendiente asociados entre 3.1 y 3.4.

Para cada muestra, la suma de cada DNAC transcrito se determinó en relación a curvas estándar. La razón Gene/Gadph fue utilizada para estimar y comparar la expresión relativa del gen.

Al final de la reacción de PCR, todos los productos alcanzaron un plateau. Para averiguar si otros productos no esperados habían sido también amplificados, los productos de la PCR después de 40 ciclos, fueron sometidos a proceso de electroforesis en gel de agarosa al 4% con bromuro de etidio para confirmar la especificidad de la amplificación.

Para la normalización y cuantificación de los resultados se utilizará como controlador interno la expresión de dos genes constitutivos que se expresan en la misma cantidad independientemente del ambiente que las rodee, nos referimos a la GAPDH (Chomcynski y cols., 1987).

#### 4.4 VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS

Se han recogido determinadas variables epidemiológicas de cada gestación para su posterior estudio. Entre las mismas se incluyeron:

- a. Edad materna
- b. Edad gestacional en el momento de cada exploración y en el momento de la finalización del embarazo.
- c. Peso del recién nacido
- d. Peso placentario (individual y total )
- e. Vía del parto
- f. Tipo de gestación gemelar (espontánea / TRA)

Al analizar de forma global todas las gestaciones gemelares bicoriales biamnióticas , observamos los datos expuestos a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Variables epidemiológicas de la muestra estudiada. N= 64

	Media $\pm$ DE	Rango
Edad materna (años)	33 $\pm$ 5	18-45
Semanas parto	35 $\pm$ 2	31-40
Peso neonato (gr)	2338 $\pm$ 540,6	590-3290
Peso placentario individual (gr)	479 $\pm$ 102,2	250-820

La edad gestacional media del parto en dichas gestaciones fue de 35 semanas ( rango 31- 40 semanas).

En el 53% de las ocasiones se produjo el parto antes de la semana 37, y en el 15% antes de la semana 34.

La forma de finalizar la gestación fue mediante cesárea en el 87% (56 pacientes) de las ocasiones, mientras que únicamente en el 13% (8 pacientes) finalizaron mediante un parto por vía vaginal.

Debemos tener en cuenta que las pacientes que han quedado gestantes mediante técnicas de inducción de la ovulación se han incluido dentro las que han gestado mediante TRA, ya que al considerarse pacientes subfértiles, estas se asocian a mayores complicaciones gestacionales.

De las 64 gestaciones gemelares bicoriales biamnióticas el 45% (29 gestaciones) han sido gestaciones espontáneas y el 55% (35 gestaciones) obtenidas mediante TRA.

#### **4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Cuando analizamos variables cualitativas y se quiso valorar si las proporciones observadas eran diferentes, se utilizó un test de Chi Cuadrado. Sin embargo, cuando algún valor observado fue menor de cinco, se realizó el test exacto de Fisher.

Cuando estudiamos la existencia de diferencias entre dos variables cuantitativas normalmente distribuidas se recurrió al test de “t” de muestras independientes, si bien, cuando se compararon valores dentro de la misma gestación (ej: entre dos gemelos o madre-feto) se realizó un test de “t” de muestras pareadas.

Eventualmente, cuando las observaciones no tuvieron una distribución normal, realizamos un test de diferencias no paramétricas: U Mann Withney o test de Wilcoxon si las observaciones eran pareadas.

Para estudiar la asociación entre diferentes parámetros hemos calculado el coeficiente de correlación de Pearson, obteniendo posteriormente la significación. Hemos realizado ajustes lineales, y las comparaciones entre rectas fueron hechas mediante los intervalos de confianza del 95% de sus pendientes e intersecciones.

Hemos construido curvas operadas por el receptor (ROC) para analizar la relación entre la sensibilidad y la tasa de falsos positivos, y calcular el punto crítico diagnóstico; así mismo exploramos el rendimiento diagnóstico (S, E, VPP, VPN), calculando LR positiva y negativa.

El tratamiento estadístico de los índices de Apgar se realizó tras una transformación logarítmica en base 10 para normalizar los valores.

Se considera la existencia de significación estadística valores de  $p < 0.05$ .

Los cálculos se han realizado utilizando el programa estadístico SPSS.12.

## **5. RESULTADOS**



## 5. RESULTADOS

### 5.1 GESTACIONES GEMELARES CONCORDANTES VS DISCORDANTES PONDERALMENTE

#### 5.1.1 Variables epidemiológicas

##### a. Edad materna

Al analizar los 2 grupos de estudio gestaciones normales y gestaciones discrepantes vemos que no existen diferencias en la edad de las pacientes.

Si tomamos como punto de corte una discrepancia ponderal entre gemelos  $\geq 25\%$  la edad media materna de las gestantes con fetos discrepantes es de  $32,2 \pm 5,2$ , siendo de  $33,6 \pm 5,1$  la edad media de las gestantes con fetos normales ( $p = 0,222$ ).

Cuando la discrepancia ponderal existente entre los gemelos es  $\geq 20\%$ , la edad media de las gestantes es de  $32,8 \pm 5$ , mientras que la de las madres con gestaciones no discrepantes es de  $33,6 \pm 5,3$  ( $p = 0,418$ ).

##### b. Técnica reproductiva

De las 64 gestaciones gemelares 35 (55%) han sido secundarias a TRA.

En el grupo de pacientes con una discrepancia ponderal entre gemelos  $\geq 25\%$ , 11 (85%) eran secundarias a TRA, mientras que tomando como punto de corte una discrepancia  $\geq 20\%$  encontramos 15 gestaciones (71%) obtenidas mediante TRA.

Cuando analizamos la diferencia entre los grupos según el embarazo fuera espontáneo o tras TRA, observamos que tomando como punto de corte una discrepancia ponderal entre gemelos  $\geq 20\%$ , no existen diferencias entre los dos grupos; en cambio, cuando la discrepancia entre gemelos es  $\geq 25\%$ , sí se encuentran diferencias ( Test exacto de Fisher  $P_{2\infty} = 0,026$ ) (Tabla 1).

Tabla 1. Gestaciones gemelares y técnica reproductiva

	Concordantes	Discrep. $\geq 25\%$
Espontáneos	27	2
TRA	24	11
Total	51	13

Al analizar la probabilidad de ocurrencia de dicha discrepancia  $\geq 25\%$  la LR + = 4,56 (IC 95% 1,10-18,93) y LR - = 0,74 (IC 95% 0,56-0,96), lo que muestra que las TRA son un factor de riesgo para la discrepancia ponderal y alternativamente las gestaciones gemelares de tipo espontáneo tienen un efecto protector frente a la discrepancia en nuestra muestra.

### c. Semanas de gestación en el parto

Dado que la prematuridad implica una mayor morbi-mortalidad fetal, analizamos si las gestaciones discrepantes asocian una mayor prematuridad.

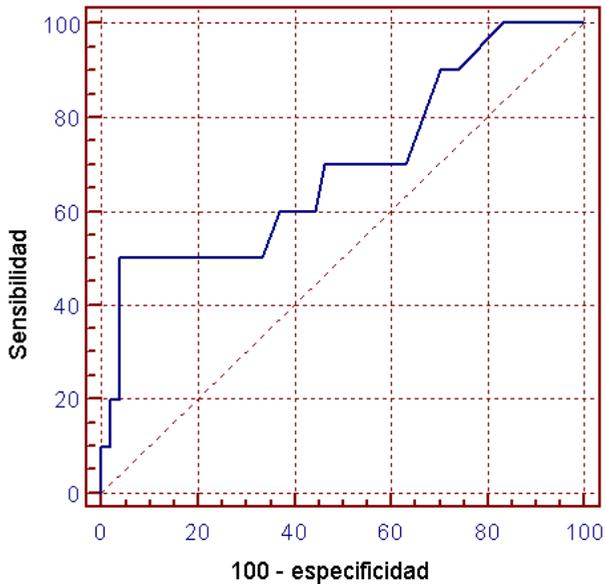
Al comparar las semanas en que aconteció el parto, cuando la discrepancia fue del 25% la edad media del parto fue  $34,7 \pm 2,3$  en tanto que en los controles fue  $36 \pm 2$   $p < 0,01$ . La diferencia no se observó considerando una discrepancia del 20%.

Al analizar las gestaciones gemelares discrepantes y el parto producido antes de la semana 34, obtenemos una curva de rendimiento diagnóstico (ROC) significativa, siendo el valor de la discrepancia que maximiza la sensibilidad y minimiza los falsos positivos el 35% (Figura 4).

De forma semejante y considerando el concepto de prematuridad como gestaciones finalizadas ante de la semana

37, obtenemos una curva ROC significativa (IC 95% superiores a 0,5), y en este caso el punto de corte obtenido es del 6%.

Figura 4. Área bajo la curva para el diagnóstico de parto prematuro (< 34 semanas) en gestaciones gemelares discordantes.



Área bajo la curva (ABC) = 0,694 IC 95% (0,57 - 0,80)

Sensibilidad (S) = 50% ( IC 18,9 – 81,1)

Especificidad (E) = 96.3% (87,2- 99,4)

Criterio de discrepancia > 35%

Likelyhood Ratio o razón de verosimilitud+ (LH+) : 13,49

Likelyhood Ratio o razón de verosimilitud -(LH-) : 0,52

Se observa que si tomamos como prematuridad el parto que se produce antes de la semana 37, no existen diferencias significativas entre los dos grupos independientemente del punto de corte utilizado para definir la discrepancia ponderal ( $\geq 20\%$  /  $\geq 25\%$ ).

De forma semejante, si estudiamos la existencia de diferencias cuando el parto se produce antes de la semana 34, vemos que si utilizamos como punto de corte una discrepancia  $\geq 20\%$ , no encontramos diferencias. En cambio, cuando la discrepancia ponderal entre gemelos es  $\geq 25\%$  si encontramos diferencias .

Los resultados se exponen más detalladamente en la siguiente tabla (Tabla 2)

Tabla 2: Discrepancia ponderal  $\geq 25\%$  y parto prematuro  $< 34$  semanas

	Concordantes	Discrep. $\geq 25\%$
Parto $< 34$ sem. :	5	5
Parto $\geq 34$ sem.	46	8
Total	51	13

Chi cuadrado( $\chi^2$ ) p = 0,023

	Valores	IC 95%
Sensibilidad	38,5%	17,7% - 64,5%
Especificidad	90,2%	79% - 95,7%
VPP	50%	23,7% - 76,3%
VPN	85,2%	73,4% - 92,3%
LR+	3,9%	1,33 – 11,55
LR-	0,7%	0,42 – 1,10

En su conjunto estos datos demuestran que la discrepancia ponderal se asocia a prematuridad.

### *5.1.2 Discrepancia ponderal y bienestar fetal anteparto.*

Para estudiar las OVF tanto en el territorio materno como en el fetal a lo largo de la gestación y establecer si existen diferencias entre las gestaciones concordantes y discrepantes hemos comparado los dos grupos empleando la “t” de Student.

Al considerar las gestaciones discrepantes frente a las no discrepantes obtenemos que las resistencias umbilicales estimadas por el IR e IP son mayores en los fetos discrepantes independientemente del punto de corte utilizado ( $\geq 20$  y  $25\%$ ) para definir la discrepancia.

Cuando la discrepancia es  $\geq 20\%$  no se observan diferencias en las OVF del promedio de las arterias uterinas, en la ACM ni en el Ccp (Tabla 3). Sin embargo, cuando

comparamos las gestaciones con discrepancia  $\geq 25\%$  frente a las concordantes, observamos que en los gemelos discrepantes existen mayores resistencias a nivel de las arterias uterinas y umbilicales con menor resistencia a nivel de la ACM, con un Ccp menor. Se alcanza significación estadística en las arterias uterinas, umbilicales y Ccp (Tabla 4).

Tabla 3. Índices velocimétricos gestaciones concordantes vs discrepantes  $\geq 20\%$

	Concordantes Media $\pm$ DE N = 134	Discrep $\geq 20\%$ Media $\pm$ DE N = 66	p
A Umb IR	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	<b>0,01</b>
A Umb IP	1,1 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,4	<b>0,003</b>
ACM IR	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,3
ACM IP	1,7 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,4	0,9
Ccp IR	1,2 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2	0,6
Ccp IP	1,6 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,5	0,3
Uterina IR	0,5 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,6
Uterina IP	0,8 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,4	0,2

Tabla 4. Índices velocimétricos gestaciones concordantes vs discrepantes  $\geq 25\%$ .

	Concordantes Media $\pm$ DE N = 152	Discrep $\geq 25\%$ Media $\pm$ DE N = 38	p
A Umb IR	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	<b>0,001</b>
A Umb IP	1,1 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,6	<b>0,001</b>
ACM IR	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,8
ACM IP	1,7 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,4	0,4
Ccp IR	1,2 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,3	<b>0,003</b>
Ccp IP	1,7 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,6	<b>0,004</b>
Uterina IR	0,5 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,07	0,4
Uterina IP	0,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,2	<b>0,01</b>

Estos datos nos hacen sugerir que ante una menor perfusión a nivel útero-placentario, existe una redistribución vascular fetal objetivada por la vasoconstricción a nivel umbilical y la vasodilatación a nivel cerebral.

Los cálculos sobre las OVF de las arterias uterinas están realizadas sobre el promedio de ambas arterias uterinas, y el número de casos es la mitad de los expuestos al inicio de la tabla.

Cuando se consideró las semanas de gestación a las que se realizó la exploración, no existieron diferencias cuando el punto de corte utilizado fue  $\geq 20\%$  ( $29,9 \pm 8,2$  vs  $29,5 \pm 7,5$ ) ni del  $\geq 25\%$  ( $29,9 \pm 8,2$  vs  $29,3 \pm 6,8$ ).

### *5.1.3 Discrepancia ponderal y bienestar fetal intraparto*

Al estudiar los mismos parámetros que en el punto anterior intraparto, los resultados que obtenemos son semejantes cuando la discrepancia ponderal entre gemelos es  $\geq 20\%$ . Existen diferencias en los índices velocimétricos de las arterias umbilicales sin observarse diferencias en el resto de los parámetros estudiados (OVF ACM, Ccp y vasos uterinos) (Tabla 5).

Tabla 5: Gestaciones gemelares concordantes vs discrepantes  $\geq 20\%$  y OVF de los vasos fetales y maternos en la semana previa al parto (media  $\pm$  DE)

	Concordantes N = 44	Discrep $\geq 20\%$ N = 32	p
A Umb IR	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	<b>0,01</b>
A Umb IP	1,0 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,5	<b>0,007</b>
ACM IR	0,7 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,9
ACM IP	1,6 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,4	0,5
Ccp IR	1,2 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,3	0,2
Ccp IP	1,6 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,6	0,1
Uterina IR	0,5 $\pm$ 0,06	0,5 $\pm$ 0,1	0,9
Uterina IP	0,7 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,4	0,7

De forma análoga, cuando la discrepancia es  $\geq 25\%$  las diferencias persisten en la arteria umbilical. Además, vemos que existen diferencias en los índices velocimétricos del Ccp, tanto en el IP como en el IR (valores inferiores del Ccp en las gestaciones con discrepancia ponderal) y en el IP del promedio de los vasos uterinos (valores superiores en las gestaciones discrepantes) (Tabla 6).

Los cálculos sobre las OVF de los arterias uterinas están realizadas sobre el promedio de ambas arterias uterinas, y el número de casos es la mitad de los expuestos al inicio de la tabla

Tabla 6: Gestaciones gemelares concordantes vs discrepantes  $\geq 25\%$  y OVF de los vasos fetales y maternos en la semana previa al parto (media  $\pm$  DE)

	Concordantes N = 56	Discrep $\geq 25\%$ N = 20	p
A Umb IR	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	<b>0,001</b>
A Umb IP	1,0 $\pm$ 0,21	1,4 $\pm$ 0,6	<b>0,001</b>
ACM IR	0,7 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,8
ACM IP	1,6 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,4	0,4
Ccp IR	1,2 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2	<b>0,003</b>
Ccp IP	1,7 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,6	<b>0,004</b>
Uterina IR	0,5 $\pm$ 0,06	0,5 $\pm$ 0,1	0,4
Uterina IP	0,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,2	<b>0,01</b>

Al analizar la posible influencia de la edad de gestación cuando se realizó la ecografía dentro de la semana de parto, vimos que cuando la discrepancia ponderal era  $\geq 20\%$  la diferencia no fue significativa ( $36,1 \pm 2,1$  vs  $35,5 \pm 2,3$ ) concordantes vs discrepantes. Cuando la discrepancia fue  $\geq 25\%$  se observó que las gestaciones concordantes finalizaron posteriormente (exploración semana previa al parto) a las discrepantes ( $36,2 \pm 2$  vs  $34,7 \pm 2,3$ ,  $p < 0,01$ ).

Por otra parte, para obviar el sesgo que pudiera suponer la sobre-representación de alguno de los grupos, hemos querido ver si dentro de la semana del parto encontramos diferencias en las OVF de las arterias uterinas, es decir, en función de la uterina que llega a la placenta que provee los nutrientes a cada feto.

Este mismo análisis se ha realizado en los vasos fetales (AUmb, ACM y Ccp ) en función del feto de mayor y menor peso.

Los máximos pares observados han sido 64 en el caso que compara feto mayor-feto menor de forma global, 21 cuando la discrepancia era  $\geq 20\%$  y 13 cuando la discrepancia era  $\geq 25\%$ .

Se utiliza un test para muestras pareadas puesto que compara los fetos que están dentro del mismo útero. Los resultados se exponen ampliamente en la tabla 7.

Tabla 7. Diferencias en las OVF de las vasos fetales y uterinos en función de la discrepancia ponderal entre el feto mayor y menor. Se toma una discrepancia mínima entre gemelos y una discrepancia ponderal  $\geq 20-25\%$ . Los resultados están expresados como diferencias (Media  $\pm$  DE)

	Mayor vs menor	Discrep $\geq 20\%$	Discrep $\geq 25\%$
Peso fetal (gr)	387,8 $\pm$ 306,4 <sup>(c)</sup>	753,57 $\pm$ 218,9 <sup>(c)</sup>	867,3 $\pm$ 196,3 <sup>(c)</sup>
A Umb IR	-0,02 $\pm$ 1,1	-0,04 $\pm$ 0,1	-0,07 $\pm$ 0,1
A Umb IP	-0,07 $\pm$ 0,4	-0,25 $\pm$ 0,6	-0,35 $\pm$ 0,7
ACM IR	0,04 $\pm$ 0,1 <sup>(a)</sup>	0,06 $\pm$ 0,1 <sup>(a)</sup>	0,06 $\pm$ 0,1
ACM IP	0,15 $\pm$ 0,5	0,17 $\pm$ 0,5	0,23 $\pm$ 0,6
Ccp IR	0,05 $\pm$ 0,3	0,11 $\pm$ 0,3	0,15 $\pm$ 0,3
Ccp IP	0,08 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,7	0,30 $\pm$ 0,6
Uterina IR	-0,5 $\pm$ 0,2	-0,2 $\pm$ 0,1 <sup>(b)</sup>	-0,13 $\pm$ 0,07 <sup>(b)</sup>
Uterina IP	- 0,04 $\pm$ 0,4	- 0,3 $\pm$ 0,4	- 0,28 $\pm$ 0,2 <sup>(b)</sup>

(a):  $p < 0,05$ ; (b):  $p < 0,01$ ; (c):  $p < 0,001$

Estos datos demuestran que las resistencias de los vasos uterinos que teóricamente nutren a los fetos discrepantes de menor peso son mayores, es decir, sugieren un obstáculo a la perfusión materna al feto menor en las gestaciones discrepantes.

Los valores de las OVF en las arterias umbilicales, ACM y Ccp son indicativas de una peor situación hemodinámica en los gemelos menores comparandolos con sus pares. Si bien, no se alcanza significación estadística.

Por otra parte, al comparar los parámetros que nos sirven para valorar el bienestar fetal en el momento del parto (peso fetal, peso placentario, EAB arterial y venoso y test de Apgar al minuto y a los 5 minutos, no observamos diferencias entre los 2 grupos estudiados (gestaciones normales vs discrepantes) independientemente del punto de corte utilizado para definir los grupos discrepantes. Únicamente observamos diferencias significativas en el peso fetal al nacimiento (Tablas 8 y 9).

Tabla 8: Gestaciones gemelares concordantes vs discrepantes  $\geq 20\%$  y parámetros de bienestar fetal intraparto.

	Concordantes Media $\pm$ DE N=86	Discrep. $\geq 20\%$ Media $\pm$ DE N= 42	P
Peso fetal (gr)	2419 $\pm$ 445	2172 $\pm$ 673	<b>0.01</b>
Peso placentario (gr)	473 $\pm$ 91,5	495 $\pm$ 128	0,3
Log 1 (*)	0,9 $\pm$ 0,06	0,9 $\pm$ 0,05	0,6
Log 5 (*)	0,1 $\pm$ 0,04	0,1 $\pm$ 0,02	0,3
pH arterial	7,3 $\pm$ 0,06	7,3 $\pm$ 0,07	0,6
EB arterial	-3,4 $\pm$ 2,9	-3,4 $\pm$ 2,1	0,9
pH venoso	7,3 $\pm$ 0,05	7,3 $\pm$ 0,07	0,2
EB venoso	-3,6 $\pm$ 2,6	-3,6 $\pm$ 2,6	0,1

(\*) El Índice de Apgar se expresa como logaritmo decimal.

Tabla 9 .Gestaciones gemelares concordantes vs discrepantes  $\geq 25\%$  y parámetros de bienestar fetal intraparto.

	Concordantes Media $\pm$ DE N =102	Discrep $\geq 25\%$ Media $\pm$ DE N = 26	p
Peso fetal (gr)	2425 $\pm$ 442	1997,1 $\pm$ 735,5	<b>0.001</b>
Peso placentario (gr)	483,5 $\pm$ 99,5	455 $\pm$ 116	0,3
Log 1 (*)	0,9 $\pm$ 0,05	0,9 $\pm$ 0,06	0,1
Log 5 (*)	0,1 $\pm$ 0,04	0,1 $\pm$ 0,02	0,8
pH arterial	7,3 $\pm$ 0,06	7,3 $\pm$ 0,09	0,4
EB arterial	-3,3 $\pm$ 2,9	-3,8 $\pm$ 3,1	0,4
pH venoso	7,3 $\pm$ 0,05	7,3 $\pm$ 0,08	0,4
EB venoso	-3,6 $\pm$ 2,5	-3,7 $\pm$ 2,8	0,7

(\*) El Índice de Apgar se expresa como logaritmo decimal.

Al obtener estos resultados, hemos querido ver si existen diferencias en los parámetros de bienestar fetal entre hermanos, es decir comparando el feto mayor vs feto menor (Tabla 10).

Los máximos pares observados han sido 64 en el caso que compara feto mayor-feto menor de forma global, 21 cuando la

discrepancia era  $\geq 20\%$  y 13 cuando la discrepancia era  $\geq 25\%$ .

- Se observó, como era de esperar, menor peso en las gestaciones que discrepantes independientemente del punto de corte, así como en el peso placentario.

- No encontramos diferencias ni en EAB tanto de arteria como de vena, ni en índice de Apgar al 1<sup>er</sup> y 5<sup>o</sup> minuto.

- Al analizar las gestaciones que presentaban una discrepancia ponderal entre hermanos  $\geq 20$  y  $25\%$ , el pH obtenido en la arteria umbilical, era estadísticamente mayor en los recién nacidos que presentan mayor peso al nacimiento ( $p < 0,009$  y  $p < 0,01$  respectivamente).

Tabla 10. Diferencias en los parámetros que evalúan el bienestar fetal intraparto en función de la discrepancia ponderal entre el feto mayor y menor. Se toma una discrepancia mínima entre gemelos y una discrepancia ponderal  $\geq 20-25\%$ .

( Los resultados están expresados como diferencias).

	Discrep mínima Mayor vs menor Media $\pm$ DE	Discrepa $\geq 20\%$ Media $\pm$ DE	Discrep $\geq 25\%$ Media $\pm$ DE
Peso fetal (gr)	387,8 $\pm$ 306,4 <sup>(c)</sup>	753,6 $\pm$ 218,9 <sup>(c)</sup>	867,3 $\pm$ 196,3 <sup>(c)</sup>
Peso placentario (gr)	83,36 $\pm$ 93,3 <sup>(c)</sup>	148,8 $\pm$ 6 <sup>(c)</sup>	159,5 $\pm$ 78 <sup>(c)</sup>
Log 1 (*)	0,01 $\pm$ 0,1	0,005 $\pm$ 0,06	0,001 $\pm$ 0,07
Log 5 (*)	0,002 $\pm$ 0,02	0,0002 $\pm$ 0,02	-0,003 $\pm$ 0,02
pH arterial	-18,2 $\pm$ 141	0,03 $\pm$ 0,05 <sup>(b)</sup>	0,04 $\pm$ 0,05 <sup>(a)</sup>
EB arterial	0,1 $\pm$ 3,6	1,1 $\pm$ 3,9	0,9 $\pm$ 4,3
pH venoso	0,19 $\pm$ 1,4	0,01 $\pm$ 0,04	0,01 $\pm$ 0,04
EB venoso	0,16 $\pm$ 4	0,009 $\pm$ 3,4	0,4 $\pm$ 3,5

(a):  $p < 0,01$ ; (b):  $p < 0,009$ ; (c):  $p < 0,001$

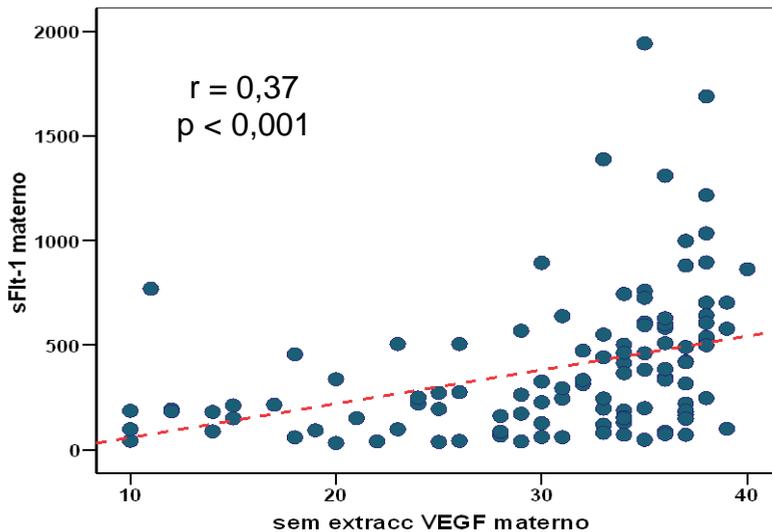
### *5.1.3 Gestaciones gemelares discrepantes y sistema VEGF materno y fetal.*

Antes de valorar si existen diferencias entre los distintos componentes del sistema VEGF entre las gestaciones discrepantes y concordantes, estudiamos las variaciones entre los niveles de VEGF y las semanas de gestación, ya que nuestro objetivo es valorar si es útil como marcador precoz de hipoxia fetal crónica.

Observamos una correlación significativa y positiva entre las semanas de gestación y los valores del sFlt-1 a lo largo de la gestación ( $r = 0,37$ ,  $p < 0,001$ ,  $N = 112$ ).

Es decir, conforme progresaba la gestación los niveles de sFlt-1 iban en aumento siendo sus valores máximos en el momento del parto. Este resultado se muestra en la figura 5.

Figura 5: Relación sFlt-1 materno y semanas de gestación de extracción VEGF materno.



El resto de componentes del sistema VEGF, VEGF libre y total, no guardaban relación con las semanas de gestación.

Semejantes resultados se observaban cuando se fraccionaban las gestaciones en aquellas con fetos concordantes y en las que desarrollaron una discrepancia ponderal  $\geq 20\%$ , no existiendo asociación cuando la discrepancia fue  $\geq 25\%$ .

No existían diferencias en las pendientes ni en la intersección de las rectas que definen los valores de sFlt-1 materno en función de la edad gestacional al considerar las

gestaciones con discrepancia  $\geq 20\%$  y las concordantes (Tabla 11).

Tabla 11: Estudio de regresión lineal de la asociación entre semana de gestación - sFlt-1.

	r	p	Constante (IC 95%)	Pendiente
Normales (N =157)	0,4	< 0,001	-116,7 (-307,4-74,1)	16,4 (10,4-22,5)
Discrep. $\geq 20\%$ ( N = 65)	0,3	< 0,05	-67,4 ( -453,3-318)	15,4 (3,1-27,6)

Cuando analizamos la diferencia de los componentes del sistema VEGF materno entre gestaciones normales y discrepantes (discrepancia  $\geq 20\%$  o del 25%) en las muestras extraídas en la semana previa al parto o intraparto (N=64), obtuvimos una mayor cantidad de VEGF libre, total y sFlt-1 en el plasma de las gestantes con gemelos sin discrepancia ponderal al compararlas con las madres que presentan gemelos discrepantes.

Existía únicamente una diferencia significativa cuando se analizaba el VEGF total y la discrepancia estudiada era del

≥ 20%, y en el VEGF libre cuando la discrepancia era ≥ 25%.  
(Tabla 12 y 13).

Tabla 12: Sistema VEGF materno y gestaciones discrepantes ≥ 20%

Sistema VEGF	No Discrepantes Media ± DE N =37	Discrepa ≥ 20% Media ± DE N =19	p
VEGF libre (pg/ml)	117,2 ± 88	89,8 ± 63,1	0,233
VEGF total (pg/ml)	362,3 ± 500,5	112,9 ± 102,5	<b>0,037</b>
sFlt-1(pg/ml)	530,5 ± 349,4	511,8 ± 443,6	0,861

Tabla 13. Sistema VEGF materno y gestaciones gemelares discrepantes ≥ 25%.

Sistema VEGF	No Discrepantes Media ± DE N =44	Discrep ≥ 25% Media ± DE N =12	p
VEGF libre (pg/ml)	118,6 ± 82,2	68,8 ± 64,6	<b>0,047</b>
VEGF total (pg/ml)	324,4 ± 468,9	106,4 ± 88,6	0,11
sFlt-1 (pg/ml)	571,8 ± 380,4	350,0 ± 337,8	0,07

Dado el reducido número de gestaciones discrepantes (N=21 discrepancia  $\geq$  20% y N=13 discrepancia  $\geq$  25%) recurrimos a pruebas no paramétricas (U Mann Withney) , observando que no existían diferencias entre los valores del sistema VEGF materno cuando el punto de corte de discrepancia lo situábamos en el 20%, aunque el valor de la “p” se aproximaba a la significación en el análisis de los tres componentes.

Sin embargo cuando la discrepancia era superior al 25% encontrábamos una diferencia significativa en los valores de VEGF libre y sFlt-1 materno ( $p < 0,05$ ). Es decir, las gestaciones con discrepancias  $> 25\%$  tienen menores valores del VEGF total y libre que las no discrepantes.

Si analizamos todos los casos estudiados (donde el mismo caso puede estar representado en varias ocasiones) observamos que las madres con gestaciones discrepantes  $\geq 25\%$  tienen valores de VEGF libre y total inferiores que las no discrepantes ( $p < 0,01$ ) (Tabla 14).

Tabla 14. Sistema VEGF materno y gestaciones gemelares discrepantes  $\geq 25\%$  a lo largo de la gestación.

Sistema VEGF	No Discrepantes Media $\pm$ DE N =93	Discrep $\geq 25\%$ Media $\pm$ DE N =20	p
VEGF libre (pg/ml)	103,4 $\pm$ 8,1	58,1 $\pm$ 12	<b>0,01</b>
VEGF total (ng/ml)	269,8 $\pm$ 46,9	103,8 $\pm$ 24,4	<b>0,01</b>
sFlt-1(pg/ml)	423,7 $\pm$ 37,0	294,4 $\pm$ 63,2	NS

Por otra parte, debido a que las gestaciones discrepantes finalizaron antes la gestación que las concordantes, normalizamos los valores para las semanas de gestación observando que los tres parámetros del sistema VEGF eran menores en las madres con gemelos discrepantes ( $p < 0,001$ ).

Los niveles de los diferentes componentes del complejo VEGF en los vasos fetales (arteria y vena) de los gemelos no discrepantes y discrepantes tampoco mostraban diferencias, al igual que tampoco lo hacía la expresión placentaria del VEGF (Tabla 15 y 16) independientemente del punto de corte utilizado para definir la discrepancia entre gemelos.

Tabla 15: Sistema VEGF fetal y gestaciones gemelares discrepantes  $\geq 20\%$  (N=21).

Sistema VEGF fetal	Concordantes Media $\pm$ DE	Discrep $\geq 20\%$ Media $\pm$ DE	p
VEGF libre arteria (pg/ml)	127,4 $\pm$ 79	121,6 $\pm$ 72,8	0,8
VEGF total arteria (pg/ml)	177,4 $\pm$ 118,7	267,4 $\pm$ 305	0,2
sFlt-1 arteria (pg/ml)	78,7 $\pm$ 100	110,2 $\pm$ 116	0,3
VEGF libre vena(pg/ml)	96,3 $\pm$ 62	103 $\pm$ 69	0,7
VEGF total vena(pg/ml)	238,5 $\pm$ 365	172,9 $\pm$ 170	0,5
sFlt-1 vena (pg/ml)	60,9 $\pm$ 104,5	229 $\pm$ 512	0,17
VEGF placenta	15,5 $\pm$ 28,9	1,9 $\pm$ 2,6	0,3
sFlt-1 placenta	1,0 $\pm$ 0,6	0,8 $\pm$ 0,3	0,4
VEGFR1 placenta	1,4 $\pm$ 2,6	0,5 $\pm$ 0,7	0,5

Tabla 16: Sistema VEGF fetal y gestaciones gemelares discrepantes  $\geq 25\%$  (N=13)

Sistema VEGF fetal	Concordantes Media $\pm$ DE	Discrep $\geq 25\%$ Media $\pm$ DE	p
VEGF libre arteria(pg/ml)	123,9 $\pm$ 93	110,9 $\pm$ 80	0,7
VEGF total arteria(pg/ml)	147,5 $\pm$ 112	266,3 $\pm$ 367	0,3
sFlt-1 arteria(pg/ml)	51,7 $\pm$ 87	89,1 $\pm$ 120	0,4
VEGF libre vena(pg/ml)	65,3 $\pm$ 43	76,6 $\pm$ 60	0,6
VEGF total vena(pg/ml)	118,9 $\pm$ 139	98,3 $\pm$ 99	0,7
sFlt-1 vena(pg/ml)	21,1 $\pm$ 35,4	280,3 $\pm$ 707	0,2
VEGF placenta	1,1 $\pm$ 1,9	3,1 $\pm$ 3,8	0,6
sFlt-1 placenta	0,6 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,2	0,4
VEGFR1 placenta	0,1 $\pm$ 0,06	0,8 $\pm$ 1	0,4

Cuando realizamos el estudio del sistema VEGF en los vasos fetales, entre el feto mayor y menor (hermanos), tampoco observamos diferencias, ni al analizarlos de forma global ni al estudiar únicamente las gestaciones con discrepancia ponderal independientemente de la discrepancia

existente entre hermanos ( $\geq 20$  y 25%). Se observaron los mismos resultados al estudiar la expresión del VEGF a nivel placentario.

## **5.2. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LAS ONDAS DE VELOCIDAD DE FLUJO EN LOS VASOS FETALES Y MATERNOS.**

### *5.2.1 Bienestar fetal anteparto*

Puesto que no disponemos de pruebas invasivas para valorar la situación fetal anteparto esta se estima mediante la situación cerebro-vascular que refleja una buena oxigenación de los centros cardio-reguladores a nivel central.

El Doppler de la arteria umbilical y la ACM así como su cociente serían los parámetros que nos informan del bienestar fetal anteparto.

Por otro lado el Doppler de las arterias uterinas en la madre nos informa de las resistencias uteroplacentarias (perfusión) e indirectamente del aporte de nutrientes al feto.

Las observaciones en estos análisis han oscilado entre 140-182 pares de datos.

Considerando el flujo total que aportan las arterias uterinas, que sería el promedio de la arteria uterina derecha y la arteria uterina izquierda, al estudiar su asociación con el Doppler de la A. Umb., ACM y Ccp observamos que existía una correlación significativa y positiva entre el IP del promedio de las uterinas, el IP de los vasos umbilicales fetales ( $r = 0,21$   $p < 0,01$ ) y significativa y negativa con el IP del Ccp ( $r = -0,24$   $p < 0,005$ ).

No se observaba una asociación significativa cuando se consideraba el IR del promedio de las arterias uterinas y el Doppler de los vasos fetales (Tabla 17).

Tabla 17: Correlación OVF vasos uterinos y OVF vasos fetales (N =146)

	IP PROMEDIO UTERINAS	IR PROMEDIO UTERINAS
A Umb. IP	<b><math>r = 0.21</math> <math>p &lt; 0.01</math></b>	$r = 0.07$ $p = 0.401$
A Umb IR	$r = 0.13$ $p = 0.097$	$r = -0.05$ $p = 0.523$
ACM IP	$r = -0.14$ $p = 0.09$	$r = -0.07$ $p = 0.407$
ACM IR	$r = -0.09$ $p = 0.287$	$r = -0.01$ $p = 0.882$
CCp IP	<b><math>r = -0.24</math> <math>p = 0.004</math></b>	$r = -0.08$ $p = 0.37$
CCp IR	$r = -0.14$ $p = 0.079$	$r = 0.06$ $p = 0.424$

Estos datos en su conjunto mostraban una asociación débil entre el promedio del flujo sanguíneo de las vasos uterinos estimado mediante la OVF y los parámetros

velocimétricos fetales a lo largo de las semanas de gestación estudiados.

Cuando analizamos de forma independiente el Doppler de las arterias uterinas con el Doppler de la arteria umbilical, ACM y Ccp del feto situado próximo a la inserción placentaria y su uterina correspondiente, no se observó asociación entre las estimaciones de las OVF de las arterias uterinas y los parámetros velocimétricos fetales, a excepción del IP de la arteria uterina derecha que se correlacionaba de forma significativamente y positiva con los índices velocimétricos de la arteria umbilical (IP  $r = 0,26$   $p < 0,05$  ) y de forma significativa y negativa con el IP del Ccp (  $r = - 0,24$   $p < 0,05$ ).

### *5.2.2 Bienestar fetal intraparto*

Intraparto y al nacimiento el EAB en la arteria umbilical es el mejor método objetivo del que disponemos para la valoración del estado fetal.

El peso fetal y placentario sirven como métodos indirectos de la situación fetal crónica informándonos del aporte de nutrientes y en su caso por su déficit por insuficiencia de estos (hipoxia materna, insuficiencia placentaria).

El Doppler umbilical, de la ACM y su cociente obtenido previo al parto, también informarán de una adaptación crónica

al entorno materno en tanto que el EAB e índice de Apgar reflejarían cambios tanto crónicos como agudos.

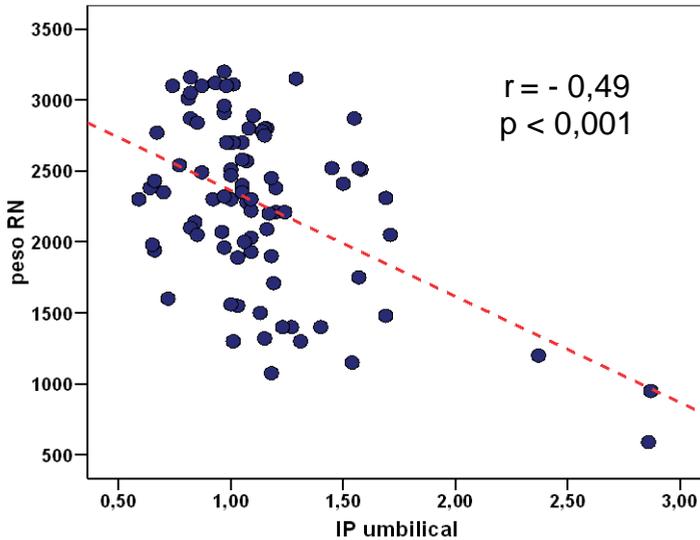
Al analizar la relación entre los distintos parámetros evaluados con el objetivo de aumentar el conocimiento del estado de bienestar fetal hemos obtenido los siguientes resultados:

No se observaba ninguna asociación entre el Doppler del promedio de las arterias uterinas en conjunto, con el peso individual de la placenta, el peso del recién nacido, el EAB en los vasos umbilicales ni con el índice de Apgar al minuto ni a los 5 minutos expresados en forma de logaritmo.

Las OVF de los vasos umbilicales, se asociaban únicamente de forma estadísticamente significativa y negativa con el peso fetal individual (IP  $r = - 0,49$   $p < 0,001$ ; IR  $r = - 0,46$   $P < 0,001$ ,  $N=82$ ). Figura 6.

No se observaba asociación alguna con el EAB de los vasos umbilicales, el peso de la placenta (total ni individual) ni con el logaritmo del índice de Apgar al minuto ni a los cinco minutos del nacimiento.

Figura 6. Correlación peso fetal (gr) - IP arteria umbilical.



Tampoco encontramos asociación entre los parámetros velocimétricos de la ACM fetal y los parámetros analizados ( peso RN, peso placentario, EAB, y logarítmico del Apgar al nacimiento).

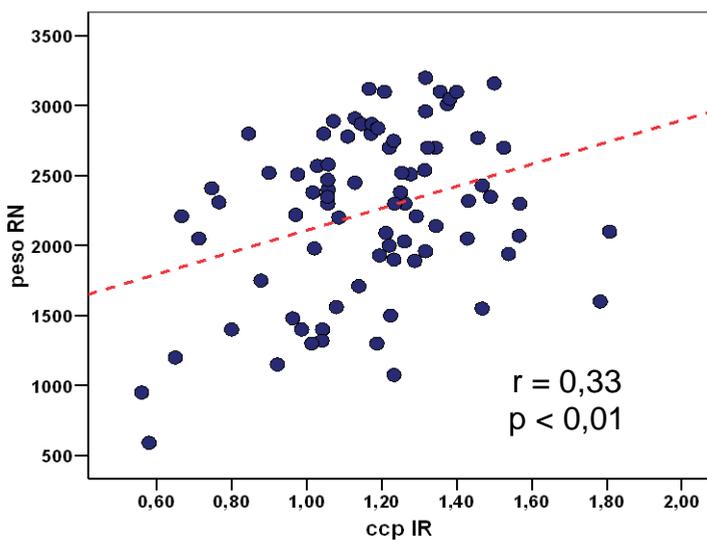
Tras analizar de forma individual los índices velocimétricos en los vasos fetales, hemos querido ver si existe alguna relación con Ccp.

Teóricamente el Ccp el estimador más sensible de la hipoxia fetal valorada de forma no cruenta, ya que , si existe un estado de hipoxia fetal este cociente sufre variaciones siendo el

cociente inferior a 1 cuando el feto está comprometido (fenómeno de redistribución vascular).

Observamos una asociación positiva entre el Ccp y el peso fetal, es decir, a mayor cociente mayor peso fetal (IP  $r = 0,27$   $p < 0,05$   $N = 82$ , IR  $r = 0,33$ ,  $p < 0,01$ ,  $N = 82$ ) sin encontrarse relación alguna con el resto de parámetros de bienestar fetal analizados (peso RN, peso placentario, EAB y logaritmo del Apgar al minuto y a los 5 minutos).

Figura 7. Relación IR Ccp- peso RN (gr).



### **5.3. SISTEMA VEGF MATERNO- FETAL**

Con el análisis de estos datos se pretende aumentar el conocimiento del sistema VEGF en el binomio feto-materno, lo que nos ayudará a comprender la interrelación y la adaptación fetal a procesos hipóxicos.

Con este objetivo, hemos analizado la relación que existe entre los valores de los diferentes componentes del sistema VEGF plasmático materno periparto y los componentes del sistema VEGF en los vasos fetales (arteria y vena), al igual que la relación que existe con la expresión del VEGF nivel placentario.

En primer lugar en la tabla 18 se exponen las diferencias materno-fetales del sistema VEGF observándose que las concentraciones de VEGF libre y total son mayores en la sangre de los vasos umbilicales que en la madre, en tanto, los niveles de sFlt-1 son superiores en sangre materna que en el compartimento fetal.

Tabla 18. Diferencias materno-fetales en el sistema VEGF.

N = 108

pg/ ml	VEGF Media $\pm$ DE	p
VEGF libre materno	106,3 $\pm$ 81,5	<b>0,01</b>
VEGF libre arteria fetal	151,8 $\pm$ 220	
VEGF total materno	289,8 $\pm$ 440,2	<b>0,003</b>
VEGF total arteria fetal	453,2 $\pm$ 526,7	
sFlt-1 materno	520,3 $\pm$ 386,5	<b>0,001</b>
sFlt-1 arteria fetal	89,8 $\pm$ 111,5	
VEGF libre materno	108,5 $\pm$ 89	<b>0,035</b>
VEGF libre vena fetal	151 $\pm$ 232,2	
VEGF total materno	293,3 $\pm$ 438,5	<b>0,001</b>
VEGF total vena fetal	420,7 $\pm$ 497,2	
sFlt-1 materno	529,7 $\pm$ 391,8	<b>0,001</b>
sFlt-1 vena fetal	67,8 $\pm$ 81,6	

En segundo lugar, analizamos la relación entre los diferentes componentes del sistema VEGF materno con sus homólogos a nivel de los vasos fetales. Observamos en todos los casos la existencia de una correlación significativa y positiva ( tabla 19).

En tercer lugar, analizamos la correlación entre los diferentes parámetros del sistema VEGF materno-fetal, y la relación con la expresión placentaria del VEGF, no observándose asociación

Tabla 19: Correlación Sistema VEGF materno- VEGF fetal y placentario.

	Sistema VEGF materno		
	VEGF libre	VEGF total	sFlt-1
<b>VEGF arteria fetal (N= 107)</b>			
VEGF libre	<b>r =0.25, p=0.008</b>	r =0.17 p=0.078	r =0.18, p=0.60
VEGF total	<b>r =0.47, p=0.001</b>	<b>r =0,54, p=0.001</b>	r =0.17, p=0.07
sFlt-1	r =0.15, p=0.11	r =0.06, p= 0.553	<b>r =0.37, p=0.001</b>
<b>Sist. VEGF vena fetal (N= 106)</b>			
VEGF libre	<b>r =0,34 ,p=0.001</b>	<b>r =0.27, p=0.004</b>	<b>r =0.26, p=0.007</b>
VEGF total	<b>r =0.53, p=0.001</b>	<b>r =0.70, p=0.001</b>	<b>r =0.19, p=0.045</b>
sFlt-1	r =0.01, p=0.304	r =-0.10, p=0.287	<b>r =0.33, p=0.001</b>
<b>Sist. VEGF placentario (N= 55)</b>			
VEGF	r =-0,12,p=0.360	r =-0.06, p=0.625	r =-0.20, p=0.137
sFlt-1	r =0.23 p=0.86	<b>r =0.30, p=0.02</b>	r =-0.10 p=0.46
VEGFR1	r =0.17 ,p=0.229	r =0.18, p=0.20	r =-0.13, p=0.363

Al analizar detalladamente los resultados expuestos en la tabla observamos los siguientes resultados:

Todos los componentes del sistema VEGF materno (VEGF libre, VEGF total y sFlt-1) se correlacionaban con sus correspondientes homólogos en los vasos fetales (arteria y vena) de forma significativa y positiva, no asociándose con el sistema VEGF a nivel placentario.

#### **5.4. SISTEMA VEGF MATERNO Y BIENESTAR FETAL**

Pretendemos evaluar si la variación de los diferentes parámetros del sistema VEGF analizados en plasma materno nos servirían como indicador de la hipoxia fetal durante la gestación que es uno de los objetivos principales de nuestro trabajo.

Sabemos que hoy por hoy no existe ningún parámetro precoz y preciso que nos permita conocer el estado de bienestar fetal intrauterino a lo largo de la gestación.

La medición de las diferentes OVF mediante el empleo del Doppler en los diferentes vasos fetales nos permite conocer el estado fetal intrauterino en gestaciones de alto riesgo obstétrico como lo son las gestaciones gemelares.

Resulta interesante, por lo tanto, conocer la relación que existe entre los niveles de VEGF plasmático materno y los diferentes índices velocimétricos en los vasos fetales a lo largo de la gestación.

Esto nos permitiría tener un mayor número de parámetros para el diagnóstico de una situación de riesgo de pérdida de bienestar fetal intrauterino.

Todo ello, ayudaría a una temprana actuación obstétrica con la posibilidad de disminuir la morbi-mortalidad fetal.

Al analizar la asociación entre los niveles del sistema VEGF plasmático materno y los índices velocimétricos en los vasos maternos y fetales únicamente observamos una correlación significativa y negativa entre el sFlt-1 materno y la OVF de la arteria umbilical (IR  $r = -0,20, p < 0,01$ ; IP  $r = -0,18, p < 0,05, n = 160$ ) y positiva con el IP del Ccp ( $r = 0,21, p < 0,005, N = 142$ ). No existía una relación con el resto de OVF ni de los vasos uterinos ni con la ACM fetal.

Al realizar el mismo estudio en la semana del parto encontramos, de forma semejante a lo que ocurría a lo largo de la gestación, una correlación significativa y negativa del sFlt-1 con las OVF de la arteria umbilical (IR  $r = -0,24, p < 0,05$ ; IP  $r = -0,23, p < 0,05, N = 78$ ) y con el IR del Ccp ( $r = 0,33, p < 0,01, N = 74$ ) y el IP ( $r = 0,27, p < 0,01, N = 74$ ).

Por otra parte hallamos una correlación significativa y positiva entre el sFlt-1 y el EAB en arteria umbilical (EB  $r = 0,24, p < 0,01, N = 109$ ) y el Apgar en el primer minuto ( $r = 0,19, p < 0,05, N = 112$ ) así como una correlación significativa y negativa del VEGF libre y total con el Apgar a los 5 minutos ( $r = -0,26, p < 0,005, r = -0,30, p < 0,001$  respectivamente  $N = 112$ ).

## 5.5 SISTEMA VEGF FETAL Y BIENESTAR FETAL

El feto recibe sangre oxigenada a través de la vena umbilical, siendo la arteria la encargada de transportar los productos de deshecho del feto.

Pensando que el feto podría responder a sus necesidades de angiogénesis mediante la producción de los componentes del complejo VEGF resultaría interesante el estudio de los diferentes componentes del sistema VEGF en los vasos fetales.

Al analizar los resultados, encontramos que existían diferencias arterio-venosas de los diferentes componentes del sistema VEGF separando individualmente a cada gemelo dentro de cada gestación gemelar. Se observaban niveles superiores en arteria fetal con respecto a la vena en todos los componentes del sistema VEGF.

Estos resultados se obtuvieron tanto cuando realizamos el análisis de los datos con el empleo de técnicas paramétricas (Test de T Student ) como no paramétricas ( Test de Wilcoxon), aunque en ninguno de los casos estas diferencias resultaron estadísticamente significativas. Tabla 20.

Tabla 20: Diferencias arterio-venosas del sistema VEGF de forma individual en cada gemelos en el momento del parto.

(N = 54)

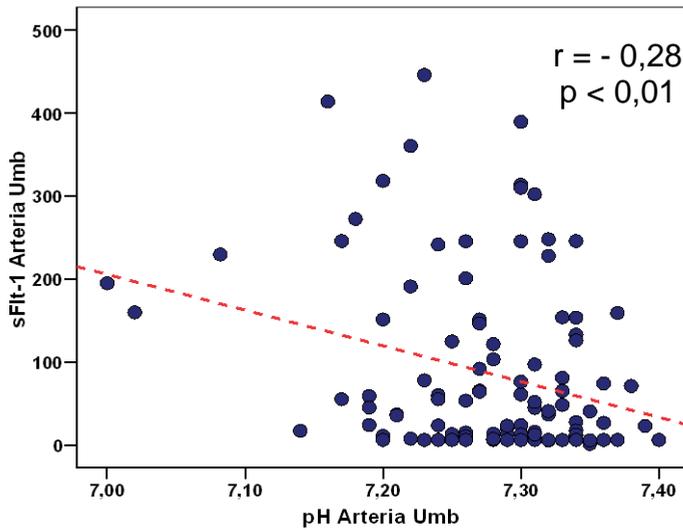
pg/ ml	VEGF Media $\pm$ DE	p
VEGF libre arteria	152,1 $\pm$ 220,1	0,9
VEGF libre vena	148,6 $\pm$ 228,4	
VEGF total arteria	426,8 $\pm$ 516,1	0,6
VEGF total vena	393,1 $\pm$ 496,6	
sFlt-1 arteria	85,6 $\pm$ 106,1	0,7
sFlt-1 vena	76,3 $\pm$ 98,6	

Al analizar la relación entre los diferentes componentes del sistema VEGF en los vasos fetales (arteria y vena) analizados de forma individual en cada recién nacido y los parámetros objetivos que determinan el estado de bienestar fetal anteparto (Doppler) e intraparto (peso fetal, peso placentario, EAB e índice de Apgar) vimos que no existía una correlación entre el sistema VEGF de los vasos fetales y sus índices velocimétricos (A. Umb, ACM, Ccp) ni tampoco con el las OVF de los vasos uterinos maternos.

Sin embargo, encontramos una correlación significativa y negativa entre los niveles de sFlt-1 en arteria fetal y el pH en arteria umbilical fetal (  $r = - 0,28$   $p < 0,01$   $N = 111$ ), es decir, a pH

menores, mayores valores de sFlt-1 encontrabamos en dichos vasos. Figura 8.

Figura 8. Relación sFlt-1- pH arteria umbilical fetal.



El VEGF total en vena fetal se correlacionaba de forma significativa y positiva con el EB tanto en arteria ( $r = 0,33$ ,  $p < 0,001$   $N = 110$ ) como en vena fetal ( $r = 0,30$ ,  $p < 0,001$ ,  $N = 110$ ).

El resto de parámetros de bienestar fetal (peso RN, peso placentario, EAB en vasos fetales e índice de Apgar al minuto y a los 5 minutos) no se correlacionaban con el resto de componentes del sistema VEGF en los vasos fetales.

## 5.6 SISTEMA VEGF PLACENTARIO Y BIENESTAR FETAL

Al analizar la correlación entre las expresión placentaria de los diferentes componentes del sistema VEGF y los parámetros de bienestar fetal, no encontramos ninguna correlación ni con las OVF de los vasos fetales y maternos ni con el resto de parámetros que valoraban el bienestar fetal intraparto (peso fetal, peso placentario, EAB e índice de Apgar).

También analizamos la relación entre el sistema VEGF placentario y el sistema VEGF fetal y materno.

Únicamente se mostraba una correlación significativa y positiva entre el VEGFR1 placentario y el VEGF libre en arteria y vena fetales ( $r = 0,31$ ,  $p < 0,05$  y  $r = 0,46$ ,  $p < 0,003$ ,  $N = 39$  respectivamente) y también con el VEGF total en ambos vasos fetales ( $r = 0,41$   $p < 0,09$  y  $r = 0,43$ ,  $p < 0,007$ ,  $N = 39$  respectivamente). No existía correlación entre el resto de parámetros placentarios del sistema VEGF y los sistemas VEGF materno y fetales.



## **6. DISCUSIÓN**



## 6. DISCUSIÓN

El trabajo que hemos desarrollado pretende conocer con mayor exactitud los factores involucrados en el desarrollo de la discrepancia ponderal dentro de las gestaciones gemelares bicoriales biamnióticas .

Entre sus posibles etiologías encontramos un papel genético y lo que es más importante para nuestro estudio la posibilidad de la existencia de una insuficiencia placentaria que origine la discrepancia entre gemelos.

Sabemos que el VEGF y / o su receptor soluble, sFlt-1, está aumentado en situaciones obstétricas donde existe un desarrollo placentario patológico como son la preeclampsia y los CIR (Wathen y cols., 2006, Chainworapongsa y cols., 2005).

Las gestaciones gemelares discrepantes proporcionan un modelo ideal natural para el estudio de la relación del VEGF con la hipoxia fetal o los factores que interfieren en su crecimiento para valorar si estos factores realmente fueran responsables de la discrepancia.

Este es el primer estudio en humanos que analiza la utilidad del sistema VEGF en gestaciones gemelares.

Con su análisis pretendemos conocer la fisiopatología de la gestaciones gemelares discrepantes y la utilidad del sistema

VEGF como marcador de compromiso vascular en las mismas.

El aumento en la incidencia de las gestaciones gemelares debido a la gran demanda en el empleo de TRA, ha llevado a numerosos autores al estudio de las complicaciones derivadas de su empleo así como al estudio de las complicaciones obstétricas derivadas de las mismas.

La gestación múltiple iatrógena es la complicación más importante asociada a las TRA. A pesar de ello existe poca información y controvertida sobre las complicaciones obstétricas y resultados perinatales en gestaciones gemelares derivadas de TRA con respecto a las gestaciones gemelares espontáneas.

Se describe un aumento en la incidencia de partos prematuros y de pequeños para edad gestacional en las gestaciones gemelares de TRA frente a las espontáneas (Moise y cols.,1998; Saygan-Karamursel y cols., 2006). Otros autores encuentran resultados similares, es decir una mayor incidencia de prematuridad y un menor resultado en el test de Apgar al nacimiento en los gemelos de TRA (Cornelis y cols., 2001), pero señalan el hecho de la subfertilidad en las parejas que demandan TRA como factor intrínseco contribuyente de estos resultados.

Existen varios factores que sugieren la asociación entre subfertilidad y resultados obstétricos desfavorables, entre los que encontramos el tabaquismo, la enfermedad pélvica inflamatoria, deficiencia de ácido fólico y el estrés (Baird y cols., 1999), apuntando también que posiblemente estas pacientes pudieran tener problemas tiroideos o patología inmunológica asociada.

Sin embargo, Haydon y cols., 2006, no encuentran diferencias en cuanto a complicaciones neonatales entre las gestaciones gemelares espontáneas y las derivadas de TRA.

En nuestra muestra estudiada la edad materna fue superior en las gestantes del grupo que gestaron con el empleo de TRA (  $34 \pm 4,6$  vs  $32,7 \pm 5,3$ ) sin ser significativa esta diferencia. Estos resultados son esperables debido a que la edad es un factor íntimamente asociado a problemas de infertilidad (Kessler y cols, 1980, Haydon y cols., 2006).

Entre las complicaciones obstétricas derivadas de las gestaciones gemelares encontramos la discrepancia ponderal que es un fenómeno común que acontece en aproximadamente un 15% de las mismas. Usualmente definida como una diferencia ponderal entre gemelos  $\geq 20$  o al 25%, debido a que este punto de corte es el que mejor identifica los fetos o neonatos que presentan mayor morbi-mortalidad (Hollier y cols., 1999; Gernt y cols., 2001; Demissie y cols., 2002)

Respecto a este hallazgo existe discrepancia entre diversos autores. Narine y cols 2003 no encuentran diferencias en cuanto a la discrepancia entre gestaciones espontáneas y las derivadas de TRA, mientras que autores como Zadori y Audibert observan un aumento de las gestaciones discrepantes en las gestaciones derivadas de TRA ( Zadori y cols., 2004; Audibert y cols., 2002). Esta discrepancia puede ser debida en parte a una diferencia en el punto de corte empleado para definir la discrepancia ponderal y por otra parte, de mayor importancia, a la diferencia según la corionicidad.

Nosotros, analizando únicamente gestaciones gemelares bicoriales biamnióticas, encontramos una mayor frecuencia de gestaciones con discrepancia ponderal entre gemelos concebidos mediante TRA con respecto a las gestaciones espontáneas, aunque sólo llega a ser significativa la diferencia cuando la discrepancia entre gemelos es  $\geq 25\%$ . Por ello consideramos que es una de las complicaciones obstétricas a tener en cuenta a la hora del manejo de gestaciones gemelares derivadas de TRA.

Por otra parte también se ha estudiado la prematuridad por su gran importancia con respecto a la morbi-mortalidad perinatal. Así, autores como Jackson y Reddy, en recientes publicaciones concluyen que las gestaciones únicas derivadas de TRA tienen un riesgo incrementado de parto prematuro y como consecuencia de bajo peso y de fetos pequeños para la edad gestacional ( Jackson y cols., 2004; Reddy y cols., 2007).

Las gestaciones gemelares implican por ellas mismas una mayor incidencia de parto prematuro, sin embargo se ha postulado que las TRA también podrían jugar un papel en este hecho, ya que se ha visto que las gestaciones únicas derivadas de TRA presentan, como hemos comentado anteriormente, una mayor prematuridad y fetos de menor peso la nacimiento con respecto a las gestaciones únicas espontáneas (Dawood, 1996).

Moise y cols., 1998 describen un riesgo de parto prematuro 4 veces superior en gestaciones múltiples con respecto a las únicas documentando que el 50% de las gestaciones gemelares finalizan antes de la semana 37 de gestación.

Nosotros observamos que el 53% de las gestantes tienen un parto antes de la semana 37 y hasta en un 15% de las ocasiones un parto antes de la semana 34.

Tomando la prematuridad en su concepto clásico, es decir, fetos nacidos antes de la 37 semanas, hemos observado tras el análisis mediante el empleo de curvas ROC que la prematuridad está asociada a una discrepancia superior al 6%.

Cuando consideramos la prematuridad inferior a 34 semanas, lo que como es sabido se asocia a una mayor morbi-mortalidad perinatal, (Mercer y cols., 2003), en nuestra muestra

se asocia a gestaciones con gemelos con discordancias superiores al 35%.

Es importante destacar que en nuestra población estudiada la incidencia de prematuridad no está aumentada en las gestaciones derivadas de TRA con respecto a las espontáneas. siendo estos resultados similares a los descritos por Olivennes y cols., 1996. Otros autores, en cambio apuntan un aumento de la prematuridad (partos entre semana 34-36) en gestaciones derivadas de TRA ( Verstraelen y cols., 2005).

Con esto, al analizar en conjunción la prematuridad con la discrepancia ponderal, sí vemos que las gestaciones que presentan grandes discrepancias entre gemelos presentan una mayor incidencia de parto prematuro si tomamos como punto de corte las 34 semanas de edad gestacional.

Desde el punto de vista clínico, la discrepancia ponderal expresa una mayor severidad hipóxica en el gemelo menor, lo que presumiblemente lleva a los obstetras a finalizar antes la gestación (Hollier y cols., 1999).

Debido a que la morbi-mortalidad perinatal está aumentada hasta 10 veces en las gestaciones gemelares con fetos discrepantes comparada con los gemelares con fetos concordantes, la detección anteparto de dichas gestaciones y sus posibles complicaciones está siendo un área importante de estudio e investigación.

El empleo de la ecografía es una herramienta obligada en el control de las gestaciones gemelares para el diagnóstico precoz de la gemelaridad, su corionicidad, la posible discrepancia ponderal, la exploración del bienestar fetal en caso de CIR y presentación fetal.

Numerosos autores han empleado la ecografía para el diagnóstico precoz de la discrepancia ponderal entre gemelos.

Dickey y cols.,1992 demostraron un crecimiento discrepante entre gemelos ya desde el periodo embrionario. Por otra parte Kalish y cols., 2003 observan que los gemelos que presentan una discrepancia ponderal en el momento del nacimiento, ya presentan estas diferencias en la longitud cráneo-caudal (CRL) > percentil 90 entre la semana 11 y 14 de gestación.

El DBP ha sido el parámetro más ampliamente estudiado en las gestaciones gemelares. Una diferencia superior a 4 -5mm entre los DBP de ambos gemelos se ha asociado con discrepancia ponderal y un resultado perinatal adverso (Crane y cols.,1980, Grumbach y cols.,1986). Estos hallazgos no han sido encontrados en otras publicaciones donde se encuentra una diferencia ponderal entre gemelos superior al 30% con sólo una diferencia entre ambos DBP de 1mm (Erkkola y cols.,1985)

Campbell y Willkin fueron el primer grupo que estudiaron la CA como predictor de discrepancia ponderal entre gemelos (Campbell y cols., 1975). Tras estos hallazgos otros autores como Shab, Charlemaine y Klam han estudiado otros parámetros ecográficos para el diagnóstico de gemelos discordantes. Estos autores concluyen que la medición de la CA es el parámetro de mayor importancia a la hora de discernir gemelos discrepantes (Shah y cols., 1994; Charlemaine y cols., 2000; Klam y cols., 2005).

Otros autores como Gernt concluye que la ecografía es capaz de discernir con precisión los gemelos que presentarán una discrepancia superior al 25% entre gemelos con las biometrías realizadas 2 semanas previas al parto (Gernt y cols., 2001).

En nuestro estudio hemos sospechado la discrepancia ponderal entre gemelos con las biometrías realizadas a lo largo de la gestación (DBP, CA y LF) para inferir el peso fetal, si bien el diagnóstico de confirmación se produjo tras el parto determinado por el peso de ambos fetos.

Sabemos que la placenta juega un papel importante en el crecimiento fetal. La disfunción placentaria o un flujo uterino desigual en los gemelos podría afectar al crecimiento fetal desde el primer trimestre de la gestación.

El CIR, la hipertensión inducida por la gestación y la gestación múltiple se asocian a un 50% de prematuridad y riesgo de hipoxia.

La hipoxia fetal aguda o crónica es un factor de riesgo que se asocia a mortalidad y morbilidad fetal. Para minimizar la agresión de la hipoxia el feto recurre fundamentalmente a tres mecanismos: redistribución de la masa circulante a favor de los órganos vitales (cerebro, corazón y suprarrenales), disminución del consumo de O<sub>2</sub> y glucólisis anaerobia.

Por lo tanto es crítico para la objetivación de la hipoxia el conocimiento del EAB y cuando esto no sea posible la redistribución del flujo sanguíneo, mediante el estudio Doppler en A.Umb y ACM del feto.

El estudio Doppler en las gestaciones de alto riesgo obstétrico ha sido evaluada por diversos autores. La medición de las OVF permite conocer el estado hemodinámico fetal posibilitando el diagnóstico de situaciones de hipoxia fetal.

Neilson (1998) y Alfirevic (1995) demostraron que la valoración de las OVF en los vasos umbilicales en gestaciones únicas de alto riesgo obstétrico reducía de forma significativa la morbi-mortalidad perinatal.

Sin embargo, existe pocos datos sobre el empleo del Doppler en el manejo de las gestaciones gemelares y su

utilidad para disminuir las complicaciones que estas gestaciones implican.

Autores como Giles y col., 2003 no encuentran beneficio en el empleo del Doppler de los vasos umbilicales en las gestaciones gemelares. Este último estudio tiene la limitación de no distinguir la corionicidad entre gemelos, cosa importante ya que las gestaciones monocoriales per se tienen un riesgo incrementado de complicaciones obstétricas. En cambio, Ding 2006 y Joern 2000 en sus estudios encuentran en el Doppler una herramienta fundamental para valorar los resultados obstétricos en las gestaciones que presentan una discrepancia ponderal.

En nuestro estudio se han valorado las OVF de las arterias uterinas y de los vasos fetales a lo largo de los tres trimestres de la gestación.

Observamos que los fetos que muestran una discrepancia ponderal presentan IR e IP mayores en los vasos umbilicales con respecto a los fetos que presentan un crecimiento simétrico, dato concordante con lo que muestran Neilson y Ding en sus estudios.

Sabemos que de forma fisiológica se produce una disminución de las resistencias en los vasos umbilicales conforme progresa la gestación. Por ello tuvimos en cuenta la semana de gestación en la que se realizó la exploración.

De esta manera, se obvia que el cambio observado en los parámetros velocimétricos de los vasos umbilicales sean edad gestacional - dependientes y por lo tanto pudieran ser atribuibles a la discrepancia ponderal.

Nosotros observamos las diferencias en el IR e IP tanto en las discrepancias  $\geq 20$  y 25%, no encontrando diferencias en las semanas de gestación cuando la discrepancia fue del 20%. En contraste, cuando la discrepancia fue superior al 25% si que se observaron diferencias en las semanas de finalización de la gestación o cuando se realizaron las exploraciones.

Esto sugiere, que cuando la discrepancia es mayor del 25% las resistencias elevadas en el IP e IR en el caso de las gestaciones discrepantes pueden tener un doble componente: hipóxico y edad gestacional dependiente, puesto que a menor edad gestacional las resistencias serán mayores

La placentación anómala se pone de manifiesto durante las primeras semanas de gestación, y aunque los vasos uterinos no muestren diferencias, el que exista una mayor resistencia a nivel de los vasos umbilicales podría justificar el consiguiente desarrollo de una discrepancia ponderal en la gestación secundaria a una insuficiencia placentaria

Por ello hemos comprobado si los fetos de menor peso presentan diferencias en las OVF con respecto a los fetos de mayor peso con el objetivo de realizar un buen diagnóstico diferencial entre fetos pequeños para edad gestaciones (PEG)

o fetos con CIR y valorar la importancia de los vasos uterinos del lado de cada inserción placentaria.

Se observa que existe un menor IR en ACM y un Ccp cercano a 1 en los fetos de menor peso al estudiarlos de forma global.

Al estudiar la diferencia entre el feto mayor y menor dentro únicamente de las gestaciones discrepantes ( $\geq 20$  y 25%) también se observa el mismo fenómeno, existiendo una mayor resistencia a nivel de los vasos umbilicales en los fetos de menor peso.

Esto indica que los fetos que muestran menor peso presentan un menor aporte sanguíneo y como consecuencia inician una redistribución del flujo que se objetiva por una vasodilatación cerebral permitiendo la llegada de sangre a los territorios fetales vitales.

Todo ello permite afirmar que los fetos que presentan un menor peso dentro de las gestaciones discrepantes son verdaderos CIR y no PEG, por lo que sería la disfunción placentaria el origen de dichos CIR (Sterne y cols., 2001).

Con todo lo analizado nuestros datos apoyan que el empleo de la ecografía y del Doppler nos es de utilidad en el manejo clínico-obstétrico de las gestaciones de alto riesgo como lo son las gestaciones gemelares.

.La determinación de las OVF a nivel de las arterias uterinas ha sido ampliamente estudiado en las gestaciones únicas , ya que se ha visto que se encuentran alteradas en las gestaciones que desarrollan complicaciones obstétricas ( Fratelli, y cols., 2006).

Papageorghiou y cols., 2007 en una revisión que realizan sobre los estudios del Doppler en las arterias uterinas y resultados obstétricos adversos, concluyen que su empleo es útil para el diagnóstico de gestantes que desarrollarán preeclampsia y otras patologías obstétricas.

Sin embargo existen pocos estudios sobre el Doppler de las arterias uterinas en las gestaciones gemelares.

Geipel y cols., 2002 sugieren que su determinación tiene una baja sensibilidad a la hora de predecir resultados obstétricos desfavorables. Sin embargo Yu y cols., 2002 encuentran que la medición de las OVF de los vasos uterino en el segundo trimestre gestacional es útil para predecir resultados obstétricos desfavorables.

Nuestro estudio encuentra diferencias en los IP de los vasos uterinos cuando existe una discrepancia entre gemelos  $\geq 25\%$ , y cuando analizamos estos vasos entre feto mayor y menor y la discrepancia es  $\geq 25\%$ , siendo el IP y el IR en los vasos uterinos mayores en los fetos de menor peso.

De estos datos se deduce que una disminución en el flujo utero-placentario podría contribuir en el fenómeno de discrepancia en las gestaciones gemelares.

El no observar diferencias en los parámetros que valoran el bienestar fetal intraparto entre las gestaciones gemelares discrepantes y concordantes se puede explicar por una precoz finalización de las gestaciones gemelares discrepantes al realizar un diagnóstico de un CIR de uno de los gemelos.

Al analizar si existen diferencias entre el feto mayor y menor en todas las gestaciones de forma global tampoco evidenciamos diferencias, si bien, al ser el pH en la arteria umbilical el parámetro objetivo que valora intraparto el estado de oxigenación fetal, vemos que los fetos de menor peso al analizar únicamente las gestaciones discrepantes presentan un pH menor.

Esto indica que realmente son fetos que presentan una peor oxigenación fetal.

Una limitación de nuestro estudio es el no haber tenido en cuenta el orden de nacimiento entre ambos fetos, la vía de finalización, ni el tiempo transcurrido entre el nacimiento del primer y segundo gemelo, si bien el 85% de las pacientes finalizaron en cesárea.

Al analizar la gasometría en los vasos fetales Leung y cols., 2004 encuentran diferencias en el EAB entre el primer y segundo gemelo cuando nos encontramos ante un parto vaginal. Este mismo autor pone de manifiesto las diferencias en los parámetros del EAB tanto en arteria como en vena teniendo en cuenta el tiempo que transcurre entre la extracción del primer y segundo gemelo ( Leung y cols., 2002).

Estos mismos resultados son encontrados por Mc Grail y cols., 2005 que observan una disminución del pH en los vasos fetales a medida que aumenta el intervalo entre el nacimiento del primer y segundo gemelo, pero apuntan que esta diferencia no es lo suficientemente importante para producir un impacto en el manejo clínico. Edris y cols., 2006 establecen un punto de corte de 60 minutos en el intervalo entre el nacimiento de los dos gemelos observando una acidosis neonatal del segundo gemelo cuando esto se produce.

Otro de los parámetros que hemos evaluado para valorar al estado de bienestar fetal al nacimiento ha sido el Test de Apgar. Numerosos estudios han relacionado test de Apgar bajos con un aumento de la mortalidad perinatal y de parálisis cerebral (Thorngren-Jernecky cols., 2001; Casey y cols., 2001; Hogan, 2007). En nuestros resultados el test de Apgar al minuto y a las 5 minutos es similar en gemelos discrepantes y no discrepantes al igual que cuando analizamos el feto de mayor y menor peso.

Estudios recientes en animales (Matsumoto y cols., 2002, Bahtiyar y cols., 2007) y en humanos (Ahmed y cols., 2000) señalan que la hipoxia es un potente inductor de la expresión, síntesis y secreción del VEGF y su antagonista natural el sFlt-1.

La determinación de niveles de los diferentes componentes del complejo VEGF ha sido fuente de conflicto. Las discrepancias son atribuibles a que según la técnica utilizada, se detecta forma libre o total, no se valora el sFlt-1, no se especifican las isoformas específicas y, sobretodo, no se tiene en cuenta que las determinaciones séricas están contaminadas por el VEGF almacenado en las plaquetas (Jelkman y cols., 2001).

Los factores angiogénicos juegan un papel crucial en el desarrollo placentario normal y están alterados en situaciones gestacionales patológicas como la preeclampsia y CIR ( ambas situaciones constituyen dos modelos de hipoxia por insuficiencia placentaria).

La actividad de estos factores angiogénicos deben de estar en equilibrio para poder formar una red vascular correctamente funcionante.

En humanos, en gestaciones únicas y en situaciones que condicionan hipoxia, no existe unanimidad en cuanto a los resultados, así en preeclampsia el VEGF se encuentra aumentado respecto a gestaciones normales (Helske y cols.,

2001; Vuorela y cols., 2002; Bosio y cols., 2001; Simmons y cols., 2000) pero algunos lo encuentran disminuido (Zhou y cols., 2002).

En casos de CIR, se observan mayores discrepancias, así está aumentado (Helske y cols., 2001) , no cambia (Vuorela y cols., 2000, Lash y cols., 2001) o está disminuido (Regnault y cols., 2002).

También existen discrepancias en los niveles maternos de sFlt-1 en gestaciones con PEG. Estas discrepancias pueden ser debidas a que sus niveles han sido estudiados en diferentes semanas de gestación.

Autores como Shibata, 2005 y Wathen, 2006 estudian una población con una edad gestacional media de 39 y 38 semanas respectivamente no encontrando niveles de sFlt-1 en mujeres normotensas con neonatos PEG, mientras que autores como Stephan y cols., 2004 obtienen niveles superiores en las gestantes con CIR.

Por otra parte, en el estudio realizado por Shibata, los PEG se definen como un peso fetal inferior al percentil 10 sin tener en cuenta los índices velocimétricos.

La diferencia a la hora de definir los RN PEG y aquellos que presentan un CIR es de gran importancia a la hora de exponer los resultados. Esto es debido a que son realmente los RN con CIR quienes muestran una alteración en el desarrollo placentario.

Levine y cols., 2004, analizan las variaciones de los niveles de sFlt-1 y el PIGF a lo largo de la gestación, observando que los niveles de sFlt-1 aumentan y los de PIGF disminuyen en los dos últimos meses del embarazo. Estos mismos cambios se producían más precoz y marcadamente en las gestantes que desarrollaron preeclampsia posteriormente, por lo que concluyen que la determinación de estos dos factores sería útil para predecir las pacientes que posteriormente sufrirán esta patología.

No se han publicado estudios sobre el sistema VEGF y las gestaciones gemelares, ni tampoco la variación de los diferentes componentes del complejo VEGF a lo largo de las mismas.

En nuestro estudio hemos visto que los valores de sFlt-1 aumentan con la edad gestacional en plasma materno. La menor concentración de sFlt-1 materno en las gestaciones discrepantes podría ser un efecto de una menor edad gestacional en el momento de su análisis.

Por otra parte, también observamos niveles superiores de VEGF libre y total en las gestaciones no discrepantes, que es significativa cuando hablamos del VEGF libre y la discrepancia es  $\geq 25\%$  y del VEGF total cuando la discrepancia es  $\geq 20\%$ . Este fenómeno puede atribuirse a que las gestaciones discrepantes tendrían menores factores

angiogénicos, que se traduciría en una menor masa fetoplacentaria.

Los componentes del sistema VEGF en los vasos fetales han sido estudiados por pocos autores (Wallner y cols., 2007, Schlembach y cols., 2007). El grupo de Schlembach estudia los niveles VEGF y sFlt-1 en gestaciones únicas con preeclampsia y CIR tanto en plasma materno como en los vasos fetales y la correlación con el IP de los vasos umbilicales y las arterias uterinas.

En sus resultados no obtienen diferencias en los niveles de VEGF y sFlt-1 en arteria y vena fetales, observando únicamente una correlación significativa y positiva entre el sFlt-1 en vena fetal y el IP en la arteria umbilical. No observan correlación entre los niveles de VEGF en arteria umbilical y el IP ni de la arteria umbilical ni de los vasos uterinos. Finalmente concluyen que la combinación de ambos parámetros sería útil como screening para predecir posibles complicaciones obstétricas como la preeclampsia y los CIR en gestaciones únicas.

Al analizar en conjunto en las gestaciones gemelares la relación entre el sistema VEGF materno y fetal y las OVF en los vasos maternos y fetales, vemos que anteparto existe una correlación significativa y negativa entre el sFlt-1 en plasma materno y los índices velocimétricos en arteria umbilical y significativa y positiva con el Ccp.

Esto indicaría que a mayor inhibición de la angiogénesis a nivel materno, es decir mayores niveles de sFlt-1, el feto tendría menores resistencias en los vasos umbilicales y, por tanto recibiría mayor aporte sanguíneo lo que posibilitaría una mayor extracción de O<sub>2</sub>.

Esto es concordante con la relación existente entre el sFlt-1 y el Ccp, ya que a menor Ccp peor situación hemodinámica presentaría el feto.

Estos mismos resultados se obtienen cuando se analiza la correlación entre el sistema VEGF materno y las OVF fetales en la semana previa al parto.

La combinación del Doppler en los vasos uterinos y los componentes del sistema VEGF materno ha sido evaluada recientemente por diversos autores para el diagnóstico de la preeclampsia y el CIR en gestaciones únicas.

Savvidou y cols., 2006 encuentran niveles de sFlt-1 mayores y de VEGF menores en las gestantes que presentan OVF patológicas con CIR establecido con respecto a las gestantes que presentan OVF en los vasos uterinos normales entre la semana 23 y 26 de gestación.

Nuestro estudio es el primero que valora de forma conjunta el sistema VEGF materno y las OVF en las arterias uterinas gestaciones gemelares.

Autores como Geipel y cols., 2002, y Yu y cols., 2002, han evaluado el empleo de las OVF en las arterias uterinas para predecir el resultado perinatal en gestaciones gemelares encontrando resultados dispares.

Así como algunos autores establecen su utilidad para predecir la evolución e preeclampsia o CIR en gestaciones unicas que a diferencia de lo que ocurre en gestaciones únicas (Pilalis y cols., 2007; Papageorghiou y cols., 2001; Martín y cols., 2001), Geipel y cols., establecen que la medición de las OVF en los vasos uterinos tiene una baja sensibilidad para predecir un resultado obstétrico desfavorable en gestaciones gemelares.

Con esto, concluyen que en las gestaciones gemelares debe existir un mecanismo adicional que sea el responsable de la aparición de preeclampsia o de CIR.

Sin embargo, Yu y cols., 2002, defienden que el empleo del Doppler en los vasos uterinos en la semana 23 de gestación es capaz de identificar a una importante población de gestaciones gemelares que desarrollarán patologías relacionadas con una insuficiencia útero-placentaria.

Nuestros resultados encuentran mayor resistencia en los índices velocimétricos de los vasos uterinos correspondientes al feto de menor peso cuando la discrepancia entre gemelos es superior al 25%.

Esto indicaría un menor aporte de sustratos, que se podría explicar por una alteración en la dilatación de la arterias

espirales que conduciría a una angiogénesis placentaria deficitaria y, con ello, a un menor aporte sanguíneo al feto.

Los niveles de los componentes del sistema VEGF fetal no se correlacionan con las OVF de los vasos maternos ni fetales. El no encontrar relación entre el sistema VEGF en la arteria umbilical, que drena del feto a la placenta, y las OVF tanto de vasos materno como fetales nos hace sugerir que la angiogénesis fetal inducida expresada por el sistema VEGF, no contribuiría en la génesis de la discrepancia ponderal en las gestaciones gemelares.

Estos datos tomados en su conjunto nos sugerirían que sería la combinación del sistema VEGF materno y los índices velocimétricos de los vasos fetales lo que nos ayudaría a conocer mejor el estado de oxigenación fetal a lo largo de la gestación dentro de las gestaciones gemelares.

No encontramos asociación entre los componentes del sistema VEGF fetal y los índices velocimétricos de los vasos fetales, por lo tanto, la combinación de ambos no nos ayudaría para predecir los resultados obstétricos desfavorables en las gestaciones gemelares.

Lo anteriormente expuesto, nos induce a pensar que el empleo de los niveles maternos de sFlt-1 podría ser útil para valorar el estado de oxigenación fetal, ya que como hemos

dicho anteriormente se asocia con las OVF de la arteria umbilical y el Ccp.

Este estudio, también es el primero que valora la relación del sistema VEGF tanto materno como fetal con el resto parámetros de bienestar fetal en el momento del parto.

La correlación significativa y positiva entre el sFlt-1 en plasma materno y el EB en la arteria umbilical y el test de Apgar al minuto hace al sFlt-1 el único componente del sistema VEGF que se relaciona con la situación de bienestar fetal en el momento del nacimiento.

La asociación de un sFlt-1 materno elevado con una resistencia umbilical disminuida (coeficiente de correlación negativo) es consecuente, en tanto, valores mayores del test de Apgar al minuto así como del EB (se han analizado con signo negativo) resulta desconcertante.

En el feto, encontramos niveles mayores de sFlt-1 en arteria umbilical a menores pH fetales, mientras que los niveles de VEGF total en vena umbilical fetal se correlacionan de forma significativa y positiva con el EB tanto en arteria como en vena umbilical. Estos datos sí que están en línea con los conocimientos que poseemos sobre el sistema VEGF y la fisiopatología de la adaptación fetal a los compromisos hipóxicos.

Llama la atención que no exista asociación entre los parámetros del sistema VEGF materno y las OVF de las arterias uterinas ni con el peso total de las placentas ni de los fetos, ni con la suma del peso total de placentas y fetos.

A semejanza de las neoplasias el sistema VEGF induciría el crecimiento estimulando la neovascularización, y cabría pensar en la gestación como un proceso neofornativo en el que el sistema VEGF materno tuviera importancia en el peso fetal y placentario (Kim y cols., 1993)

El estudio de la asociación entre el sistema VEGF materno y fetal ha sido poco estudiado hasta la actualidad .

Vemos que todos los parámetros del sistema VEGF materno se correlacionan con sus homólogos en los vasos fetales por lo que la unidad feto-placentaria sería una fuente importante de producción de estos factores.

Al analizar la relación materno fetal de los diferentes componentes del sistema VEGF, observamos que estos se correlacionan madre-feto tanto en gemelares globalmente, como al considerar por separado los concordantes y discrepantes. Las diferencias madre-feto del sistema VEGF muestra un gradiente significativo feto materno de VEGF libre y total, mientras que el sFlt-1 muestra un gradiente opuesto, es decir, las concentraciones de VEGF libre y total son mayores en el feto (arteria y vena) mientras que los de sFlt-1 son

superiores en la madre. Estos datos analizados globalmente se muestran en la tabla 18.

Wallner y cols., 2007 afirman que el sFlt-1 se secretaría a la circulación materna, mientras que el VEGF se secretaría a la circulación fetal.

Estos datos sugerirían que el crecimiento fetal estaría condicionado por un aumento del factor inhibidor de la angiogénesis (sFlt-1) materno. En respuesta existiría un aumento de la angiogénesis fetal evidenciada por el aumento del VEGF libre y total.

Nuestros datos en su conjunto coinciden con lo expuesto por Wallner y cols.

Finalmente hemos querido observar la relación entre la expresión del sistema VEGF placentario, su relación con los parámetros de bienestar fetal y la correlación con el sistema VEGF materno y fetal.

Sabemos que una de las familias encargada de estimular la angiogénesis es el sistema VEGF. Este es esencial para un correcto crecimiento y maduración placentaria (Smith y cols., 2000). Recientemente se ha postulado un posible papel de la familia VEGF en la regulación de la angiogénesis en el lugar de implantación (Plaisier y cols., 2007).

La regulación de la angiogénesis es un proceso complejo que engloba la interacción de factores tanto estimuladores e inhibidores.

El VEGF y sus receptores (VEGFR-1 y VEGFR2) estimulan la angiogénesis y vasculogénesis placentaria. Numerosos estudios han revelado la expresión del VEGF y sus receptores a nivel placentario y la implicación en su desarrollo (Dermir y cols., 2004; Dermir y cols., 2006).

La placenta humana no es un órgano homogéneo y cada cotiledón actúa como unidad independiente en el intercambio materno-fetal. En la decidua materna, la expresión del VEGF es más evidente en el trofoblasto intermedio que contiene vellosidades del tejido próxima a la interfase feto-materna. Esto sugiere que el VEGF actúa de manera paracrina. Sin embargo, se han implicado otros factores como las citokinas (Trudinger y cols., 2000) y otros factores angiogénicos, como el PlGF y las angiopoyetinas, en la regulación del sistema VEGF (Shore y cols., 1997; Kingdom y cols., 2000).

Cuando se produce una alteración entre los factores implicados en el proceso de angiogénesis, se produce un crecimiento insuficiente vascular a nivel de los vasos de las vellosidades terminales zona encargada del intercambio gaseoso. Esto conlleva a una insuficiencia placentaria produciéndose subsecuentemente patología obstétrica como CIR o preeclampsia (Kumazaki y cols., 2002, Regnault y cols., 2002).

Sharkey y cols 1993 han demostrado la expresión placentaria del VEGF a lo largo de la gestación ( Sharkey y cols., 1993). En las placentas de gestaciones normales a término, la expresión del VEGF ha sido localizada en las vellosidades del sincitiotrofoblasto y en el trofoblasto de la decidua materna, observándose una variabilidad en la expresión del VEGF a nivel de los diferentes territorios placentarios (Clark y cols., 1996).

Rajakuman y cols., 2005 observaron un aumento de la expresión del RNAm del VEGFR1 y del sFlt-1 a nivel placentario en las pacientes con preeclampsia, sugiriendo que una alteración en su expresión podría contribuir a una alteración en el proceso de vasculogénesis placentaria al inicio de la gestación.

En nuestra muestra, encontramos niveles bajos en la expresión de VEGF, VEGFR1 y sFlt-1 en las placentas de las gestaciones gemelares. Sin embargo, aunque no encontremos una diferencia estadísticamente significativa entre las placentas de gestaciones gemelares discrepantes y concordantes, encontramos menores niveles de los tres componentes en las gestaciones gemelares discrepantes ( $\geq 20$  y 25%).

Pensando que podría ser secundario a que hemos analizado las placentas de forma global, decidimos analizar si realmente existían diferencias en la expresión placentaria de los tres componentes entre el feto de mayor y menor peso. Sin

embargo, tampoco obtuvimos diferencias en su expresión entre hermanos.

Estos resultados pueden ser debidos, en parte a un tamaño muestral insuficiente, y por otra parte al análisis de diferentes territorio placentarios, ya que la muestra de cada placenta se obtuvo de forma aleatoria.

Debido a que el VEGF participa en la angiogénesis placentaria, su expresión podría ser un indicador del estado de oxigenación fetal. Por ello hemos establecido la relación entre la expresión placentaria del VEGF, los Índices velociméticos en los vasos fetales y maternos y el resto de parámetros de bienestar fetal.

Pocos estudios han determinado si la expresión del VEGF a nivel placentario tiene relevancia clínica. Tse y cols., 2001 encontraron una correlación entre la expresión placentaria del VEGF a nivel tanto del sincitiotrofoblasto como del trofoblasto intermedio y el Apgar al minuto y a los 5 minutos tanto en gestaciones normales como en las que presentaban un CIR.

Sabemos que el test de Apgar al minuto y a los 5 minutos refleja el estado del RN y que el EAB en los vasos umbilicales es el marcador bioquímico que mejor refleja la situación de la oxigenación fetal en el momento del parto.

Nuestros datos no muestran ninguna asociación entre la expresión del sistema VEGF a nivel placentario y factores que nos indican el bienestar fetal de forma directa o indirecta.

Por los hallazgos de nuestro estudio podemos decir que a diferencia de lo que ocurre en otras patologías donde existe una insuficiencia placentaria, la expresión del VEGF a nivel placentario no nos aporta información a la hora de diferenciar gestaciones gemelares con crecimiento concordante de las discordante, lo que apuntaría a otro mecanismo fisiopatológico responsable de la discrepancia ponderal entre gemelos.



## **7. CONCLUSIONES**



## 7. CONCLUSIONES

1. La determinación del sistema VEGF en plasma materno a lo largo de la gestación no nos ayuda a diferenciar entre las gestaciones gemelares concordantes y discrepantes, tampoco es útil para el diagnóstico de la hipoxia fetal.
2. La existencia de discrepancia ponderal en gemelares se asocia a TRA.
3. El empleo del Doppler para el estudio de las OVF en los vasos fetales en gestaciones gemelares, es una herramienta útil que permite valorar las situaciones de CIR, puesto que existe una mayor resistencia en la arteria umbilical y un menor Ccp en los fetos de menor peso al nacimiento.
4. No encontramos diferencias en los parámetros directos que valoran el bienestar fetal al nacimiento entre las gestaciones gemelares con fetos concordantes y las que presentan fetos discrepantes. Sin embargo, al realizar la comparación entre hermanos, vemos que el peso placentario individual y los valores de pH en arteria fetal son menores en los fetos que presentan menor peso al nacimiento.

5. Los niveles del sistema VEGF fetal tanto en arteria como en vena umbilical no muestra diferencias entre los dos grupos estudiados.
6. La placenta es un inductor de los cambios del sistema VEGF tanto a nivel materno como fetal.
7. Los niveles de sFlt -1 en arteria umbilical fetal se correlacionan con el pH en arteria fetal al nacimiento, lo que sugiere su papel en el mecanismo de adaptación fetal a la hipoxia.
8. La expresión placentaria del sistema VEGF en nuestro estudio no nos ha aportando ninguna ventaja, ya que no se correlaciona ni con las OVF de los vasos maternos ni fetales ni con ninguno de los parámetros valorados de bienestar fetal intraparto ni al nacimiento.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**



## 8. BIBLIOGRAFÍA

ACOG committee on Obstetrics Practice. ACOG Committee Opinion No.348, November 2006: Umbilical cord blood gas and acid-base analysis. *Obstet Gynecol.* 2006; 108: 1319-22.

Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq a. Regulation of placental vascular growth factor (VEGF) and placental growth factor (PIGF) and sFlt-1 by oxygen-a review. *Placenta.* 2000; 21: 16-24.

Alfirevic Z, Neilson JP. Doppler ultrasonography in high-risk pregnancies: systematic review with meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 172: 1379-1387.

Allen VM, Windrim R, Barrett J, Oshsson A. Management of monoamniotic twin pregnancies: a case series and systematic review of the literature. *BJOG.* 2001; 108: 931-6.

American College of Obstetricians and Gynecologists Task Force on Neonatal Encephalopathy and Cerebral Palsy, American College of Obstetricians and Gynecologists, American Academy of Pediatrics. Neonatal encephalopathy and cerebral palsy: defining the pathogenesis and pathophysiology. Washington. American College of Obstetricians and Gynecologists. 2003.

Andres RL, Saade G, Gilstrap LC, Wilkins I, Witlin A, Zlatnik F, Hankins GV. Association between umbilical blood gas parameters and neonatal morbidity and death in neonates with pathologic fetal acidemia. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 181: 867-71.

Apgar V. Proposal for a new born method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg.* 1953 ; 32: 260-7.

Arany E, Hill D.J. Fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 mRNA expression and peptide localization in placentae from normal and diabetic pregnancies. *Placenta.* 1998; 19: 133-142.

Audibert F, Boullier M, Kerbrat V, Vial M, Boithias C, Frydman R. Growth discordance in dichorionic twin pregnancies: risk factors, diagnosis and management. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2002; 31: 15-24.

Bahtiyar MO, Buhimschi C, Ravishankar V, Copel J, Norwitz E, Julien S, Guller S, Buhimschi IA. Contrasting effects of chronic hypoxia and nitric synthase inhibition on circulating angiogenic factors in a rat model of growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 196: 72-6.

Bahado-Singh RO, Kavanci E, Jeffres A, Oz U, Deren O, Copel J, Mari G. The Doppler cerebroplacental ratio and perinatal outcome in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180: 750-6.

Baird DD, Wilcox AJ, Kramer MS. Why might infertile couples have problem pregnancies?. *Lancet.* 1999; 353: 1724-5.

Ball E, Robson SC, Ayis S, Lyall F, Bulmer JN. Early embryonic demise: no evidence of abnormal spiral artery transformation or trophoblast invasion. *J Pathol.* 2006; 208: 528-34.

Bartha JL, Ling Y, Kyle P, Soothill PW. Clinical consequences on first-trimester growth discordance in twins. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005; 119: 56-9.

Bejar R, Vigliocco G, Gramajo H, Solana C, Benirschke K, Berry C, Coen R, Resnik R. Antenatal origin of neurologic damage in newborn infants II. Multiple gestations. *Am J Obstet Gynecol.* 1990; 162: 1230-36.

Ben -Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 1995; 372: 83-7.

Blickstein I. Normal and abnormal growth of multiples. *Semin Neonatal.* 2002; 7: 177-85.

Blickstein I. Is it normal for multiples to be smaller than singletons?. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004; 18: 613-23.

Bortolus R, Parazzini F, Chatenoud L, Benzi G, Bianchi MM, Marini A. The epidemiology of multiple births. 1999; 5: 179-87.

Bosio PM, Wheeler T, Anthony F, Conroy R, O'herlihy C, McKenna P. Maternal plasma vascular endothelial growth factor concentrations in normal and hypertensive pregnancies and their relationship to peripheral vascular resistance. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 184: 146-52.

Boura AL, Walters WA, Read MA, Leitch IM. Autacoids and control of human placental blood flow. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1994; 21: 737-48.

Bracero LA, Byrne DW. Ultrasound determination of chorionicity and perinatal outcome in twin pregnancies using dividing membranes thickness. *Gynecol Obstet Invest.* 2003; 55: 50-57.

Branum AM, Schoendorf KC. The effect of birth weight discordance on twin neonatal mortality. *Obstet Gynecol.* 2003; 101: 570-4.

Breier G, Damert A, Plate KH, Risau W. Angiogenesis in embryos and ischemic disease. *Tromb Haemostasis.* 1997; 78: 678-683.

Bretscher J, Saling E. pH values in the human fetus during labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1967; 97: 906-911.

Brooks PC, Clark RA, Chersesh DA requirement of vascular integrin alpha V beta 3 for angiogenesis. *Science.* 1994; 264: 569-71.

Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. The miometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 187: 1416-23.

Callahan TL, Hall JE, Ettner SL, Christiansen CL, Greene MF, Crowley WF Jr. The economic impact of multiple-gestation pregnancies and the contribution of assisted-reproduction techniques to their incidence. *N Engl J Med.* 1994; 331: 244-9.

Campbell S, Wilkin D. Ultrasonic measurement of fetal abdomen circumference in the estimation of fetal weight. *Br J Obstet Gynaecol.* 1975; 82: 689-97.

Carbillon L, Challier JC, Alouini S, Uzan M, Uzan S. Uteroplacental circulation development: Doppler assessment and clinical importance. *Placenta.* 2001; 22 :795-9.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A.

Abnormal blood vessels development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996; 380: 435-9.

Carroll SG, Soothill PW, Abdel-Fattah SA, Porter H, Montaque I, Kyle PM. Prediction of chorionicity in twin pregnancies at 10-14 weeks of gestation. *BJOG*. 2002;109: 182-6.

Carroll SG, Tyfield L, Reeve L, Porter H, Soothill P, Kyle PM. Is zygosity or chorionicity the main determinant of fetal outcome in twin pregnancies?. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193: 757-61.

Casey BM, McIntire DD, Leveno KJ. The continuing value of the Apgar score for assesment of newborn infants. *N Engl J Med*. 2001; 344: 467-71.

Chaiworapongsa T, Romero R, Kim GJ, Espinosa J, Bujold E, Goncalves L, Gomez R, Edwin S, Mazor M. Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptos-1 concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2005; 17: 3-18.

Charlemaine C, Duyme M, Ville Y, Aurengo A, Tremblay R, Fryman R, Pons J-C. Fetal biometric parameters, twin type and birth weight difference. A longitudinal study. *Eur J Obstet Gynecol*. 2000; 93: 27-32.

Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boocock CA, Smith SK.

Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod.* 1993; 48: 1120-8.

Cheema R, Dubiel M, Gudmundsson S. Fetal brain sparing is strongly related to the degree of increased placental vascular impedance. *J Perinat Med.* 2006; 34: 318-22.

Chittacharoen A, Leelapattana P, Phuapradit W. Umbilical Doppler velocimetry prediction of discordant twins. *J Obstet Gynaecol Res.* 1999; 25: 95-8.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162: 156-9.

Clark DE, Smith SK, Sherkey AM, Charnock-Jones DS. Localization of VEGF expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum Reprod.* 1996; 11: 1090-8.

Crane JP, Tomich PJ, Kopta M. Ultrasonic growth patterns in normal and discordant twins. *Obstet Gynecol.* 1980; 55: 678-83.

Cripsi F, Dominguez C, Llurba E, Martin-Gallan P, Cabero L, Gratacos E. Placental angiogenic growth factors and uterine Doppler findings for characterization of different subsets in

preeclampsia and isolated intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195: 201-7.

Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1996; 271: 736-41.

Cordero L, Franco A, Joy SD. Monochorionic monoamniotic twins: neonatal outcome. *J Perinatol.* 2006; 26: 170-5.

Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, Levene KJ, Gilstrap III LC. *Williams. Obstetricia.* 4<sup>a</sup> ed. Barcelona (E): Masson, S.A.;1996.

Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg.* 1995; 82: 1598-610.

Dawood MY. In vitro fertilization, gamete intrafallopian transfer, and superovulation with intrauterine insemination: efficacy and potential health hazards on babies delivered. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 174: 1208-17.

Demir R, Kayisli UA, Cayli S, Huppertz B. Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta.* 2006; 27: 535-9.

Demir R, Kayisli UA, Seval Y, Celik-Ozanci C, Korgun ET, Dermir-Weusten AY, Huppertz B. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very

early pregnancy:differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta*. 2004; 25: 560-72.

Demissie K, Ananth CV, Martin J, Hanley ML, MacDorman MF, Rhoads GG. Fetal and neonatal mortality among twin gestation in United States:the role of intrapair growth discordance.*Obstet Gynecol*. 2002; 100: 474-80.

Dickey RP, Olar TT, Taylor SN, Curole DN, Rye PH, Maturlich EM, Dickey MH. Incidence and significance of unequal sac diameter or embryo crown-rump length in twin pregnancy. *Hum Reprod*. 1992; 7: 1170-2.

Ding DC, Hsu S, Chu TW, Lai HC, Chen WH. Utility of Doppler velocimetry in correlating with outcomes in severe discordant twins. *J Obstet Gynecol*. 2006; 16: 198-9.

Di Petro LA, Polverini PJ. Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor trombospondin 1. *Am J Pathol*. 1993; 143: 678-84.

Divon MY, Girz BA, Sklar A, Guidetti DA, Langer O. Discordant twins- a prospective study of diagnostic value of real time ultrasonography combined with umbilical artery velocimetry. *Am J Obstet Gynecol*. 1989; 161: 757-60.

Dube J, Dodds L, Armson BA. Does chorionicity or zygosity predict adverse perinatal outcomes in twins?. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186: 579-83.

Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. Vascularization of the mouse embryo: a study of Flt-1, Tek, Tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn.* 1995; 203: 80-92.

Duncombe GJ, Dickinson JE, Evans SF. Perinatal characteristics and outcomes of complicated by twin-twin transfusion syndrome. *Obstet Gynecol.* 2003; 101: 1190-6.

Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol.* 2000; 156: 2185-99.

Edris F, Oppenheimer L, Yang Q, Wen SW, Fung Kee Fung K, Walker M. Relationship between intertwin delivery interval and metabolic acidosis in the second twin. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 23: 481-5.

Espinosa J, Romero R, Mee Kim Y, Kusanovic JP, Hassan S, Erez O, Gotsch F, Than NG, Papp Z, Jai Kim C. Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. 2006; 34: 447-58.

Erkkola R, Ala-Mello S, Piroinen O, Kero P, Sillanpaa M. Growth discordancies in twins pregnancies: a risk factor not detected by measurement of biparietal diameter. *Obstet Gynecol.* 1985;66: 203-6.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 2000; 55: 15-35.

Ferrara N, Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrin Rev.* 1997; 18: 4-25.

Ferre F. Regulation of fetal placental circulation. *Gynecol Obstet Fertil.* 2001; 29: 512-7.

Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1997; 173: 206-10.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science.* 1987; 235: 442-7.

Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992; 267: 10931-4.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the sFlt-1 receptor tyrosin kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995; 376: 66-70.

Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J. Biol Chem.* 1995; 270: 12607-13.

Fratelli N, Rampello S, Soregaroli M, Guala M, Platto C, Valcamonico A, Lojacono A, Frusca T. Transabdominal uterine arteries Doppler between 11-14 weeks of gestation for prediction of outcome in high risk pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195: 207.

Gagnon R. Placental insufficiency and its consequences. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 22: 99-107.

Ganapathy R, Ayling LJ, Thilaganathan B, Sebire NJ. Effect of first-trimester serum from pregnancies with high-resistance uterine artery Doppler resistance on extravillous trophoblast invasion. *Hum Reprod.* 2006; 21: 1295-8.

Gaziano EP, Gaziano C, Terrell CA, Hoekstra RE. The cerebroplacental Doppler ratio and neonatal outcome in diamniotic monochorionic and dichorionic twins. *J Matern Fetal Med.* 2001; 10: 371-5.

Geipel A, Berg C, Germer U, Katalinic A, Krapp M, Smrcek J, Gembrun U. Doppler assessment of uterine circulation in the second trimestre in twin pregnancies: prediction of pre-

eclampsia, fetal growth restriction and birth weight discordance. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002; 20: 541-5.

Gernt PR, Mauldin JG, Newman RB, Durkalski VL. Sonographic prediction of twin birth discordance. *Obstet Gynecol.* 2001; 97: 53-6.

Giles W, Bisits A, O'Callaghan S, Gill A. The Doppler Assessment in multiple pregnancy randomized controlled trial ultrasound biometry versus umbilical artery Doppler ultrasound and biometry in twin pregnancies. *BJOG.* 2003; 110: 593-597.

Giles WB, Trudinger BJ, Baird PJ. Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance: pathological correlation. *Br J Obstet Gynaecol.* 1985; 92: 31-8.

Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1(VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using a novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem.* 2001; 276: 3222-30.

Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, Neufeld G. Neuropilin-2 is a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J. Biol Chem.* 2000; 275: 18040-5.

Gordon A, Johnson J. Value of umbilical blood acid base studies in fetal assesment. J Reprod Med. 1985; 30: 329-36.

Grover TR, Zenge JP, Parker TA, Abman SH. Vascular endothelial growth factor causes pulmonary vasodilatation through activation of the phosphatidylinositol-3-kinase-Nitric oxide pathway in late gestation ovine fetus. Pediatr Res. 2002; 52: 907-12.

Grumbach K, Coleman B, Apger PH et al. Twin and singleton growth patterns compared during ultrasound. Radiology.1986; 158: 237-41.

Gudmundsson S, Dubiel M. Doppler velocimetry in the evaluation of fetal hypoxia. J Perinat Med. 2001; 29: 399-407.

Habek D, Jugovic D, Hodek B, Herman R, Maticevik A, Habek JC, Pisl Z, Salihagic A. Fetal biophysical profile and cerebro-umbilical ratio in assesment of brain damage in growth restricted fetuses. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004;114: 29-34.

Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner KT. Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. Nat Med. 1996; 2: 529-33.

Hankins GD, Speer M. Defining the pathogenesis and pathophysiology of neonatal encephalopathy and cerebral palsy. *Obstet Gynecol.* 2003; 102: 628-36.

Haydon M, Gaffaney CL, Saul L, Ghamsary M, Hannam B, Lagrew D. Dichorionic twins conceived through assisted reproduction have similar pregnancy outcomes to spontaneous conceptions. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195: 108.

Hayes AJ, Huang WQ, Mallah J, Yang D, Lippman ME, Li LY. Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res.* 1999; 58: 224-37.

Helske S, Vuorela P, Carpen O, Horning C, Weich H, Halmesmaki E. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1,2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7: 205-10.

Hippenstiel S, Krull M, Ikermann A, Risau W, Clauss M, Suttorp N. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am J Physiol.* 1998; 274: 678-84.

Hockel M, Schlenger K, Doctrow S, Kissel T, Vaupel P. Therapeutic angiogenesis. *Arch Surg.* 1993; 128: 423-9.

Hogan L, Ingermarsson I, Thorngren-Jerkneck K, Herbst A. How often is a low 5 min Apgar score in term newborns due to asphyxia?. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007; 169-75.

Hollier LM, McIntire DD, Leveno JK. Outcome of twin pregnancies according to intrapair birth weight differences. *Obstet Gynecol.* 1999; 94: 1006-10.

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, LiB, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991; 5: 1806-14.

Howard W Jones, J. Multiple births: how are we doing?. *Ferti Steril.* 2003; 79: 17- 21.

Itho S, Brawley L, Wheeler T, Anthony FW, Poston L, Hanson MA. Vasodilatation to vascular endothelial growth factor in the uterine artery of pregnant rat is blunted by low dietary protein intake. *Pediatr Res.* 2002; 51: 485-91.

Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2004; 103: 551-63.

Jaffe R. Development of early uteroplacental circulation. *Early pregnancy.* 2001; 5: 34-5.

Jaim M, Farooq T, Schukla C. Doppler cerebroplacental ratio for prediction of adverse perinatal outcome. *International J Obstet Gynecol.* 2004; 384-385.

Jaffe R. Development of early uteroplacental circulation. *Early pregnancy.* 2001; 5 : 34-5.

Jelkmann W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem.* 2001; 47: 617-23.

Joern H, Klein A, Kuehlwein H, Rath W. Critical comparison of indices and threshold values for assessing placenta performance using Doppler ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 1997; 23: 1179-83.

Joern H, Rath W. Correlation of Doppler velocimetry findings in twin pregnancies including course of pregnancy and fetal outcome. *Fetal Diagn Ther.* 2000; 15: 160-4.

Jung SP, Sieqrist B, Wang YZ , Wade MR, Anthony CT, Hornick C, Woltering EA. Effect of human Angiostatin protein on human angiogenesis in vitro. *Angiogenesis.* 2003;6: 233-40.

Kadyrov M, Kingdom JC, Huppertz B. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 194: 557-63.

Kalish RB, Chasen ST, Gupta M, Sharma G, Perni SC, Chervenak FA. First trimester prediction of growth discordance in twin gestations. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189: 706-9.

Kaufmann P, Stark J. Basal plate of mature human placenta. I. Lightmicroscopical investigations of plastic embedded tissue sections. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 1971; 135: 1-19.

Kessler L, Lancet M, Borenstein R, Steinmetz A. The problem of older primipara. *Obstet Gynecol.* 1980; 56: 165-9.

Kim KJ, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature.* 1993; 362: 841-4.

Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol.* 2000; 92: 35-43.

Kitsukawa T, Shimizu M, Sonbo M, Hirata T, Taniguchi M, Bekku Y, Yagi T, Fujisawa H. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron.* 1997; 995-1005.

Klagsbrung M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; 7: 259-70.

Klam SL, Rinfret D, Leduc L. Prediction of growth discrepancy in twins with the use of abdominal circumference ratios. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192: 247-51.

Koufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis.II. Changes during normal pregnancy. *Placenta.* 2004; 25: 114-26.

Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. Expresión of vascular endotelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Human Pathol.* 2002; 33: 1069-1077.

Lash G, MacPherson A, Liu D, Smith D, Charnock-Jones S, Baker P. Abnormal fetal growth is not associated with altered chorionic expression of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Human Reprod.* 2001;7:1093-8.

Leduc L, Takser L, Rinfret D. Persistence of adverse obstetrics and neonatal outcomes in monochorionic twins after exclusion of disorders unique to monochorionic placentation. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193: 1670-5.

Leung TY, Lok IH, Tam WH, Leung TN, Lau TK. Deterioration in cord blood gas status during the second stage of labor is more rapid in the second twin than in the first twin. *BJOG.* 2004; 111: 546-9.

Leung TY, Tam WH, Leung TN, Lok IH, Lau TK. Effect of twin-to-twin delivery interval on umbilical cord blood gas in the second twins. *BJOG*. 2002; 109: 1424-5.

Levene MI, Wild J, Steer P. Higher multiple births and the modern management of infertility in Britain. The British Association of Perinatal Medicine. *Br J Obstet Gynaecol*. 1992; 99: 607-613.

Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004; 350: 672-83.

Li J, Perella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1995; 270: 308-12.

Lyall F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy- a review. *Placenta*. 2005; 26: 31-6.

Makhseed M, Jirous J, Ahmed MA, Viswanathan DL. Middle cerebral artery to umbilical artery resistance index in the prediction of neonatal outcome. *Int J Gynaecol Obstet*. 2000; 71: 119-25.

Martín AM, Bindra R, Curcio P, Cicero S, Nicolaides KH. Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by uterine artery Doppler at 11-14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001; 18: 583-6.

Matijevic R, Ward S, Bajoria R. Non- invasive method of evaluation of trophoblast invasion of spiral arteries in monochorionic twins with discordant birthweight. *Placenta.* 2002; 23: 93-9.

Matsumoto LC, Bogic L, Brace RA, Cheung CY. Prolonged hypoxia upregulates vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in ovine fetal membranes and placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186: 303-10.

McGrail C, Bryant DR. Intertwin time interval: how its affects the immediate neonatal outcome of the second twin. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192: 1420-1422.

Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, Mc Fadyen IR, van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol.* 1994; 101: 669-74.

Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinz R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* 1993; 72: 835-46.

Minakami H, Honma Y, Matsubara S, Uchida A, Shiraishi H, Sato I. Effects of placental chorionicity on outcome in twin pregnancies. A cohort study. *J Reprod Med.* 1999;44: 595-600.

Moise J, Laor A, Armon Y, Gur I, Gale R. The outcome of twins pregnancies after IVF. *Hum Reprod.* 1998;13: 1702-5.

Morbideilli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol.* 1996; 270: 411-5.

Morrish DW, Dakour J, Li H. Functional regulation of human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol.* 1998; 39: 179-95.

Narine LH, Vezmar M, Sutija VG, Shah B, Sidhu S, Schwarz RH, Gudavalli M. Mode of conception, placental morphology and perinatal outcome in twin gestation. *J Perinat Med.* 2003; 31: 99-104.

Neilson JP, Alfirevic Z. Doppler ultrasound for fetal assessment in high risk pregnancies. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000; CD000073.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltarak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB.* 1999; 13: 9-22.

Norwitz ER, Edusa V, Park JS. Maternal Physiology and complications of multiple pregnancy. *Seminars in Perinatology*. 2005; 29: 338-48.

Olivennes F, Kadhel P, Rufat P, Fanchin R, Fernández H, Frydman R. Perinatal outcome of twins pregnancies obtained after in vitro fertilization: comparison with twins pregnancies obtained spontaneously or after ovarian stimulation. *Fétil Steril*. 1996; 66: 105-9.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Cheng C, Rosenthal RA, Moses M. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994; 79: 315-28.

Ostlund E, Lindholm H, Hemsén A, Fried G. Fetal erythropoietin and endothelin-1: relation to hypoxia and intrauterine growth retardation. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000; 79: 276-82.

Padavala S, Pope N, Baker P, Crockert I. An imbalance Between Vascular Endothelial Growth Factors and Its Soluble Receptor in Placental Villous Explants of Intrauterine Growth-Restricted Pregnancies. *Journal of Society for Gynecologic Investigation*. 2006; 13: 40-47.

Papageorghiou AT, Leslie K. Uterine artery Doppler in the prediction of adverse pregnancy outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007; 19: 103-109.

Papageorghiou AT, Roberts N. Uterine artery Doppler screening for adverse pregnancy outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2005; 17: 584-90.

Papageorghiou AT, Yu CK, Bindra R, Pandis G, Nicolaides KH; Fetal Medicine Foundation Second Trimestre Screening Group. Multicenter screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by transvaginal uterine Doppler at 23 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001; 18: 441-9.

Peebles DM. Fetal consequences of chronic substrate deprivation. *Seminars Fetal Neonatal Med.* 2004; 9: 379-86.

Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggest a role in endothelial differentiation and blood vessels growth. *Proc Natl Aca Sci USA.* 1993; 90: 8915-9.

Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta.* 2006; 27 :939-58.

Pilalis A, Souka AP, Antsaklis P, Daskalakis G, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A. Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by uterine Doppler and PAPP-A at 11-14 weeks gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007; 86: 135-40.

Plaisier M, Rodrigues S, Willems F, Koolwijk P, Hinsbergh VW, Helmerhost FM. Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first trimester decidual tissues. *Fertil Steril.* 2007; 88: 176-87.

Rajakumar A, Michael HM, Rajakumar PA, Shibata E, Hubel CA, Karumanchi SA, Thadhani R, Wolf M, Harger G, Markowicz N. Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1) and soluble Flt-1(sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women. *Placenta.* 2005; 26: 563-73.

Rao A, Sairam S, Shebata H. Obstetric complications of twin pregnancies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004; 18: 557-76.

Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N, Zeleznik AJ. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology.* 1992;131: 254-60.

Rayburn WF. Monitoring fetal body movements. *Clin Obstet Gynecol.* 1987; 30: 899-911.

Reddy UM, Wapner RJ, Rebar RW, Tasca RJ. Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy

outcomes: executive summary of National Institute of Child Health and Human Development workshop. *Obstet Gynecol.* 2007; 109: 967-77.

Regnault TR, Orbus RJ, de Vrijer B, Davidsen ML, Galan HL, Wilkening RB, Anthony RV. Placental expression of VEGF, PlGF and their receptors in a model of placental insufficiency-intrauterine growth restriction (PI-IUGR). *Placenta.* 2002; 23: 132-44.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997; 386: 671-4.

Rodis JF, Mcilveen PF, Egan JF, Borqida AF, Turner GW, Campbell WA. Monoamniotic twins: improved perinatal survival with accurate prenatal diagnosis and antenatal fetal surveillance. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 177: 1046-9.

Rottem S. RONFAN: new time-oriented malformation work-up and classification of fetal anomalies. *International Registry of Fetal Anomalies. Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997; 10: 373-4.

Salihagic-Kadic A, Medic M, Jucovic D, Kos M, Latin V, Kusan Jukic M, Arbeille P. Fetal cerebrovascular response to chronic-implications for prevention brain damage. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2006; 19: 387-96.

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 1995; 376: 70-4.

Savvidou MD, Yu CK, Harland LC, Hingorani AD, Nicolaides KH. Maternal serum concentration of soluble fms-like tyrosin kinase 1 and vascular endothelial growth factor in women with abnormal uterine artery Doppler and in those with fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 195: 1668-73.

Saygan-Karamursel B, Teksam O, Aksu T, Yurdakok M, Ondergoglu L. Perinatal outcome twins compared with twins conceived through intracytoplasmatic sperm injection. *J Perinat Med*. 2006; 34:132-6.

Schlembach D, Wallner W, Sengerberger R, Stiegler E, Mortl M, Beckmann MW, Lang U. Angiogenic growth factor in maternal and fetal blood: correlation with Doppler ultrasound parameters in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007; 29: 407-13.

Sebire NJ, D'Ecorle C, Soares W, Nayar R, Nicolaides KH. Intertwin disparity in fetal size in monochorionic and dichorionic pregnancies. *Obstet Gynecol*. 1998; 91: 82-5.

Sebire NJ, Snijders R, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. The hidden mortality of monochorionic twin pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997;104: 1203-7.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascitic fluid. *Science.* 1983; 219: 983-5.

Seoud MA, Toner JP, Kruithoff C, Muasher SJ. Outcome of twins, triplet, and quadruplet in in vitro fertilization pregnancies: the Norfolk experience. *Fertil Steril.* 1992; 57: 825-34.

Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, Odivo A, Nicolaides KH. The lambda sign at 10-14 weeks of gestation as a predictor of chorionicity in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1996; 7: 421-3.

Shah YG, Sherer DM, Gragg LA, Casaceli CJ, Woods J. Diagnosis accuracy of different ultrasonographic parameters in predicting discordancy in twin gestations: a different approach. *Am J Obstet Perinat.* 1994; 11: 199-204.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flt-1-deficient mice. *Nature.* 1995; 375: 62-5.

Sharkey AM, Charnock-Jones Ds, Boocock CA, Brown KD, Smith Sk. Expresión of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. J Reprod Fertil. 1993; 99: 609-15.

Shetty A, Smith AP. The sonographic diagnosis of chorionicity. Prenat Diagn. 2005; 25: 735-9.

Shibata E, Rajakumar A, Powers R, Larkin RW, Gilmour C, Bodnar LM, Crombleholme WR, Ness RB, Roberts JM. Soluble fms-like tirosine kinase 1 is increased in preeclmpsia but not in normotensibe pregnancies with small-for-gestational-age neonates:relationship to circulating placental growth factor.J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90: 4895-903.

Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. Cell Struct Funct. 2001; 26 :25-35.

Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. Placenta. 1997; 18: 657-65.

Simmons LA, Hennessy A, Gillin AG, Jeremy RW. Uteroplacental blood flow and placental vascular endothelial growth factor in normotensive and pre-eclamptic pregnancy. BJOG. 2000; 107: 678-85.

Smith SK, He Y, Clark DE, Charnock-Jones DS. Angiogenic growth factor expression in placenta. *Seminars in Perinatology*. 2000; 24: 82-6.

Sonntag J, Waltz S, Schollmeyer T, Schuppler U, Schroder H, Weisner D. Morbidity and mortality of discordant twins up to 34 weeks of gestational age. *Eur J Pediatr*. 1996; 155: 224-9.

Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidler H, Charnahelli H, Klagsbrun M. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J Biol Chem*. 1997; 272: 31582-8.

Soker S, Fidler H, Neufeld G, Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem*. 1996; 271: 5761-7.

Soregaroli M, Bonera R, Danti L, Dinolfo D, Taddei F, Valcamonico A, Frusca T. Prognostic role of umbilical artery Doppler velocimetry in growth-restricted fetuses. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2002; 11: 199-203.

Stepan H, Geide A, and Faber R. Soluble fms-like tyrosine kinase 1. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2241-2242.

Sterne G, Shields LE, Dubinsky TJ. Abnormal fetal cerebral and umbilical Doppler measurement in fetuses with intrauterine

growth restriction predicts the severity of perinatal morbidity. *J Clin Ultrasound*. 2001;29: 146-51.

Strigini FA, De Luca G, Lencioni G, Scida P, Giusti G, Genazzani AR. Middle cerebral artery velocimetry: different clinical relevance depending on umbilical velocimetry. *Obstet Gynecol*. 1997; 90: 953-7.

Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*. 1998; 282: 468-71.

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991; 266: 11947-54.

Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol*. 2000; 190: 330-7.

Thorngren-Jerneck K, Herbst A. Low 5-minute Apgar score: a population-based register study of 1 million term births. *Obstet Gynecol*. 2001; 98: 65-70.

Torry DS, Holt VJ, Keenan JA, Harris G, Caudle MR, Torry RJ. Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil Steril*. 1996; 66: 72-80.

Trudinger B, Beutler L, Wang J. Placental vascular disease causes a fetal acute inflammatory cytokine and chemokine response. *J Soc Gynecol Invest*. 2000; 6:1 85A.

Tse JY, Lao TT, Chan CC, Chiu PM, Cheung AN. Expression of vascular endothelial growth factor in third-trimester placentas is not increased in growth restricted fetuses. *J Society Gynecol Invest*. 2001; 8: 77-86.

Vayssiere CF, Heim N, Camus EP, Hillion YE, Nisand IF. Determination of chorionicity in twin gestations by high-frequency abdominal ultrasonography: counting the layers of dividing membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 175: 1529-33.

Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Sem Cancer Biol*. 1999; 9: 211-20.

Verstraelen H, Goetgeluk S, Derom C, Vansteelandt S, Derom R, Goetghebeur E, Temmerman M. Preterm Birth twins after subfertility treatment: population based cohort study. *BJM*. 2005; 331: 1173.

Victoria A, Mora G, Arias F. Perinatal outcome, placental pathology, and severity of discordance in monochorionic and dichorionic twins. *Obstet Gynecol.* 2001; 97: 310-5.

Viero S, Chaddha V, Alkazaleh F, Simchen MJ, Malik A, Kelly E, Windrim R, Kingdom JC. Prognosis value of placental ultrasound in pregnancies complicated by absent end-diastolic flow velocity in the umbilical arteries. *Placenta.* 2004; 25: 735-41.

Vuorela P, Helske S, Horning C, Alitalo K, Weich H, Halmesmaki E. Amniotic fluid-soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2000; 95: 353-7.

Wallner W, Sengenberger R, Strick R, Strissel PL, Meurer B, Beckmann MW, Schlembach D. Angiogenic growth factors in maternal and fetal serum in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Clin Sci.* 2007; 112: 51-7.

Wathen KA, Tuutti E, Stenman UH, Alfthan H, Halmesmaki E, Finne P, Ylikorkola O, Vuorela P. Maternal serum-soluble vascular endothelial growth factor ending in preeclampsia or intrauterine growth retardatio. *J Clin Endocrin Metab.* 2006; 91: 180-4.

Weissman A, Achiron R, Lipitz S, Blickstein I, Mashiach S. The first-trimester growth-discordant twins: an ominous prenatal findings. *Obstet Gynecol.* 1994; 84: 110-4.

Whelan JG 3<sup>rd</sup>, Vlahos NF. The ovarian hiperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 2000; 74: 883-96.

Yu CK, Papageorghiou AT, Boli A, Cacho AM, Nicolaidis KH. Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction in twins pregnancies at 23 weeks of gestation by transvaginal uterine artery Doppler. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002; 20: 532-4.

Zadori J, Kozinsky Z, Orvos H, Katona M, Kaali SG, Pal A. Birth weight discordance in spontaneous versus induced twins: impact on perinatal outcome. *J Assist Reprod Genet.* 2004; 21: 85-8.

Zeeman GG, McIntire DD, Twicler DM. Maternal and fetal artery Doppler findings in women with chronic hypertension who subsequently develop superimposed pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003; 14: 318-23.

Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher S. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol.* 2002; 160: 1405-23.