

DEPARTAMENT DE PEDIATRIA, OBSTETRICIA I
GINECOLOGIA

PREECLAMPSIA Y CRECIMIENTO INTRAUTERINO
RESTRINGIDO Y SU RELACIÓN CON EL FACTOR DE
CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF).

DOLORES BORRÁS SUÑER

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 6 de setembre de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Lorenzo Abad Martínez
- Dr. Ernesto Fabre González
- Dr. Miguel Ángel Herraiz Martínez
- Dr. Juan Carlos Melchor Marcos
- Dr. Vicente Serra Serra

Va ser dirigida per:

Dr. Antonio Pellicer Martínez

Dr. Alfredo Perales Marín

©Copyright: Servei de Publicacions
Dolores Borrás Suñer

Dipòsit legal: V-3366-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7997-4

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



Preeclampsia y Crecimiento intrauterino
restringido y su relación con el Factor de
Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)

Tesis Doctoral
M^a Dolores Borrás Suñer
Valencia 2010

Antonio Pellicer Martínez, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y Alfredo Perales Marín Profesor titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: Preeclampsia y Crecimiento intrauterino restringido y su relación con el Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). ha sido realizado íntegramente por Dña. M^a Dolores Borrás Suñer bajo nuestra supervisión. 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 16 de Noviembre de 2009.

Fdo. Antonio Pellicer Martínez

Fdo Alfredo Perales Marín

A Santi

Agradecimientos

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

Al Prof Antonio Pellicer, ha sido un honor tenerte como director de tesis, gracias por esta oportunidad.

Al Prof Alfredo Perales, sin ti esto no hubiese sido posible, gracias por tu paciencia, tiempo y por transmitirme tu ilusión y ganas de investigar. Espero poder seguir aprendiendo de ti.

A Nerea Ruíz, por tu gran ayuda en este trabajo, como bien dijiste, esto sólo es el comienzo.

A mis compañeros de La Fe, en especial a Sara, Cris, Rosa, Gema y César, por pensar en mi cuando aparecía patología por la puerta del Hospital y hacerme mucho más fácil y divertido el día a día.

A mis compañeros del Puerto de Sagunto, por animarme en la recta final de la elaboración de esta tesis.

A todos mis amigos, en especial a Carol y Juan Luís, por su gran amistad, por animarme en los malos momentos y servirme de vía de escape de la rutina.

A Bea, compañera y amiga, gracias por todo lo que has hecho por mi, desde que me adoptaste de estudiante hasta la elaboración de la tesis. Tus consejos siempre me han llevado por buen camino, no sé como lo haces.

A mis sobrinos, que a pesar de su corta edad y sin darse cuenta, han conseguido sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles.

A Sonia y Alicia, hermanas, amigas y confidentes, gracias por el apoyo y confianza que habéis tenido siempre en mi.

A Jesús, por tus esfuerzos por animarme desde que me conociste de estudiante y a Héctor, siempre resolviendo mis problemas burocráticos, gracias a los 2.

A Santi, mi gran amigo y compañero, por tu paciencia y apoyo en todo momento, gracias por estar siempre a mi lado.

A mis padres, a los que más debo, por vuestro amor y sacrificio constante, sólo espero en un futuro ser reflejo de todo lo que me habéis enseñado.

ABREVIATURAS

ABC	área bajo la curva
Ang-1	angiopoyetina 1
Ang-2	angiopoyetina 2
AU	arteria
AUU	arteria umbilical única
ACM	arteria cerebral media
A2M	Alfa 2 macroglobulina
CCP	cociente cerebro/placentario
CIR	restricción del crecimiento intrauterino
COX-2	ciclooxigenasa 2
DAG	diacilglicerol
DC	célula decidual
EC	célula endotelial
EDRF	factor relajante derivado endotelial
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EEM	célula mesodérmica extraembrionaria
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
FGF ₁	factor de crecimiento fibroblástico 1, ácido
FGF ₂	factor de crecimiento fibroblástico 2, básico
FGFR	receptor del factor de crecimiento fibroblástico
HBL	Hemangioblasto
HIE	Hipertensión inducida por el embarazo
HIF-1 α	factor de transcripción hipoxia inducible 1 α
HIF-2 α	factor de transcripción hipoxia inducible 2 α
HIF- β	factor de transcripción hipoxia inducible β
HRE	elemento de respuesta a la hipoxia
HS	célula madre
HSPG	proteoglicanos heparán sulfatos
IGF-1	factor de crecimiento insulínico

IL-1	Interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
IMV	Vellosidad intermedia madura
IP ₃	inositol 1,4,5 trifosfato
L-NAME	L-nitro arginina metil ester
LHR	Likelihood-ratio
MAPK	proteinkinasa de activación mitógena
MMPs	metaloproteinasas
MMV	vellosidad intermedia madura
NO	óxido nítrico
Nos	óxido nítrico sintetasa
NP-1	neuropilina 1
NP-2	neuropilina 2
OVF	onda de velocidad de flujo
PAI-1	factor activador del plasminógeno
PEG	pequeño para la edad gestacional
PGC-1 α	peroxisoma proliferador activador receptor γ coactivador 1 α
PGE2	prostaglandina E2
PGI2	prostaciclina
PDGF	factor de crecimiento derivado plaquetario
PIP ₂	fosfoinositol 2 fosfato
PKC	proteinkinasa
PIGF	factor de crecimiento placentario
PLC γ	fosfolipasa C
PNC	red capilar primitiva
ROC	características del operador receptor
sFlt-1	receptor soluble del VEGF
TGF- β 1	factor de crecimiento de transformación β 1
Tie 1, 2	receptores tirosinkinasa
TiMPs	inhibidores tisulares de las metaloproteinasas

TNF α	factor de necrosis tumoral α
tPA	activador del plasminógeno tipo tisular
TSP	trombospondina
TV	vellosidad terminal
uPA	activador del plasminógeno tipo urocinasa
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial
VEGF _f	VEGF free o libre
VEGF _t	VEGF total
VEGFR1/flt-1	receptor 1 del factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR2/flk-1 o KDR	receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR3/flt-4	receptor 3 del factor de crecimiento vascular endotelial
VHL	von Hippel-Lindau

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 LA CÉLULA ENDOTELIAL	16
1.1.1 Metabolismo de la célula endotelial y secreción de factores.....	17
1.1.2 La célula endotelial y trombosis.....	17
1.1.3 Permeabilidad de la célula endotelial.....	18
1.2 FORMACIÓN DE LA RED VASCULAR	19
1.2.1 Vasculogénesis.....	19
1.2.2 Angiogénesis.....	19
1.2.2.1 Regulación de la angiogénesis.....	21
1.2.2.1.1 Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).....	22
1.2.2.1.2 Factor decrecimiento fibroblástico (FGF).....	31
1.2.2.1.3 Angiopoyetinas.....	31
1.2.2.1.4 Factor de crecimiento placentario (PIGF)	32
1.2.2.1.5 Inhibidores de la angiogénesis.....	32
1.2.2.2 Angiogénesis feto-placentaria.....	32
1.2.2.2.1 Vasculogénesis (días 21 A 32 postconcepción).....	35
1.2.2.2.2 Formación de la red capilar (día 32 a semana 25 postconcepción).....	36
1.2.2.2.3 Prevalencia de la angiogénesis no ramificada (semanas 24 A 25 postconcepción hasta el momento de término).....	38
1.2.2.2.4 La discordancia temporal entre la variación en el oxígeno y el cambio	

morfológico.....	39
1.2.2.3 Angiogénesis e hipoxia	40
1.2.2.3.1 VEGF e hipoxia	41
1.2.2.3.2 PIGF e hipoxia	43
1.3 HIE	44
1.3.1 Introducción.....	44
1.3.2 Incidencia	46
1.3.3 Factores de riesgo	47
1.3.4 Pronóstico	48
1.3.5 Fisiopatología.....	49
1.3.5.1 Disfunción del sistema endotelial.....	52
1.3.6 Factores predictores de HIE	58
1.3.6.1 sFlt-1	58
1.3.6.2 PIGF	59
1.3.6.3 Endoglina	61
1.4 CIR.....	62
1.4.1 Introducción	62
1.4.2 Factores de riesgo para CIR	63
1.4.3 Consecuencias fetales de un insuficiente desarrollo vascular placentario	65
1.4.4 Utilidad del doppler en los CIR	67
1.4.5 Factores angiogénicos alterados en el CIR	69
2. OBJETIVOS	73
2.1 GENERALES	74
2.2 ESPECÍFICOS	74

3. MATERIAL Y MÉTODO	75
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	76
3.1.1 Pacientes	76
3.2 BIENESTAR FETAL	78
3.3 DETERMINACIONES ANALÍTICAS	80
3.3.1 Determinación del VEGF y su receptor soluble sFit-1	81
3.4 DEFINICIÓN DE HIE, CIR, HIPOXIA	82
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	82
4. RESULTADOS	85
4.1. VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS	87
4.1.1 Edad materna	88
4.1.2 Peso del Recién nacido	88
4.1.3 Peso placentario	88
4.1.4 Semana de parto	89
4.1.5 Semana de extracción del Complejo VEGF	89
4.1.6 Paridad	89
4.1.7 Sexo	90
4.1.8 Finalización del parto	90
4.2 ANÁLISIS DEL COMPLEJO VEGF MATERNO-FETAL.....	91
4.2.1 VEGF materno	91
4.2.1.1 Estudio del complejo VEGF materno en todos los casos.....	91
4.2.1.2 Estudio por grupos del complejo VEGF materno	94
4.2.1.2.1 Complejo VEGF-semana de gestación	94
4.2.1.2.2 Valores del Complejo VEGF	

materno	94
4.2.1.2.2.1 VEGF _F	94
4.2.1.2.2.2 VEGF _T	94
4.2.1.2.2.3 sFlt-1	95
4.2.1.2.2.4 VEGF _f / sFlt-1	95
4.2.1.3 Relación entre los distintos parámetros del complejo VEGF materno.....	96
4.2.1.3.1 Análisis de la muestra en su conjunto	96
4.2.1.3.2 Análisis por grupos	96
4.2.2 VEGF fetal en vasos umbilicales	97
4.2.2.1 Estudio del complejo VEGF fetal en relación con la semana de parto, peso del RN y placentario	97
4.2.2.2 Valores del complejo VEGF fetal por grupos	97
4.2.3. Relación materno-fetal del complejo VEGF	99
4.2.4. Gradiente materno-fetal del complejo VEGF	103
4.2.5. Relación arterio-venosa del complejo VEGF.....	105
4.2.6 Gradiente arterio-venoso del complejo VEGF	108
4.3. HIE Y COMPLEJO VEGF	110
4.3.1 Variables epidemiológicas	110
4.3.2 VEGF materno	111
4.3.3 VEGF fetal	117
4.3.4 Relación del complejo VEGF materno y parámetros de gravedad de la HIE.	118
4.3.4.1 Relación de la TA con marcadores putativos de gravedad en la HIE	118
4.3.4.2 Análisis global del complejo VEGF en todos	

los grupos a nivel materno	119
4.3.4.3 Estudio por grupos del complejo VEGF materno	123
4.3.4.3.1 Gestaciones control	123
4.3.4.3.2 Gestaciones con HTA	124
4.3.4.3.3 Gestaciones con HIE	125
4.3.5 Relación del complejo VEGF fetal y parámetros de gravedad de la HIE.....	125
4.4. CIR y complejo VEGF	126
4.4.1 Variables epidemiológicas	126
4.4.2 VEGF materno	126
4.4.3 VEGF fetal	130
4.4.4 Relación del complejo VEGF materno y parámetros de gravedad del CIR	131
4.4.4.1 Análisis global del complejo VEGF en todos los grupos a nivel materno	131
4.4.4.2 Análisis por grupos del complejo VEGF materno	132
4.4.4.2.1 Gestaciones control	132
4.4.4.2.2 Gestaciones con PEG	132
4.4.4.2.3 Gestaciones con CIR	132
4.4.5 Relación del complejo VEGF fetal y parámetros de gravedad del CIR	133
4.4.5.1 Análisis global del complejo VEGF en todos los grupos a nivel fetal	133
4.4.5.2 Análisis por grupos del complejo VEGF fetal	133
4.4.5.2.1 Gestaciones control	133
4.4.5.2.2 Gestaciones con PEG	133
4.4.5.2.3 Gestaciones con CIR	133

4.5. HIPOXIA FETAL Y COMPLEJO VEGF	134
4.5.1 Complejo VEGF materno	134
4.5.1.1 Parámetros directos de bienestar fetal y complejo VEGF	134
4.5.1.2 Parámetros indirectos de bienestar fetal y complejo VEGF	134
4.5.2 complejo VEGF fetal	137
4.5.2.1 Parámetros directos de bienestar fetal y complejo VEGF fetal	137
4.5.2.2 Parámetros indirectos de bienestar fetal y complejo VEGF fetal	137
5. DISCUSIÓN	139
5.1 HIE Y COMPLEJO VEGF	151
5.2 CIR Y COMPLEJO VEGF	158
5.3 HIPOXIA FETAL Y COMPLEJO VEGF	162
6. CONCLUSIONES.....	169
6.1 ESPECÍFICAS.....	170
6.2 GENERALES.....	171
7. BIBLIOGRAFÍA.....	173

1.-INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La angiogénesis, es uno de los procesos biológicos más importantes, 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. En procesos cancerígenos, la angiogénesis aberrante puede ser terapéuticamente bloqueada para prevenir la progresión de la enfermedad. El embarazo, el desarrollo de feto y la placenta, requiere la formación de vasos sanguíneos y los procesos angiogénicos tienen una importancia capital. Asimismo, existen situaciones en las que se ha involucrado una vascularización anómala, como son la hipertensión inducida por el embarazo (HIE), la restricción del crecimiento intrauterino (CIR), la diabetes....

Parece estar claro que una gran diversidad de procesos patológicos tienen en común la alteración del sistema vascular. Durante los últimos años, estos procesos han empezado a ser bien definidos a nivel celular y molecular, buscando nuevas estrategias para el tratamiento de estos procesos a nivel primario en lugar de tratar las manifestaciones provocadas a consecuencia de la lesión vascular. Por tanto, el conocimiento de la función normal de las células vasculares y cómo puede ser alterada, es fundamental para conseguir lo anterior. Los factores involucrados en la angiogénesis durante la gestación, tanto normal como patológica, no han sido muy estudiados y los resultados de que disponemos son contradictorios.

1.1 La célula endotelial.

La función normal de la célula endotelial, es fundamental para una adecuada homeostasis del sistema vascular. El endotelio, tiene tres funciones fundamentales:

1. Es un tejido metabólicamente activo, secretor de factores vasoactivos.
2. Es una superficie anticoagulante, antitrombótica.
3. Actúa de barrera para evitar el paso indiscriminado de sustancias a través de la pared arterial.

1.1.1 Metabolismo de la célula endotelial y secreción de factores vasoactivos.

La célula endotelial, secreta sustancias vasoactivas que juegan un papel importante en el control del tono vascular. Estas moléculas incluyen vasodilatadores como la prostaciclina, factor relajante derivado endotelial (EDRF) u NO (óxido nítrico) (Taylor y Weston 1988) y el factor hiperpolarizante derivado endotelial. Por otro lado, el endotelio también estará produciendo sustancias vasoconstrictoras como son la endotelina y los prostanooides (Lin y cols., 1994). Además, la célula endotelial también sintetiza y secreta sustancias como el antígeno factor VIII, factor von Willebrand, factor tisular, trombomodulina y activador tisular del plasminógeno los cuales intervienen en las vías de coagulación y fibrinólisis. Los componentes estructurales de la matriz extracelular sintetizados por estas células incluyen el colágeno, elastina, glicosaminoglicanos y la fibronectina (Sato y cols., 1987). La composición de la matriz extracelular está dinámicamente modulada por las metaloproteinasas, enzimas también sintetizadas por las células endoteliales y las células del músculo liso (Galis y cols., 1994). Además, la célula endotelial, sintetiza factores de crecimiento que regulan la proliferación de las células del músculo liso. Finalmente, la célula endotelial, es capaz de aclarar los metabolitos transportados por la sangre y sustancias sintetizadas localmente como los lípidos y las lipoproteínas plasmáticas, serotonina, catecolaminas, bradicinina y angiotensina (Cary y Mendelsohn 1987). También participará en el metabolismo de los lípidos plasmáticos.

1.1.2 La célula endotelial y trombosis.

Las células endoteliales quiescentes, presentan una superficie antitrombótica que inhibe la adhesión plaquetaria y la coagulación. Es capaz de sintetizar factores protrombóticos, especialmente cuando son estimuladas por citocinas o factores inflamatorios. Por tanto, el endotelio representa una balanza funcional trombosis-antitrombosis. Potentes anticoagulantes sintetizados por estas células son la prostaciclina y el NO, que inhiben la agregación plaquetar, (Gryglewski y cols., 1988) la antitrombina III, moléculas heparin-

like, trombomodulina, la cual activa a la proteína C que también se expresa en el endotelio y factor activador del plasminógeno (t-PA). Entre los factores procoagulantes que puede sintetizar el endotelio se encuentran el factor tisular, factor VIII, factor Va y el Inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1). Situaciones de lesión endotelial o procesos inflamatorios, realzan el estado protrombótico del endotelio estimulando el factor tisular y el PAI-1. No todos los factores que controlan la expresión de las moléculas protrombóticas-antitrombóticas/fibrinolíticas son conocidas, pero lo que si que está claro es que el endotelio, es un gran regulador de la homeostasis.

1.1.3 Permeabilidad de la célula endotelial.

Un papel muy importante del endotelio es regular la permeabilidad a las macromoléculas. El transporte de estas moléculas será diferente, dependiendo del tamaño del vaso. En los vasos grandes, el proceso contribuye a la nutrición del vaso y actúa como una barrera selectiva. En la microcirculación, la permeabilidad endotelial regula la distribución de los nutrientes a los órganos y el intercambio de productos metabólicos.

Los dos mecanismos mayores para regular la barrera endotelial, son modulando las uniones intercelulares y el transporte transendotelial vesicular. La regulación de las uniones intercelulares, va a ser importante en el crecimiento de nuevos vasos, en la extravasación de los leucocitos y en la filtración de las macromoléculas. Estas uniones, tendrán distintas características dependiendo de su localización y del tamaño del vaso. A nivel capilar y postcapilar venoso, responderán a agentes vasoactivos, incluyendo el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), histamina y prostaglandinas. A nivel arterial, estas uniones son más oclusivas. Todo esto, permite al endotelio actuar como una barrera selectiva y modular el acceso de sustancias mitógenas, trombóticas o vasoactivas a la capa vascular de músculo liso.

Otro mecanismo modulador de la barrera endotelial es la contracción de la célula endotelial, en respuesta de varios agonistas como la histamina, la trombina y la ionomicina, probablemente, este mecanismo contráctil sea uno

de los mecanismos más importantes en la formación de edema, en respuesta a la bradicinina y a la histamina. Este fenómeno ocurrirá en respuesta a señales intracelulares como la activación de la proteinkinasa C, la fosforilación del canal de miosina o la activación de las tirosinas.

1.2 Formación de la red vascular

El sistema vascular se desarrolla a través de 2 procesos distintos, vasculogénesis y angiogénesis.

1.2.1 Vasculogénesis

Durante la vasculogénesis, las células endoteliales progenitoras (angioblastos) forman una red vascular primitiva. Este proceso se produce sobretodo durante el desarrollo fetal, aunque el reclutamiento de angioblastos desde la médula ósea y sangre periférica en respuesta a la isquemia se ha descrito en adultos.(Risau y Flamme 1995).

La vasculogénesis comprende tres pasos (Flamme y cols 1997):

- 1 Inducción de los hemangioblastos y angioblastos (mediado principalmente a través del factor de crecimiento fibroblástico (FGF)).
- 2 Ensamblaje de los vasos primordiales (mediado principalmente por el factor de crecimiento vascular endotelial / sistema receptor del factor de crecimiento vascular endotelial VEGF/VEGF R).
- 3 Transición de vasculogénesis a angiogénesis.

1.2.2 Angiogénesis

La angiogénesis consiste en el desarrollo de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes. Podemos clasificarla de varias formas; ramificada y no ramificada (Folkman y Shing 1992), fisiológica y patológica o como angiogénesis terapéutica.

Durante la gestación, la angiogénesis ramificada la encontramos sobre todo en el 2º trimestre, sin embargo la no ramificada predomina en el tercer trimestre.

La angiogénesis fisiológica juega un papel importante en la curación de las

fracturas de hueso, formación del cuerpo lúteo, crecimiento endometrial, en la implantación del embrión y en la placentación. La angiogénesis patológica forma parte del crecimiento metastático de los tumores, artritis reumatoide, retinopatías, inflamaciones crónicas y psoriasis (Folkman 1995).

La angiogénesis terapéutica, se define como el uso de agentes biológicos o material bioactivo para estimular el crecimiento de los nuevos vasos, utilizado en los procesos isquémicos cardíacos, en enfermedad cerebrovascular o fracturas de hueso (Thompson y cols 2000). La inhibición de la angiogénesis parece ser un importante acercamiento al tratamiento del cáncer (Folkman 1995).

En general, el proceso angiogénico, es iniciado por factores de crecimiento (FGF, VEGF, factor de crecimiento placentario (PIGF), factor de necrosis tumoral (TNF α), etc). Estos factores de crecimiento, aumentan la permeabilidad de los vasos, estimulan 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 e invasión de la matriz extracelular, formación de la luz del vaso y maduración funcional del endotelio (reclutamiento de pericitos y células del músculo liso) (Risau 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 que 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 (Hammes y cols 1996) .

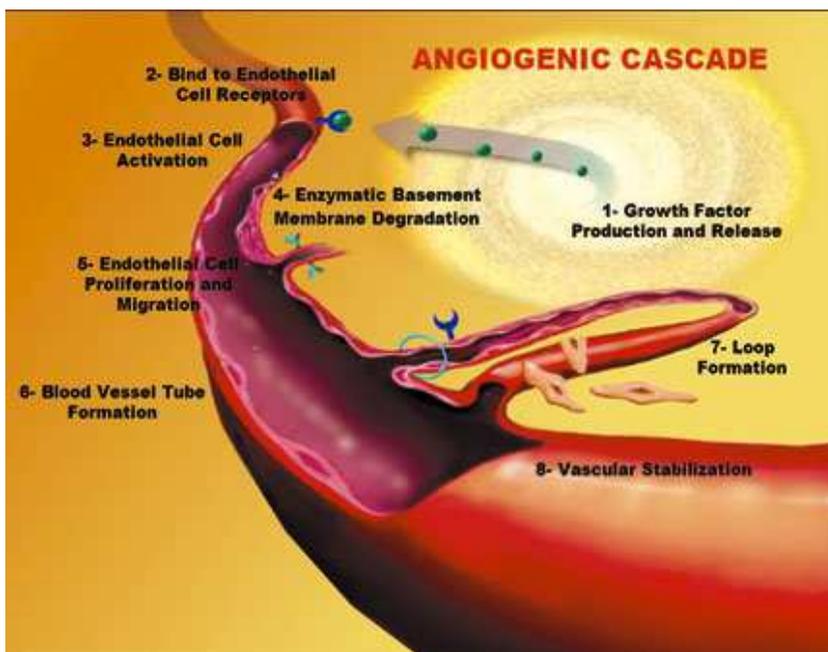


Figura 1: cascada de la angiogenesis. 1 Producción de factores de crecimiento y liberación. 2 Unión a los receptores de la célula endotelial. 3 Activación de la célula endotelial. 4 Degradación enzimática de la membrana basal. 5 Proliferación y migración de la célula endotelial. 6 Formación de los tubos vasculares. (Lavaque y cols., 2006).

1.2.2.1 Regulación de la angiogénesis

Un amplio espectro de factores juegan un papel importante en la iniciación y regulación de la angiogénesis y el paso a ésta es regulado por un cambio en el equilibrio local entre factores angiogénicos y sus inhibidores. La lista de factores reguladores de la angiogenesis incluye :

- Citocinas, hormonas y factores de crecimiento
- Hipoxia e hipoglucemia
- Componentes de la matriz extracelular (laminina, fibronectina) y sus receptores (integrinas alfa V)
- Metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y sus inhibidores titulares (TIMPs) así como sus reguladores
- Otras proteasas (uroquinas , activador del plasminógeno tipo urocinasa

(uPA) y tipo tisular (tPA))

-Fibrina

-Células inflamatorias y pericitos

-Factor de crecimiento derivado plaquetario (PDGF)

-Factor de crecimiento de transformación TGF- β 1

Los factores más importantes en la regulación positiva de la angiogénesis son:

- 1 VEGF
- 2 FGF
- 3 Angiopoyetinas
- 4 PIGF

1.2.2.1.1 Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

El VEGF es una glicoproteína homodimérica de 34-46 kDa producida por varios tipos de células diferentes en respuesta a diversos estímulos. Actúa sobre las células endoteliales vasculares uniéndose a receptores transmembrana específicos. Esta unión activa una serie de rutas de transducción de señales dando lugar a una serie de efectos como son la proliferación, la migración de la célula endotelial, su supervivencia y el aumento de la permeabilidad vascular.

Estos efectos tienen un importante papel en la angiogénesis, cuyo mediador clave parece ser el VEGF. Además, el VEGF tiene efectos sobre las células endoteliales linfáticas y las células efectoras inmunitarias que también pueden ser clínicamente importantes.

Estas proteínas forman parte de la familia de factores de crecimiento VEGF derivados de las plaquetas.

El complejo VEGF, incluye el VEGF a nivel de mRNA, proteína circulante, así como sus ligandos y receptores. Se han identificado seis miembros de la familia del VEGF (Tabla 1).

Tabla 1: Familia del VEGF y sus funciones (Achen y Stacker 1998).

Ligando	Receptor	Función
VEGF (VEGF-A)	Receptores -1 y 2 del VEGF neuropilina-1	Angiogénesis, mantenimiento vascular
VEGF-B	Receptor 1 del VEGF	No determinado
VEGF-C	Receptor 2 y 3 del VEGF	Linfangiogénesis
VEGF-D	Receptor 2 y 3 del VEGF	Linfangiogénesis
VEGF-E (factor viral)	Receptor 2 del VEGF	Angiogénesis
PIGF	VEGFR-1, neuropilina-1	Angiogénesis e inflamación

-El VEGF-A o VEGF es un potente factor mitógeno y de supervivencia para las células endoteliales.

-VEGF B, VEGF C, VEGF D VEGF E y Factor de crecimiento placentario (PIGF), son 5 miembros más de la familia.

El transcrito primario del gen VEGF humano deriva de un único gen que contiene 8 exones separados por 7 intrones (Tischer y cols., 1991).

Inicialmente se observó que el corte alternativo de los exones, daba lugar a 4 isoformas, obteniendo respectivamente las isoformas 121, 165, 189, 206 (Tischer y cols., 1991; Houck y cols., 1991). Posteriormente se han descrito isoformas menos frecuentes , como son las isoformas 145 y 183 (Neufeld y cols., 1999).

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 VEGF₁₂₁ y el VEGF₁₆₅ 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.

Una diferencia importante entre las isoformas es su afinidad por la heparina, lo que afecta a su unión a la superficie celular y a la matriz extracelular (Ferrara 1999). 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 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 la isoforma 121.

Tabla 2: Propiedades de las principales isoformas del VEGF (Ferrara 2001).

	VEGF121	VEGF165	VEGF189	VEGF206
Afinidad por la heparina	+	++	+++	+++
Potencia biológica	++	++++	?	?
Difusibilidad	++++	+++	+	+
Unión a neuropilina-1	No	Sí	¿Sí?	¿Sí?

El VEGF tiene cuatro actividades biológicas principales que contribuyen todas ellas a la inducción de la angiogénesis y que han sido estudiadas exhaustivamente (Ferrara y cols., 2003; Neufeld y cols., 2001):

- crecimiento y proliferación de células endoteliales vasculares
- migración de células endoteliales vasculares
- supervivencia de células endoteliales inmaduras mediante la prevención de la apoptosis
- aumento de la permeabilidad vascular de los capilares

También se ha implicado al VEGF en la linfangiogénesis (Nagy y cols., 2002). Además de estas acciones sobre las células endoteliales, existe cierta evidencia de efectos sobre otros tipos de células [Ferrara y cols 2003]. Entre los efectos observados sobre células obtenidas de la médula ósea, se incluyen los siguientes:

- promoción de la quimiotaxis de los monocitos
- inhibición de la maduración de las células dendríticas

-aumento de la producción de células B y generación de células mieloides inmaduras

El VEGF también parece estar involucrado en la supervivencia de las células madre hematopoyéticas durante la repoblación hematopoyética [Gerber y cols., 2002]. Es posible que estos efectos estén mediados a través del receptor 1 del VEGF.

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.

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 2001).

Dichos receptores son:

- El receptor de VEGF nº1 (VEGFR1), también llamado Flt-1, se encuentra fundamentalmente en las vellosidades del trofoblasto y sincitiotrofoblasto (Helske y cols.,2001). Posee una forma soluble que se detecta en suero durante el embarazo denominado sVEGFR1 o sFlt-1.
- El receptor nº2 (VEGFR2), también llamado Flk-1 o KDR (siendo el KDR el nombre que recibe el receptor en humanos y Flk-1 el nombre que recibe en roedores), se encuentra fundamentalmente en las células endoteliales vasculares de la placenta y decidua (Helske y cols.,2001).
- El VEGFR3 (Flt-4) no se une al VEGF pero tiene una elevada afinidad por el VEGF C y D, involucrado principalmente en la regulación de la linfangiogénesis.
- Neuropilina 1 (NP-1) y Neuroepitelina 2 (NP-2), han sido identificados en las células endoteliales y actúan como coreceptores para el VEGF. Son capaces de unirse al VEGF₁₆₅ pero no al VEGF₁₂₁ (Soker y cols., 1996; Gluzman-Poltorak y cols., 2000).

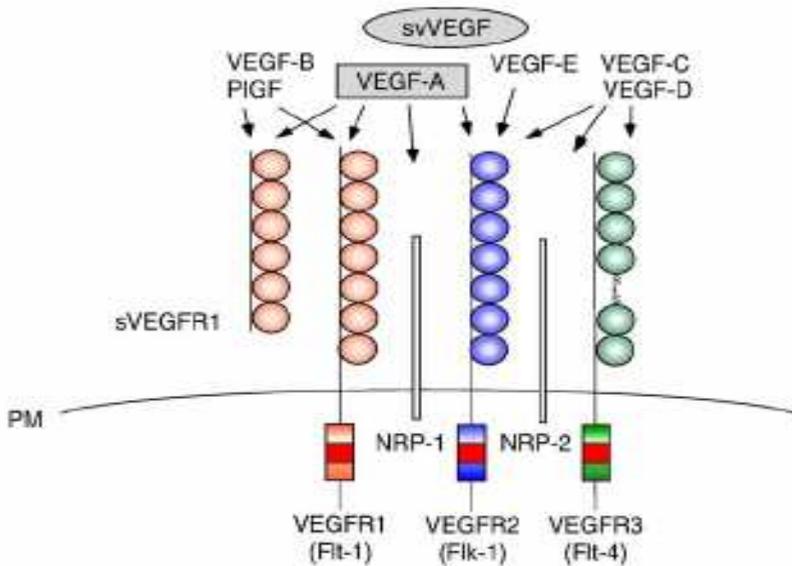


Fig 2: Esquema de la familia VEGF y sus receptores. (VEGF-A, -B, -C,-D, -E, PIGF) y sus receptores VEGFR1, VEGFR2 Y VEGFR3. Las neuropilinas (NRP-1, NRP-2) actúan como coreceptores para el VEGF.

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 el 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 estimulación de la mitosis (Shalabi 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 Davis-Smyth 1997). Se forma a partir de un “splicing” alternativo, que contiene la región extracelular del dominio de unión del ligando, pero no la porción que se encuentra a nivel de transmembrana y citoplasmática (Kendall y Thomas 1993, He y cols., 1999). Este sFlt-1, es capaz de bloquear los efectos del VEGF, inhibiendo su

interacción con sus receptores. También inhibe al PIGF, miembro de la familia del VEGF, que es producido fundamentalmente por la placenta en forma soluble en el suero materno durante el embarazo. La Alfa-2-Macroglobulina (A2M) también es un secuestrador natural del VEGF circulante (Soker y cols., 1993).

La disrupción de ambos receptores, conlleva a una alteración en la función de los vasos sanguíneos.

A diferencia del VEGFR1 y 2, el NP-1 y 2 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).

El complejo VEGF, es estimulador específico de la permeabilidad vascular, así como de la producción y migración de las proteasas (uPA y tPA) y colagenasas, aumentando la quimiotaxis endotelial y la vasodilatación. Basado en una revisión de estudios tanto in vivo como in vitro, parece que el VEGF, es un regulador de la angiogénesis tanto en procesos fisiológicos como en patológicos, incluyendo el crecimiento del cuerpo lúteo, la curación de heridas, isquemia coronaria y en el crecimiento de tumores. Algunos estudios, han implicado al VEGF en la angiogénesis fetal y placentaria. Por ejemplo, VEGF o sus receptores, están asociados con la angiogénesis que se produce durante el desarrollo de los ventrículos cerebrales, en los glomérulos renales y en los tejidos placentarios a final del embarazo en ratones (Breier y cols., 1997, Dumont y cols., 1995).

La expresión del VEGF está regulada por diferentes factores: hipoxia, NO, citoquinas y regulación hormonal. El aporte reducido de O₂ 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, también estimulado por hormonas placentarias (ej: hCG) (Zygmunt y cols., 2000). En condiciones de hipoxia, los factores de transcripción hipoxia inducibles HIF-1 α y HIF-2 α son estabilizados y transportados al núcleo, donde

ejercen una interacción con HIF- β . Este complejo se une entonces a una secuencia específica del gen del VEGF denominada elemento de respuesta a la hipoxia (HRE), que estimula la transcripción del gen del VEGF. La regulación de la expresión del VEGF por la tensión de oxígeno, también puede implicar al supresor tumoral, la proteína VHL (originalmente identificada como el gen responsable de la enfermedad von Hippel-Lindau), que parece suprimir la expresión del VEGF en condiciones normales de oxigenación.

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), Prostaglandina E2 (PGE2) (Ben-Av y cols., 1995) inducen el aumento del VEGF en diferentes líneas celulares.

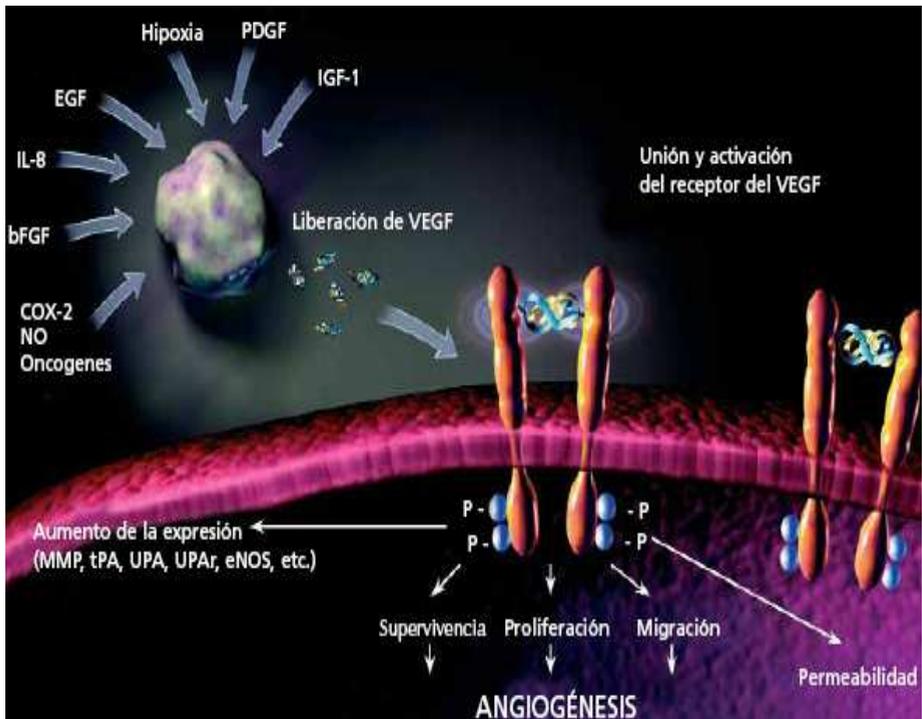


Figura 3: Factores que estimulan la producción del VEGF. IGF-1(factor de crecimiento insulínico), PDGF (factor de crecimiento derivado plaquetario), EGF (factor de crecimiento epidérmico), bFGF (factor de crecimiento fibroblástico), COX-2 (ciclooxigenasa 2), NO (óxido nítrico), MMP (metaloproteinasas), tPA (activador de plasmina tipo tisular), uPA (activador del plasminógeno tipo urocinasa), NOS (óxido nítrico sintetasas).

Recientemente, Arany y cols., 2008, demuestran que el PGC-1 α (peroxisoma proliferador-activador receptor- γ coactivador 1 α), aumenta los niveles de VEGF y estimula la revascularización en situaciones de isquemia tisular, siendo la vía diferente a la utilizada por el HIF.

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 y tiempo dependiente en

el endotelio vascular. Se ha comprobado 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 NOS, 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).

También se ha propuesto, que el VEGF produce vasodilatación a través de la prostaciclina (He y cols., 1999), siendo el estímulo de esta independiente de la actividad de la NOS, como podemos ver en la figura.

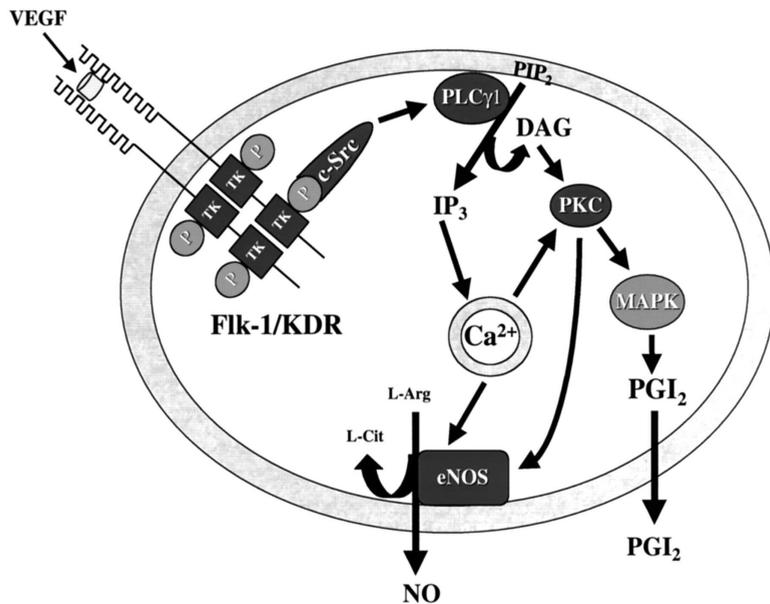


Figura 4: cascada de señales tras la unión del VEGF a su receptor (Flk-1/KDR), hasta la síntesis de NO y PGI $_2$, en células aórticas endoteliales de bovino (He y cols., 1999) PLC γ (fosfolipasa C), PKC (proteinkinasa), MAPK (proteinkinasa de activación mitógena), DAG (diacilglicerol) PIP $_2$ (fosfoinositol 2 fosfato) IP $_3$ (inositol 1,4,5 trifosfato) PGI $_2$ (prostaciclina).

Estudios realizados con la eliminación de determinados genes, han puesto en evidencia la participación del VEGF en la angiogénesis tanto fetal como materna. En ratones, la afectación homocigota del gen del receptor VEGFR2, conduce a un defecto en la vasculogénesis fetal y placentaria, dando lugar a

la muerte embrionaria alrededor del octavo día de embarazo (Shalabi y cols.,1995). De forma similar, se observó que la afectación homocigota del gen para el VEGF, era letal alrededor del onceavo día de embarazo y el embrión presentaba alteraciones en el desarrollo cardíaco, aorta, vasos mayores y vasos extraembrionarios (Carmeliet y cols., 1996, Ferrara y cols., 1996). Se puede sacar la conclusión de estos estudios que no solamente el desarrollo de la angiogénesis feto-placentaria depende del VEGF, sino que también los niveles de VEGF, son importantes para un desarrollo vascular normal.

1.2.2.1.2 Factor de crecimiento fibroblástico (FGF).

FGF, representa una gran familia de factores de crecimiento y diferenciación, con al menos 18 miembros. Los 2 más importantes son FGF-1 (ácido FGF) y el FGF-2 (básico FGF), los cuales comparten más del 50% de homología estructural. Los 2, estimulan la proliferación y modulan la función de las células endoteliales, inhiben la apoptosis y son quimiotácticos.

Existen receptores de alta y baja afinidad por el FGF. Los de alta afinidad están representados por el FGFR-1-4, los cuales son receptores tirosin-kinasas y son los responsables de realizar las funciones señaladas. Los de baja afinidad, están involucrados en el secuestro y estabilización de los ligandos y muchos de ellos son proteoglicanos heparán sulfatos (HSPG). También se presentan en forma soluble en los fluidos biológicos y en la matriz extracelular.

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

1.2.2.1.3 Angiopoyetinas

Las angiopoyetinas (Ang-1 y Ang-2) están involucradas en la formación vascular durante la vasculogénesis. Las dos se unen al receptor Tie-2 (receptor tirosin-kinasa) que se encuentra en las células endoteliales y hemangiopoyéticas. 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). Se demostró que la Ang-1 se expresaba en el citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto, mientras que la Ang-2 y Tie-2 se expresan predominantemente en el citotrofoblasto (Dunk y cols., 2000).

1.2.2.1.4 Factor de crecimiento placentario (PIGF)

La expresión del PIGF está restringida a la placenta y el trofoblasto representa la mayor fuente de este factor. El PIGF es un miembro de la familia del VEGF. Presenta 4 isoformas diferentes. El PIGF es capaz de inducir angiogénesis in vivo y también estimula la proliferación y la migración de la célula endotelial. Su receptor free tirosin kinase-1 (flt-1), al cual también se une el VEGF se expresa en las células endoteliales (Kaipainen y cols., 1993), monocitos (Barleon y cols., 1996), células del músculo liso y en el trofoblasto (Ahmed y cols., 1995, Clark y cols., 1996, Vuckovic y cols., 1996). La expresión de su receptor en el trofoblasto, sugiere que el PIGF puede tener efectos paracrinos sobre estas células.

1.2.2.1.5 Inhibidores de la angiogénesis

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

La angioestatina, 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 (O'Reilly y cols., 1994).

La Trombospondina (TSP), se libera a partir de la trombina de las plaquetas activadas y es producida por muchas células incluyendo las células endoteliales y del músculo liso, macrófagos, neutrófilos y fibroblastos. La TSP soluble, tiene función antiproliferativa de las células endoteliales, modula la adhesión de las células endoteliales y tiene efecto antiquimiotáctico, mientras que la TSP unida puede actuar como promotor angiogénico (DiPietro y Polverini 1993).

1.2.2.2 Angiogénesis fetoplacentaria

En las vellosidades placentarias la angiogénesis tiene lugar en presencia de un gradiente de oxigenación y nutrición que se extiende desde la circulación materna (el proveedor), por vía de los trofoblastos vellosos (un consumidor importante) y la circulación fetal en desarrollo (que extrae el oxígeno y los nutrientes a partir de las vellosidades), al feto en desarrollo (consumidor final). Factores que afectan al desarrollo fetal, como son el genotipo materno, el número de fetos, desnutrición materna, edad materna, paridad, un ambiente demasiado frío o caliente, tienen los mismos efectos sobre el tamaño placentario y por tanto también estará asociado con una reducción del oxígeno que le llega al feto (Reynolds y Redmer 1995).

Debido a estas condiciones locales peculiares de la placenta, la vasculogénesis y la angiogénesis fetoplacentaria también difieren de la formación de los vasos en otros lechos vasculares humanos. La conexión entre los capilares en desarrollo placentarios y el sistema circulatorio embrionario, se establece por una estrecha vía, alrededor del día 32 posterior a la concepción. A partir de este estadio, el sumamente inmaduro lecho vascular intravelloso debe llevar a cabo todas las funciones de transporte placentario. Al hacerlo, nunca alcanza un estado estable, sino que se expande continuamente para cumplir con las necesidades nutricionales y de oxígeno del embrión en crecimiento.

El desarrollo tiene lugar en un medio ambiente de presiones de oxígeno reducidas en relación con los tejidos maternos, pero durante el curso de la gestación las presiones de oxígeno intervallosas aumentan (Rodesch y cols., 1992). Contrariamente a la mayoría de los otros órganos en desarrollo, en los cuales la oxigenación mejora con el avance de la vascularización, la oxigenación tisular en las vellosidades placentarias parece estar inversamente relacionada con la densidad numérica de los capilares fetales, ya que más que liberar simplemente el oxígeno, lo extraen de las vellosidades (Kingdom y Kaufmann, 1997). Consecuentemente, una baja densidad de capilares fetales por causa de extracción disminuida de oxígeno produce aumento de los niveles de oxígeno intraplacentario, el que a su vez impacta

sobre la angiogénesis (Charnock-Jones y cols., 2003). Por el contrario y bajo otras condiciones constantes, densidades numéricamente altas de capilares y elevada extracción de oxígeno por la circulación fetal podrían disminuir las presiones intraplacentarias de oxígeno (Todros y cols., 1999; Sibley y cols., 2002). Cuando se exceden ciertos límites, ambas situaciones pueden producir círculos viciosos.

El desarrollo de la vascularización placentaria depende de las acciones de factores de crecimiento angiogénicos y sus receptores, producidos por las células y los componentes de la matriz intracelular que se encuentran dentro de los vasos fetales o en sus alrededores. Estos vasos carecen de inervación autónoma, por lo que la resistencia al flujo en la vascularización madura debe también ser regulada por efectores locales vasoactivos.

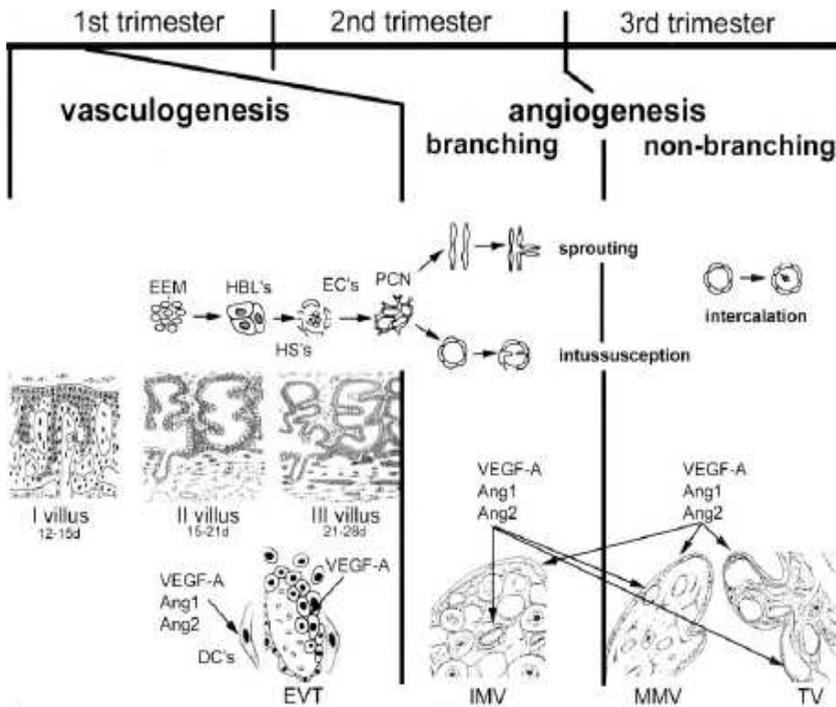


Figura 5: esquema del desarrollo del sistema vascular durante la placentación (Geva E, y cols., 2002). EEM (célula mesodérmica extraembrionaria), HBL (hemangioblasto), EC (célula endotelial), PCN (red capilar primitiva), DC (célula decidual), HS (células madre), IMV (vellosidad intermedia inmadura), MMV (vellosidad madura intermedia), TV (vellosidad Terminal).

1.2.2.2.1 Vasculogénesis (días 21 a 32 postconcepción)

La vascularización fetal de la primera generación de vellosidades placentarias es el resultado de la formación local de novo de capilares (vasculogénesis). La vasculogénesis comienza alrededor de los 21 días tras la concepción (Demir y cols., 1989). Se cree que el factor básico de crecimiento fibroblástico podría estar involucrado en el reclutamiento de las células progenitoras hemangiogénicas y su expresión en las vellosidades placentarias humanas ha sido descrita repetidamente (Ferriani y cols., 1994; Shams y cols., 1994; Crescimanno y cols., 1995), aunque según los autores nunca en ese estadio temprano de la gestación, y también se carece de datos sobre sus receptores. Por el contrario, es bien conocido que el VEGF A o VEGF,

responsable de la selección, crecimiento y agregación de los precursores endoteliales para la formación de los cordones hemangiogénicos, se expresa intensamente en la gestación temprana (Sharkey cols., 1993; Ahmed y cols., 1995; Ahmed y cols., 1997; Wheeler y cols 1995; Shore y cols., 1997; Vuorela y cols 1997).

Hacia el día 28 los cordones hemangioblásticos de la mayoría de las vellosidades presentan conductos poligonales largos y claramente definidos, con células endoteliales circundantes que comienzan a aplanarse considerablemente. Células mesenquimáticas adicionales se superponen estrechamente con los túbulos endoteliales y sus extensiones se integran en la red mesenquimática y en esos túbulos endoteliales. Estas células yuxtahemangioblásticas se considera que se transforman en pericitos (King, 1987).

Durante esta fase, las células madre hematopoyéticas se hacen visibles en la luz de los capilares, aunque todavía no son circulantes debido a que no existe conexión anatómica por vía del cordón umbilical hacia la circulación embrionaria. Esta última se establece unos pocos días después (entre los días 32 y 35) por fusión entre los capilares vellosos con los más grandes vasos alantoideos (Benirschke y Kaufman 2000), los que se forman dentro de la alantoides y luego se diseminan en dirección placentaria y embrionaria, para establecer finalmente la conexión entre los lechos vasculares placentario e intraembrionario.

1.2.2.2.2 Formación de la red capilar (día 32 a semana 25 postconcepción)

A partir del día 32 tras la concepción hasta el final del primer trimestre, los segmentos tubulares endoteliales formados por vasculogénesis se transforman en redes capilares primitivas por la interacción equilibrada de dos mecanismos paralelos: elongación de los tubos preexistentes por angiogénesis no ramificada y ramificación de esos tubos por gemación angiogénica y, tal vez, por crecimiento microvascular intususceptivo. El análisis histomorfométrico (Jauniaux y cols., 1991) e inmunohistoquímico (Te

Velde y cols., 1997) en gestaciones aparentemente normales entre la semana 6-15, demuestra un aumento en el desarrollo vascular a partir de la angiogénesis ramificada.

La expresión del PIGF y del sFlt-1, se incrementan hacia el momento del término, cuando la angiogénesis ramificada está siendo intensamente reemplazada por los mecanismos de angiogénesis no ramificada.

En el tercer mes de la gestación, algunos de los tubos endoteliales localizados centralmente en las vellosidades inmaduras intermediarias adquieren diámetros mayores. En unas pocas semanas formarán las estructuras de tipo adventicio y la delgada capa media por fibrosis concéntrica en el estroma circundante y por diferenciación de los precursores de las células musculares lisas. En las vellosidades inmaduras intermediarias proximales más grandes, la adventicia de los precursores ubicados centralmente en las arterias y venas se fusionan para formar un núcleo de estroma fibrosado dentro de la vellosidad y este tipo de vellosidad es llamado vellosidad madre.

El establecimiento y mantenimiento de las partes externas de las paredes vasculares se piensa que está controlado, al menos en parte, por el equilibrio entre la angiopoyetina-1 y la angiopoyetina-2, interactuando con el receptor de la angiopoyetina-2 (Hanahan y cols., 1997).

En la segunda mitad de la gestación, el proceso fibrótico dentro del estroma de las vellosidades madre avanza en forma radial hacia los trofoblastos vellosos. Los capilares subtrofoblásticos superficiales se transforman en una red capilar paravascular. Junto con la expansión de la fibrosis vellosa en las vellosidades madre y la transformación de los capilares centrales en arterias y venas, la red de capilares superficiales se retrotrae gradualmente. En el momento del término, muy pocos capilares paravasculares permanecen en las grandes vellosidades madre (Leiser y cols., 1985), aunque el mecanismo por el que se produce esa regresión capilar es desconocido. No se sabe si la angiopoyetina-2 y su receptor, así como la ausencia VEGF están involucrados. Es interesante, que esa regresión capilar sea contemporánea con la pérdida de trofoblastos en la superficie vellosa y la reducción de

macrófagos en el estroma fibrosado, siendo ambos procesos ricas fuentes de VEGF.

Otro punto importante que ocurre durante la gestación, es la remodelación de la microcirculación de la decidua por el trofoblasto (Jaffe y cols., 1998). El citotrofoblasto coloniza las arterias espirales donde desplazan a las células endoteliales maternas. Este citotrofoblasto endovascular convierte los vasos maternos de ser de alta resistencia y baja capacidad, a ser de baja resistencia y alta capacidad (Khong TY y cols., 1986). Esta remodelación de las arterias espirales se inicia a final del primer trimestre y finaliza entre la semana 18-20.

1.2.2.2.3 Prevalencia de angiogénesis no ramificada (semanas 24 a 25 postconcepción hasta el momento del término)

Desde la semana 25 hasta el término de la gestación, los patrones de crecimiento vascular veloso cambian desde la angiogénesis prevalentemente ramificada hacia la no ramificada. Esto es debido al desarrollo de nuevos tipos de velosidades, las denominadas velosidades maduras intermediarias que se agregan a las ya existentes. El análisis de los marcadores de proliferación en este estadio revela una disminución relativa de la proliferación trofoblástica e incremento de la proliferación endotelial a lo largo de la extensión de esas estructuras, lo que produce angiogénesis sin gemación por elongación proliferativa. Por tanto, esta angiogénesis no ramificada es debido a la proliferación de la célula endotelial (Mayhew 2002).

Esos capilares enrollados protruyen en la superficie del trofoblasto y contribuyen a la formación de las velosidades terminales, cada una de las cuales está provista por 1 o 2 rollos de capilares y está cubierta por una capa extremadamente delgada de trofoblastos, que contribuyen a las membranas sincitiovasculares. Estos son los principales lugares de intercambio difusional de los gases entre la madre y el feto.

Con el avance de la gestación, los capilares terminales se dilatan focalmente formando grandes sinusoides de más de 40 μm de diámetro, que se cree se contraponen a los efectos adversos de los largos y escasamente ramificados

rollos capilares, sobre la impedancia vascular fetoplacentaria total.

Reynolds y Redmer 1995, observaron que la densidad vascular del tejido placentario materno, va aumentando lentamente a lo largo de la gestación, sin embargo, la densidad vascular del tejido placentario fetal permanece relativamente constante a lo largo de la gestación, e incrementa dramáticamente en el tercer trimestre en asociación con el importante crecimiento fetal. Estos patrones de angiogénesis placentaria, coinciden con los patrones de flujo a nivel uterino y umbilical, de tal forma, que a final de embarazo, el flujo umbilical se incrementa de forma más rápida que el flujo a nivel de arterias uterinas.(Reynolds y Redmer 1995).

1.2.2.2.4 La discordancia temporal entre la variación en el oxígeno y el cambio morfológico

En estadios tempranos y tardíos de la gestación es necesario proteger el feto de los efectos potencialmente perjudiciales de las altas presiones de oxígeno, el desarrollo y remodelado de la vasculatura fetoplacentaria puede ser parte de esa protección. Resulta claro que existe un desfase de tiempo de aproximadamente 2 meses entre el aumento de los niveles de la pO_2 intervillosas y los índices de perfusión por un lado y los cambios morfológicos que son cualitativamente y cuantitativamente evidentes por el otro. Los niveles de oxígeno aumentan tras la semana 12, mientras que los cambios efectivos de la vascularización periférica se hacen aparentes aproximadamente entre las 20 a 25 semanas. Este escenario permite la posibilidad de que los factores de crecimiento angiogénico no sean los únicos factores que regulen y dirijan el desarrollo de las vellosidades y la angiogénesis. Quizá la formación de las primeras vellosidades intermediarias maduras requiera señales adicionales y distintas de las de los factores de crecimiento que dependen del oxígeno. Por lo menos para las terminales vellosas, existe evidencia de que su desarrollo es afectado directamente por los niveles de oxígeno, la elongación de los capilares y probablemente por los factores de crecimiento angiogénicos.

A pesar de que el desarrollo y remodelación de la placenta es conocida, los

mecanismos reguladores que controlan estos procesos vasculares no son bien conocidos. Existen cada vez más evidencias de que la aberración o alteración de la función del sistema vascular contribuyen al desarrollo de diversas situaciones patológicas durante la gestación.

1.2.2.3 Angiogénesis e hipoxia

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 oxígeno y glucolisis anaerobia, situaciones que podemos objetivar con el estudio doppler en vasos umbilicales y cerebral media y con la toma del EAB de sangre de cordón al nacimiento.

Dos patologías en gestaciones humanas, HIE y CIR, constituyen dos modelos de hipoxia por insuficiencia placentaria. 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.

En general, la angiogénesis se estimula por situaciones de hipoxia, como son el crecimiento de un tumor o en la retinopatía diabética. Observando el desarrollo placentario, que se produce en un ambiente con bajos niveles de oxígeno, podemos especular, que bajos niveles de oxígeno, podría servir para estimular la producción de sustancias angiogénicas. La presión de oxígeno en el citotrofoblasto, dependerá de la localización en la placenta así como de la edad gestacional. Así en un trabajo realizado por Rodesch y cols., 1992, se observa que la presión de oxígeno en el lado vellositario fetal, es menor (18mm Hg) en comparación con el lado materno de la placenta (40mmHg), entre la 8-10 semana de gestación, pero aumenta hasta 60mmHg cuando la sangre materna penetra en el espacio intervelloso (tras la semana 12). Así se podría hipotetizar que la presión local de oxígeno controla la actividad necesaria por parte del citotrofoblasto, para la remodelación

vascular, presentando este un papel importante en la reconstitución de la estructura uterina vascular.

Se ha visto que la red capilar fetal se adapta a la hipoxia asociada a las pacientes fumadoras (Khong TY y Mott C 1993), a las altitudes (Mayhew y cols., 2003) y a la anemia materna. En general, la capacidad de difusión se mantiene principalmente por la reducción en el grosor de las membranas vellositarias, aumentando el volumen capilar (Reshetnikova y cols., 1995) y/o la densidad de superficie y longitud (Mayhew y cols., 2003).

Diferentes morfologías de las vellosidades placentarias han sido descritas en relación con el tipo de hipoxia. Así la estructura de las vellosidades observadas en CIR por hipoxia materna o en situaciones de altitud se caracteriza por un aumento de la angiogénesis ramificada y una disminución de la resistencia vascular (Ali y cols., 1996, Kingdom y Kaufmann 1997). Sin embargo, las placentas de los CIR severos caracterizados por ausencia de onda diastólica en arteria umbilical y aumento de las resistencias se ven asociadas con un aumento de la angiogénesis no ramificada (Ahmed y Perkins 2000, Kingdom y cols., 2000).

Se ha visto que un determinado número de genes inducidos por la hipoxia y sus productos proteicos participan en la angiogénesis y vasculogénesis. Entre los factores más importantes estimulados por la hipoxia se encuentran el VEGF y el PIGF.

1.2.2.3.1 VEGF e hipoxia

El VEGF es uno de los factores estimulados por la hipooxigenación tisular. A pesar de que la expresión del VEGF mRNA se ve influenciada por distintos factores de crecimiento y citocinas, parece que la hipoxia tisular es el mayor factor que estimula un aumento de VEGF (Taylor y cols., 1997). Los resultados de la expresión del VEGF y sus receptores en respuesta a la hipoxia son contradictorios (Ahmed y Perkins 2000, Khaliq y cols., 1999). Trollman y cols., 2003, realizan un estudio cuyo objetivo era valorar la influencia de la hipoxia aguda en el complejo VEGF(VEGF, flt-1, KDR) a nivel placentario, tanto in vitro en células BeWo (células de coriocarcinoma

trofoblástico humano) como in vivo en nacimientos con asfixia en comparación con pacientes control, siendo sus criterios de inclusión, pacientes > 36 semanas, pH de cordón < 7.10 y un exceso de bases de $\geq 10\text{mEq}$. Los resultados que se encontraron in vitro, fueron un aumento del VEGF dentro de las 12h desde el inicio de la hipoxia siendo mayor el aumento a las 24h, los receptores KDR y flt-1 aumentaron significativamente, pero no antes de las 24h. In vivo, se observó en partos que al nacimiento sufrieron asfixia, un aumento significativo en aquellos que sufrieron una asfixia severa de VEGF y KDR en comparación con los que tuvieron una asfixia leve no siendo significativo la diferencia de flt-1 entre ambos grupos. En gestaciones con HIE, considerada una situación de hipoxia crónica, observaron un aumento tanto del VEGF, como de los 2 receptores, por tanto el sFlt-1 sólo se veía aumentado en situaciones de hipoxia crónica.

Gerber y cols., 1997 demostraron un aumento del receptor flt-1 estimulado por la hipoxia en las células endoteliales de la vena umbilical, no siendo significativo el aumento del receptor KDR. Observaron que la diferencia entre ambos receptores, es que el gen del flt-1 presenta una región que es estimulada por el factor hipoxia inducible (HIF) en situaciones de hipoxia, que el receptor KDR no presenta.

Otros autores (Brogi y cols., 1996, Waltenberger y cols., 1996) encontraron un aumento significativo del receptor KDR no siendo significativo el aumento del flt-1 en las células endoteliales de la vena umbilical. La diferencia entre los tejidos utilizados, las distintas condiciones experimentales pueden ser la causa de la diferencia en los resultados (Waltenberger y cols., 1994).

El exceso de sFlt-1 puede ser secundario a la isquemia placentaria. Estudios in vitro, han demostrado que el citotrofoblasto produce un aumento de sFlt-1 cuando existe una reducción de oxígeno (Nagamatsu y cols., 2004).

Se ha observado que en condiciones de hipoxia, el VEGF es fuertemente inducido por el HIF (Pugh y Ratcliffe 2003) (figura 6). El aumento de este factor en placentas de pacientes con HIE da mayor consistencia a esta hipótesis (Rajakumar y cols., 2003). Así que la isquemia placentaria, podría conducir a un aumento del sFlt-1 el cual antagoniza la actividad angiogénica

de VEGF y PlGF.

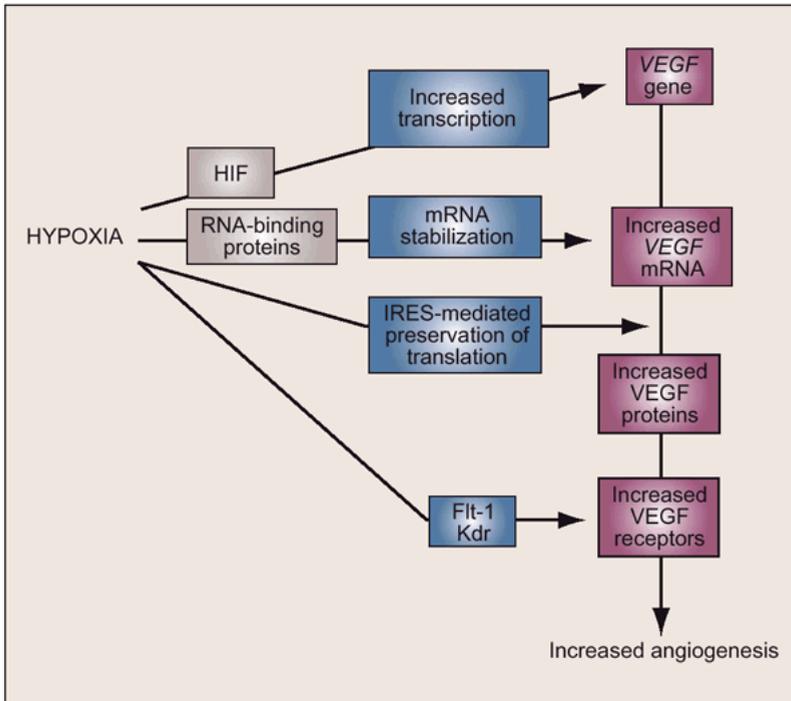


Fig 6: Inducción del VEGF ante situación de hipoxia por el HIF (Pugh y Ratcliffe 2003).

1.2.2.3.2 PIFG e hipoxia

Uno de los factores reguladores del PIFG es el oxígeno. La hipoxia disminuye la expresión de PIFG en el trofoblasto (Ahmed y Perkins 2000, Lash y cols., 2002), sin embargo parece aumentarlo en cultivo de fibroblastos (Green y cols., 2001) en células de glioma y en la isquemia de los miocardiocitos de ratones normales (Carmeliet y cols., 2001). La hiperoxemia aumenta el PIFG en el trofoblasto (Ahmed y Perkins 2000) y en las células ganglionares de la retina (Simpson y cols., 1999). La explicación molecular del efecto del oxígeno sobre este factor no está clara.

En gestaciones normales, los niveles de PIFG aumentan significativamente desde el primer trimestre hasta el final del segundo trimestre y a partir de la

semana 28-30 empieza a disminuir (Torry y cols., 1998). Varios estudios han demostrado que los niveles de PIGF en las mujeres con HIE son significativamente menores que aquellos en mujeres con gestaciones normales (Taylor y cols., 2003, Torry y cols.,1998). Se piensa, que la disminución del PIFG en la HIE es debido a la hipoxia que ocurre durante la HIE (Torry y cols., 1998).

1.3 HIE

1.3.1 Introducción

Algunos autores, describen la HIE como un proceso con dos estadios (Roberts y Cooper 2001, Roberts 2000): el primer estadio, asintomático, se caracteriza por una placentación anormal, seguido por la formación a partir de la placenta de determinados factores solubles que entran en la circulación materna y consecuentemente producen disfunción endotelial (Roberts y cols., 1989). El segundo estadio se caracteriza por hipertensión y proteinuria, clínica materna en la HIE.

Por otro lado, en la HIE también existirá un síndrome fetal, a consecuencia de la inadecuada placentación y perfusión, dando lugar a una restricción del crecimiento, disminución del líquido amniótico y oxigenación anormal.

La HIE ocurre en presencia de placenta, con o sin feto, como es en el caso de la mola hidatiforme, consecuentemente, la única solución para un tratamiento con éxito es el alumbramiento de la placenta, lo que puede conducir a una importante morbilidad para el recién nacido, incluso su muerte . (Page y cols., 1939).

Aunque existen múltiples clasificaciones, nosotros utilizaremos la establecida por el Programa Nacional para Educación e Hipertensión del Instituto Nacional de Corazón, Pulmón y Sangre, en colaboración con el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG) que se publicó en 1990 y que ha sido actualizada en 2000 .

La clasificación incluye los cuatro tipos de hipertensión en el embarazo:

1) Hipertensión crónica: es una hipertensión que se detecta antes del embarazo o antes de la semana 20 del mismo y/o persiste a la 12 semana tras el parto.

2) Preeclampsia (HIE), eclampsia: se define como el hallazgo, después de la semana 20 de embarazo (salvo embarazo múltiple, enfermedad trofoblástica o hidrops) de hipertensión más proteinuria. Eclampsia es la ocurrencia de convulsiones en una paciente con preeclampsia que no pueden ser atribuidas a otras causas.

3) Hipertensión crónica con preeclampsia sobreañadida: se define como aparición o aumento súbito de proteinuria, o súbito aumento de la hipertensión, o desarrollo de Síndrome HELLP, en gestante con hipertensión crónica.

4) Hipertensión gestacional: es una hipertensión sin proteinuria, que desaparece dentro de las 12 semanas primeras tras el parto y se denomina también hipertensión transitoria. Una hipertensión sin proteinuria que persiste tras 12 semanas postparto es una hipertensión crónica.

Definimos hipertensión como una presión arterial sistólica igual o superior a 140 mm Hg o diastólica de 90, determinadas en dos ocasiones separadas de cuatro a seis horas, excepto en los casos que cumplen criterios de hipertensión grave tal como los definiremos.

Proteinuria se define como la existencia de 300 mg o más de proteínas en orina de 24 horas, que se suele correlacionar con 30 o más mg/dl en una muestra aislada. Si se utilizan tiras reactivas esta concentración se corresponde, aproximadamente, con $\Rightarrow 1+$. Existe un acuerdo generalizado en recomendar el diagnóstico de proteinuria en orina de 24 horas.

La HIE siempre es potencialmente peligrosa para madre y feto, pero son signos de especial gravedad y se considerará que se trata de una HIE grave si se da uno o más de los siguientes criterios:

- Tensión arterial de 160 y/o 110 mmHg o más.
- Proteinuria de 2 gr o más en 24 horas. La proteinuria deberá ocurrir por primera vez en el embarazo y regresar tras el parto.
- Creatinina sérica mayor de 1,2 mg/dL.

- Menos de 100.000 plaquetas/mL o bien anemia hemolítica con microangiopatía.
- Enzimas hepáticas elevadas por encima de los niveles normales del laboratorio.
- Cefalea, alteraciones visuales o dolor epigástrico.
- Hemorragia retiniana, exudado en fondo de ojo o papiledema.
- Cianosis o edema pulmonar.

1.3.2 Incidencia

La HIE es, a pesar de los avances en el conocimiento y la práctica médica, guías clínicas y conducta basada en la evidencia científica, una de las principales causas de morbi-mortalidad materna y perinatal (Sibai y cols., 2005, Magee y cols., 1999).

Los estudios realizados en diferentes centros a nivel mundial, han mostrado una gran disparidad en cuanto a la incidencia de los EHE (estados hipertensivos del embarazo). Es de destacar la baja incidencia observada en nuestro país en relación a la observada en países del área anglosajona. Así, en estos últimos se ha informado de una prevalencia de hipertensión crónica del 1 al 5% y una incidencia de HIE en nulíparas de entre el 10 y el 20%. En España, aunque también existen notables diferencias entre diferentes centros, tanto la prevalencia de hipertensión crónica como la incidencia de HIE son bajas. Así Comino en 1986 publicó el resultado de un estudio multicéntrico en el que se incluyeron 70073 partos procedentes de 23 hospitales españoles, observando una frecuencia global de EHE del 2,23%, de los cuales el 1,1% correspondían a HIE, el 0,4% a hipertensión crónica, el 0,3% a hipertensión crónica más HIE sobreañadida y el 0,5% a hipertensión transitoria. Más recientemente, el mismo autor ha publicado los resultados de un estudio poblacional que recoge la mitad de los partos asistidos en Andalucía durante 1991(Comino y cols., 2000). La frecuencia global de EHE durante este período no difirió significativamente de la observada en el estudio anterior, siendo del 2,59%.

Al considerar la HIE como causa de muerte, ésta representa el 19.65% de las

muerter (4024 muerter en gestantes en USA, datos extraídos del CDC) de edad gestacional mayor de 20 semanas. El perfil de la mortalidad en mujeres con HIE es: edad avanzada, gestación entre las 20 a 28 semanas, después del primer hijo, sin cuidados prenatales o escasos, raza negra. Las causas de muerte fueron principalmente: eventos cerebrovasculares 38.7% (de ellos la hemorragia fue mayoritaria, 34.7%), fallo renal o hepático 12.5%, HELLP 7.1% otras complicaciones de la hipertensión 25.7%, no especificadas 15.9% (Sibai y cols., 2005).

1.3.3 Factores de riesgo

El antecedente de HIE en una gestación anterior es un factor de riesgo importante. Una revisión realizada por Duckitt y Harrington 2005, observa que el riesgo relativo de HIE en mujeres con antecedentes, es de 7,19 en comparación con las gestantes sin antecedentes. Cuanto más precoz y severa es la HIE mayor es el riesgo, se han publicado hasta una incidencia de 25-75% en estas mujeres (Sibai y cols., 1986, Van Rijn y cols., 2006). La incidencia en las mujeres con leve HIE en el anterior embarazo es de 5-7% comparado con una incidencia de menos del 1% en mujeres con TA normal en el primer embarazo (Campbell y Mc Gillirray 1985).

Existe mayor riesgo en las primigestas (Duckitt y Harrington 2005), aunque no está claro porque la primigravidad sea un factor de riesgo tan importante.

Antecedentes familiares de HIE, también están asociados con incremento del riesgo (Duckitt y Harrington 2005), sugiriendo un mecanismo hereditario en algunos casos (Nilsson y cols., 2004).

La diabetes pregestacional, también incrementa el riesgo de HIE (Duckitt y Harrington 2005), probablemente relacionado a otros factores como la enfermedad renovascular, niveles elevados de insulina en plasma o alteración en el metabolismo de los lípidos.

Las gestaciones múltiple también presentan mayor riesgo. Para una gestación gemelar, el riesgo relativo es de 2,93 (95% 2.04-4.21) (Duckitt y Harrington 2005) siendo el riesgo mayor a mayor número de fetos.

La obesidad también es un factor de riesgo claramente establecido.

La presencia de HTA preexistente, enfermedad renal, alteraciones del colágeno vascular, han sido descritos como factores de riesgo.

El síndrome antifosfolipídico, ha sido asociado con múltiples complicaciones incluyendo HIE, pérdida fetal y trombosis materna (Stella y cols., 2006). La evidencia actual, indica que las trombofilias hereditarias no están asociadas con mayor riesgo de HIE.

La edad materna avanzada es un factor de riesgo independiente (edad materna ≥ 40 RR 1.96, 95% CI 1.34-2.87 para mujeres multíparas) (Duckitt y Harrington 2005). Además, las mujeres mayores, tienen factores de riesgo adicionales como, diabetes, HTA crónica.

1.3.4 Pronóstico

El resultado materno y perinatal en la HIE depende de una o varias circunstancias: edad gestacional al inicio, severidad de la enfermedad, manejo de la misma y la presencia de enfermedades maternas pre-existentes (Sibai y cols., 2005).

En general, a mayor precocidad en la presentación, peor pronóstico (Douglas y Redman 1994). Una aparición de HIE antes de la semana 24 ($n = 26$), se asoció con un 65% de complicaciones maternas mayores: muerte materna ($n = 1$), HELLP ($n = 16$), eclampsia ($n = 5$) y edema pulmonar ($n = 4$). El 30% de estas pacientes ya presentaron al ingreso morbilidad severa. La mortalidad perinatal fue del 82% (19 muertes fetales y 4 neonatales) (Sibai y cols., 2005). Cuando se siguió una conducta expectante, otro 35 % desarrollo morbilidad severa (Gaugler-Senden y cols., 2006).

En un estudio de 453 gestaciones consecutivas, complicadas tras HIE o HELLP, se observa que a mayor severidad de éstas, ya sean por criterios clínicos o biológicos, mayor riesgo de desarrollar complicaciones (Sibai y cols., 2005). Las pacientes en las que existen patologías previas, hipertensión crónica, trombofilias, etc., tienen un mayor porcentaje de complicaciones y éstas son mas severas que en las pacientes con HIE que no tenían estas complicaciones previas (Sibai y cols., 2005).

1.3.5 Fisiopatología

Un adecuado desarrollo placentario, requiere que el citotrofoblasto invada las arterias espirales maternas. Como ya hemos dicho, esta remodelación de las arterias espirales se inicia al final del primer trimestre y finaliza entre la semana 18-20 y el resultado supone una sustitución del endotelio y de la túnica muscular media (Robertson y cols., 1967, Gerretsen y cols., 1981). La invasión del trofoblasto, supone cambios en la expresión de ciertas citocinas, moléculas de adhesión, moléculas de la matriz extracelular, metaloproteinasas, el complejo mayor de histocompatibilidad Ib y el antígeno leucocitario de histocompatibilidad (HLA-G). Por tanto, el término pseudovasculogénesis representa una transformación de características epiteliales (ej en las moléculas de adhesión de las integrinas α_6/β_4 α_V/β_5 y E-caderinas) a endoteliales (ej integrinas α_1/β_1 α_V/β_3 , células de adhesión endotelial y plaquetarias y VE-caderinas) (Zhou y cols., 1997). En esta transformación van a estar participando un gran número de factores de transcripción, factores de crecimiento y citocinas (Zhou y cols., 2003, Red-Horse y cols., 2004). En las mujeres destinadas a desarrollar HIE, la invasión citotrofoblástica endovascular permanece superficial llevando a una deficiente circulación útero-placentaria y una subsecuente isquemia placentaria (Brosens y cols., 1972). Esto es evidente en la descripción macroscópica de las placentas de pacientes con HIE (De Wolf y cols., 1975, Khong y cols., 1986). La biopsia de estas placentas, también demuestran unos vasos estrechos y constrictos, como resultado de la insuficiente invasión trofoblástica (Robertson y cols., 1967, Gerretsen y cols., 1981). Las pacientes que están predispuestas a una insuficiencia vascular, como las diabéticas, trombofilias o hipertensas crónicas, tienen mayor riesgo de HIE (Dekker 1999). Las pacientes con un aumento de la masa placentaria y menor flujo placentario presentan también mayor riesgo (Dekker 1999). A pesar de que se han descrito muchas teorías sobre la insuficiente invasión trofoblástica, incluyendo la medioambiental, la genética (Lachmeijer y cols., 2002), factores inmunológicos (Saito y cols., 1999) la principal causa de la insuficiente invasión trofoblástica aún es desconocida.

La teoría de que factores inmunológicos pueden contribuir en la fisiopatología de la HIE se basa en parte en el hecho de que la exposición previa de los antígenos paternos pueden proteger frente a la HIE. En un estudio realizado a 1011 gestantes, la incidencia de la hipertensión fue aproximadamente 12% entre las primigestas, 5% entre las multigestas de una misma pareja y un 24% en las pacientes multigestas con una nueva pareja. Además el tiempo de convivencia sexual previo a la concepción, es inversamente proporcional al riesgo de HIE, sugiriendo, que la exposición prolongada a los antígenos del esperma paterno, puede ser protector (Robillard y cols., 1994).

Por otro lado, las células del trofoblasto, expresan una combinación de antígenos de la clase HLA I: HLA-C, HLA-E y HLA-G. Las células natural Killer (NK), que expresan varios receptores (CD94, KIR, ILT) reconocen a las moléculas de clase I, infiltrando la decidua materna, estando en contacto con las células del trofoblasto (Loke y King 2000). Se ha hipotetizado que la interacción entre las células NK y las células del trofoblasto controla la implantación placentaria. En la HIE se cree que la incompatibilidad entre los genes de la madre y el padre induce alteración en la implantación a través de un aumento en la actividad de las células NK. Aunque existe aun un déficit de evidencia en esta teoría. Estudios genéticos en busca de polimorfismos en los receptores inmunoglobulin Killer (KIR), en las células maternas NK y en el haplotipo fetal HLA-C, sugieren que mujeres con genotipo KIR-AA y fetal HLA-C2 tienen mayor riesgo de HIE (Hiby y cols., 2004). En una revisión sistemática realizada por Saftlas y cols., 2005, no se encontró evidencias de que uno o varios alelos HLA específicos estuvieran envueltos en la patogénesis de la HIE. Sus autores sugieren que la interacción entre los HLA maternos, paternos y fetales, más que un genotipo aislado, es probablemente un factor importante a considerar en el estudio de factores inmunogenéticos determinantes de HIE. Por otro lado, se ha observado que la producción materna de autoanticuerpos que activan el receptor de la angiotensina II AT1 puede producir un aumento del activador del plasminógeno 1, produciendo una invasión trofoblastica más superficial, similar a la vista en la HIE (Xia y cols., 2003).

Aunque muchos casos de HIE son esporádicos, se piensa, que los factores genéticos pueden tener un papel en la susceptibilidad de presentar la enfermedad. La predisposición genética para el desarrollo de la HIE se sospecha, en primer lugar, porque las mujeres primigestas con historia familiar de HIE, tienen de 2 a 5 veces mayor riesgo de desarrollar HIE que las primigestas sin historia familiar (Skjaerven y cols., 2005). La contribución materna para el desarrollo de HIE se puede explicar parcialmente por la impronta genética. En un estudio realizado en hermanas con HIE, se demostró que la madre desarrollaba HIE cuando el feto heredaba una mutación genética (10q22). Cuando el feto presentaba el homólogo paterno, la enfermedad no se desarrollaba (Van Dijk y cols., 2005). Por otro lado, las esposas de hombres que fueron producto de un embarazo complicado por HIE, tienen mayor probabilidad de desarrollar HIE que aquellas mujeres cuyos maridos no presentan este antecedente (Skjaerven y cols., 2005). Estos datos sugieren que la contribución tanto materna como paterna a la genética fetal, puede tener un papel en la alteración de la placentación y en consecuencia, el desarrollo de HIE. Varios genes como la variante del gen de la angiotensina (T235), genes que producen trombofilia entre otros, han sido relacionados con la HIE, pero grandes estudios, no han demostrado que sean importantes para la susceptibilidad de la enfermedad (Lachmeijer y cols., 2002).

Tuohy y James 1992 , encontraron una relación entre HIE y trisomía 13. Los genes para el sFlt-1 y el Flt-1 se encuentran en el cromosoma 13. Los fetos con una copia de más de este cromosoma debería teóricamente producir más productos de este gen que en un feto normal. La incidencia de HIE en pacientes con fetos portadores de trisomía 13 está aumentada en comparación con otras trisomías o con gestantes control (Tuohy y James 1992). Bdoлах y cols , 2006 comprobaron un aumento del ratio sFlt-1/PIFG en estas mujeres.

A pesar de estos estudios genéticos, el mecanismo de la placentación anómala es aun desconocido.

Existen estudios de laboratorio que sugieren que las variaciones en los

niveles de oxígeno pueden regular la invasión trofoblástica (Genbancev y cols., 1996, Roberts y cols., 1992). Más recientemente se ha descrito el factor hipoxia-inducible, que se encuentra elevado de forma selectiva en las placentas con HIE (Jaffe R, 2000, Mayhew y cols., 2003).

La isquemia placentaria puede tener un papel en la fisiopatología de la HIE, ya que las gestantes con enfermedades de base que las predisponen a una insuficiencia vascular como son la HTA crónica, diabetes, lupus.. tienen mayor riesgo de desarrollar HIE. Además, situaciones obstétricas, en las que se produce un aumento de masa placentaria con una disminución relativa de flujo, como son la mola hidatiforme o el hidrops fetal, también tienen mayor riesgo de HIE (Dekker 1999).

La hipoperfusión placentaria se hará más pronunciada a medida que progresa la gestación, porque los vasos uterinos anormales serán incapaces de acomodarse a la llegada del flujo de sangre. Los cambios que se producirán en la placenta a final de la gestación será de aterosclerosis, necrosis fibrinoide, trombosis, las arteriolas se estrechan y finalmente se produce infarto placentario. Aunque estas lesiones no se encuentran en todas las pacientes con HIE, parece que existe una correlación entre la extensión de estas lesiones y la gravedad de la enfermedad (Salafia y cols., 1998).

Aunque probablemente la hipoxia está presente en las pacientes preeclámpticas, no está claro, si es un fenómeno primario o secundario (Salafia y cols., 1997). Se piensa, que la alteración de la placentación acompañada por la hipoxia conduce a la síntesis de factores solubles, citocinas, u otros factores proinflamatorios, que actúan en la circulación materna, induciendo la disfunción endotelial y la clínica de HIE.

1.3.5.1 Disfunción del sistema endotelial

Muchos estudios, han indicado, que la disfunción endotelial generalizada es la causa de la clínica en la HIE (Roberts y Cooper 2001). Específicamente, se pierde el control endotelial del tono vascular, dando lugar a hipertensión, aumento de la permeabilidad vascular glomerular produciendo proteinuria y alteración de la expresión endotelial de los factores de coagulación (Lam y

cols., 2005). Además la vasoconstricción y en consecuencia la isquemia, puede producir disfunción a nivel hepático. La biopsia renal de pacientes con HIE muestran una célula endotelial glomerular edematizada, conocido como endoteliosis glomerular (Fisher y cols., 1981). Se ha visto que en el suero de las pacientes con HIE existen marcadores de daño endotelial, como incremento de fibronectina, antígeno del factor VIII y trombosmodulina (Friedman y cols., 1995, Taylor y cols., 1991). Se ha descrito también en pacientes preeclámpticas, mayor sensibilidad a la angiotensina, mayor síntesis de endotelina y tromboxanos y menor producción de los vasodilatadores derivados del endotelio, como el NO y las prostaciclina (Mills y cols., 1999, Clark y cols., 1992).

Recientes estudios sugieren que su fisiopatología podría estar relacionada con alteración de los niveles angiogénicos, aunque existen grandes controversias entre ellos.

Lee y cols., 2007, comparan los niveles de VEGF_t, free y su receptor sFlt-1 en gestaciones con HIE con gestaciones control y obtienen que los valores de VEGF_t y sFlt-1 son significativamente mayores y los de VEGF_f menores que en las gestaciones sin patología. Además encuentran una correlación positiva entre el VEGF_t y sFlt-1 con TA sistólica y diastólica, siendo negativa con el VEGF_f.

Trollman y cols., 2003, refieren un aumento tanto de VEGF como de sus receptores flt-1 y KDR a nivel placentario en gestantes con HIE, en comparación con gestaciones control.

Maynard y cols., 2003, observan que el aumento de sFlt-1 durante el embarazo, se ve asociado con una disminución del VEGF_f y de la PIGF. Estudios realizados in vitro, indican que el estado antiangiogénico en las gestantes con HIE, inducido por el exceso de sFlt-1, podría ser “rescatado” administrando VEGF y PIFG (Maynard y cols., 2003). La transferencia de un gen exógeno de sFlt-1 en ratas embarazadas a través de un vector adenovirus, produce en ellas hipertensión, proteinuria y endoteliosis glomerular, la lesión renal clásica de la HIE (Maynard y cols., 2003). Esto también se observó en las ratas no gestantes, sugiriendo que el efecto del

sFlt-1 sobre la circulación materna es directo y no depende de la presencia de la placenta. Cuando a las ratas gestantes se les dio una forma de receptor 2 antagonista (sFlk-1), el cual no antagoniza al PlGF, no desarrollaron el fenotipo preecláptico, indicando que es necesario antagonista frente al VEGF y al PlGF para reproducir el síndrome materno (Maynard y cols., 2003). Estos datos sugieren que el exceso de sFlt-1 producido por las placentas preeclápticas, da lugar a una disminución de VEGF y PlGF, creando un estado antiangiogénico y dando lugar a la hipertensión y proteinuria característica visto en la HIE (Maynard y cols., 2003). Lu y cols., 2007, realizan un estudio similar en ratas, obteniendo además un descenso de las plaquetas en aquellas ratas a las que se les transfiere el gen exógeno de sFlt-1 y retraso de crecimiento en los fetos.

Por otro lado, se ha visto que los pacientes oncológicos, que reciben sustancias antagonistas del VEGF, desarrollan hipertensión y proteinuria (Kabbavar y cols., 2003).

No existe unanimidad en cuanto a resultados en los distintos estudios que relacionan estos factores con la HIE y CIR, así en HIE se pueden encontrar estudios en los que el VEGF se encuentra aumentado respecto a gestaciones normales (Helske y cols., 2001, Vuorela y cols., 2000, Bosio y cols., 2001, Simmons y cols., 2000, Wathen y cols., 2006, Chainworapongsa y cols., 2004), otros estudios lo encuentran disminuido (Zhou y cols., 2002) y en otros se observa un aumento del sFlt-1 con disminución de la fracción libre (Maynard y cols., 2003, Lee y cols., 2007). En los estudios de CIR, se observan mayores discrepancias, así algunos estudios encuentran el VEGF aumentado (Helske y cols., 2001), en otros no cambia (Vuorela y cols., 2000, Lash y cols., 2001) o está disminuido (Regnault y cols., 2002) y en otros observan además un aumento del sFlt-1 (Savvidou y cols., 2006).

Las discrepancias en las determinaciones de VEGF y su patrón son atribuibles a que según la técnica utilizada, se detecta forma libre o total, no se tienen en cuenta las proteínas secuestradoras de VEGF (Alfa-2-Macroglobulina (A2M), sFlt-1), no se especifican las isoformas y sobretodo no se tiene en cuenta la contaminación por el VEGF almacenado en

plaquetas (Jelkmann y cols., 2001). Además, existen diferencias metodológicas: tipo de VEGF estudiado (expresión: localización e intensidad de la señal, VEGF m-RNA, isoformas, receptores, etc.), tejidos utilizados, diferencias interespecies, determinación de fracción libre o total o si el sustrato para determinación del VEGF circulante es suero o plasma.

Como ya hemos dicho, la HIE se caracteriza por una disfunción endotelial generalizada. Ness y Roberts 1996, proponen que el endotelio es el punto de convergencia de las causas maternas y placentarias de la HIE y que los factores de riesgo que están asociados con la HIE, probablemente tengan efecto directo sobre la integridad del endotelio. Yogev y cols., 2004, demuestran en pacientes con diabetes gestacional que la incidencia de HIE, se ve influenciada por la severidad de la diabetes, condición asociada a la disfunción endotelial y que mejorando los controles glucémicos durante la gestación, se puede disminuir dicha incidencia. Por otro lado, las mujeres que han desarrollado HIE durante la gestación, presentan mayor riesgo de desarrollar un síndrome metabólico (Innes y cols., 2005). Este incremento del riesgo puede no ser debido por la HIE en sí pero puede estar reflejando, que las pacientes que tienen factores de riesgo vasculares, tienen mayor probabilidad de desarrollar HIE. Levine y cols., 2005, hipotetizan y demuestran, que las mujeres con probable lesión endotelial, presentan un aumento de la TA en segundo trimestre y son susceptibles a desarrollar HIE con niveles más bajos de sFlt-1, que aquellas mujeres cuyo endotelio es relativamente normal y que necesitan mayores niveles de sFlt-1 para desarrollar HIE. Ya que parte de la disminución de la tensión arterial durante el embarazo se atribuye a los cambios hemodinámicos, entre los que forma parte la remodelación uteroplacentaria, el fallo de esta remodelación puede ser la causa de este aumento de TA que se produce antes de la aparición de hipertensión y proteinuria. En el estudio realizado por Levine 2005, las mujeres que presentaban HIE con valores elevados de sFlt-1, no presentaban este incremento de la TA en el segundo trimestre, solo las que presentaban valores de sFlt-1 bajos, siendo esto difícil de explicar, a no ser que la remodelación uteroplacentaria solo falle en aquellas pacientes con niveles

bajos de sFlt-1, o que el aumento de TA a mitad trimestre fuera producido por un mecanismo diferente. Por otro lado Xiong y cols (2000, 2002), demuestran que muchas mujeres con HIE, tienen hijos con peso adecuado incluso con mayor peso para la edad gestacional, lo que sugiere la presencia de un sistema vascular uteroplacentario normal en muchas mujeres con HIE.

Lo que permanece incierto, es el mecanismo por el cual la placenta produce un exceso de sFlt-1, el papel que juega el sFlt-1 en la placentación normal, la relación que presenta el sFlt-1, PIFG y el VEGF y los factores de riesgo conocidos para la HIE.

Por el hecho de que no se han descrito en los animales tratados con sFlt-1 hemólisis y trombocitopenia , características observadas en el síndrome HELLP la hipótesis que puede plantearse es que otros factores deben actuar junto con el factor soluble para causar disfunción endotelial y causar HIE severa.

La endoglina (Eng), o CD105, correceptor celular del factor de crecimiento de transformación (TGF)- β 1 y TGF- β 3 se expresa de forma importante en las células endoteliales y en el sincitiotrofoblasto y modula la acción del TGF- β 1 y TGF- β 3 (Gougos y cols., 1992, St-Jacques y cols., 1994). Se ha visto que mutaciones en el gen de la endoglina, son las causantes de enfermedades hereditarias como la hemorragia telangiectasica tipo 1 o enfermedades autosómicas dominantes como malformaciones arteriovenosas (McAllister y cols., 1994). Recientemente se ha relacionado a la endoglina con la enzima NOs, sugiriendo que la endoglina regula su actividad y el tono vascular (Toporsian y cols., 2005). Estos datos sugieren que la endoglina no solamente participa en el desarrollo cardiovascular, sino también participa en la homeostasis vascular.

El TGF- β y el VEGF, son factores cruciales en la angiogénesis. La sEng recombinante, inhibe la formación de las estructuras tubulares endoteliales in vitro al mismo nivel que el sFlt-1. Más aún, sEng potencia el efecto antiangiogénico del sFlt-1, observándose una mayor reducción en el número de capilares en presencia de ambas proteínas. Esto sugiere que el sFlt-1 y la sEng bloquean el efecto proangiogénico de los factores TGF- β 1 y VEGF. La

permeabilidad capilar está aumentada en la HIE, existiendo mayor tendencia al edema periférico y pulmonar. Así en el estudio realizado por Venkatesha y cols., 2006, valoran la permeabilidad microvascular en ratones pretratados con sFlt-1, sEng, y sFlt-1+sEng, comparándolos con ratones control, observando un aumento de la permeabilidad en los pulmones, riñones e hígado en los ratones tratados con sFlt-1 y los tratados con sEng, mostrando su asociación mayor efecto sobre el hígado, sugiriendo que estos factores actúan sinérgicamente, produciendo mayor lesión a nivel endotelial. También en el grupo de los ratones tratados con ambos factores asociados, se observa mayor proteinuria, mayores cifras de TA y mayor evidencia bioquímica de Síndrome HELLP así como mayor restricción en el crecimiento fetal.

Torry y cols., 2004, que observan valores disminuidos de PIGF en pacientes con HIE en comparación con las gestantes control, realizan un trabajo experimental para valorar si la expresión disminuida de PIFG es debido a un defecto intrínseco en la producción trofoblástica, cultivando trofoblasto aislado tanto de pacientes con HIE como pacientes control, observando que en los cultivos, el trofoblasto de las pacientes con HIE, es capaz de sintetizar niveles similares de PIFG que el trofoblasto de gestantes normales. Estos datos soportarían la idea de que es un factor extrínseco al trofoblasto el que inhibiría la expresión de PIFG. También observan que el receptor flt-1 está elevado en el trofoblasto de las pacientes con HIE. Por tanto, sus resultados, sugieren que factores extrínsecos a nivel de la interfase materno-fetal, que son desconocidos, son los responsables de la alteración en la expresión de este receptor.

El rápido declive de las concentraciones de sFlt-1 tras el parto encontrado por Maynard y cols., 2003 y Koga y cols., 2003 soporta la teoría del origen placentario del factor soluble, a pesar de que no pueden excluir al feto como una fuente adicional de este factor. Staff y cols., 2005, valoran los niveles de sFlt-1 a nivel de la circulación materna y fetal, observando que este factor está aumentado en la circulación fetal durante la HIE, pero a niveles menores que en la circulación materna, concluyendo que el feto no contribuye de forma importante a la elevación del sFlt-1 a nivel materno.

1.3.6 Factores predictores de HIE.

Parece ser, que en la fisiopatología de la HIE, un punto muy importante, es la alteración de los factores angiogénicos.

Estas anomalías en los niveles de estas proteínas angiogénicas no están solamente presentes durante la clínica de HIE sino que parece ser que también anteceden varias semanas antes de la aparición de los síntomas. Por tanto, la posibilidad de medir estos factores angiogénicos en la sangre, podrían ser una buena herramienta para el screening de HIE. La posibilidad de tener un test predictor de HIE sería una gran herramienta para la prevención de HIE.

Vamos a estudiar el comportamiento de estos factores angiogénicos durante las gestaciones con HIE.

1.3.6.1 sFlt-1

En varios estudios, se ha demostrado que el factor soluble presenta una correlación positiva con la edad gestacional y a partir de la semana 35 el aumento de este factor es mucho mayor (Maynard y cols., 2003 , Tsatsaris y cols., 2003) En un estudio prospectivo, en el cual se recogían muestras a intervalos de 4-5 semanas en gestantes sanas desde la semana 8, se observó que los valores de sFlt-1 no variaban hasta la semana 33-36, aumentando los valores a partir de este momento. En las pacientes que desarrollaron HIE el sFlt-1 empezó a estar elevado en la semana 20 (Levine y cols., 2004). En varios estudios, valoran el sFlt-1 antes de la semana 20 y se observa que no existen diferencias entre las pacientes que desarrollan HIE y las que presentaban un embarazo normal (Bowers y cols., 2004, Thadhani y cols., 2004, Unal y cols., 2007). Sin embargo Vatten y cols., 2007, en otro estudio con 30.000 gestantes, observan que entre el primer y segundo trimestre, existe una disminución del PIGF y un mayor incremento de sFlt-1 en las gestantes que desarrollan HIE en comparación con las gestantes control, pudiendo utilizar los cambios de estos factores como predictores de HIE.

Realizando un estudio entre subgrupos, se observa que no existe diferencias

entre las pacientes nulíparas y multíparas, con o sin HIE, aunque las pacientes con antecedentes de HIE, si que presentaban valores más elevados (Chaiworapongsa y cols., 2004). Sin embargo, un estudio más reciente, demostró niveles más elevados en pacientes nulíparas que en multíparas, en la misma mujer, lo que ofrece una explicación para el riesgo aumentado de HIE en las pacientes nulíparas.

Levine y cols., 2004, en un estudio valoran los niveles de VEGF_f, PIGF y su receptor sFlt-1, tanto en mujeres que desarrollan HIE como en mujeres control, obtienen que en las mujeres con HIE los niveles de sFlt-1 estaban aumentados significativamente y los niveles de PIGF disminuidos. Además, estos cambios ocurrían antes de la aparición de la enfermedad: el sFlt-1 estaba aumentado 5 semanas antes del desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, la alteración de los niveles de estos factores, fue mayor en las pacientes que desarrollaron antes la enfermedad y en las pacientes que presentaban asociado un feto pequeño para la edad gestacional.

Además, Chaiworapongsa y cols., 2004, realizan un estudio en el que se observa que además de que el sFlt-1 está aumentado en las gestaciones con HIE, éste se correlaciona con la gravedad de la enfermedad, presentando mayores concentraciones las gestaciones de inicio más precoz de la enfermedad, con mayores cifras de TA y proteinuria y menor recuento de plaquetas, así como menores pesos fetales.

A pesar de las publicaciones en las que se observa una fuerte correlación entre la presencia de niveles elevados de sFlt-1 y la presencia de HIE, muchas mujeres preeclámpticas presentan valores de sFlt-1 dentro de los rangos normales y viceversa (Powers y cols., 2005), por lo tanto, la utilidad de las concentraciones de sFlt-1 como un método de screening, permanece aún en investigación.

1.3.6.2 PIGF

En numerosos estudios, se ha demostrado una disminución del PIGF en las pacientes preeclámpticas (Maynard y cols., 2003, Levine y cols., 2004). Esto es probable, por su unión al sFlt-1 que se encuentra elevado (Maynard y

cols., 2003) más que por una disminución en su síntesis por la placenta preecláptica.

La tendencia esperada de las concentraciones de PIGF en gestaciones normales, es un aumento ininterrumpido durante los dos primeros trimestres de embarazo, con un pico máximo en semana 29-32, disminuyendo posteriormente (Levine y cols., 2004). Su disminución, se piensa que se produce por un aumento del sFlt-1 entre la semana 33-36 hasta final del embarazo y de hecho, los niveles de ambos son recíprocos, es decir, cuanto mayor son los niveles de sFlt-1 menores son los de PIGF (Levine y cols., 2004). Numerosos estudios han documentado que el descenso de PIGF se puede iniciar al principio del segundo trimestre, incluso en semana 10-11 en pacientes que van a desarrollar HIE, en comparación con las pacientes control (Levine y cols., 2004, Thadhani y cols., 2004, Torry y cols., 2003, Unal y cols., 2007). En el estudio randomizado realizado por Levine y cols 2004, se observa que los niveles de PIFG entre la semana 21 y 32, fueron menores en las pacientes con HIE de inicio más temprano (<37 semanas) en comparación con las de inicio tardío y también fueron menores en pacientes con fetos pequeños para la edad gestacional, en comparación con aquellos que presentan una tamaño adecuado para la edad gestacional (Levine y cols., 2004). También se ha observado que los niveles de PIFG son inversamente proporcionales a la gravedad de la enfermedad. Otros estudios, no confirman esta reducción de PIFG en pacientes con HIE (Livingston y cols., 2001, Ong y cols., 2001). Estas diferencias pueden ser debidas a la diferencias en las características de la población, en los distintos grados de gravedad de HIE o en el almacenaje de las muestras (Ong y cols., 2001).

Recientemente se ha explorado el PIFG urinario como otra posible herramienta para el diagnóstico de HIE (Ong y cols., 2001). Aunque el sFlt-1 es una molécula muy grande para ser filtrada por el riñón sano, el PIFG es una proteína considerablemente pequeña y de hecho se observó una disminución de su concentración en la orina de mujeres con HIE en comparación con gestantes normales (Levine y cols., 2005).

En un estudio reciente (Buhimschi y cols., 2005), se midieron los marcadores angiogénicos a nivel urinario, en mujeres con clínica de HIE. Durante la enfermedad activa, se produce la disrupción del endotelio glomerular, lo que conduce a proteinuria y una pequeña cantidad de sFlt-1 pasa a la orina. En este estudio, se observó que el sFlt-1 estaba significativamente aumentado en orina en mujeres con HIE, en comparación con las gestantes control. El PIFG, también estaba significativamente disminuido en la orina de las gestantes con HIE, en comparación con las gestantes control.

Una revisión sistemática que engloba 10 estudios que analizan el sFlt-1 y 14 estudios analizando el PIFG, concluye que los niveles de estos factores tras la semana 25 de gestación son predictores de desarrollo de HIE severa, pero no existe suficiente evidencia para recomendarlos como test de screening (Widmer y cols., 2007)

1.3.6.3 Endoglina

Además del sFlt-1 y PIFG, es probable que existan factores que actúen de forma sinérgica junto los dos anteriores en la patogénesis de la HIE.

Como ya hemos dicho previamente, la sobreexpresión de sFlt-1 en ratas, produce hipertensión proteinuria y endoteliosis glomerular, las manifestaciones clásicas de la HIE, sugiriendo que este exceso de sFlt-1 tiene un papel importante en la HIE (Maynard y cols., 2003), sin embargo, los animales tratados con sFlt-1 no desarrollan hemólisis y trombocitopenia, signos observados en el síndrome de HELLP, por tanto, se establece la hipótesis como hemos sugerido antes de que existen otros factores que actúan junto con el sFlt-1 que favorecerán la lesión endotelial, dando lugar a HIE severa.

Se ha observado, que los niveles de sEng, están aumentados de dos a tres veces en gestaciones normales, en comparación con mujeres no gestantes, sugiriendo que la sEng tiene un papel en la gestación normal (Venkatesha y cols., 2006). Además en este estudio, niveles de sEng fueron de 3 a 10 veces mayor en las mujeres con HIE que en las gestaciones normales. Las concentraciones de sEng se correlacionaban con las de sFlt-1 excepto en los

casos con síndrome de HELLP, donde los niveles de sEng eran mayores que los de sFlt-1. Los niveles de sEng, se reducían en un 70% 48h tras el parto. (Venkatesha y cols.,2006).

Levine y cols., 2006, observan que la endoglina está elevada de 2 a 3 meses antes del desarrollo de la HIE y este aumento se acompaña de un aumento del cociente sFlt-1/PIGF, pudiendo ser la combinación de estos tres factores útil para la predicción de HIE.

1.4 CIR

1.4.1 Introducción

Crecimiento fetal restringido, es el término utilizado para referirse a un feto que no ha alcanzado su potencial de crecimiento por causas genéticas o medioambientales. Este término, es inexacto para describir aquellos fetos que son pequeños constitucionalmente y que están sanos. Si lo definimos como aquel que no ha alcanzado un umbral de peso (normalmente definido como el percentil 10) el 10% de la población que se incluya serán recién nacidos pequeños constitucionalmente, pero sanos. Valorar si un feto tiene riesgo de restricción del crecimiento o si está restringido, es muy importante, ya que en estos fetos, existe una relación inversa entre el percentil del peso fetal y la mortalidad perinatal. Los fetos que mayor riesgo tienen de presentar resultados adversos son aquellos que presentan pesos por debajo del percentil 3 para la edad gestacional. Por ello, es necesario distinguir entre el feto constitucionalmente pequeño (PEG) y aquel cuyo crecimiento se restringe intraútero, por tanto estos fetos constituyen un grupo heterogéneo desde el punto de vista de la etiología, conducta y pronóstico (Gardosi y cols.,1998, Garite y cols., 2004). Los errores más frecuentes en el diagnóstico de CIR son la incorrecta datación de la edad gestacional y los fetos constitucionalmente pequeños pero sanos. El feto con CIR, es aquel que tiene una limitación del potencial de crecimiento intrínseco. Comparados con los fetos desarrollados de forma adecuada, los CIR presentan mayores tasas de muerte, asfisia al nacimiento, hipotermia, hipoglucemia, aspiración de meconio y secuelas neurológicas.

La correcta datación de la gestación es uno de los aspectos más importantes para descartar un CIR. Al principio de la gestación, la longitud cefalo-nalga (LCN) es el parámetro que nos permite estimar adecuadamente la edad gestacional. Cuando existe una discrepancia entre la LCN y la edad gestacional por fecha de última regla de más de 5 días, se debe corregir la edad gestacional de acuerdo con la biometría fetal (Robinson y Fleming 1975). Cuando la biometría no es acorde en el tercer trimestre, nunca se debe cambiar la edad gestacional. Algunos autores han propuesto otros parámetros que son dependientes de la edad gestacional pero que no se ven afectados por el CIR para datar la gestación como es el diámetro del cerebelo (Reece y cols., 1987, Goldstein y cols., 1987).

El peso fetal dependerá fundamentalmente de la interacción de estas 4 variables: la predisposición genética, el feto, la placenta y la madre. La implantación adecuada de un feto y placenta genéticamente normal en una gestante sana, tiene mayor probabilidad de dar lugar a un neonato sano. Por otro lado, si algunos de estos factores se altera es posible que de lugar a una restricción del crecimiento fetal. Por tanto, el CIR no es una enfermedad específica per se, sino que puede ser la manifestación de varias condiciones. Las causas de CIR se han subdividido tradicionalmente en causas fetales, placentarias y maternas.

1.4.2 Factores de riesgo para CIR (Bamberg y Kalache 2004).

MATERNO	PLACENTA	FETAL
Hipertensión	Patología 1ª placentaria	Cromosomopatías
Patología renal	Mosaicismo	Malformaciones congénitas
Trombofilias	Placenta previa	Infecciones
Diabetes		Gestación múltiple
Drogas/tabaco/teratógenos		

La causa más frecuente de CIR en un feto bien formado, es la enfermedad materna vascular asociada con HIE (Odegard y cols., 2000) y como consecuencia, afectación de la perfusión uteroplacentaria (Ounsted y cols., 1985).

Las causas maternas como enfermedad renal, hipertensión crónica (Ounsted y cols., 1985), enfermedad del colágeno vascular, lupus, diabetes, trombofilia o situaciones como malnutrición, tabaco o drogas, pueden contribuir aunque con menor intensidad. El mecanismo por el cual las enfermedades tromboembólicas son causa de CIR no está claro. Se ha sugerido que la mutación del gen de la protrombina puede jugar un papel importante (Kupfermine y cols., 2000).

Una vez se ha descartado cualquier tipo de enfermedad materna, se debe descartar una cromosomopatía, ya que representa una de las causas más frecuentes de CIR (Van Vugt y cols., 1991). Los fetos con anomalías cromosómicas autónomas tales como la trisomía 13, 18 y 21, frecuentemente presentan un CIR (Khoury y cols., 1988). Las alteraciones de los cromosomas sexuales, aunque frecuentemente son letales, también producen CIR en los supervivientes. El porcentaje de anomalías cromosómicas entre los CIR es 7-20% (Snijders y cols., 1993). Cuanto más precoz se diagnostica el CIR, más posibilidades de tener asociada una cromosomopatía. La asociación de anomalías estructurales así como polihidramnios, también nos deben hacer pensar en una cromosomopatía.

Ante la ausencia de lo anterior, hay que descartar una infección congénita, frecuentemente producida por el CMV (Fowler y cols., 1992). También se debe descartar las infecciones por toxoplasma, parvovirus y rubeola.

Rara vez la causa de retraso de crecimiento es la alteración de la perfusión debida a desprendimiento parcial de la placenta, pequeños infartos, placenta previa o hematomas.

Por otro lado, las pacientes fumadoras tienen de 3-5 veces más riesgo de presentar un CIR que las pacientes no fumadoras. La toma de drogas como la cocaína se asocia a un 30% de CIR, siendo hasta del 50% en las pacientes que toman heroína. También el abuso de alcohol está asociado a CIR.

Por tanto, una vez se sospecha el CIR, se debe realizar un estudio ecográfico cuidadoso, combinándolo con el cariotipo, serologías maternas para descartar una infección vírica, PCR en líquido amniótico, descartando la posibilidad de HIE o trombofilias.

1.4.3 Consecuencias fetales de un insuficiente desarrollo vascular placentario.

El desarrollo fetal adecuado, depende de una adecuada difusión de los nutrientes desde la madre al feto y por tanto, requiere una adecuada perfusión uterina, un adecuado intercambio transplacentario de nutrientes y residuos y una adecuada perfusión umbilical. La glucosa y los aminoácidos esenciales son activamente transportados a través de la placenta y metabolizados activamente por el feto. El eje glucosa/factor de crecimiento insulín like (IGF) juegan un papel importante en el desarrollo fetal (Fant y Weisoly 2001). Por el hecho de que el 70% de la glucosa y el 45% del oxígeno son utilizados por la propia placenta, la adecuada difusión de nutrientes y oxígeno al feto dependerá de la perfusión uterina, del área de intercambio fetoplacentaria y de la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina fetal. Son necesarios cambios importantes en el flujo materno y fetal que se acomoden al rápido crecimiento fetal a medida que avanza la gestación. Con una invasión trofoblástica adecuada y el aumento en la capacidad de las arterias espirales se crea un lecho placentario con bajas resistencias. Como resultado, aumenta la proporción de gasto cardíaco materno que llega a los cotiledones placentarios, llegando a volúmenes de flujo sanguíneo de hasta 500-600 mL/minuto a término. En el compartimento fetal, este proceso es paralelo aumentando la superficie vellositaria y capilar, dando lugar a una disminución de las resistencias a nivel de la arteria umbilical y un aumento de la superficie de intercambio. Al mismo tiempo, la función cardíaca fetal aumenta exponencialmente, produciéndose un aumento de 5-10 veces el flujo a nivel arteria y vena umbilical con el avance de la gestación. Este incremento es necesario para mantener una relación constante entre el volumen de flujo sanguíneo/peso fetal a través de la gestación (Sutton y cols., 1990). Una vez

los nutrientes han entrado en la circulación fetal a través de la vena umbilical, su distribución a órganos vitales como son el hígado, corazón, cerebro, riñones, es asegurado por la circulación fetal. El shunt venoso a nivel del ductus venoso modifica la proporción de sangre rica en nutrientes que se distribuye a través del hígado y el corazón. A nivel de la aurícula derecha, las diferentes direcciones de la corriente sanguínea permiten que los nutrientes sanguíneos se distribuyan a nivel del corazón y cerebro mientras que el retorno venoso es distribuido hacia la placenta para la reoxigenación e intercambio de nutrientes y residuos. Las consecuencias de la insuficiencia utero-placentaria son complejas, ya que la función respiratoria feto-placentaria puede verse afectada en distintos niveles.

En los CIR, la transferencia de oxígeno, glucosa y aminoácidos está afectada, así como la respuesta insulínica pancreática. La hipoinsulinemia relativa puede disminuir la transferencia placentaria de glucosa. Esto hace que el feto se encuentre en una situación donde el aporte de oxígeno y substratos y por tanto la posibilidad de un metabolismo aeróbico y en consecuencia el crecimiento fetal estén limitados. La eritropoyesis puede mejorar el transporte de oxígeno aumentando las células rojas y la concentración de la hemoglobina (Weiner y Williamson 1989). La demanda de otros nutrientes son más difíciles de adaptarse. El glucógeno hepático almacenado inicialmente puede proporcionar un aporte limitado de glucosa. Una alternativa eventual puede ser la neoglucogénesis a partir del catabolismo tisular. Con estas limitaciones, la producción de lactato a través del metabolismo anaeróbico va aumentando. Aunque la glucosa es la primera fuente energética para el cerebro y el corazón, el lactato y los cuerpos cetónicos se convierten en los sustitutos en las hipoglucemias prolongadas. Al mismo tiempo, se produce una redistribución sanguínea a favor de los órganos vitales. Secuencialmente se produce una alteración de las variables de dinámica del feto, como la variabilidad de la frecuencia cardíaca, movimientos y tono, para poder conservar energía (Vintzileos y cols., 1991). Por tanto, la adaptación fetal se realizará a distintos niveles y si los mecanismos de compensación tienen éxito el feto sobrevivirá, incluso será

posible el crecimiento fetal. La descompensación fetal se producirá cuando la adaptación no pueda mantener la función de los órganos y se caracteriza por el fallo cardíaco, acidosis metabólica, pérdida del comportamiento normal del feto, y finalmente muerte fetal.

1.4.4 Utilidad de doppler en los CIR.

El doppler ayuda a distinguir los fetos PEG constitucionales de los CIR. El doppler de arteria uterina, tiene un valor limitado en la predicción del CIR tanto en población de bajo como de alto riesgo, con una razón de verosimilitud positiva 3.6 y 2.7 y negativa de 0.8 y 0.7 respectivamente (RCOG 2002). En la 23 – 24 semanas el notch protodiastólico bilateral de las arterias uterinas tiene una sensibilidad hasta del 85% para la predicción de CIR y HIE. El doppler en arteria umbilical (AU), es la única prueba de bienestar fetal que utilizada en población de alto riesgo se asocia con una tendencia a mejora de la mortalidad perinatal. Es la prueba de elección en el seguimiento de los CIR (RCOG 2002). Es muy poco frecuente la presencia de morbilidad en fetos pequeños con percentil<10 pero con AU normal.

Sólo el 20% de los fetos PEG, presentan CIR, es decir tienen afectación cardiovascular. En un estudio de fetos PEG (McCowan y cols., 2000), sólo el 10% de los fetos presentó una ratio ACM/AU anómalo dentro de las dos semanas al parto, lo que muestra que la redistribución del flujo sanguíneo (brain-sparing effect) objetivado en fetos PEG es un hecho infrecuente cuando la OVF umbilical y el líquido amniótico son normales (Baschat y cols., 2000, Baschat y Weiner 2000). Sin embargo, el flujo ausente o reverso en arteria umbilical se asocia a elevada mortalidad perinatal (Kingdom, Burrell y cols., 1997, Kingdom, Rodeck y cols., 1997).

La evaluación mediante doppler es un instrumento importante para graduar la severidad del CIR ya que con la obtención de la OVF arterial y venosa, se puede objetivar el grado de afectación placentaria, el nivel redistribución y el grado de compromiso cardíaco (Baschat y Hecher 2004).

El flujo diastólico en la AU en caso de la insuficiencia placentaria esta disminuido (para ello estarían afectadas un 30% de vellosidades terciarias). El

IR umbilical aumenta o disminuye en función del número de arteriolas funcionales propias de las vellosidades terciarias, si disminuye el número de arteriolas aumenta el IR de la arteria umbilical (Giles y cols., 1985). Se estima que hace falta un 60 a 70% de vellosidades terciarias dañadas para que el flujo sea ausente o reverso (Weiner y Baschat 1999). Conviene no obstante reseñar que, cerca de término incluso con OVF AU normal si las resistencias cerebrales están disminuidas o el cociente cerebro – placentario alterado puede sugerir la presencia de un CIR.

Parece existir una secuencia de deterioro de la oxigenación y nutrición fetal (Baschat y Hecher 2004) concomitante con los cambios en la OVF, de manera que inicialmente se observaría un aumento de la resistencia en AU, reflejo del aumento de éstas a nivel placentario, lo que iniciaría la redistribución a nivel cerebral con disminución de las resistencias (brain-sparing effect). Posteriormente las OVF venosas se alterarían, lo que explica su mejor correlación con la acidosis fetal umbilical (Rizzo y cols., 1996). Finalmente la ausencia o inversión atrial en el ductus venoso (DV) o la pulsatilidad a nivel umbilical, sería la manifestación de la descompensación fetal y está asociado a una elevada probabilidad de muerte perinatal.

Ferrazzi y cols., 2002 valoraron el doppler de 5 vasos en fetos con CIR y observaron que las alteraciones ocurren de forma secuencial. Los cambios precoces se dan en la periferia (AU y ACM; 50% se afectaron 15 – 16 días antes del parto), mas tardíamente aparece el flujo reverso y cambios anómalos en DV, tractos de salida aórtico y pulmonar (50% de pacientes afectas 4 a 5 días antes del parto), concluyen que los cambios tardíos son mejores predictores de la mortalidad perinatal.

La HIE y el CIR posiblemente se asocien a una alteración del flujo uteroplacentario que se atribuye a un defecto en la invasión trofoblástica (Khong y cols., 1986, Divon 1996). La flujometría Doppler permite estudiar la circulación uteroplacentaria durante la gestación, son las arterias uterinas las más frecuentemente estudiadas. (Coleman y cols., 2001, Robertson y cols., 1986, Farré y cols., 2001) A través de la medición de las velocidades de la sangre durante la sístole y la diástole se han propuesto varios índices:

resistencia (IR), pulsatilidad (IP) y relación sístole/diástole (S/D); generalmente el valor de estos parámetros es directamente proporcional a la resistencia inmediata al vaso evaluado. (Papageorghiou y cols., 2001, Gómez y cols., 2005) La invasión trofoblástica normal hacia las arterias espirales produce a nivel uteroplacentario un sistema de alta perfusión y baja resistencia, la ecografía Doppler de las arterias uterinas “evalúa” el éxito de esa invasión.(Gómez y cols., 2005).

El patrón característico de la flujometría Doppler de las arterias uterinas en el primer trimestre de la gestación es la presencia de una muesca diastólica junto con una alta pulsatilidad. La persistencia de la muesca más allá de las 24 semanas se considera anormal (Gómez y cols., 2005). Varias investigaciones han evidenciado asociación entre la persistencia de la muesca diastólica con un riesgo incrementado de complicaciones obstétricas como HIE, CIR, desprendimiento de placenta, entre otras. (Divon, 1996, Coleman y cols., 2001, Farré y cols., 2001). La persistencia de la muesca diastólica después de la semana 24 implica la existencia de un flujo placentario anormal, que puede ser consecuencia de una insuficiente migración trofoblástica. Es precisamente este evento la posible causa de la isquemia uteroplacentaria y de la activación endotelial.

1.4.5 Factores angiogénicos alterados en el CIR

En la fisiopatología de la HIE observamos que una insuficiente placentación y decidualización del sistema vascular precede a la clínica de HIE. Defectos vasculares similares ocurren en las gestantes cuyos embarazos acaban con un crecimiento intrauterino restringido sin HIE. Esto implica que probablemente ambas patologías tengan un origen vascular común.

Wathen y cols., 2006 valora la posibilidad de utilizar el sFlt-1 como factor predictor en primer trimestre de aquellas gestantes que evolucionan a HIE o CIR y observa que valores elevados de sFlt-1 en semana 16-20 están asociados con un aumento del riesgo de desarrollar HIE pero no de desarrollar CIR de forma aislada. A diferencia de Smith y cols., 2007, que también valoran los niveles de PIFG y sFlt-1 al inicio de embarazo (semana

10-14 semanas) como posibles marcadores de riesgo de resultados perinatales adversos y obtienen que niveles elevados de sFlt-1 no están asociados con un aumento de riesgo de desarrollar HIE y sí que están asociados tanto los niveles elevados de sFlt-1 como de PIFG con una disminución del riesgo de resultados adversos perinatales.

Savvidou y cols., 2006, analizan en gestantes de 23-25 semanas los valores de sFlt-1 en gestantes normales, gestantes con doppler de arterias uterinas alterado y en gestantes con CIR establecido. Observa que el sFlt-1 está aumentado de forma significativa en aquellas gestantes con CIR establecido no siendo así en aquellas con gestaciones normales o doppler alterado que posteriormente evolucionan a CIR o HIE, concluyendo que aunque el sFlt-1 tenga un papel importante en el desarrollo de estas dos situaciones, es improbable que este factor antiangiogénico juegue un papel importante en el inicio de estas patologías.

Wallner y cols., 2007, valora los niveles de sFlt-1 y PIFG en el momento del parto tanto en suero materno como en cordón umbilical y observa que en las gestaciones con CIR el sFlt-1 está aumentado mientras que el PIFG está disminuido en suero materno. Se observa que tanto en las gestantes normales como en las gestaciones con CIR los niveles de VEGF fueron mayores y los niveles de sFlt-1 fueron menores en el suero de vena y arteria umbilical en comparación con los niveles maternos. Esto sugiere que en las gestantes con CIR existe un desequilibrio de los factores angiogénicos a favor de los antiangiogénicos y que el feto no contribuye a este desequilibrio de factores.

Boutsikou y cols., 2006, analizan en gestantes con CIR, los valores de sFlt-1 en el momento del parto, a nivel materno, en cordón umbilical y a nivel neonatal el primer y cuarto día tras el nacimiento y observan que tanto a nivel materno como a nivel neonatal, sFlt-1 es significativamente mayor en los casos de CIR que en los casos control, correlacionándose de forma negativa el sFlt-1 con los percentiles neonatales, demostrando el estado antiangiogénico en los casos de CIR. También observan una disminución progresiva desde la toma sanguínea de cordón, a la toma sanguínea neonatal

en el cuarto día de nacimiento, tanto en los CIR como en las gestaciones control, prevaleciendo en el neonato los factores angiogénicos para su crecimiento.

El hecho de que la endoglina soluble, tenga un efecto antiangiogénico in vitro y que esté elevado en las pacientes con HIE, hace pensar si este factor, está elevado también en las gestaciones con CIR.

Stepan y cols., 2007, valoran los niveles de endoglina tanto en gestantes con HIE como con CIR, observando que las gestantes con CIR presentan niveles de endoglina significativamente más elevados pero no alcanzan los niveles de endoglina de las gestantes con HIE. Además, se observa una correlación positiva de la endoglina con el sFlt-1 tanto en la HIE como en las gestantes con CIR.

Nuestra hipótesis se basa en:

- La determinación del sistema VEGF en plasma materno puede ser un marcador bioquímico de compromiso fetal
- El feto hipóxico aumenta sus niveles de VEGF, aumentando la angiogénesis para compensar la hipoxia
- Una disminución del VEGF o una mayor inactivación de éste puede jugar un papel en la patogénesis de la preeclampsia y CIR.

2.-OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El propósito de este estudio es evaluar el papel del VEGF en respuesta a la hipoxia fetal y la posibilidad de utilizar el nivel plasmático materno como marcador de esta hipoxia .

2.1. Generales

- Evaluar la importancia de de la expresión, producción y secreción del complejo VEGF (materno y fetal) como mecanismo en la fisiopatología de la HIE y CIR.
- Evaluar la importancia de la expresión, producción y secreción del complejo VEGF (materno y fetal) como mecanismo compensatorio de la hipoxia crónica.
- Evaluar si el aumento del VEGF plasmático materno es un indicador de la hipoxia fetal.

2.2. Específicos

- Determinar la secreción del complejo VEGF en sangre materna durante la gestación en embarazos únicos.
- Determinar las variaciones del complejo VEGF en gestaciones con HIE y CIR.
- Determinar la relación entre los parámetros ecográficos que determinan una hipoxia durante el embarazo y la secreción del complejo VEGF materno.
- Determinar la relación entre los parámetros que objetivan la hipoxia fetal mediante el EAB en el parto con la expresión y producción placentaria del complejo VEGF y la secreción materna y fetal del mismo.

3.-MATERIAL Y MÉTODO

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Diseño del estudio

El presente trabajo es un estudio observacional prospectivo, de casos-contrroles, que 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 P1030059.

3.1.1 Pacientes

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

Reclutamos a pacientes que acudieron para control a consultas externas de nuestro hospital con criterios de oportunidad, siendo el intervalo de seguimiento entre semana 12 y 42, o que ingresan por HIE o CIR.

Criterios de exclusión:

- Gemelaridad
- Malformaciones fetales o cromosomopatías.
- Muerte fetal anteparto.
- Gestantes con cardiopatía o insuficiencia respiratoria.

Recogimos como variables epidemiológicas:

- Edad materna
- Paridad
- Edad gestacional en el momento de la exploración.
- Semana de parto.
- Vía de parto.
- Peso del recién nacido (RN)
- Peso placentario

Realizamos una exploración cada 4-5 semanas en el 2º y 3º trimestre y en la semana que antecede al parto. En cada visita, estimamos los índices velocimétricos de arterias uterinas derecha e izquierda, arteria umbilical (AU),

arteria cerebral media (ACM), el cociente cerebro/placentario (CCP), valorando el crecimiento fetal y la cantidad de líquido amniótico . De forma concomitante, realizamos un extracción de sangre materna, que posteriormente centrifugamos para separar el plasma y almacenarlo a -20°C para posterior medición del complejo VEGF.

En el parto obtuvimos sangre materna y fetal (arteria y vena) para las posteriores mediciones en plasma del complejo VEGF y a partir de la sangre fetal (arteria y vena), medimos los valores del EAB.

Para analizar la asociación del complejo VEGF materno sobre el bienestar fetal anteparto, utilizamos todas las estimaciones de velocimetría que obtuvimos de forma concomitante. Cuando se valoró el estado del RN en relación con el complejo VEGF materno o fetal, tan sólo utilizamos la exploración que estuvo dentro de los 7 días antes del parto.

Clasificando las gestaciones de nuestro estudio por grupos obtenemos 16 tipos de gestaciones:

A-. 61 gestaciones control, sin ningún tipo de patología

B-. 11 con HTA sin proteinuria.

C-. 27 con preeclampsia

D-. 25 con PEG.

E-. 27 con CIR

F-. 6 con AUU

G-. 3 con diabetes gestacional insulindendientes

H-. 9 con diabetes tipo I.

I-. 1 con HTA + PEG

J-. 5 con HTA +CIR

K-. 7 con preeclampsia+PEG

L-. 18 con preeclampsia+CIR

M-. 2 con preeclampsia+diabetes I

N-. 1 AUU +CIR

O-. 5 AUU+PEG

De estas 208 gestaciones obtenemos un total de 272 muestras de sangre materna a lo largo de la gestación y conseguimos recoger muestra de cordón en el momento del parto en 103 de estas gestaciones.

Las gestaciones fundamentalmente objeto de nuestro interés son las 61 gestaciones control, 52 HIE, 27 CIR y 24 gestaciones con Hipoxia ($\text{pH} < 7.20$ en arteria umbilical). Si bien estas últimas no son estudiadas en ciertos resultados ya que este grupo está compuesto por gestaciones que han sido normales así como por gestaciones que pueden estar afectadas por cualquier patología, serán descritas y analizadas posteriormente.

3.2 Bienestar fetal

Para valorar el estado fetal, hemos utilizado diferentes aproximaciones, directas e indirectas.

- Estimación indirecta o subrogados de bienestar fetal in útero:
 - Onda de velocidad de flujo (OVF) de arterias uterinas que 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- ítmica, 2-3cm medial a la espina iliaca 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 iliacas 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 de arteria umbilical, que nos informan de las resistencias placentarias y sugieren redistribución.

En orden a minimizar errores, se deben visualizar al menos 3 ondas de velocidad de flujo pulsátil, para obtener mejores complejos.

- OVF, que es un reflejo de la redistribución vascular fetal y el CCP. Es sabido, que la reactividad de la ACM es exquisita en su 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 pelúcidum. 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 anterolateral hacia el borde lateral de la órbita.

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

Cuando determinamos la onda de velocidad de flujo en cualquier territorio, estimamos el índice de resistencia (IR), el índice de pulsatilidad (IP) y calculamos el cociente sístole/diástole, utilizando un ecógrafo Toshiba ECCO CCE.

- Estimación directa:

- Peso fetal y placentario que nos informan si se trata de un feto eutrófico o no.

- Índices de Apgar al 1º y 5º minuto, este último, que dentro de limitaciones, es el que mejor se relaciona con la morbilidad neurológica del RN. Describimos a los 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 ≥ 7 .

- EAB de vasos umbilicales, el de AU, es el patrón oro del estado del RN y de la posible existencia de la hipoxia. Incluye el pH, el exceso de bases (EB), la pO_2 y la pCO_2 .

La obtención de sangre de cordón umbilical se realizó pinzando doblemente el cordón 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 obtuvo 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, PO₂ y PCO₂ de ambos vasos umbilicales empleando un microanalizador de gases sanguíneos Radiometer ABL 77 y el segundo para la determinación del complejo VEGF.

3.3 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 dentro de la semana previa al parto o en el momento del mismo.

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

Asimismo, se obtuvo sangre de los vasos del cordón umbilical de cada RN (arteria y vena) donde también se determinó el VEGF circulante (free 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 – 20°C para la posterior determinación del sistema VEGF.

3.3.1. Determinación del VEGF y su receptor soluble (sFlt-1)

Para la determinación cuantitativa de VEGF_f y el sFlt-1 se utilizó la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) en sandwich (Preprotech, 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 contro 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.

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 sustrato 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_f.

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

Para la cuantificación del VEGF_f 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.

3.4 Definición de HIE, CIR, Hipoxia.

Definiremos:

- HIE a la presencia de TA \geq 140/90 y proteinuria en orina (medida por la tira reactiva LABSTIX) de \geq a 2 cruces.
- CIR, a un crecimiento fetal menor al percentil 10 y que presente alteración hemodinámica (Doppler en AU > p95). Para la clasificación en percentiles del peso del RN utilizamos las tablas de Alexander y cols., 1996. Para clasificar los valores del doppler en AU en percentiles, utilizamos las tablas de Acharya y cols 2005.
- Consideramos feto hipóxico al que tiene un pH < 7.20 en AU, conocedores de que puede tener un componente respiratorio, metabólico o mixto la acidosis por debajo de este valor. La hipoxia puede ser aguda (intraparto), o crónica.

Para valorar la severidad de la HIE, utilizaremos como parámetros la HTA (sistólica, diastólica y media), proteinuria y otros indicadores que pueden asociarse y muestran la posible afectación sistémica, como son las plaquetas, enzimas hepáticos, fibrinógeno, ácido úrico, hemoglobina y hematocrito y las resistencias a nivel placentario estimadas por el doppler de las arterias uterinas tanto de forma cuantitativa como cualitativa (notch).

3.5 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 uno, se realizó el test exacto de Fisher.

Cuando describimos las variables, expresamos los datos como la media más su error estándar.

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 comparan valores dentro del mismo sujeto, se realizó un test de t de muestras pareadas. El análisis comparativo entre grupos, se realizó utilizando un análisis de la varianza (ANOVA),

seguido de una prueba de rango múltiple Student Newman Keuls (SNK). Cuando se analizan variables que pudieran estar influenciadas por otras (por ejemplo la edad gestacional), se estudia la posible influencia haciendo un análisis de regresión introduciendo las variables a estudio y las que pudieran influenciar (Creando Dummy variables) y aceptamos la existencia de influencia si hay una variación que siendo significativa, implica un aumento del 20% de coeficiente de correlación.

Eventualmente, cuando las observaciones fueron pocas, 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. Eventualmente, si alguna variable no se distribuye normalmente o su número era reducido, se realizó un análisis de Spearman.

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

Hemos utilizado curvas ROC (características del operador receptor), para analizar el área bajo la curva (ABC), así como la sensibilidad, especificidad y razón de verosimilitud positiva y negativa para identificar el punto de corte de los niveles de sFlt-1 así como del cociente $VEGF_f/sFlt-1$, que maximicen su utilidad diagnóstica

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

Los cálculos se han realizado utilizando el programa estadístico SPSS 15 y MedCalc v4.20.021.

4.- RESULTADOS

4. RESULTADOS

Para alcanzar nuestros objetivos, realizaremos el estudio de la siguiente manera:

-En primer lugar analizaremos globalmente, es decir, en todos los casos, el comportamiento del complejo VEGF.

-En segundo lugar, estudiaremos el comportamiento del complejo VEGF por grupos de patologías:

-HIE

-CIR

-Hipoxia

Para ello, utilizaremos en los 2 primeros casos un grupo control para compararlo con las gestaciones con HIE y CIR, añadiendo en cada uno de los estudios como situaciones intermedias las gestantes con hipertensión sin proteinuria y las que parieron RN etiquetados de PEG respectivamente. En cada uno de los estudios realizaremos en primer lugar un análisis global con todas las gestaciones ya descritas anteriormente y posteriormente el análisis lo haremos por subgrupos ((control, HIE e HTA sin proteinuria) y (control, CIR y PEG)).

En el caso de la hipoxia y puesto que el patrón oro para valorar la hipoxia es un pH al nacimiento en arteria menor de 7.20, utilizaremos todos los casos ya que la existencia de patología materna o fetal pueden alterar el medio interno fetal y esto ser instrumental en la posible relación de la hipoxia, independientemente de su origen con un EAB anómalo. Sólo consideramos las gestaciones que tengan una determinación materna dentro de la semana de parto cuando realicemos análisis de la hipoxia o cuando analicemos datos bioquímicos que impliquen la proximidad o simultaneidad de las determinaciones de la madre y su hijo.

4.1. Variables epidemiológicas

Las variables epidemiológicas en todas las gestantes que han participado en nuestro estudio se presentan en las tablas 1 y 2:

Tabla 1: valores medios de las siguientes variables; edad, semanas de parto, peso del recién nacido y peso placentario.

	N	Media \pm ES	Mínimo	Máximo
Edad (años)	198	31,67 \pm 0,39	15	48
Semana de parto (semanas)	190	37,22 \pm 0,22	26	42
Peso RN (g)	197	2706,57 \pm 63,95	500	4950
Peso placenta (g)	188	532 \pm 13,70	200	1150

Tabla 2: análisis descriptivo de las siguientes variables; sexo del recién nacido (RN), paridad y finalización de la gestación.

Sexo RN		
	Mujeres	95 (48,2%)
	Varones	102 (51,8%)
Paridad		
	Primigestas	101 (70,1%)
	Multigestas	43 (29,9%)
Finalización de gestación		
	P. Espontáneo	52 (26,5%)
	P. Instrumentado	17 (8,7%)
	Cesárea	127 (64,8%)

A continuación exploraremos las variables epidemiológicas atendiendo a los grupos CIR, HIE y control.

4.1.1 Edad materna

Las pacientes con HIE tuvieron mayor edad (Tabla 3).

Tabla 3: análisis de la edad por grupos.

SNK	GRUPOS	N	Edad (años) p<0.05	
	CIR	27	29,37±1.08	33,14±0.72
	Control	52	30,42±0.73	
	HIE	51		

4.1.2 Peso del Recién Nacido

Al analizar los pesos de RN, observamos que aumentan de forma escalonada en 3 grupos, siendo los más pequeños los RN de gestaciones con CIR, menores que los de gestaciones con HIE y todos menores que las gestaciones control que fueron los RN con mayor peso (Tabla 4).

Tabla 4: diferencias de pesos de los recién nacidos en los distintos grupos.

(SNK)	GRUPOS	N	Peso RN (g) p<0.05		
	CIR	27	1955±103	2358±149	3351±68
	HIE	51			
	Control	52			

4.1.3 Peso placentario

Como era de esperar el peso fetal y placentario se comporta de forma semejante, siendo la diferencia significativa para los 3 grupos (tabla 5).

Tabla 5: diferencias de los pesos placentarios en los distintos grupos.

(SNK)	GRUPOS	N	Peso placenta (g) p<0.05		
	CIR	23	380±27	517±29	608±21
	HIE	51			
	Control	44			

4.1.4 Semana de parto

Podemos observar dos grupos, las gestaciones con HIE y CIR en las que el parto aconteció más precozmente que las gestaciones control (Tabla 6).

Tabla 6: semana media de parto por grupos.

(SNK)	GRUPOS	N	Semana parto $p < 0.05$	
	HIE	51	35,61±0,56	38,76±0,26
CIR	27	36,44±0,54		
Control	49			

4.1.5 Semana de extracción del Complejo VEGF

La semana media de extracción de VEGF fue inferior en gestaciones control que en gestaciones con HIE. En gestaciones con CIR, no hubo diferencia significativa respecto a las gestaciones control o HIE (tabla 7).

Este resultado es esperable ya que los fetos con patología se reclutaron a medida que aparecía ésta y con menos frecuencia, pudo aparecer alguna derivada de una gestación inicialmente normal.

Tabla 7: semana media de extracción del Complejo VEGF en los distintos grupos.

(SNK)	GRUPOS	N	semana extracción VEGF $p < 0.05$	
	Control	105	30,99±0,84	32,55±0,97
CIR	39	32,55±0,97		
HIE	65		34,29±0,50	

4.1.6 Paridad

No existe diferencias entre la proporción de primigestas y multigestas cuando lo consideramos por grupos (tabla 8). Tampoco si agrupamos las gestaciones control versus los otros 2 grupos juntos.

Tabla 8: proporción de primigestas y multigestas en los distintos grupos.

GRUPOS	paridad	
	Primigesta	Multigesta
control	61,8%	38,2%
CIR	83,3%	16,7%
HIE	73,5%	26,5%

4.1.7 Sexo

Tampoco existe diferencias en la proporción del género al considerarlo por grupos (Tabla 9).

Tabla 9: proporción de género en los distintos grupos.

GRUPOS	sexo RN	
	niña	varón
control	44,9%	55,1%
CIR	61,5%	38,5%
HIE	45,1%	54,9%

4.1.8 Finalización del parto

Al realizar un análisis Chi cuadrado, como en los dos últimos análisis, en éste si observamos diferencias significativas y al realizar un ajuste de Bonferroni, constatamos que la cesárea es la forma más frecuente de finalización del parto en las gestantes con HIE, en comparación con las gestantes control, no siendo significativa la diferencia en el CIR (Tabla 10).

Tabla 10: diferencias en la forma de finalización del parto en las distintas gestaciones.

GRUPOS	Cesárea	Parto vaginal	χ^2
Control	28	21	
CIR	16	11	NS
HIE	42	9	$\chi^2=6.41$ $p<0.01$

4.2 Análisis del complejo VEGF materno-fetal.

4.2.1 VEGF materno

4.2.1.1 Estudio del complejo VEGF materno en todos los casos.

Analizando todas las gestaciones sin diferenciar entre grupos, valoramos la asociación del complejo VEGF con los siguientes parámetros: edad gestacional, edad materna, paridad y vía de parto.

-Edad gestacional: existe una asociación positiva entre el sFlt-1 y la edad gestacional ($r=0,29$ $n=272$ $p<0.001$) (Figura 1), es decir, a mayor edad gestacional mayor concentración de sFlt-1, no existiendo correlación ni con el $VEGF_f$ ni con el $VEGF_t$. También observamos que existe una relación negativa entre las semanas de gestación y el cociente $VEGF_f/sFlt-1$ ($r=-0.28$ $n=272$ $p<0.001$), es decir a mayor edad gestacional, menores cocientes, lo que sugiere un mayor potencial antiangiogénico.

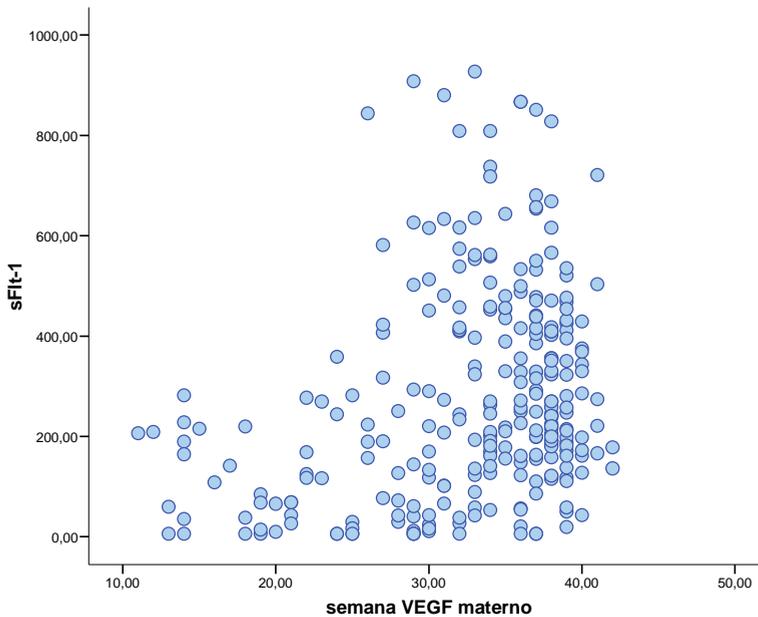


Figura 1: correlación entre la semana de gestación de extracción del VEGF y sFlt-1 ($r=0,29$ $p<0,001$)

Al estratificar el complejo VEGF en función de la semana de gestación no se observan diferencias cuando utilizamos el punto de corte en 37 semanas, en tanto que si que existen diferencias significativas cuando utilizamos como punto de corte la semana 34 para el VEGF_f y el sFlt-1 (tabla 11), siendo en ambos casos mayores los valores a mayor edad gestacional. Estas diferencias persisten tanto utilizando el punto de corte en semana 32 y 28, si bien en la semana 28 sólo persiste la diferencia para el sFlt-1.

Tabla 11: diferencias en los valores de los distintos parámetros del complejo VEGF según edad gestacional, utilizando como punto de corte la semana 34.

	sem extracc VEGF materno	N	media±ES	p
VEGF _f (pg/ml)	≥ 34	160	99,10±6,69	0.02
	< 34	112	78,37±4,72	
VEGF _t (pg/ml)	≥ 34	156	62,89±6,09	NS
	< 34	107	70,74±8,45	
sFlt-1 (pg/ml)	≥ 34	160	319,66±15,06	0.001
	< 34	112	227,38±21,69	

La existencia de una correlación positiva entre la edad gestacional y el sFlt-1 y negativa con el cociente VEGF_f/sFlt-1 así como las diferencias de sFlt-1 y VEGF_f en función de las semanas (32 y 34), nos sugiere que estos elementos del complejo VEGF son edad gestacional dependiente. Esto es importante ya que si las determinaciones se realizan antes en los grupos patológicos (por la necesidad de terminar antes estas gestaciones), tendrán valores medios menores teóricamente o en caso de ser mayores, la diferencia será infraestimada. Es decir, un análisis realizado sin tener en cuenta la edad gestacional, infraestimaría las diferencias en el complejo VEGF en caso de ser discrepantes las semanas de gestación entre los grupos en el momento de las extracciones de sangre.

-Edad materna: no existe asociación entre el sistema VEGF y la edad materna. Tampoco existen diferencias si agrupamos a las gestantes en mayores y menores de 35 años.

-Paridad: observamos que las multigestas presentan de forma significativa mayor cantidad de $VEGF_t$ ($p < 0.001$) y menor cantidad de $VEGF_f$ y sFlt-1 así como menor cociente $VEGF_f / sFlt-1$, existiendo por tanto una situación más antiangiogénica en las primigestas (Tabla 12), lo que explicaría porque las HIE son más frecuentes en primigestas.

Tabla 12: diferencias en los distintos parámetros del complejo VEGF en función de la paridad.

	paridad	N	Media±ES	p
$VEGF_f$ (pg/ml)	multigesta	35	85,55±1,55	0.001
	primigesta	94	94,57±1,64	
$VEGF_t$ (pg/ml)	multigesta	34	82,26±2,84	0.001
	primigesta	89	48,74±0,82	
sFlt-1 (pg/ml)	multigesta	35	308,26±5,6	0.001
	primigesta	94	324,77±3,70	
$VEGF_f / sFlt-1$	multigesta	35	0,79±0.04	0.001
	primigesta	94	0,52±0.01	

Al analizar el VEGF materno (última determinación, una semana antes del parto) en función de la vía de parto, las gestaciones que terminaron mediante cesárea, presentaron mayores niveles de todos los componentes del complejo. Sin embargo, sólo alcanzó significación estadística en caso el sFlt-1, siendo éste en partos vaginales $307,27 \pm 3,71$ pg/ml ($n=53$) versus $372,6 \pm 3,79$ pg/ml ($n=89$) en las cesáreas. Como era de esperar, las cesáreas se realizaron antes que los partos vaginales $36,27 \pm 0,33$ vs $37,93 \pm 0,32$ respectivamente $p < 0.001$, lo que nos hace sugerir que las diferencias están minimizadas por efecto de la edad gestacional.

4.2.1.2 Estudio por grupos del complejo VEGF materno.

4.2.1.2.1 Complejo VEGF-semana de gestación.

En gestaciones control, observamos que existe una asociación positiva entre el sFlt-1 y la semana de gestación ($r=0.46$ $p<0.001$ $n=86$), y una asociación negativa entre la semana de gestación y el cociente $VEGF_f/sFlt-1$ ($r= -0.34$ $p<0.01$) no apreciándose esta asociación en los grupos con HIE, CIR.

4.2.1.2.2 Valores del Complejo VEGF materno

Hemos realizado un ANOVA entre los diferentes valores del complejo VEGF dentro de cada grupo estudiado así:

4.2.1.2.2.1 $VEGF_f$

Al analizar el $VEGF_f$ materno por grupos observamos que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos (Tabla 13).

Tabla 13: valores de $VEGF_f$ a nivel materno en los distintos grupos.

SNK	GRUPOS	N	$VEGF_f$ (pg/ml) $p<0.05$
	control	86	$82,85\pm 5,27$
HIE	51	$91,77\pm 10,04$	
CIR	39	$103,91\pm 17,84$	

Al ponderar por semanas de determinación del complejo VEGF, tampoco se observan diferencias.

4.2.1.2.2.2 $VEGF_t$

Al analizar el $VEGF_t$, observamos que las gestaciones con CIR son las que mayor cantidad de $VEGF_t$ presentan (Tabla 14).

Tabla 14: valores de VEGF_t a nivel materno en los distintos grupos.

SNK	GRUPOS	N	VEGF _t (pg/ml) p<0.05	
		control	82	48,24±4,92
	HIE	49	65,26±14,28	65,26±14,28
	CIR	38		86,95±14,36

Resultado que no se ve influenciado por la edad gestacional en las que se hicieron las determinaciones.

4.2.1.2.2.3 sFlt-1

Cuando analizamos el sFlt-1 observamos un incremento en los valores de forma creciente desde controles, CIR a HIE (Tabla 15).

Tabla 15: valores de sFlt-1 en los distintos grupos.

SNK	GRUPOS	N	sFlt-1 (pg/ml) p<0.05		
		Control	86	193,13±17,03	
	CIR	39		298,13±31,97	
	HIE	51			458,92±31,01

Como en las ocasiones anteriores no observamos cambios en la significación de las diferencias a causa de la edad gestacional.

4.2.1.2.2.4 VEGF_t / sFlt-1

Cuando analizamos el cociente en función del grupo estudiado, observamos que este cociente es mayor en gestaciones control que en gestaciones con CIR y HIE de tal forma que las gestaciones con HIE y CIR difieren estadísticamente de las gestaciones control .

Tabla 16: cociente VEGF_t/ sFlt-1 en los distintos grupos.

SNK	GRUPOS	N	VEGF _t / sFlt-1 p<0.05	
		HIE	51	,40±0,14
	CIR	39	,45±0,29	
	control	86		1,64±0,29

La edad gestacional tampoco influye en la significación estadística.

En su conjunto, estos resultados sugieren que existe un predominio de inhibición de la vasculogénesis en los casos de HIE y CIR lo que es concordante con los hallazgos clínicos y experimentales de una hipoperfusión placentaria y un aumento de las resistencias placentarias.

4.2.1.3 Relación entre los distintos parámetros del complejo VEGF materno.

4.2.1.3.1 Análisis de la muestra en su conjunto

Al considerar globalmente todos los casos estudiados, observamos que dentro del complejo VEGF, los parámetros que se asocian significativamente son el $VEGF_f$ y el sFlt-1 ($r=0.34$ $n=272$ $p<0.001$), no existiendo relación entre el $VEGF_t$ y estos parámetros.

4.2.1.3.2 Análisis por grupos

En las gestaciones control se observa que el sFlt-1 se asocia de forma positiva con el $VEGF_f$ ($r=0,58$ $p<0,001$) y de forma negativa con el cociente $VEGF_f/sFlt-1$ ($r= -0,54$ $p<0.01$).

La relación negativa entre sFlt-1 y el cociente sugiere que hay un incremento mayor de sFlt-1 que de $VEGF_f$ dado que como hemos apuntado antes en gestaciones control hay una relación positiva entre el sFlt-1 y el $VEGF_f$, el aumento del sFlt-1 es proporcionalmente mayor que el $VEGF_f$ al observar esta asociación negativa.

En los casos de HIE y CIR, no existe asociación entre el sFlt-1 y el $VEGF_f$. Observamos una asociación entre el sFlt-1 y el cociente de forma negativa (HIE $r= -0,40$ $p< 0,01$) (CIR $r= -0,37$ $p<0,01$), observándose solo en el caso de CIR una asociación positiva entre el $VEGF_f$ y el cociente.

El $VEGF_t$ no se asocia con ningún parámetro.

4.2.2 VEGF fetal en vasos umbilicales

4.2.2.1 Estudio del complejo VEGF fetal en relación con la semana de parto, peso del RN y placentario.

Al estudiar en todas las gestaciones descritas al inicio el complejo VEGF fetal en relación con la semana de parto, el peso del RN y placentario, observamos que a nivel de arteria umbilical existe una correlación negativa entre el sFlt-1 con la semana de parto ($r=-0.34$ $p<0.001$ $n=90$) y con el peso del RN ($r=-0.27$ $p<0.05$ $n=94$), es decir, hay mayor cantidad de sFlt-1 a menor semana de parto y menor peso fetal. A nivel de vena umbilical, observamos las mismas correlaciones, aunque sólo es significativo la correlación con el peso del RN ($r=-0.23$ $p<0.05$ $n=98$).

El cociente $VEGF_f/sFlt-1$ no se correlaciona ni en vena ni en arteria, ni con la semana de parto, ni con el peso del RN ni placentario.

4.2.2.2 Valores del complejo VEGF fetal por grupos

Al analizar los niveles fetales del complejo VEGF mediante un ANOVA, observamos que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos de patología, tanto en arteria como en vena (Tabla 17 y 18).

Tabla 17: Niveles del complejo VEGF a nivel de arteria umbilical en el momento del parto.

GRUPOS	N	VEGF _f arteria(pg/ml)	VEGF _t arteria(pg/ml)	sFlt-1 arteria (pg/ml)
Control	24	126,57±2,48	180,97 ±4,8	78,58 ±2,47
CIR	17	129,58±5,6	241,07 ±7,53	103,21 ±5,05
HIE	18	163,10±5,41	223,22 ±11,32	136.02 ±6,55

Como puede apreciarse, en arteria, los niveles de los integrantes del complejo VEGF son menores en gestaciones control. Estos datos, pueden estar influenciados por la semana de parto. La semana de gestación media para las gestaciones control es de 38,76±0,26, para los CIR es de 36,44±0,54 y para las HIE 35,61±0,56 ($p<0.001$) diferentes estas dos últimas de la

gestaciones control, sin embargo, al controlar el efecto por las semanas de gestación, estas no influyen en los resultados.

Tabla 18: Niveles del complejo VEGF a nivel de vena umbilical en el momento del parto.

GRUPOS	N	VEGF _f vena(pg/ml)	VEGF _t vena(pg/ml)	sFlt-1 arteria (pg/ml)
Control	24	141,74±3,84	141,69 ± 3,46	111,30 ±3,34
CIR	18	109,19 ±4,59	206,34±8,08	120,12 ±4,77
HIE	20	129,15 ±4,71	86,88 ±2,88	146,47 ±8,4

En vena umbilical, como ya avanzamos, tampoco existen diferencias significativas, si bien el grupo control muestra mayores niveles de VEGF_f y menores de sFlt-1 que en las gestaciones patológicas.

Un comportamiento paralelo a los resultados anteriores se observa en el cociente tanto en arteria como en vena, siendo menor en ambos casos en las gestaciones con HIE.

Tabla 19: valores del cociente VEGF_f/ sFlt-1 en arteria umbilical en el momento del parto.

GRUPOS	N	VEGF _f /sFlt-1 arteria	N	VEGF _f /sFlt-1 vena
HIE	16	3,45±0,17	20	2,28±0,1
CIR	17	4,66±0,22	18	3,32±0,17
Control	22	4,79±0,19	24	3,06±0,1

Si bien no hemos observado diferencias significativas, llama la atención la constancia de los datos de manera que puede sugerir una potencia más antiangiogénica en gestaciones patológicas.

4.2.3. Relación materno-fetal del complejo VEGF

Hemos analizado la relación que puede tener el complejo VEGF a nivel madre-feto, para estudiar mejor el comportamiento de este complejo, utilizando aquellas gestaciones en las que tenemos muestra materna en el momento del parto o dentro de la semana previa al parto y hemos observado que el $VEGF_f$ y total materno se correlacionan con sus homónimos en el feto a nivel de arteria y vena (Tabla 20) (Figuras 2-5).

Tabla 20: relación materno fetal del complejo VEGF.

	$VEGF_f$ materno	$VEGF_t$ materno
$VEGF_f$ arteria	$r=0,78$ $p< 0.001$ $n=87$	
VEG_t arteria		$r=0.35$ $p< 0.001$ $n=83$
$VEGF_f$ vena	$r=0.80$ $p<0.001$ $n=89$	
$VEGF_t$ vena		$r=0,24$ $p<0.05$ $n=87$

Sin embargo el sFlt-1 no se correlaciona con su correspondiente en arteria y vena, pero éste, si que se correlaciona con el $VEGF_f$ a nivel de arteria y vena. Recordemos que el sFlt-1 tiene un comportamiento de dirección contraria en madre y feto en función de la edad gestacional, esto es, el sFlt-1 se correlaciona con la semana de gestación positivamente a nivel materno y de forma negativa a nivel de arteria umbilical.

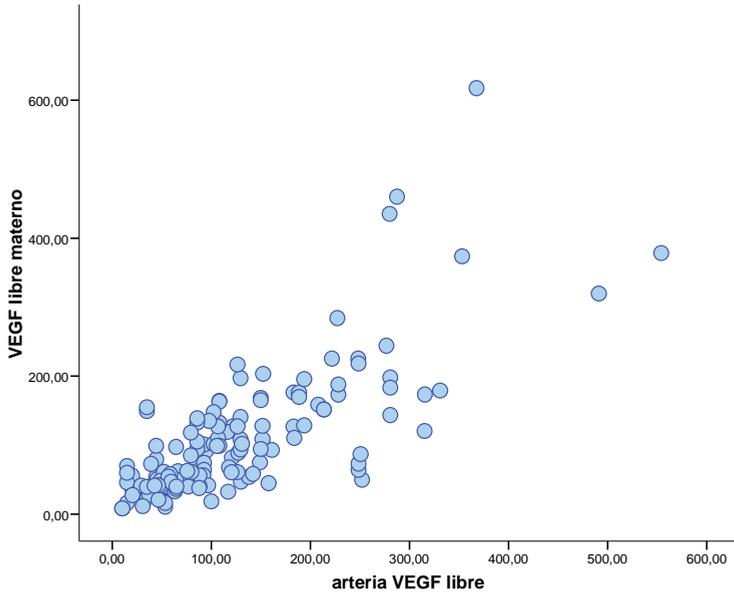


Figura 2: relación $VEGF_f$ materno y arterial ($r=0,78$ $p<0,001$)

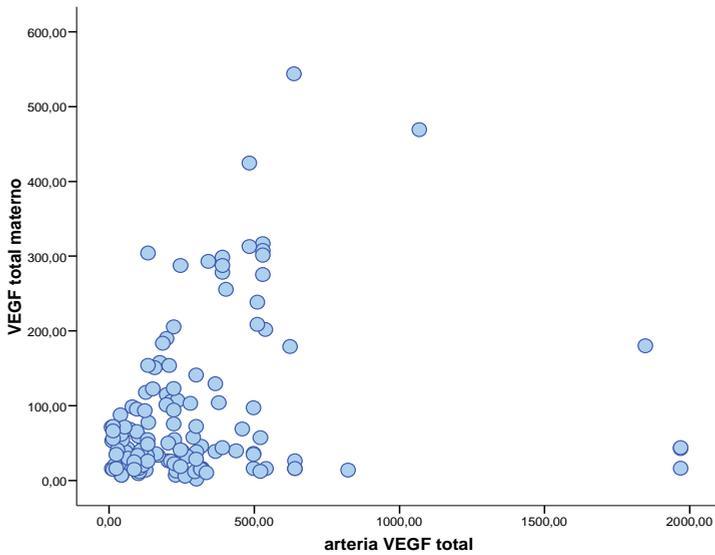


Figura 3: relación $VEGF_t$ materno y arterial ($r=0,35$ $p<0,001$)

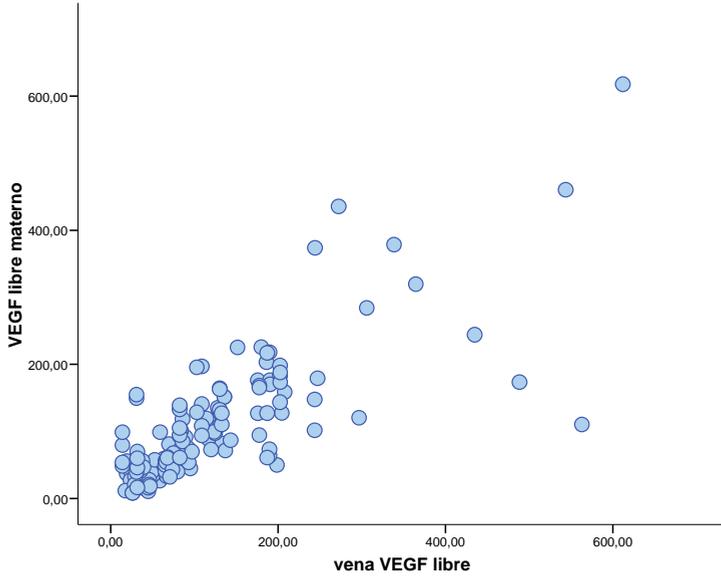


Figura 4: relación $VEGF_f$ materno y venoso ($r=0.8$ $p<0.001$)

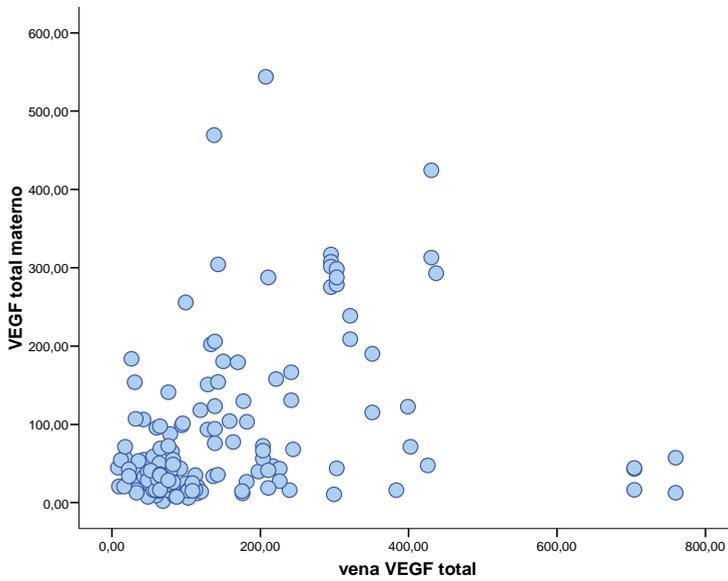


Figura 5: relación $VEGF_t$ materno y venoso ($r= 0.25$ $p<0.05$).

Al realizar el análisis por grupos para observar si existen diferencias entre ellos en el comportamiento del complejo VEGF observamos los siguientes resultados:

Tanto en los controles como en los CIR, observamos que existe una asociación significativa entre el $VEGF_f$ materno y su correspondiente en arteria y vena sin que exista asociación entre el $VEGF_t$ y el sFlt-1 con sus correspondientes.

Sin embargo, en las HIE, si que observamos un comportamiento distinto del complejo VEGF, observando asociación significativa entre madre y arteria-vena, tanto para el $VEGF_f$ como para el total y el sFlt-1 (tabla 21). Como hemos adelantado esto supone un elemento diferencial del factor soluble en las gestaciones con HIE respecto a las gestaciones control y las afectas por CIR.

Tabla 21: relación por grupos de los distintos parámetros del complejo VEGF a nivel materno-fetal.

	Controle	CIR	HIE		
	V _f m	V _f m	V _f m	V _t m	sFlt-1 m
Arteria V _f	r=0,50 p<0.05 n=19	r=0.94 p<0.001 n=15	r=0.76 p<0.001 n=16		
Arteria V _t				r=0.88 p<0.001 n=14	
Arteria sFlt-1					r=0.68 p<0.01 n=16
Vena V _f	r=0.48 p<0.05 n=19	r=0.86 p<0.001 n=16	r=0.71 p<0.001 n=17		
Vena V _t				r=0.56 p<0.05 n=16	
Vena sFlt-1					r=0.79 p<0.001 n=17

4.2.4. Gradiente materno-fetal del complejo VEGF.

Analizamos el gradiente que existe entre madre y feto del complejo VEGF, estudiando sólo aquellas gestaciones de las que tenemos muestra materna una semana previa al parto y observamos que existe un gradiente negativo materno-fetal (madre-vena umbilical) de VEGF_f y VEGF_t en tanto, que este se

invierte en el caso del sFlt-1, por tanto, la madre tiene mayor cantidad de sFlt-1 que el feto y éste, mayor cantidad de VEGF_f y total (Tabla 30). La media que obtenemos en las tablas es la media de las diferencias.

Tabla 30: análisis global del gradiente materno-fetal de los distintos parámetros del complejo VEGF.

Gradiente materno-fetal	media±es	n	p
VEGF_f materno - vena VEGF_f	-21,05±7,93	88	,009
VEGF_t materno - vena VEGF_t	-57,45±16,08	86	,001
sFlt-1 materno - vena sFlt-1	233,11±21,75	87	,000

En términos generales podemos decir que cuando se analiza por grupos, obtenemos los mismos gradientes materno-fetales, sin embargo, difiere la significación estadística.

En el grupo control observamos que estas relaciones persisten de forma significativa.

En el resto de grupos sólo resulta significativo el gradiente materno-fetal de sFlt-1, sólo llegando a alcanzar la significación estadística el VEGF_t en las gestaciones con CIR. Quizá estas relaciones no persisten al analizarlo por grupos por el escaso poder estadístico (tablas 31,32, 33).

Tabla 31: gradiente materno-fetal de los distintos parámetros del complejo VEGF en el grupo control.

Gradiente materno-fetal. Control	media±es	n	p
VEGF_f materno - vena VEGF_f	-57,88±25,36	18	,035
VEGF_t materno - vena VEGF_t	-81,93±25,59	18	,005
sFlt-1 materno - vena sFlt-1	151,49±37,88	18	,001

Tabla 32: gradiente materno-fetal de los distintos parámetros del complejo VEGF en el grupo con CIR.

Gradiente materno-fetal. CIR	media±es	n	p
VEGF _f materno - vena VEGF _f	-12,31±14,37	15	NS
VEGF_t materno - vena VEGF_t	-121,89±49,28	14	,027
sFlt-1 materno - vena VEGF R1	108,37±38,70	15	,013

Tabla 33: gradiente materno-fetal de los distintos parámetros del complejo VEGF en el grupo con HIE.

Gradiente materno-fetal. HIE	media±es	n	p
VEGF _f materno - vena VEGF _f	-23,86±22,09	16	NS
VEGF _t materno - vena VEGF _t	5,49±34,04	15	NS
sFlt-1 materno - vena VEGF R1	414,34±35,47	16	,000

Al analizar los gradientes en función de los diferentes grupos (control, CIR e HIE), se observa que en las gestaciones con HIE el gradiente madre-vena umbilical del sFlt-1 es mayor significativamente que en el resto de los grupos. Estos datos confirman el hecho diferencial de la HIE respecto al binomio materno-fetal respecto a las gestaciones control y afectados por CIR.

4.2.5. Relación arterio-venosa del complejo VEGF

Al analizar la relación arterio-venosa para valorar los posibles cambios del paso de la sangre venosa a nivel fetal y la posible participación del feto en los niveles del complejo VEGF observamos que en el feto, existe una asociación positiva arterio-venosa entre los parámetros VEGF_f ($r=0.74$ $p<0.001$ $n=93$), VEGF_t ($r=0.44$ $p<0.001$ $n=91$) y sFlt-1 ($r=0.23$ $p<0.05$ $n=89$), cuando analizamos todos los grupos (fig 6, 7, 8).

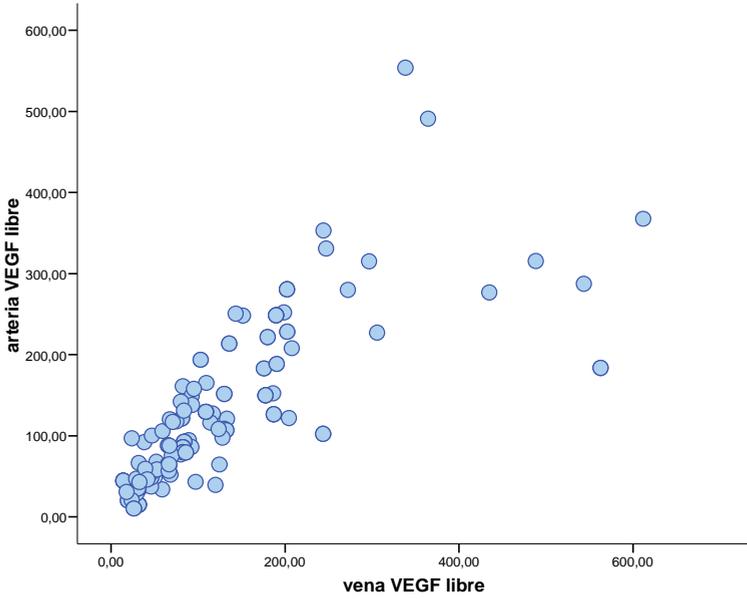


Figura 6: relación global de VEGF_f a nivel arterio-venoso ($r=0.74$ $p<0.001$ $n=93$).

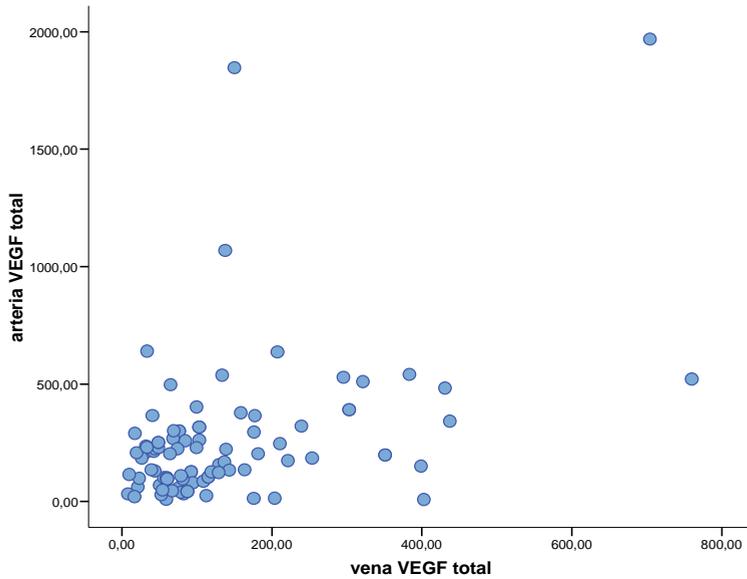


Figura 7: relación global de VEGF_t a nivel arterio-venoso ($r=0.44$ $p<0.001$ $n=91$).

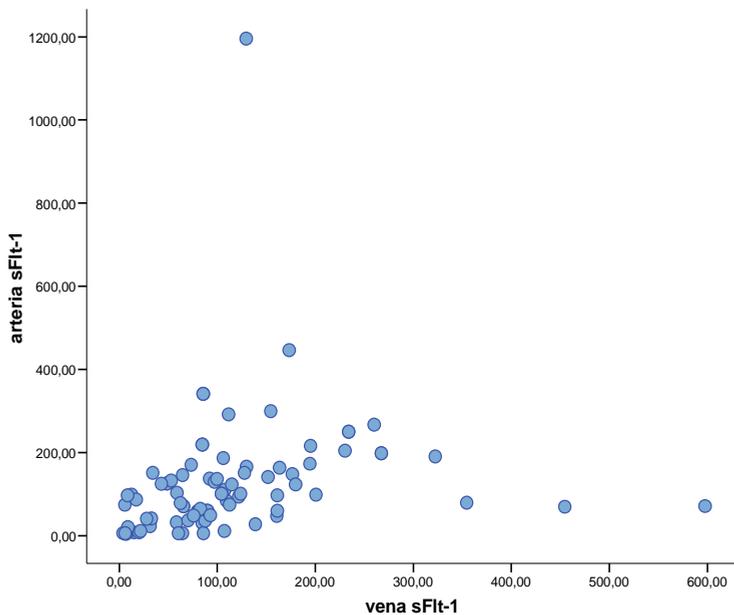


Fig 8: relación global de sFlt-1 a nivel arterio-venoso ($r=0.23$ $p<0.05$ $n=89$).

Al estudiar la asociación arterio-venosa por grupos observamos que tanto el $VEGF_f$ como el $VEGF_t$ pero no el sFlt-1 se asocian en los casos de CIR, siendo la asociación significativa en los tres parámetros en los casos de HIE. En los grupos control, la correlación arterio-venosa es significativa para el $VEGF_f$ y el sFlt-1 (tabla 34).

Tabla 34: asociación arterio-venosa del complejo VEGF por grupos

	Controles		CIR		HIE		
	Vena VEGF _f	Vena sFlt-1	Vena VEGF _f	Vena VEGF _t	Vena VEGF _f	Vena VEGF _t	Vena sFlt-1
Arteria VEGF _f	r=0.58 p<0.01 n=22		r=0.82 p<0.001 n=16		r=0.84 p<0.001 n=16		
Arteria VEGF _t				r=0.7 p<0.01 n=15		r=0.57 p<0.02 n=15	
Arteria sFlt-1		r=0.66 p<0.001 n=20					r=0.81 p<0.001 n=16

4.2.6 Gradiente arterio-venoso del complejo VEGF

Al analizar las diferencias arterio-venosas de los distintos componentes del complejo VEGF, observamos que sólo existen diferencias arterio-venosas de VEGF_t al analizar el total de la muestra (tabla 35) y por grupos en el caso de las gestaciones con HIE (tabla 36).

Tabla 35: gradiente arterio-venoso entre de los distintos parámetros del complejo VEGF, al realizar un estudio global de todos los grupos.

Gradiente arterio-venoso	media±es	n	p
arteria VEGF _f - vena VEGF _f	-3,21±9,04	92	NS
arteria VEGF _t - vena VEGF _t	117,39±28,66	90	,000
sFlt-1 - vena sFlt-1	10,05±16,53	88	NS

Tabla 36: gradiente arterio-venoso entre de los distintos parámetros del complejo VEGF en el grupo con preeclampsia.

Gradiente arterio-venoso. HIE	media±es	n	p
arteria VEGF _{free} - vena VEGF _{free}	19,29±18,26	15	NS
arteria VEGF_t - vena VEGF_t	146,28±65,31	14	,042
arteria sFlt-1 - vena sFlt-1	-5,10±12,75	15	NS

Tampoco se observan diferencias entre las diferencias de gradiente entre los 3 grupos.

4.3. HIE y Complejo VEGF.

Para valorar que papel tiene el complejo VEGF en la HIE, analizaremos los niveles del complejo VEGF tanto a nivel materno como fetal, así como su relación con la gravedad de la enfermedad.

Dentro de las pacientes con HTA, tenemos dos subgrupos, las que presentan proteinuria (HIE n=52) y las gestantes con HTA pero sin proteinuria (n=17), estudiaremos si existen diferencias entre estos subgrupos, comparándolo con el grupo control.

4.3.1 Variables epidemiológicas.

Analizamos 3 variables, la edad materna, la semana de parto y la semana en que se determinó el VEGF.

Al comparar la edad materna entre los distintos grupos, observamos que no existen diferencias significativas entre ellos, si bien las pacientes con HIE e HTA tuvieron 2 años más de media ($33,14 \pm 0,72$ n=51) y ($33,06 \pm 1,16$ n=17) respectivamente que las pacientes del grupo control ($30,42 \pm 0,73$ n=52).

Con respecto a la semana de parto, como era de esperar, las pacientes con HIE, parieron antes de forma significativa ($35,61 \pm 0,56$ n=51) en comparación con el grupo control ($38,7 \pm 0,26$ n=49) ($p < 0,001$) estando las gestantes con HTA en un grupo intermedio que no es diferente a ninguno de los anteriores ($37,2 \pm 0,5$ n=15). Sin embargo, si agrupamos las pacientes hipertensas (proteinúricas o no) y las comparamos al grupo control, las diferencias son significativas tanto para la edad ($30,42 \pm 0,73$ vs $33,12 \pm 0,61$ años) como para la semana de parto ($38,75 \pm 0,25$ vs $35,98 \pm 0,48$ semanas).

Al analizar las semanas de extracción de VEGF, no se observan diferencias entre los distintos grupos, sin bien en el grupo control se observa una menor edad de gestación que en el grupo de HTA o HIE. La explicación a este hecho, es que tenemos más controles en semanas más precoces, que de HIE e hipertensión que se recogieron cuando estas se manifestaron. Grupo control ($30,99 \pm 0,84$) HTA ($32,38 \pm 0,5$) HIE ($34,3 \pm 0,5$).

4.3.2 VEGF materno

Al analizar los niveles de los distintos parámetros del complejo VEGF en sangre materna en los 3 grupos (control, HTA, HIE) analizando todas las determinaciones que hemos tomado a lo largo de la gestación, observamos que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos, ni para el VEGF_f ni para el VEGF_t existiendo niveles de sFlt-1 más elevados en gestaciones con HIE que en las gestaciones control y en las HTA sin proteinuria (Tabla 37). El cociente VEGF_f/sFlt-1 a nivel materno será menor en las pacientes con HIE, lo que se puede traducir en un potencial antiangiogénico mayor.

Tabla 37: niveles de sFlt-1 en los distintos grupos (control, HTA, HIE).

SNK	GRUPOS	N	sFlt-1(pg/ml) p<0.05	
	Control	86	193,13±17,03	
HTA	23	236,28±44,68		
HIE	51			458,92±31,01

Tabla 38: Cociente VEGF_f/sFlt-1 en los distintos grupos (control, HTA, HIE).

SNK	GRUPOS	N	Cociente VEGF _f /sFlt-1 p<0.05	
	HIE	51	0,39±0,39	
Control	86			1,64±0,29
HTA	23			2,21±2,2

Al ajustar por semanas de gestación en el momento de la extracción, no se observa la influencia de ésta como factor confusor en la existencia de diferencias.

Realizamos curvas ROC para poder obtener un punto de corte tanto de los niveles de sFlt-1 como del cociente VEGF_f/sFlt-1 que nos permita diagnosticar la HIE.

En primer lugar, realizaremos una curva ROC (tanto para el sFlt-1 como para

el cociente), tomando 2 grupos, por un lado las gestantes con HIE y por otro lado las gestantes control y aquellas con HTA sin proteinuria.

Para el sFlt-1 obtenemos una ABC de 0.78, error estándar 0.04 Intervalo de confianza (IC) del 95% [0.73-0.83]. Punto de corte ≥ 291.61 . Sensibilidad 80.4% IC [66.9-90.2], Especificidad 71.4% IC [75-77.2], LHR (+) 2.81, LHR (-) 0.27. (Fig 9)

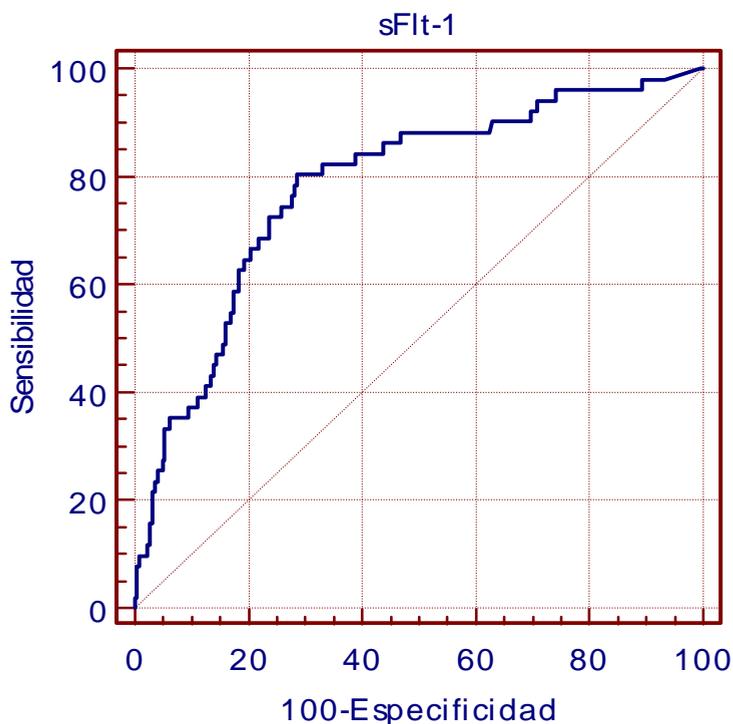


Fig 9: curva ROC de niveles de sFlt-1, para diagnóstico de HIE.

Cuando realizamos la curva ROC para el cociente $VEGF_t/sFlt-1$, obtenemos una ABC 0.75, error estándar 0.03, IC [0.69-0.80]. Punto de corte ≤ 0.24 , sensibilidad 68.6% IC [54.1-80.9], especificidad 72.8% IC [66.4-78.5], LHR (+) 2.52, LHR (-) 0.43 (Fig 10).

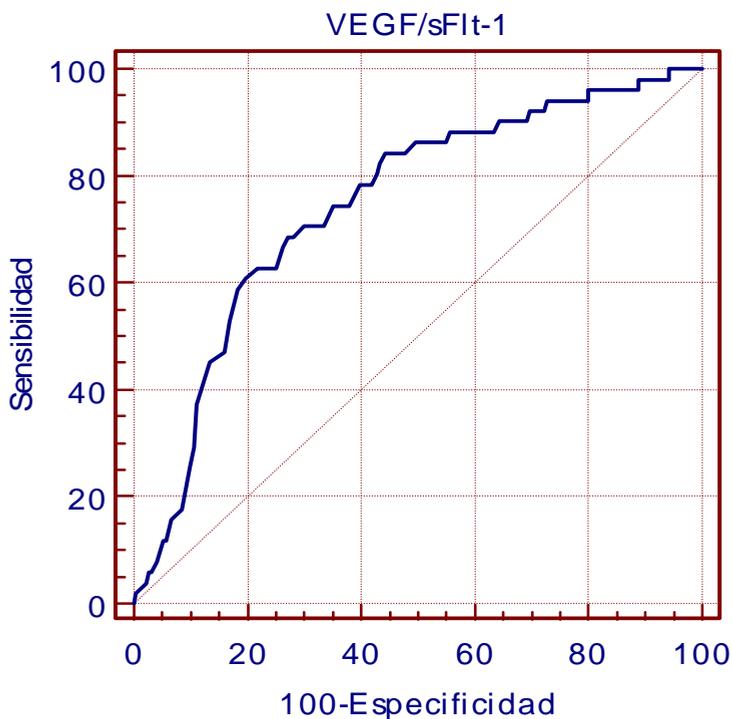


Fig 10: curva ROC de niveles de VEGF₇/sFlt-1, para diagnóstico de HIE.

Es decir, estas curvas son significativas, y nos posibilitan identificar los puntos de corte de sFlt-1 y del cociente VEGF₇/sFlt-1, que nos permitan diferenciar entre las gestantes control y las gestantes con HIE.

Cuando dividimos a las gestantes con HIE según la precocidad de la enfermedad, es decir de inicio precoz (≤ 34 semanas) y de inicio tardío (por encima de la semana 34), obtenemos para el sFlt-1 un ABC de 0.81 con un error estándar de 0.06 y un IC de [0.76 – 0.85]. El punto de corte es ≥ 404.13 , sensibilidad 80% IC [56.3 – 94.1], especificidad de 70.7% IC [70.8 - 81.5], LHR (+) 3.40, LHR (-) 0.26. (Fig 11)

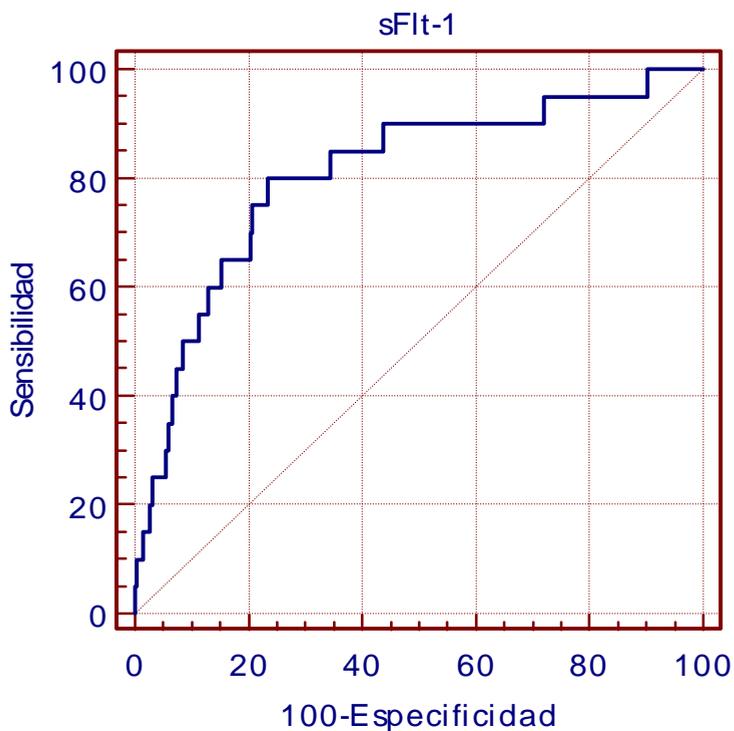


Fig 11: curva ROC para el sFlt-1 de gestantes HIE de inicio precoz versus inicio tardío.

Hacemos lo mismo para el cociente $VEGF_f/sFlt-1$ y obtenemos ABC 0.75 error estándar 0.05, IC [0.69 – 0.80]. Punto de corte ≤ 0.18 , sensibilidad 70% IC [45.7 - 88], especificidad 70.7% IC [72 – 82.6], LHR (+) 3.13, LHR (-) 0.39. (Fig 12).

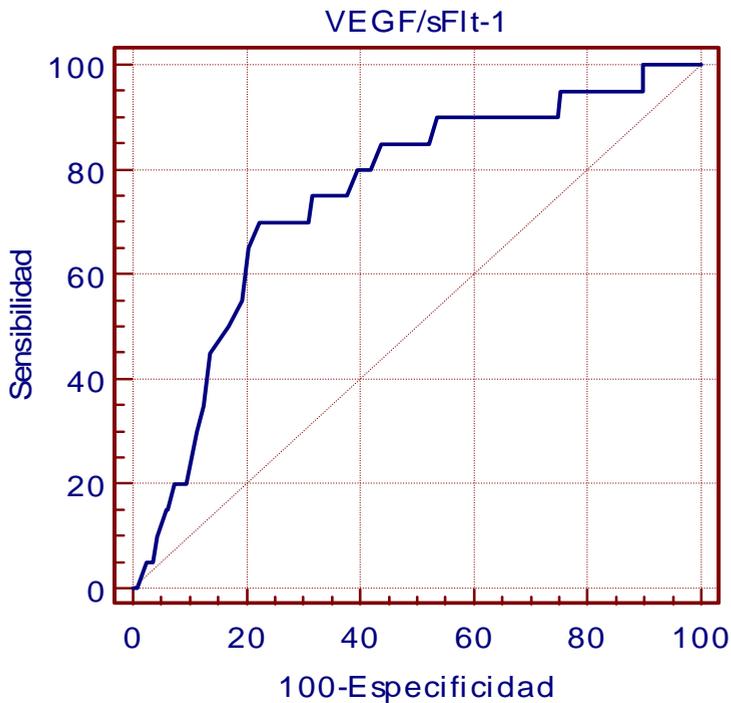


Fig 12: curva ROC para el VEGF_r/sFlt-1 de gestantes HIE de inicio precoz versus inicio tardío.

Es decir, podemos obtener unos puntos de corte tanto del sFlt-1 como para el cociente, que nos permite diferenciar entre una HIE de inicio precoz de una de inicio tardío.

Para poder diferenciar entre las gestantes con HTA sin proteinuria de las gestantes con HIE, realizamos una curva ROC con estos 2 grupos, obteniendo de forma significativa para el sFlt-1 una ABC de 0.78, error estándar 0.53, IC [0.77 – 0.87]. Punto de corte ≥ 356.15 , sensibilidad 68.6, IC [54.1 -80.9], especificidad 82.6% IC [71.2 – 94.9], LHR (+) 3.95, LHR (-) 0.38.

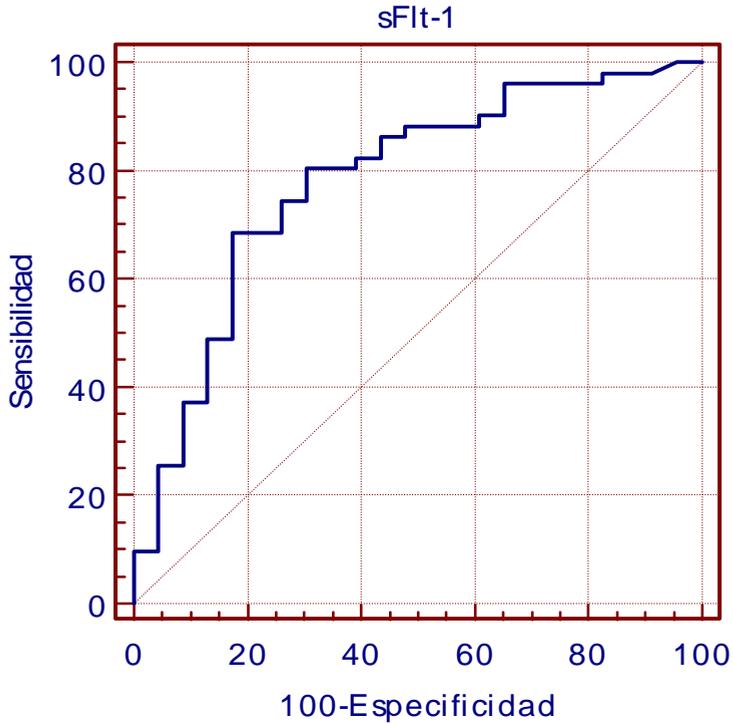


Fig 13: curva ROC para el sFlt-1 de gestantes HIE versus gestantes con HTA.

Cuando realizamos lo mismo para el cociente $VEGF_{\text{p}}/sFlt-1$ obtenemos un ABC de 0.75, error estándar 0.07 IC [0.74 – 0.84]. Punto de corte ≤ 0.19 , sensibilidad 60.8% IC [46.1 – 74.2], especificidad 82.6% IC [61.2 – 94.9], LHR (+) 3.5, LHR (-) 0.47. (Fig 14).

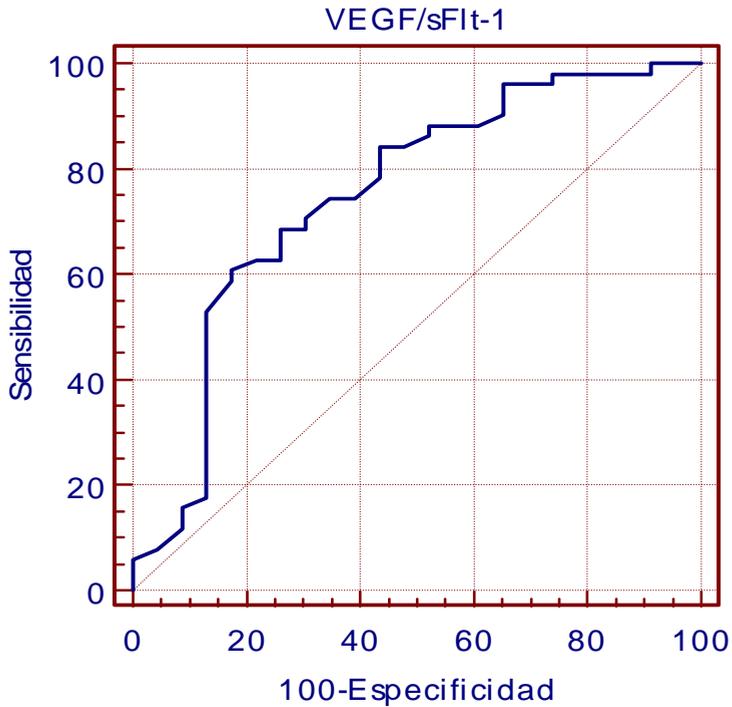


Fig 14: curva ROC para el VEGF_f/sFlt-1 de gestantes HIE versus gestantes con HTA.

4.3.3 VEGF fetal

Al analizar los niveles de complejo VEGF a nivel fetal (arteria y vena), en los distintos grupos, observamos que no existen diferencias significativas en ninguno de los 3 parámetros tanto en arteria como en vena. Tampoco existen diferencias en el cociente VEGF_f/sFlt-1.

Tabla 39: niveles de los 3 parámetros del complejo VEGF a nivel arteria y vena fetal

	Control (n=24)	HTA (n=10)	HIE (n=20)
VEGF _f arteria	126,03±15,17	100,38±17,70	156,82±30,31
VEGF _f vena	137,80±24,19	94,70±14,79	126,60±27,57
VEGF _t arteria	174,79±30,17	191,78±36,99	249,63±71,18
VEGF _t vena	135,78±21,38	89,36±18,38	86,83±16,55
sFlt-1 arteria	74,83±15,25	236,83±112,18	142,99±38,69
sFlt-1 vena	107,68±21,04	85,28±15,68	148,80±50,16

4.3.4 Relación del complejo VEGF materno y parámetros de gravedad de la HIE.

Para valorar la situación de gravedad en que se encuentra una gestante con HIE, utilizamos parámetros bioquímicos y hemodinámicos.

Los parámetros bioquímicos que utilizamos para valorar el grado de afectación de la enfermedad a nivel materno son las enzimas hepáticas (GOT, GPT, LDH), creatinina, ac úrico, urea, proteínas, hemograma (Hb, Hto, plaquetas) y fibrinógeno en sangre y proteinuria.

Los parámetros hemodinámicos que nos informan de la gravedad a nivel materno son la TA sistólica, TA diastólica y media. También analizamos el bienestar fetal a través del doppler de arteria umbilical, ACM y arterias uterinas.

4.3.4.1 Relación de la TA con marcadores putativos de gravedad en la HIE.

Analizamos la relación entre la TA y los parámetros de gravedad, observando que no se puede descartar que exista un sesgo en algunos parámetros, donde no podemos diferenciar que está mediado por la HTA y que está mediado por el VEGF y alrevés, cuando uno se asocia y el otro no a un parámetro, probablemente se trata de relaciones independientes.

Tabla 40: correlación de HTA con los parámetros de gravedad de HIE.

	TA sistólica	TA diastólica	TA media
Plaquetas	r=-0.18 p<0.05	r=- 0.17 p<0.05	r=-0.17 p<0.05
GOT	r= 0.16 p<0.05	r= 0.17 p<0.05	r= 0.17 p<0.05
GPT	r= 0.16 p<0.05	r= 0.17 p<0.05	r= 0.17 p<0.05
LDH	r= 0.31 p<0.001	r= 0.19 p<0.05	r= 0.25 p<0.01
Creatinina	r= 0.32 p<0.05	r= 0.34 p<0.05	r= 0.34 p<0.01
Acido úrico	r= 0.86 p<0.001	r= 0.75 p<0.001	r= 0.82 p<0.001
Urea	r= 0.34 p<0.001	r= 0.32 p<0.001	r= 0.34 p<0.001
Proteínas en sangre	r= -0.33 p<0.05	r= -0.31 p<0.05	r= -0.33 p<0.05
Proteinuria	NS	NS	NS

4.3.4.2 Análisis global del complejo VEGF en todos los grupos a nivel materno.

Cuando realizamos un estudio en conjunto de todos los grupos (Tabla 41), observamos que existe una correlación positiva del sFlt-1 tanto con la TA sistólica (r=0.28 p<0.001 n=186) TA diastólica (r=0.29 0<0.001 n=186) como con la TA media (r=0,3 p<0.001 n=186), así como con la proteinuria (r=0.42 p<0.001 n=71).

El sFlt-1 también se asocia de forma positiva con la LDH (r=0.25 p<0.01 n=119), creatinina en sangre (r=0.29 p<0.001 n=136) y urea (r=0.34 p<0.001 n=117). Es decir peores parámetros se asocian a mayor cantidad de sFlt-1.

Por otro lado el VEGF_f presenta una asociación positiva con la Hb (r=0.19 p<0.05 n=135) Hto (r=0.17 p<0.05 n=135) y una asociación negativa con el fibrinógeno (r=-0.19 p<0.05 n=133) y con las proteínas en sangre (r=-0.18 p<0.05 n=126).

El VEGF_f presenta al contrario que el sFlt-1 una asociación negativa con la LDH (r=-0,19 p<0.05 n=119) al igual que el cociente VEGF_f/sFlt-1 con la LDH (r=-0.20 p<0.05 n=119). También el VEGF_f presenta una correlación positiva con la proteinuria (r=0.24 p<0.05 n=71).

Tabla 41: correlación del complejo VEGF con parámetros de gravedad de la HIE.

	VEGF_f	VEGF_t	sFlt-1	VEGF_f /sFlt-1
Plaquetas	NS	NS	NS	NS
GOT	NS	NS	NS	NS
GPT	NS	NS	NS	NS
LDH	r=-0.19 p<0.03	NS	r=0.25 p<0.01	r=-0.19 p<0.05
Hb	NS	r=0.19 p<0.05	NS	NS
Hto	NS	r=0.17 p<0.05	NS	NS
Creatinina	NS	NS	r=0.29 p<0.001	NS
Acido úrico	NS	NS	NS	NS
fibrinógeno	NS	r=-0.19 p<0.05	NS	NS
Urea	NS	NS	r=0.34 p<0.001	NS
Proteínas en sangre	NS	r=-0.18 p<0.05	NS	NS
Proteinuria	NS	NS	r=0.42 p<0.001	NS
TA sistólica	NS	NS	r=0.28 p<0.001	NS
TA diastólica	NS	NS	r=0.29 p<0.001	NS

Al analizar la relación que tienen los parámetros del complejo VEGF materno con los valores del doppler en los tres territorios (uterinas, umbilical, cerebral y cociente cerebro/placentario) (tabla 42) observamos:

El sFlt-1 materno, presenta una correlación positiva con el IP de arteria umbilical, una correlación negativa con todos los parámetros a nivel de ACM y presenta una asociación positiva con todos los parámetros a nivel de arterias uterinas. También con el cociente cerebro-placentario tiene una asociación negativa en los dos parámetros (IR, IP) , es decir, tenemos mayor cantidad de sFlt-1 cuanto peores son los valores de doppler en los tres territorios, es

decir, mayores resistencias a nivel de arteria umbilical y arterias uterinas y menores resistencias a nivel de ACM, por tanto mayor vasodilatación cerebral.

El $VEGF_f$ presenta correlación negativa con los parámetros de ACM y cociente cerebro-placentario. Sin embargo, cuando analizamos el cociente $VEGF_f/sFlt-1$, observamos que existe una correlación positiva con los parámetros a nivel de ACM, lo que significa que existe mayor potencial vasculogénico cuanto mayores son las resistencias a nivel de ACM o al contrario, un menor potencial vasculogénico o una inhibición global de la vasculogénesis, se asocia a una mayor redistribución del flujo, con aumento de éste a nivel de ACM. Tanto el $sFlt-1$ como el $VEGF_f$, presentan una correlación negativa con los parámetros de ACM. Esto se podría explicar porque ambos factores aumentan de forma paralela durante la gestación, manteniendo una situación estable en la angiogénesis (entre un factor inhibidor y un factor estimulador de la angiogénesis), sin embargo, en situaciones patológicas, es posible que llegue un momento en que este equilibrio entre ambos factores se pierda, existiendo un aumento más rápido del $sFlt-1$, creando una situación más antiangiogénica y por tanto existiendo cocientes de $VEGF_f/sFlt-1$ menores.

El $VEGF_f$ sólo presenta una correlación negativa con el IR e IP del cociente cerebro-placentario.

Tabla 42: relación que tienen los parámetros del complejo VEGF con los valores del doppler en los tres territorios (uterinas, umbilical, cerebral y cociente cerebro/placentario), en un estudio global.

	VEGF _f materno	VEGF _t materno	sFlt-1 materno	VEGF _f /sFlt-1 materno
umbilical IP			r=0.15 p<0.05 n=212	
ACM IR	r=-0.18 p<0.01 n=211		r=-0.38 p<0.001 n=211	r=0.17 p<0.01 n=211
ACM IP	r=-0.20 p<0.01 n=210		r=-0.41 p<0.001 n=210	r=0.25 p<0.001 n=210
Uterinas IR			r=0.23 p<0.001 n=221	
Uterinas IP			r=0.14 p<0.001 n=212	
CCP IR		r=-0.19 p<0.01 n=205	r=-0.30 p<0.001 n=210	
CCP IP	r=-0.16 p<0.05 n=208	r=-0.17 p<0.05 n=203	r=-0.39 p<0.001 n=208	

Al igual que antes, también analizamos la relación entre la TA y el doppler a nivel de los 3 territorios (uterinas, umbilical y ACM) (Tabla 43) observando que no se puede descartar que exista un sesgo en algunos parámetros, donde no podemos diferenciar que está mediado por la HTA y que está mediado por el VEGF, por ello, para valorar el factor más implicado en el resultado hemodinámica (doppler), hemos realizado un análisis de regresión múltiple, donde se introduce como variables predictoras la TA sistólica, diastólica y media, así como el VEGF_f, VEGF_t, sFlt-1 y cociente VEGF_f/sFlt-1 y observamos que el único factor que se asocia de forma positiva significativamente es el sFlt-1 con el IP de arterias uterinas (p=0.027), estando próximos a la significación estadística en la asociación negativa entre

el sFlt-1 con el CCP ($p=0.078$) ($n=53$). En su conjunto, estos resultados, nos permiten afirmar que al menos el sFlt-1 jugaría un papel en la regulación del flujo útero-placentario.

Tabla 43: correlación de TA con el doppler en los 3 territorios (umbilical, ACM, uterinas).

	TA sistólica	TA diastólica	TA media
Umbilical IR	$r=0.25$ $p<0.001$	$r=0.23$ $p<0.001$	$r=0.25$ $p<0.001$
Umbilical IP	$r=0.26$ $p<0.001$	$r=0.24$ $p<0.001$	$r=0.26$ $p<0.001$
ACM IR	NS	NS	NS
ACM IP	NS	NS	NS
Uterinas IR	$r=0.27$ $p<0.001$	$r=0.28$ $p<0.001$	$r=0.29$ $p<0.001$
Uterinas IP	$r=0.34$ $p<0.001$	$r=0.32$ $p<0.001$	$r=0.34$ $p<0.001$
CCP IR	$r=-0.26$ $p<0.001$	$r=-0.27$ $p<0.001$	$r=-0.28$ $p<0.001$
CCP IP	$r=-0.28$ $p<0.001$	$r=-0.28$ $p<0.001$	$r=-0.29$ $p<0.001$

4.3.4.3 Estudio por grupos del complejo VEGF materno

4.3.4.3.1 Gestaciones control

Al analizar los mismos parámetros por grupos, en el grupo control observamos que sólo se mantiene la relación positiva entre la TA sistólica al ingreso y el sFlt-1 ($r=0.38$ $p<0.05$ $n=42$), es decir mayor TA, mayor cantidad de sFlt-1.

A nivel de doppler sólo observamos a nivel de ACM las mismas correlaciones que en el estudio global, no siendo significativas las relaciones en el resto de territorios (Tabla 44). Observamos que existe una correlación positiva entre el doppler a nivel de arteria umbilical y arterias uterinas con el cociente $VEGF/sFlt-1$, para lo que no tenemos una explicación.

Tabla 44: relación que tienen los parámetros del complejo VEGF con los valores del doppler en los tres territorios en el grupo control.

	VEGF _f materno	VEGF _t materno	sFlt-1 materno	VEGF _f /sFlt-1 materno
AU IR				r=0,37 p<0.01 n=61
AU IP				r=0.44 p<0.001 n=60
ACM IR	r=-0.37 p<0.001 n=60		r=-0.41 p<0.001 n=60	r=0.37 p<0.01 n=60
ACM IP	r=-0.41 p<0.001 n=59		r=-0.52 p<0.001 n=59	r=0.47 p<0.001 n=59
Uterinas IR				r=0.34 p<0.01 n=69
Uterinas IP				r=0.26 p<0.05 n=69
CCP IR	r=-0.3 p<0.05 n=60			
CCP IP	r=-,39 p<0.01 n=59		r=-0.27 p<0.05 n=59	

4.3.4.3.2 Gestaciones con HTA

En las pacientes con HTA sin proteinuria, observamos que la TA diastólica se asocia de forma negativa con el VEGF_f (r=-0.52 p<0.05 n=19) y de forma positiva con el sFlt-1 (r=0.44 p<0.05 n=19), sin presentar asociación con ninguno de los otros parámetros analíticos.

A nivel de doppler, se observa que el sFlt-1 presenta una asociación negativa a nivel de ACM con el IR (r=-0.60 p<0.05 n=17) y con el IP (r=-0.48 p<0.05 n=17) y con el cociente cerebroplacentario del IR (r=-0.59 p<0.05 n=17) y del IP (r=-0.57 p<0.05 n=17). No existiendo más asociaciones.

4.3.4.3.3 Gestaciones con HIE

En las gestaciones con HIE solo observamos a nivel analítico una asociación positiva entre el sFlt-1 y la proteinuria ($r=0.28$ $p<0.05$ $n=50$), es decir, a mayor proteinuria, mayor cantidad de sFlt-1.

A nivel de doppler, las relaciones que observamos son entre el sFlt-1 y el IR de AU ($r=0.38$ $p<0.01$ $n=42$) así como el IP de AU ($r=0.4$ $p<0.01$ $n=42$), y con el cociente cerebroplacentario IR ($r=-0.35$ $p<0.05$ $n=41$) e IP ($r=-0.40$ $p<0.01$ $n=41$), es decir, a mayor cantidad de sFlt-1 peores parámetros.

4.3.5 Relación del complejo VEGF fetal y parámetros de gravedad de la HIE.

Al realizar un análisis de los parámetros del complejo VEGF en relación con los parámetros de gravedad tanto a nivel hemodinámica (utilizando el doppler de los 3 territorios) como bioquímico, en todos los grupos, encontramos a nivel del territorio de arterias uterinas, una correlación positiva entre el IP de arterias uterinas con el sFlt-1 a nivel venoso (IR $r=0.26$ $p<0.01$ $n=60$), es decir, a mayor cantidad de sFlt-1 peor perfusión útero-placentaria. No observamos ninguna correlación entre el complejo VEGF a nivel arterial y venoso con los parámetros del doppler en arteria umbilical. Sin embargo observamos una correlación negativa entre el sFlt-1 de arteria umbilical con el IP del CCP ($r=-0.25$ $p<0.05$ $n=64$) como con el IR del CCP ($r=-0.26$ $p<0.05$ $n=65$), es decir, a mayor sFlt-1 menor cociente y por tanto, mayor redistribución fetal. A nivel bioquímico, no encontramos ninguna correlación.

En el análisis global, también observamos una correlación negativa entre el sFlt-1 a nivel arterial y las semanas de parto ($r=-0,28$ $p<0.001$).

Al realizar el análisis por grupos, se minimiza tanto el número de casos, que las asociaciones que se observan son mínimas y no consistentes.

4.4. CIR y complejo VEGF.

Para valorar que papel tiene el complejo VEGF en las gestantes con CIR, analizaremos los niveles del complejo VEGF tanto a nivel materno como fetal, así como su relación con la gravedad de la enfermedad, de forma semejante a como hemos hecho con las pacientes con HIE.

Subdividimos las pacientes en 3 grupos, las gestantes control (n=61) las gestantes con PEG (n=25) y las gestantes con CIR (n=27).

4.4.1 Variables epidemiológicas

Al analizar la edad media de estos 3 grupos no se observan diferencias significativas, siendo la edad media de $29,91 \pm 0,52$ años.

Con respecto a la semana de parto, como era de esperar, las pacientes con CIR de forma significativa, parieron antes ($36,44 \pm 0,54$ n=27) que el grupo control ($38,7 \pm 0,25$ n=49) y que las gestaciones con PEG ($38,44 \pm 0,37$ n=25).

Al analizar las semanas de extracción de VEGF, el grupo control presenta menor semana de extracción que en las gestaciones con PEG y CIR, aunque la diferencia no es significativa. La explicación a este hecho, al igual que en la HIE, es que tenemos más controles en semanas más precoces y de PEG y CIR cuando estás se diagnosticaron. Grupo control ($30,99 \pm 0,84$) PEG ($33,71 \pm 0,89$) CIR ($32,55 \pm 0,97$)

Al valorar el peso del RN, como era de esperar, es menor de forma significativa en las gestaciones con CIR ($1955 \pm 103g$), siguiéndole las gestaciones con PEG ($2558 \pm 62,47g$), siendo las de mayor peso las gestaciones control ($3351 \pm 68,23g$).

4.4.2 VEGF materno

Al analizar los niveles de los distintos parámetros del complejo VEGF en sangre materna en los 3 grupos (control, PEG y CIR), observamos que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para el $VEGF_f$. De forma consistente, se observa una diferencia significativa en los fetos con CIR respecto a gestaciones control en términos de $VEGF_f$, sFlt-1 y $VEGF_f/sFlt-1$. En las tablas siguientes (45-48) observamos estos resultados:

Tabla 45: Niveles de VEGF_f materno .

SNK	GRUPOS	N	VEGF _f (pg/ml) p<0.05	
	Control	86	82,85±5,27	
	PEG	40	103,67±12,93	
	CIR	39	103,91±17,84	

Tabla 46: Niveles de VEGF_t materno

SNK	GRUPOS	N	VEGF _t (pg/ml) p<0.05	
	Control	82	48,24±4,92	86,95±14,36
	PEG	39	50,07±9,78	
	CIR	38		

Tabla 47: Niveles de sFlt-1 materno.

SNK	GRUPOS	N	sFlt-1 (pg/ml) p<0.05	
	Control	86	193,13±17,03	245,37±26,97 298,13±31,97
	PEG	40	245,37±26,97	
	CIR	39		

Tabla 48: Valores del cociente VEGF_f/sFlt-1 materno.

SNK	GRUPOS	N	VEGF _f /sFlt-1 p<0.05	
	CIR	39	,45±0,29	1,20±0,41 1,64±0,29
	PEG	40	1,20±0,41	
	Control	86		

El valor del sFlt-1 materno, pudiera estar influenciado (interacción) por la semana de extracción de la muestra ya que al realizar los análisis de regresión lineal, la ecuación que introduce los valores de PEG y CIR respecto la que introduce en el segundo paso la semana de extracción, son ambas significativas $p<0.005$ y $p<0.001$ respectivamente. Se observa una variación sustancial del coeficiente de correlación que pasa de 0,25 a 0,41, más del 20%. Otro tanto puede afirmarse cuando hablamos del cociente VEGF_f/sFlt-1. Hemos realizado un análisis homogeneizando las semanas de extracción del complejo VEGF, estudiando sólo aquellos casos de ≥ 23 semanas, no siendo diferentes en este caso las semanas de extracción del VEGF entre los 3

grupos. Al repetir el análisis del complejo VEGF en función de los grupos control, PEG y CIR, observamos que son significativos los análisis de la varianza para $VEGF_t$ y sFlt-1 ($p < 0.05$) siendo las gestaciones con CIR las que mayor sFlt-1 tienen respecto al grupo control (SNK $p < 0.05$), ocupando una situación intermedia las gestaciones con PEG y con menores valores las gestaciones control. Un orden de potencia semejante ocurre con el cociente $VEGF_t/sFlt-1$ siendo de menor a mayor el cociente CIR < PEG < Control

Cuando intentamos buscar un punto de corte diagnóstico para CIR en los niveles de sFlt-1, así como del cociente $VEGF_t/sFlt-1$, para el primero no obtenemos un ABC significativa y para el segundo a pesar de ser significativa el área no es una curva adecuada para obtener un buen rendimiento diagnóstico.

Curva ROC de sFlt-1 para CIR versus PEG y controles: ABC 0.53, error estándar 0.05 IC [0.47 – 0.60]. Punto de corte ≥ 285.17 , sensibilidad 72.5% IC [56.5 – 85.4], especificidad 41.3% IC [34.9 -47.9], LHR (+) 1.23, LHR (-) 0.67. (Fig 15).

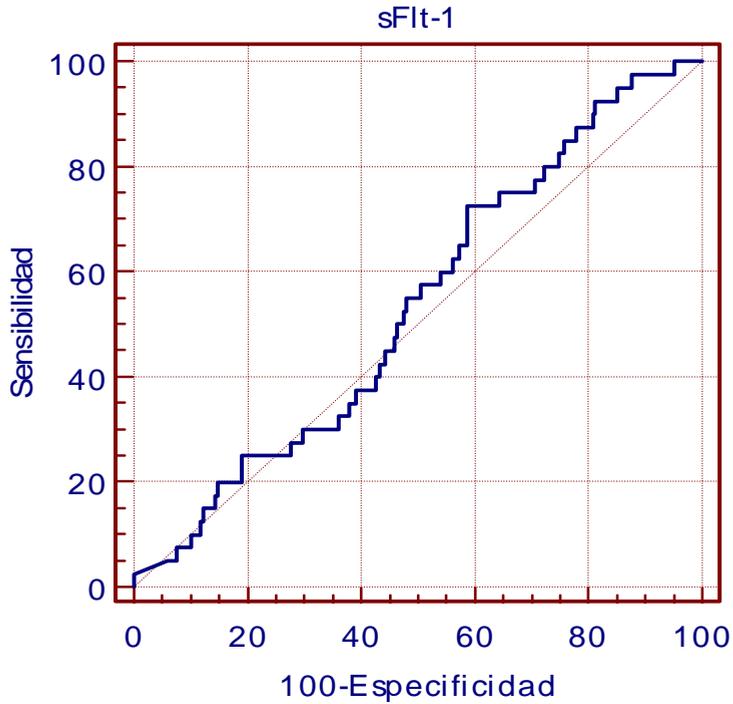


Fig 15: Curva ROC de sFlt-1 para CIR versus PEG y controles

Curva ROC para VEGF_f/sFlt-1 para CIR versus PEG y controles: ABC 0.57 error estándar 0.05, IC [0.51 – 0.63]. Punto de corte ≥ 0.20 , sensibilidad 85% IC [70.2 – 94.3], especificidad 31.9% IC [26 – 38.3], LHR (+) 1.25, LHR (-) 0.47. (Fig 16)

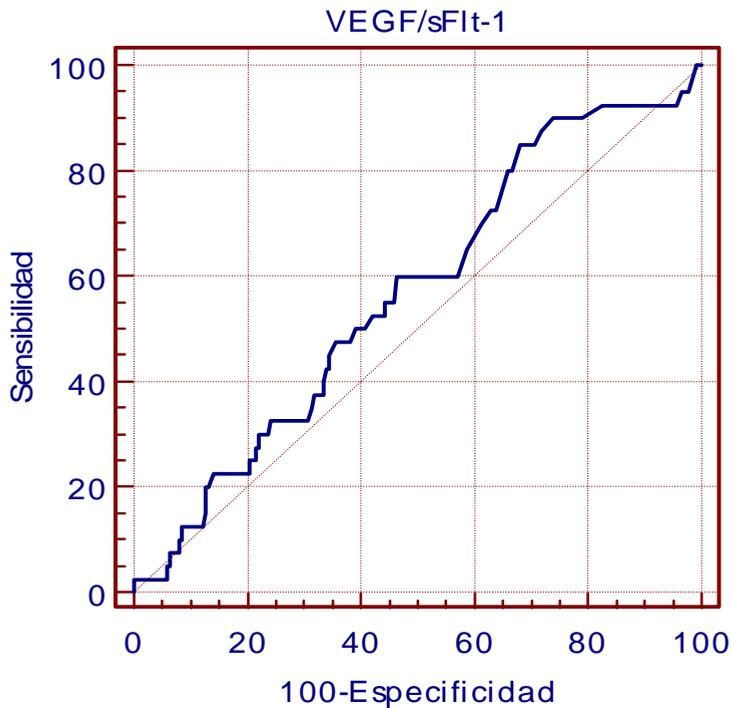


Fig 16: Curva ROC de VEGF_f/sFlt-1 para CIR versus PEG y controles.

4.4.3 VEGF fetal.

Cuando analizamos los distintos parámetros del complejo VEGF a nivel de arteria y vena, observamos que no existen diferencias significativas para ninguno de los 3 parámetros, tanto a nivel arterial como venoso (tabla 49).

Tabla 49: niveles de los 3 parámetros del complejo VEGF en arteria y vena umbilical

	Control (n=25)	PEG (n=16)	CIR (n=20)
VEGF _f arteria	122,39±15	122,03±21,33	133,30±30,85
VEGF _f vena	133,53±23,60	137,31±32,96	131,91±34,42
VEGF _t arteria	177,64±29,08	400,21±150,54	236,25±37,84
VEGF _t vena	138,78±20,73	150,72±47,42	205,15±42,75
sFlt-1 arteria	71,84±14,88	77,31±16,23	100,95±25,68
sFlt-1 vena	103,53±20,58	133,30±35,84	117,5±26,27

4.4.4 Relación del complejo VEGF materno y parámetros de gravedad del CIR.

Para valorar el bienestar fetal anteparto, utilizamos el doppler tanto a nivel materno (arterias uterinas) como a nivel fetal (arteria umbilical, arteria cerebral media) y valoraremos la relación que tienen estos parámetros con los distintos componentes del complejo VEGF.

4.4.4.1 Análisis global del complejo VEGF en todos los grupos a nivel materno.

El estudio global de la relación del complejo VEGF con los parámetros del doppler, ya lo hemos realizado cuando hemos estudiado a las gestantes con HIE (apartado 4.3.4.2) donde hemos observado que a mayor cantidad de sFlt-1 materno existe un aumento de las resistencias a nivel de arteria umbilical y una disminución de las resistencias a nivel de ACM, lo que sugiere una mayor redistribución fetal y por tanto, un mayor compromiso fetal desde el punto de vista hemodinámico. Además existe mayor cantidad de sFlt-1 a menor cociente VEGF_f/sFlt-1 (menor potencial vasodilatador materno) y en consecuencia, posible peor estado fetal.

También observamos que a mayor potencial vasodilatador materno (objetivado con el cociente VEGF_f/sFlt-1), más resistencias a nivel de ACM y por tanto mejor estado fetal.

El VEGF_t no se correlaciona con ningún parámetro del doppler.

4.4.4.2 Análisis por grupos del complejo VEGF materno

4.4.4.2.1 Gestaciones control

El estudio en las gestaciones control del doppler en relación con el VEGF materno, ya lo hemos realizado cuando hemos hecho el estudio de las gestaciones con HIE. Tabla 44.

4.4.4.2.2 Gestaciones con PEG

En la gestaciones con PEG se mantiene la correlación negativa entre el sFlt-1 y el doppler a nivel de ACM (IR ($r=-0.61$ $p<0.01$ $n=32$) IP ($r=-0,55$ $p<0.01$ $n=32$)) y con el IP del cociente cerebro/placentario ($r=-0.38$ $p<0.05$ $n=32$), no existiendo más relaciones.

4.4.4.2.3 Gestaciones con CIR

En las gestaciones con CIR la única relación que objetivamos es una correlación positiva entre el sFlt-1 y el doppler a nivel de arterias uterinas (IR, $r=0,37$ $p<0.05$ $n=30$), es decir, a mayor cantidad de sFlt-1 peor perfusión útero-placentaria.

Por otro lado, hemos considerado como parámetro de gravedad el peso fetal, expresado de forma bruta, su percentil, así como el peso placentario y lo relacionamos con aquellas muestras maternas que tenemos dentro de la semana de parto.

Al estudiar la asociación del complejo VEGF y el peso del RN en todos los grupos, se observa que el sFlt-1 materno, se asocia de forma negativa con el peso del RN ($r=-0.25$ $p<0.01$ $n=119$) no presentando relación con el peso placentario.

Al realizar el análisis por grupos, en las gestaciones control observamos una correlación negativa entre el peso del RN y el sFlt-1 ($r=-0,41$ $p<0,05$ $n=25$).

En las gestaciones con CIR, además de observar una asociación negativa entre el sFlt-1 materno y el peso del RN ($r=-0.25$ $p<0.01$ $n=27$) también existe una asociación negativa entre el sFlt-1 y el peso placentario ($r=-0,51$ $p<0,03$

n=17) . No se observan estas asociaciones en los casos con PEG.

4.4.5 Relación del complejo VEGF fetal y parámetros de gravedad del CIR.

4.4.5.1 Análisis global del complejo VEGF en todos los grupos a nivel fetal.

Este análisis que relaciona el doppler materno-fetal con el complejo VEGF, ya lo hemos realizado en el apartado 4.3.5 de HIE.

4.4.5.2 Análisis por grupos del complejo VEGF fetal

4.4.5.2.1 Gestaciones control

A nivel de las gestaciones control, no observamos ninguna relación.

4.4.5.2.2 Gestaciones con PEG

En las gestaciones con PEG, no observamos ninguna relación.

4.4.5.2.3 Gestaciones con CIR

En las gestaciones con CIR, observamos una correlación positiva a nivel de vena fetal, entre el sFlt-1 con los índices velocimétricos a nivel de arteria umbilical (IR $r = 0.68$ $p < 0.01$ $n=13$) (IP $r=0.65$ $p < 0.05$ $n=13$) y de arterias uterinas (IR $r=0.73$ $p < 0.01$ $n=11$) (IP $r=0.84$ $p < 0.001$ $n=11$).

El complejo VEGF a nivel de cordón umbilical (arteria y vena), no presenta una asociación consistente con el peso fetal, su percentil y con el peso placentario.

4.5. Hipoxia fetal y Complejo VEGF.

Para valorar el estado fetal, utilizamos unos parámetros directos (peso fetal y placentario, índice Apgar y pH de vasos umbilicales) otros indirectos (doppler a nivel de arterias uterinas, umbilical y ACM) y valoraremos si existe relación entre estos parámetros y el complejo VEGF. Estudiaremos aquellas pacientes que tengan muestra materna, dentro de la semana de parto.

Definimos hipoxia fetal cuando existe un pH < 7,20 a nivel de arteria umbilical. Nosotros dividimos en dos grupos utilizando como punto de corte este valor de pH, para valorar si existen diferencias en los niveles del complejo VEGF y observamos que no existen diferencias para ningún parámetro tanto a nivel materno, como a nivel fetal (arteria y vena).

4.5.1 Complejo VEGF materno

4.5.1.1 Parámetros directos de bienestar fetal y complejo VEGF

Existe una correlación negativa entre el peso del RN ($r=-0,25$ $p<0,001$ $n=119$) y el sFlt-1 no existiendo correlación con el peso placentario, ya dicho anteriormente.

Por otro lado, el $VEGF_f$ presenta una correlación negativa con el índice de Apgar al primer ($r=-0,25$ $p<0,001$ $n=119$) y quinto minuto ($r=-0,26$ $p<0,01$ $n=119$), observando también una correlación negativa entre el sFlt-1 y el índice de Apgar al quinto minuto ($r=-0,2$ $p<0,05$ $n=119$). Es decir a peor índice de Apgar, mayores niveles de sFlt-1 y mayores de $VEGF_f$, probablemente el aumento de éste último, sea secundario a la situación de hipoxia.

No existiendo ninguna correlación de estos parámetros con el $VEGF_t$.

No observamos ninguna asociación con el EAB.

4.5.1.2 Parámetros indirectos de bienestar fetal y complejo VEGF

Como ya hemos visto antes (tabla 42), cuando relacionamos el complejo VEGF con los parámetros del doppler observamos que existe mayor cantidad de sFlt-1 a peor perfusión uteroplacentaria y peor circulación feto-placentaria, existiendo mayor cantidad de sFlt-1 a mayor redistribución fetal (Fig 17-19).

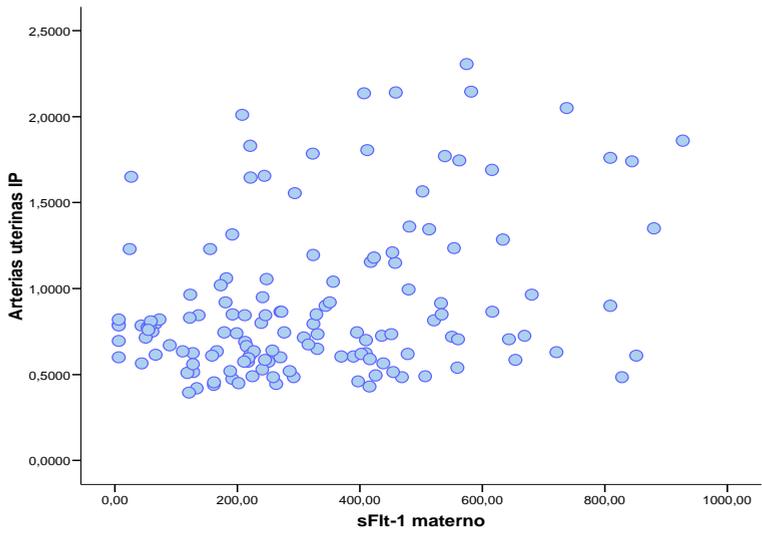


Fig 17: Relación sFlt-1 con IP de arterias uterinas (IP $r = 0.22$ $p < 0.001$ $n = 221$).

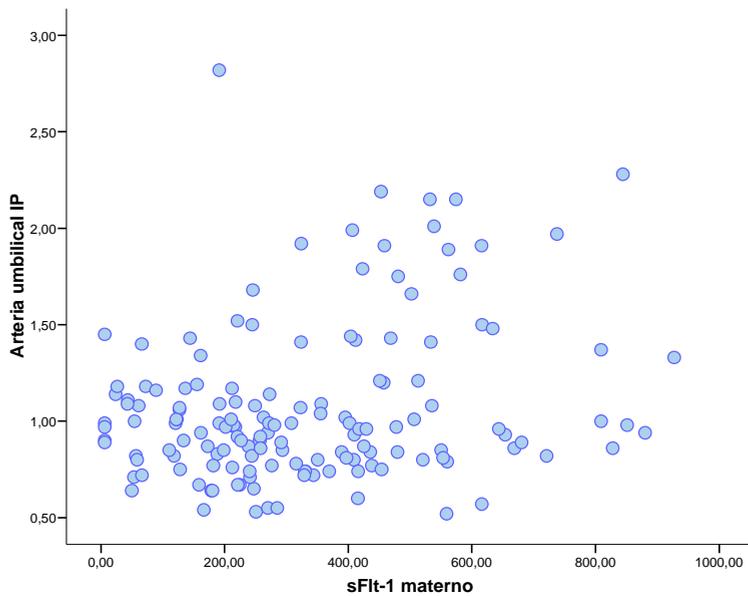


Fig 18: Relación sFlt-1 con IP de arteria umbilical ($r = 0.14$ $p < 0.05$ $n = 212$).

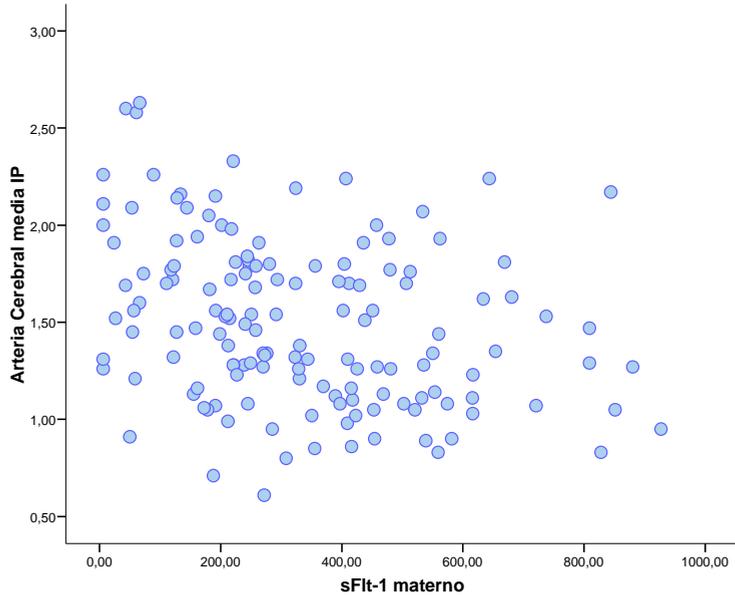


Fig 19: Relación sFlt-1 con IP de ACM (IP $r = -0.38$ $p < 0.001$ $n = 210$).

También observamos (tabla 42) que a mayor potencial vasculogénico a nivel materno (valorado con el cociente), existe mayores resistencias a nivel de ACM o viceversa, a mayor inhibición de la vasculogénesis, mayor redistribución del flujo fetal, con un aumento de flujo a nivel de cerebral.

A nivel de arterias uterinas, también valoramos de forma cualitativa la morfología de la onda, es decir, la presencia o no de notch tanto unilateral como bilateral. Su presencia nos estará indicando mayores resistencias a nivel de este territorio vascular. Agrupamos las gestaciones según la presencia de notch y si este es unilateral o bilateral y valoramos en primer lugar los niveles del complejo VEGF en estos tres grupos, observando que no existen diferencias significativas para el $VEGF_f$, ni para el $VEGF_t$ pero si que existen diferencias significativas con el sFlt-1, siendo las gestaciones con notch bilateral las que mayor nivel de sFlt-1 presentan (507.69 ± 195.6 pg/ml) vs gestaciones sin notch (296.51 ± 211.46 pg/ml) y gestaciones con notch unilateral (299.04 ± 147.96 pg/ml), es decir, a mayor cantidad de sFlt-1 peor perfusión uteroplacentaria.

También observamos que la presencia de notch bilateral se asocia con pesos de RN menores, así como de percentil de peso, menores pesos placentarios, presentando mejores valores a nivel de EAB.

4.5.2 complejo VEGF fetal

4.5.2.1 Parámetros directos de bienestar fetal y complejo VEGF fetal

Observamos una asociación negativa entre el pH arterial con el sFlt-1 de arteria umbilical ($r=-0.22$ $p<0.05$ $n=85$). Asimismo, el pH arterial se asocia de forma positiva con el cociente $VEGF_f/sFlt-1$ tanto de arteria ($r=0,26$ $p<0.01$ $n=85$) como de vena ($r=0,21$ $p<0,05$ $n=88$), lo que sugiere que existe peor pH con niveles mayores de sFlt-1 así como a menor potencial vasculogénico objetivado con el cociente. También observamos una correlación negativa entre el pH venoso con el sFlt-1 de arteria umbilical ($r=-0.3$ $p<0.01$ $n=84$).

Por otro lado, el $VEGF_f$ y el sFlt-1 a nivel de arteria umbilical presenta una correlación negativa con el logaritmo del índice de Apgar al quinto minuto ($r=-0,21$ $p<0,05$ $n=90$) y ($r=-0.26$ $p<0.05$ $n=87$) respectivamente. Es decir a peor índice de Apgar, mayores niveles de sFlt-1 y mayores de $VEGF_f$, probablemente el aumento de éste último, sea secundario a la situación de hipoxia.

No existiendo ninguna correlación de estos parámetros con el $VEGF_f$.

No existe relación entre ningún parámetro del VEGF a nivel umbilical con el peso del RN o placentario.

4.5.2.2 Parámetros indirectos de bienestar fetal y complejo VEGF fetal

Cuando analizamos los componentes del complejo VEGF en función de la vía de parto (vaginal o cesárea), observamos que los valores de $VEGF_f$ y sFlt-1 son mayores cuando se utilizó la vía abdominal, existiendo significación estadística en el caso del sFlt-1 en vena umbilical. Tampoco observamos diferencias en el $VEGF_f$. Estos resultados sobre el sFlt-1 pueden estar sobreestimados ya que la semana media de las cesáreas fue $36,27\pm 0,33$ vs $37,93\pm 0,32$ en partos vaginales. Recordemos que existe una asociación negativa entre las semanas de parto y el sFlt-1 a nivel fetal. Asimismo las

cesáreas se realizaron con mayor frecuencia en gestaciones con patología (con mayor sFlt-1) que los partos vaginales $p < 0.05$.

Observamos a nivel del territorio de arterias uterinas, una correlación positiva entre el IP de arterias uterinas con el sFlt-1 a nivel venoso (IR $r=0.26$ $p < 0.01$ $n=60$), es decir, a mayor cantidad de sFlt-1 peor perfusión útero-placentaria.

Cuando analizamos los niveles del complejo VEGF según la presencia o ausencia de notch en arterias uterinas, observamos que no existen diferencias entre los distintos parámetros del complejo VEGF tanto en arteria como en vena.

No observamos ninguna correlación entre el complejo VEGF a nivel arterial y venoso con los parámetros del doppler en arteria umbilical. Sin embargo observamos una correlación negativa entre el sFlt-1 de arteria umbilical con el IP del CCP ($r=-0.25$ $p < 0.05$ $n=64$) como con el IR del CCP ($r=-0.26$ $p < 0.05$ $n=65$), es decir, a mayor sFlt-1 menor cociente y por tanto, mayor redistribución fetal.

En su conjunto, estos datos sugieren que existe una asociación entre el potencial vasculogénico con el pH y el grado de redistribución hemodinámica fetal.

5. -DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Un adecuado aporte de nutrientes es esencial para el desarrollo fetal normal intrauterino. Alteraciones a nivel de la circulación utero-placentaria, se han visto asociadas con mayor morbi-mortalidad perinatal, debido al desarrollo de patologías como son la HIE o CIR.

La adaptación de la circulación uterina a las necesidades crecientes del desarrollo fetal se realiza gracias a la formación de nuevos vasos y su vasodilatación. La angiogénesis, es el proceso de neovascularización a partir de vasos preexistentes en respuesta a la hipoxia, o debido a un aumento de la demanda tisular de nutrientes para el desarrollo. El endometrio, decidua y placenta son fuentes ricas en factores de crecimiento angiogénicos. En general, el proceso de angiogénesis se inicia gracias a factores de crecimiento como el VEGF, PlGF o FGF.

La HIE y el CIR, tienen en común una alteración de la placentación y esta vascularización deficiente, podría facilitar la aparición de hipoxia. Recientes estudios, establecen como posible causa de estas 2 patologías, una alteración en los niveles angiogénicos, tales como el aumento del sFlt-1, aunque el origen de la placentación anormal no está clara.

En nuestro estudio, valoramos los distintos componentes complejo VEGF tanto a nivel global como por patologías, tanto a nivel materno como fetal, para poder dilucidar su forma de actuación y su posible relación con estas patologías.

En la gestante, al estudiar el complejo VEGF de forma global en todos los grupos, observamos una asociación positiva entre el sFlt-1 y la edad gestacional. Además, observamos una correlación negativa entre el cociente $\text{VEGF}_f/\text{sFlt-1}$ y las semanas de gestación, lo que sugiere, que a medida que avanza la gestación existe un predominio del factor inhibidor del crecimiento vascular.

Desde un punto de vista teleológico, el aumento del sFlt-1 en gestaciones normales, o la progresiva disminución del cociente, tendrán por objetivo modular la proliferación vascular y el crecimiento fetal. Es decir, el hecho de

que las concentraciones de sFlt-1 son mayores a lo largo de la gestación (Chaiworapongsa 2004) junto con el incremento de VEGF tanto total como $VEGF_f$ (Bosio 2001), hace pensar que el sFlt-1 puede actuar como un inhibidor natural del VEGF durante la gestación para prevenir un crecimiento excesivo de la célula endotelial (Hornig 2000).

Tsenga y cols., 2006, observan que en las pacientes con placenta acreta, existe niveles disminuidos de uno de los receptores (VEGFR2), siendo normales los niveles de sFlt-1, llegando a la conclusión que los niveles de estos receptores son importantes para un adecuado desarrollo placentario.

En varios estudios, se ha demostrado que el factor soluble presenta una correlación positiva con la edad gestacional y a partir de la semana 35 el aumento de este factor es mucho mayor (Maynard y cols., 2003, Tsatsaris y cols., 2003). McKeeman y cols., 2004, analizan el sFlt-1 y VEGF desde semana 12 hasta final de la gestación en gestaciones control y en HIE, observando que tanto el sFlt-1 como el VEGF son mayores desde el principio de la gestación en las gestaciones con HIE, siendo las diferencias significativas para el sFlt-1 en semana 30 y previo al parto y para el VEGF en semana 37 y previa al parto. Sin embargo, en nuestro estudio, cuando desglosamos por grupos a las pacientes, observamos que esta correlación entre el sFlt-1 y la semana de gestación sólo se mantiene en las pacientes control, perdiéndose en las pacientes con HIE y CIR. Esta falta de asociación, podría interpretarse en dos sentidos, una no asociación por la patología existente o una falta de poder estadístico por la fragmentación de la muestra. Sin embargo, no parece probable esta segunda opción, ya que al analizar de forma conjunta estos dos grupos (HIE, CIR), no se observa ninguna asociación entre los parámetros del complejo VEGF con la semana de gestación. Además en las gestaciones control, observamos una correlación negativa entre la semana de gestación y el cociente $VEGF_f/sFlt-1$, es decir, a lo largo de la gestación, el aumento de sFlt-1 es más rápido que el de $VEGF_f$. Al utilizar un punto de corte en la edad gestacional para valorar los niveles del complejo VEGF, observamos que utilizando como punto de corte la semana 37 no obtenemos diferencias significativas entre los distintos

parámetros del complejo VEGF, pero si que la observamos al utilizar como punto de corte la semana 34 siendo los niveles de VEGF_f y sFlt-1 mayores por encima de la semana 34, que por debajo de estas semanas. Las diferencias se mantienen cuando utilizamos el punto de corte en 32 semanas, si bien cuando utilizamos como punto de corte la semana 28 sólo persiste la diferencia para el sFlt-1. Chaiworapongsa y cols., 2004 observan una correlación negativa entre el sFlt-1 y la semana de inicio de la HIE, es decir, a más precocidad y por tanto mayor gravedad de la HIE, los niveles de sFlt-1 son mayores. Nosotros no encontramos diferencias en función de la precocidad de la HIE. También Wikström y cols., 2007 observan que las HIE de inicio precoz, tienen niveles de sFlt-1 43 veces más que las gestaciones control y las HIE de inicio tardío tienen 3 veces niveles mayores de sFlt-1 que las gestaciones control. También observan estas diferencias con el PIGF presentando niveles menores en las HIE. Levine y cols., 2004, observan en gestantes normotensas, que los niveles de sFlt-1 son estables al inicio y mitad gestación y que existe un aumento entre la semana 33 y 36. Nosotros observamos en gestaciones control, que este aumento se inicia alrededor de la semana 28. También observan que este aumento corresponde con una disminución de la PIGF. Durante el 2º trimestre, observan que el PIGF es mayor que el sFlt-1, creando una situación proangiogénica. Al final de la gestación, probablemente, como ya se ha dicho antes, actúa como un inhibidor natural del VEGF, dando lugar a una disminución del VEGF y PIGF. Levine y cols 2004 observan que en gestaciones con HIE, se establece esta situación antiangiogénica de forma más precoz y más intensa (empezando el aumento del factor antiangiogénico entre las semanas 21 y 24) produciéndose una exacerbación del estado antiangiogénico. Esta situación antiangiogénica, podría favorecer una alteración de la placentación.

Por otro lado, a pesar de que las pacientes con HIE tienen una edad media mayor que el resto de los grupos, observamos que no existe ningún tipo de relación entre la edad materna y el complejo VEGF. Staff y cols 2009, si que observan que las pacientes normotensas con mayor edad, presentan un perfil más antiangiogénico, valorando el cociente (sFlt-1+sEng/PIGF).

En nuestro estudio, no valoramos el índice de masa corporal (IMC) de las pacientes, factor de riesgo para la HIE, pero Levine y cols., 2004, Staff y cols., 2005, Staff y cols 2009, observan que no existe relación entre los niveles angiogénicos y el IMC en las gestaciones con HIE.

Ya que en algunos estudios (Duckitt y Harrington 2005) se observa que las pacientes primigestas tienen más riesgo que las multigestas a desarrollar HIE durante la gestación, nosotros dividimos a las pacientes según paridad y encontramos que las gestantes primigestas presentan niveles mayores de VEGF_f y sFlt-1 así como menor cociente VEGF_f/sFlt-1, es decir existe una situación antiangiogénica mayor en las gestantes primigestas que multigestas. El VEGF_f es mayor en las pacientes multigestas. Chaiworapongsa y cols., 2004 no observan diferencias entre las gestantes nulíparas y las múltiparas. Thadhani y cols., observan que las gestantes múltiparas presentan niveles menores de sFlt-1 en comparación con las gestantes nulíparas, al igual que nosotros.

Tampoco hemos tenido en cuenta si las pacientes eran fumadoras o no. Levine y cols 2006, si que observan que las pacientes fumadoras con bajo riesgo de HIE, presentaban un perfil más antiangiogénico que las gestantes no fumadoras, lo que estaría en contradicción teórica con el hecho de que las gestantes fumadoras tienen menor riesgo de HIE (Newman y cols., 2001), ya que las gestantes con HIE presentan un perfil más antiangiogénico.

Al analizar el complejo VEGF materno en función de la vía de parto, observamos que las gestaciones que finalizan mediante cesárea, presentan niveles mayores de sFlt-1 en comparación con las gestaciones que acaban vía vaginal. Ya apuntamos, que las gestaciones que acaban vía cesárea son las gestaciones que se asocian a patología y adicionalmente, con una menor edad gestacional al parto, lo que se asocia a menor sFlt-1, lo que refuerza la idea de mayor potencial antiangiogénico, ya que las gestaciones con patología, como decimos a continuación, presentan semanas de parto más precoces que las gestaciones control.

Cuando analizamos la semana de parto, observamos que en las gestaciones con HIE y CIR el parto aconteció más precozmente que las gestaciones

control, es decir, en gestaciones patológicas, el parto fue más precoz.

Al analizar los valores de los distintos parámetros del complejo VEGF, hemos hecho un análisis de regresión lineal para determinar si la edad gestacional influye en los niveles de los distintos elementos del complejo VEGF, ya que como hemos visto, puede existir una dependencia con este parámetro. Además, las distintas patologías se han captado en distintas semanas de gestación, como es en el caso de la HIE, que por término medio las muestras de esta patología se toman 2 semanas después y dado que el sFlt-1 tiene una relación positiva con las semanas de gestación, es de esperar, que los valores que están tomados 2 semanas después sean mayores a los de 2 semanas anteriores.

Al analizar los niveles de sFlt-1, observamos como de forma escalonada existe más cantidad de sFlt-1 en las gestaciones con HIE, siguiéndole las gestaciones con CIR y por último las gestaciones control, es decir, las gestaciones con HIE son las que presentan más factor antiangiogénico (sFlt-1), observándose que este incremento escalonado, se asocia con la gravedad de la afectación vascular, máxima en la HIE, siendo menor y de forma decreciente en las gestaciones con CIR y controles.

La limitación de nuestro estudio es que no tenemos exploraciones desde el inicio de la gestación de las pacientes con HIE, solamente desde el momento del diagnóstico y no podemos valorar la capacidad predictiva de los factores angiogénicos, así como las tensiones medias al inicio de la gestación de las pacientes que posteriormente desarrollarán HIE. La presencia de HTA al inicio de la gestación, así como factores predisponentes como la diabetes tipo I, probablemente refleja el estado de las células endoteliales y su capacidad disminuida de sintetizar factores relajantes del músculo liso, así como su susceptibilidad de ser lesionados por los factores antiangiogénicos. Levine y cols., 2005, observan que las pacientes con TA más elevadas al inicio de la gestación, desarrollan HIE con niveles menores de sFlt-1 que aquellas con TA menores al inicio de la gestación. Las TA de estas últimas, fueron iguales al inicio de la gestación que en las gestaciones control. Estos datos sugieren que el potencial antiangiogénico sería mayor a mayor grado de lesión vascular

inicial.

Aunque las gestaciones con CIR presentan niveles de $VEGF_f$ mayores que las gestaciones con HIE y las gestaciones control, las diferencias no son significativas entre los distintos grupos. Sí observamos de forma significativa que las gestaciones con CIR y HIE tienen niveles mayores de $VEGF_t$ que las gestaciones control. Nagamatsu y cols 2004, observan que en ambiente hipóxico existe un aumento de sFlt-1, un aumento a su vez de $VEGF_t$ y una disminución de $VEGF_f$ probablemente producido por el efecto bloqueo del sFlt-1, esto último difiere de nuestros resultados. Purwosunu y cols., 2008, también observan un aumento de VEGF en las gestantes con HIE. Por otro lado, el cociente $VEGF_f/sFlt-1$, que nos informa del perfil angiogénico o potencial vasculogénico de cada gestación, es decir a mayor cociente, existe un perfil antiangiogénico menor o un potencial vasculogénico mayor, se encuentra disminuido en las gestaciones con patología, siendo por orden de menor a mayor cociente, las gestaciones con HIE, siguiéndole los CIR y por último las gestaciones control, lo que sugiere que en las gestaciones con HIE y CIR existe mayor predominio de inhibición de la vasculogénesis, concordante con los hallazgos clínicos de una hipoperfusión placentaria y un aumento de las resistencias placentarias. Recientes estudios (Maynard y cols., 2003, Levine y cols., 2004), obtienen como resultados en pacientes con HIE que el $VEGF_f$ esta disminuido a consecuencia de un aumento de sFlt-1.

Aunque el $VEGF_t$ se ha visto aumentado en las gestaciones con HIE (Tsatsaris y cols., 2003), al igual que en nuestro estudio, el VEGF se une al sFlt-1, produciendo una disminución del VEGF activo o $VEGF_f$, como hemos dicho anteriormente. Los niveles normales de VEGF circulante son $< 30\text{pg/ml}$, siendo estos niveles menores que los detectables con el Kit de ELISA (Thadhani y cols., 2004, Taylor y cols., 2003). Aunque se ha publicado un estudio en el que considera al VEGF como un marcador prometedor para la predicción precoz de HIE (Pollioti y cols., 2003), muchos estudios encuentran indetectable los niveles de VEGF ((Thadhani y cols., 2004, Taylor y cols., 2003,) y $VEGF_f$ (Shibata y cols., 2006) y por tanto no puede servir como

screening de HIE hasta que los Kits de ELISA sean tan sensibles como para detectar valores de VEGF de un solo dígito. En nuestro estudio el límite de detección para VEGF_t es de 32pg/ml. Tras comparar los niveles de VEGF_f y VEGF_t, nos cuestionamos exactamente que estamos determinando cuando analizamos el VEGF_t, ya que por lógica los niveles de éste deberían ser mayores que los de VEGF_f, no siendo así en nuestros resultados y no teniendo respuesta para ello. La inconsistencia observada, podría deberse a un aspecto metodológico, ya que se utilizan técnicas diferentes para determinar cada uno de los parámetros y diferentes fabricantes.

Queda también por demostrar, si los cambios en los niveles de VEGF_f, realmente reflejan la actividad funcional del VEGF in vivo, o si hay que tener en cuenta el porcentaje que se degrada o que se une a proteínas. Las dos proteínas que se unen al VEGF son el sFlt-1 y la α 2-Macroglobulina. Mientras que el sFlt-1 se ha comprobado que es un antagonista del VEGF, no está claro como la α 2-Macroglobulina puede afectar a la función del VEGF. (Jelkmann 2001). Bhattacharjee y cols., 2000 demuestran que bajo condiciones fisiológicas la α 2-Macroglobulina no afecta la capacidad del VEGF de inducir la proliferación de la célula endotelial, por tanto, el VEGF unido a la α 2-Macroglobulina probablemente preservaría su actividad biológica.

En resumen, las gestaciones con HIE y CIR, presentan niveles mayores de VEGF_t y VEGF_f (aunque no de forma significativa) en comparación con las gestaciones control, probablemente en respuesta a la hipoxia de ambas situaciones, sin embargo, al valorar el estado angiogénico mediante el cociente VEGF_f/sFlt-1 observamos que estas gestaciones presentan peor estado angiogénico que las gestaciones control.

Pero, ¿cual es el origen de este sFlt-1? Las concentraciones de sFlt-1 en gestaciones normales, son mayores que en mujeres no gestantes (Barleon y cols., 2001), y disminuye dramáticamente después del parto (Koga y cols., 2003) orientando su origen a la placenta. Purwosunu y cols., 2008 observan que en las gestantes con HIE, en las que encuentran aumentado tanto el sFlt-

1 como el $VEGF_t$ como la endoglina, disminuyen los tres factores tras el parto. Una fuente alternativa o complementaria de sFlt-1 es la célula endotelial ya que puede liberar sFlt-1 en respuesta a determinados agentes (Hornig y cols., 2000). Por tanto, el aumento de sFlt-1 en las gestaciones con HIE, podría estar relacionado con la disfunción de la célula endotelial que ocurre en esta patología, sin embargo, es difícil establecer esta hipótesis, ya que después del parto existe una disminución dramática de este factor (4360 vs 95pg/dl) (Koga y cols., 2003). Munaut y cols., 2008 tras someter a hipoxia células del trofoblasto y a células endoteliales de vena umbilical, observan en las primeras que existe un aumento del sFlt-1, de VEGF y una disminución del $VEGF_f$, observando en las células endoteliales únicamente un aumento de VEGF no existiendo modificación en los niveles de sFlt-1.

Maynard y cols., 2003 sugieren que el suero de mujeres con gestaciones normales es capaz de inducir a las células endoteliales a sintetizar estructuras tubulares, efecto biológico inhibido al añadir sFlt-1. Es más, el suero de mujeres con HIE inhiben la formación de estas estructuras tubulares endoteliales y este efecto puede revertirse añadiendo VEGF y PlGF. El efecto inhibitor del suero de estas mujeres con HIE desaparece tras el parto, sugiriendo que este factor es liberado por la placenta (Maynard 2003).

Se ha propuesto en otros estudios que este aumento de sFlt-1, el cual tiene más afinidad por el VEGF que el VEGFR-2, produce una disminución de $VEGF_f$, por tanto, menores niveles de este para unirse al VEGFR2 (Lyll y cols., 1997) y consecuentemente esto podría interferir en la función de la célula endotelial (Gerber y cols., 1998). Sin embargo, en nuestro estudio, son las gestaciones control las que menores niveles de $VEGF_f$ y $VEGF_t$ presentan a nivel materno, menores que las gestaciones con HIE, así como las gestaciones con CIR, nuestra hipótesis, es que estos factores podrían estar estimulados por la situación de hipoxia que encontramos en gestaciones con HIE y CIR y a pesar de que presenten niveles mayores de estos parámetros, su situación angiogénica es peor que las gestaciones control valorado con el cociente $VEGF_f/sFlt-1$.

Otra fuente de sFlt-1 que expone Rajakumar y cols., 2005, son las células

mononucleares de sangre periférica, tanto en gestantes normales como en preeclámpticas. Observan que las células mononucleares que provienen de gestantes con HIE, sintetizan niveles mayores de sFlt-1 que las gestantes sin patología y si son sometidas a un ambiente hipóxico, los niveles aún son mayores. Además, el estudio de mujeres con antecedentes de HIE en el año previo, demuestran un aumento persistente de sFlt-1, hipotetizando que estas células podrían ser una fuente extraplacentaria de sFlt-1, que contribuiría a la patogénesis de la HIE.

Para estudiar el comportamiento del complejo VEGF, analizamos si existe algún tipo de relación entre sus parámetros y observamos que cuando analizamos la muestra en su conjunto, existe una correlación positiva entre el sFlt-1 y el $VEGF_f$, y negativa del sFlt-1 con su cociente ($VEGF_f / sFlt-1$), es decir a mayor cantidad de sFlt-1 mayor cantidad de $VEGF_f$, sin embargo la relación negativa de este factor con el cociente, nos indica que el aumento del sFlt-1 es proporcionalmente mayor que de $VEGF_f$ a medida que el sFlt-1 aumenta. Cuando realizamos el estudio por grupos las gestaciones control mantienen ambas relaciones, sin embargo, las gestaciones con HIE y con CIR sólo mantienen la correlación negativa entre el sFlt-1 y el cociente, probablemente esto se debe a que el aumento de sFlt-1 en estas gestaciones presenta un aumento desproporcionado, perdiéndose la correlación positiva con el $VEGF_f$, reflejando de nuevo, que estas gestaciones presentan un estado antiangiogénico mayor que las gestaciones control.

Lee y cols., 2007, obtienen una correlación negativa entre el sFlt-1 y el $VEGF_f$ en las gestaciones con HIE, que no encontramos en nuestros resultados, pero nos puede dar la explicación a la pérdida de la correlación positiva entre el sFlt-1 y el $VEGF_f$ que observamos en las gestaciones control y que se pierde en las gestaciones con HIE y CIR. En sus resultados obtienen que el sFlt-1, el $VEGF_t$ son mayores en las gestaciones con HIE que en las gestaciones control, al igual que nosotros, sin embargo, el $VEGF_f$ es menor en gestaciones con HIE, esto último difiere de nuestros resultados. Ahmad y Ahmed 2004, observan que en gestaciones con HIE, el cociente

VEGF/sFlt-1 disminuye hasta en un 70% en comparación con gestaciones normales, a pesar de que en gestaciones con HIE observan un aumento de VEGF, mostrando que el aumento de VEGF no es suficiente para compensar el efecto antiangiogénico del sFlt-1. En nuestro estudio también observamos que en gestaciones con HIE y CIR, a mayor cantidad de sFlt-1 el cociente $VEGF_f/sFlt-1$ es menor, es decir, al igual que en el estudio realizado por Ahmad, el VEGF aunque es mayor que en gestaciones control, no es suficiente para contrarrestar el efecto antiangiogénico del sFlt-1.

Cuando analizamos los valores del complejo VEGF a nivel fetal, observamos que a nivel arterial existe mayor cantidad de sFlt-1 cuanto más precoz es el parto y menor es el peso del RN, es decir, parámetros que directa (en caso del peso del RN) e indirectamente (en caso de la semana de parto) nos informan de mayor gravedad.

Cuando hacemos el estudio por grupos, observamos que no existen diferencias entre los distintos parámetros tanto a nivel arterial como venoso, aunque las gestaciones con HIE, tanto en arteria como en vena son las que mayor nivel de sFlt-1 presentan. El cociente $VEGF_f/sFlt-1$ tampoco presenta diferencias significativas tanto en arteria como en vena, sin embargo este cociente es menor en ambos casos en las gestaciones con HIE. Si bien no hemos observado diferencias significativas, llama la atención la constancia de los datos de manera que se puede sugerir una potencia más antiangiogénica en gestaciones patológicas.

Para continuar con el estudio de su comportamiento, analizamos la relación del complejo VEGF a nivel materno-fetal, observando que cuando se estudia la muestra en su conjunto, existe una correlación entre el $VEGF_f$ y $VEGF_t$ materno y sus correspondientes a nivel de arteria y vena. Sin embargo, cuando desglosamos la muestra por grupos, las gestaciones control y las gestaciones con CIR, presentan correlación positiva solamente entre el $VEGF_f$ materno con el arterial y venoso. Sin embargo en las gestaciones con HIE existe correlación positiva entre los 3 parámetros a nivel materno, con

sus correspondientes a nivel arterial y venoso, es decir, las gestaciones con HIE presentan un comportamiento diferente al resto de gestaciones. En estas gestaciones, los 3 componentes del complejo VEGF aumentan al mismo tiempo en toda la circulación materno-fetal. La asociación entre los componentes homólogos del complejo VEGF en la madre y en el feto que se observa en las gestaciones con HIE, podría ser una expresión de la existencia de patología a nivel materno (HTA) y reflejo a nivel fetal (insuficiencia placentaria), en tanto que la no correspondencia a nivel de $VEGF_t$ y sFlt-1 en los casos de gestaciones control y CIR, sería manifestación de normalidad en las gestaciones control y de patología a nivel fetal en caso de CIR (insuficiencia placentaria). Adicionalmente, estos datos irían en contra de un transporte materno-fetal del complejo VEGF, porque sino debería existir correlación en todos los casos.

Al analizar el gradiente materno-fetal en todas las gestaciones en conjunto, observamos que a nivel materno existen niveles mayores de sFlt-1 y a nivel fetal mayores niveles de $VEGF_f$ y de $VEGF_t$, sin embargo, cuando lo analizamos por grupos, las gestaciones control presentan los mismos gradientes, pero en el resto de grupos sólo se mantiene de forma significativa el gradiente del sFlt-1, es decir, existe mayor cantidad de sFlt-1 a nivel materno en todas las gestaciones, que a nivel fetal, esto es acorde con el estudio de Staff y cols., 2004 que observan que el sFlt-1 está aumentado en las HIE tanto a nivel materno como a nivel de vena umbilical, sin embargo, los niveles a nivel materno son mayores que a nivel fetal. Staff y cols también observan una correlación positiva entre el sFlt-1 materno y fetal, al igual que nuestros resultados.

Al analizar la relación arterio-venosa del complejo VEGF, observamos que cuando se estudia la muestra en su conjunto, existe una correlación positiva de los 3 parámetros a nivel arterio-venoso. Sin embargo, al desglosar por grupos, sólo las gestaciones con HIE mantienen las 3 correlaciones, es decir, los 3 factores aumentan al mismo tiempo en arteria como en vena, tal vez el escaso número de casos al desglosar por grupos pueda explicar la pérdida de correlación. Cuando estudiamos el gradiente arterio-venoso, en conjunto se

observa que existe más cantidad de VEGF_t a nivel arterial que venoso, no observando diferencias en el resto de parámetros. Cuando desglosamos por grupos, este gradiente sólo se mantiene en las pacientes con HIE, es decir, el feto es productor de VEGF_t en mujeres con HIE, posiblemente en respuesta a la hipoxia. Staff y cols., 2004 observan en pacientes con HIE, que existe mayor cantidad de sFlt-1 en arteria umbilical que en vena, sin embargo, los niveles bajos de sFlt-1 tanto en arteria como en vena umbilical, les hace llegar a la conclusión que el feto no contribuye de forma importante en el aumento de esta proteína a nivel materno. Schelembach y Beinder 2003 tampoco observan, como en nuestro estudio, mayor cantidad de sFlt-1 a nivel de arteria fetal que en vena. Por tanto, es poco probable que el feto contribuya al aumento del sFlt-1.

5.1 HIE y complejo VEGF

La preeclampsia es un problema obstétrico grave que complica hasta el 8% de todos los embarazos y causa morbi-mortalidad materna y fetal severa. Aunque la fisiopatología del síndrome se comprende relativamente bien en la actualidad, la causa desencadenante sigue siendo desconocida. La preeclampsia es un síndrome caracterizado por hipertensión arterial y nefropatía proteinúrica que aparece de novo en embarazos normales o molares y que se resuelve espontáneamente tras el alumbramiento (Hladunewich y cols., 2008), por lo que se cree que el órgano responsable es la placenta. El acontecimiento patogénico que parece ser central es la aparición de isquemia placentaria, que induce al factor de hipoxia HIF-1 α y hace que la placenta segregue a sangre en gran cantidad una serie de factores antiangiogénicos como el sFlt-1, que neutraliza al VEGF y al PlGF y también la endoglina, que neutraliza al TGF- β (Makris y cols., 2007; Maynard y cols., 2008). Estos factores de crecimiento parecen ser fundamentales en la vasculogénesis placentaria (durante el proceso de placentación) y en el mantenimiento del endotelio normal materno durante el embarazo, con lo que su reducción en la preeclampsia podría ser una de las causas determinantes

de la deficiente placentación inicial que produce más tarde isquemia placentaria y también desencadena la disfunción endotelial y la endoteliosis glomerular renal que caracterizan al síndrome en la madre (Makris y cols., 2007; Maynard y cols., 2008; Mutter y cols., 2008).

En nuestro estudio, como ya hemos dicho antes, las gestaciones con HIE son las que más sFlt-1 presentan y estos resultados son consistentes con otros estudios (Chaiworapongsa y cols., 2004, Maynard y cols., 2003, Koga y cols., 2003). Schelembach y cols 2007, también encuentran un aumento de sFlt-1 en gestaciones con HIE y dentro de ellas, no encuentra diferencia en los niveles de este factor entre las gestaciones que desarrollan CIR y las que no. La HIE a menudo se acompaña de hipoxia a nivel placentario (Ishioka y cols., 2007), lo que podría alterar la síntesis de de VEGF y en consecuencia a sus niveles.

Cuando estudiamos las gestaciones con HIE, HTA en comparación con las gestaciones control, observamos con respecto a la edad de las gestantes que, a pesar de que las gestaciones con HIE e HTA presentan 2 años más de media no existen diferencias significativas. Staff y cols., 2009, observan que las gestantes control de mayor edad presentan un perfil antiangiogénico mayor que las de menor edad. Nosotros no encontramos diferencias del complejo VEGF en función de la edad tanto en todo el estudio como al analizar sólo las gestaciones controles.

Recientes estudios han encontrado en sus resultados que en gestaciones con HIE existe un aumento en la expresión de sFlt-1 tanto a nivel placentario (Maynard y cols., 2003, Zhou y cols., 2002, Tsaris y cols., 2003) como a nivel sérico (Maynard y cols., Tsaris y cols., 2003, Koga y cols., 2003, Levine y cols., 2004, Hertig y cols., 2004, Schelembach y Beinder 2003, Bowers y cols., 2004, Chaiworapongsa y cols., 2004). Estos es consistente con nuestros resultados donde encontramos al calcular los niveles de los tres parámetros a nivel materno que las pacientes con HIE, presentan niveles de sFlt-1, en comparación con las gestaciones con HTA y las gestaciones control, no siendo significativas las diferencias para el $VEGF_f$ y $VEGF_t$.

Existen discrepancias entre estudios en los niveles de VEGF, ya que existen estudios como el de Lyall Y cols., 1996 que encuentran los niveles de VEGF aumentados en las gestaciones con HIE y sin embargo en otros estudios como es el de Wheeler y cols., 1997, o Maynard y cols., 2003 lo encuentran disminuido. Una de las explicaciones es que los que lo encuentran disminuido miden el $VEGF_f$ y los que lo encuentran aumentado miden el $VEGF_t$. Sin embargo, nosotros medimos tanto el $VEGF_f$ como el $VEGF_t$ y ambos están aumentados en gestaciones con HIE, aunque no existen diferencias significativas.

Cuando analizamos el cociente $VEGF_f/sFlt-1$ a nivel materno, observamos que es menor de forma significativa en gestantes afectas de HIE, siendo este cociente mayor en gestaciones control y con HTA (no existiendo diferencias entre estos dos grupos).

McKeeman y cols., 2004, observan que el dramático aumento de sFlt-1 y VEGF al final de la gestación, coincide con el inicio de la HIE en aquellas pacientes que la desarrollan, indicando que estas proteínas pueden tener un papel importante en la patogénesis de la HIE. Estos datos son consistentes con estudios previos en los que se vio que existe un aumento de sFlt-1 en líquido amniótico en pacientes con HIE (Vuorela y cols., 2000), o aumento de sFlt-1 materno en gestaciones con HIE leve y grave antes del parto (Maynard y cols., 2003).

McKeeman y cols., 2004 observan que aunque los niveles de sFlt-1 estén aumentados a final de la gestación, el aumento de $VEGF_f$ es más importante que el de sFlt-1, sugiriendo que este aumento de $VEGF_f$ pudiera estar contribuyendo también a la patogénesis de HIE y por tanto que tanto el VEGF como el sFlt-1 pudieran estar involucrados en la disfunción de la célula endotelial. Asimismo y puesto que el aumento de sFlt-1 al principio de la gestación en aquellas pacientes que desarrollan HIE ocurre cuando aun no hay cambios significativos en los niveles de VEGF, sugieren un papel mayor del sFlt-1 en la patogénesis de la HIE, dado que los cambios fisiopatológicos

de la HIE ocurren de forma más precoz que las manifestaciones clínicas, al tiempo que tienen lugar las invasiones trofoblásticas antes de la semana 18-20 y además se ha observado in vitro que el aumento de sFlt-1 se ha asociado con una disminución de la invasión del trofoblasto (Zhou y cols., 2002). Por tanto, el aumento de sFlt-1 al inicio de la gestación, puede ser el reflejo de una situación antiangiogénica resultado de un exceso de inhibición del VEGF por el sFlt-1 y por tanto, reduciendo la angiogénesis placentaria. Es posible que esta hipoperfusión placentaria, estimule el aumento de sFlt-1, lo que puede agravar la situación (McKeeman y cols., 2004).

Aunque la HIE parece una enfermedad que está claramente definida, la presentación clínica y fundamentalmente la evolución puede variar de forma importante, es más, otras enfermedades como enfermedades renales o enfermedades autoinmunes, pueden simular una HIE sin serlo. Por ello, hemos calculado mediante curvas ROC, un punto de corte tanto para el sFlt-1 como para el $\text{VEGF}_f/\text{sFlt-1}$ que nos permita diagnosticar la HIE, así como diferenciar entre las HIE de inicio precoz y tardío. Verlohren y cols 2009, utilizan el mismo método para obtener puntos de corte diagnósticos para el sFlt-1, PIGF y el cociente de ambos, así como para diferenciar entre HIE precoz y tardía. Bushimshi y cols., 2004 utilizan los niveles de sFlt-1 y PIGF en orina para diferenciar entre HIE y gestantes control, así como para determinar la gravedad. Nosotros hemos calculado mediante curvas ROC, un punto de corte que nos permite diferenciar entre gestantes HTA sin proteinuria y HIE.

A nivel de arteria y vena umbilical, no existen diferencias en ninguno de los 3 parámetros del complejo VEGF, tampoco existiendo diferencias en el cociente $\text{VEGF}_f/\text{sFlt-1}$. Staff y cols 2004 observan que las gestaciones con HIE presentan niveles mayores de sFlt-1 en arteria umbilical que las gestaciones control. En nuestro estudio, son las gestaciones con HTA sin proteinuria las que más sFlt-1 presentan a nivel de arteria umbilical, aunque no de forma significativa. Schelembach y Beinder 2003, observan mayor cantidad de sFlt-1 a nivel venoso en gestaciones con HIE que en las

gestaciones control, en nuestro estudio también es así aunque no llega a la significación estadística.

Antes de analizar la relación entre el complejo VEGF y los parámetros de gravedad, analizamos la relación entre la TA y éstos, observando que existe una relación significativa entre ellos y por tanto, no podemos descartar que exista algún sesgo en algunos parámetros, donde no podemos diferenciar qué está mediado por la HTA y qué está mediado por el VEGF.

Al analizar el complejo VEGF en relación con los parámetros de gravedad, en el estudio global de los 3 grupos, control, gestaciones con HTA y gestaciones con HIE, observamos que es el sFlt-1 el que se asocia con parámetros de gravedad.

Existen estudios en los que se observa que el tratamiento con neutralizantes del VEGF, dan lugar a un aumento de la proteinuria. Las gestantes que se complican con HIE, presentan niveles elevados de sFlt-1, disfunción de la célula endotelial y proteinuria. Sugimoto y cols., 2003 demuestran en ratones, que los anticuerpos anti-VEGF y el sFlt-1 producen lesión de la célula endotelial glomerular, sugiriendo que la disminución o neutralización del VEGF, puede tener un papel importante en la inducción de proteinuria, tanto en algunas enfermedades renales, como en algunas formas de tratamientos oncológicos así como en mujeres con HIE.

En otros estudios, se ha observado que en gestantes que desarrollan HIE complicándose con desprendimiento de placenta, presentan una situación antiangiogénica mayor (PIGF disminuido y sFlt-1/PIGF aumentado) antes de que aparezca la HTA y el desprendimiento, en comparación con gestaciones control y gestaciones que se complican con desprendimiento de placenta pero sin HTA (Signore y cols., 2006).

Nosotros, en el estudio global, encontramos un sFlt-1 en aumento cuanto mayores son los niveles de TA tanto sistólica, diastólica y media, viéndose también aumentado a mayor proteinuria, esto se observa en otros estudios (Lee y cols, 2007, Chaiworapongsa y cols., 2004). Chaiworapongsa además

de encontrar una correlación del sFlt-1 directamente proporcional con la gravedad de la proteinuria, observa una correlación negativa con el recuento de plaquetas, edad gestacional y el peso del RN ajustado por la edad gestacional. Lee y cols., 2007, también observan una correlación positiva entre la TA sistólica y diastólica con el $VEGF_t$ y negativa entre la TA sistólica y diastólica con el $VEGF_f$. Nosotros estas relaciones no las obtenemos.

Yoshimatsu y cols., 2006, observan en gestantes normotensas que también existe una asociación positiva entre el sFlt-1 y el $VEGF_f$ con la excreción de albumina en orina, llegando a la conclusión de que incluso en gestantes normotensas la excreción de albumina se ve afectada por el aumento de sFlt-1 que ocurre también en gestaciones control en comparación con mujeres no gestantes, observando que si los valores de sFlt-1 se mantienen dentro de un rango normal, solamente la célula endotelial a nivel glomerular se ve afectada y no existe enfermedad sistémica como ocurre en la HIE. Maynard y cols., 2003, observan en su estudio, que el efecto patológico del sFlt-1 es dosis dependiente. Así, las ratas tratadas con dosis menores de sFlt-1 presentaban lesión menor a nivel glomerular que aquellas que eran tratadas con mayor dosis.

A nivel bioquímico también observamos correlación del sFlt-1 con parámetros de gravedad como son la LDH, creatinina en sangre y la urea. Chaiworapongsa y col., 2004, además observan una correlación negativa entre el sFlt-1 y el recuento de plaquetas, al igual que Lu y cols., 2007 relación que nosotros no observamos, al igual que Maynard y cols., 2003 en un estudio realizado con ratas, observan que el exceso de sFlt-1 produce la clínica de HIE (HTA, proteinuria y disfunción endotelial) pero no observan que este exceso de sFlt-1 se relacione con una disminución de plaquetas. Venkatesha y cols., 2006, observan que existe otro factor endotelial, la endoglina soluble, que se encuentra elevada en las gestantes con HIE, que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad y que al asociarlo con el sFlt-1 en un estudio con ratas, se reproduce la clínica de HIE agravada con el HELLP. En este estudio, estos factores de forma independiente, no producen síndrome HELLP. Venkatesha propone, que ya que la endoglina actúa

uniéndose al receptor del TGF- β 1 y produce una atenuación de la NOSe (óxido nítrico sintetasa endotelial), que la contribución de estos dos factores en la patogénesis de la HIE, puede ser en parte, debido a la inhibición de la activación por parte del VEGF y el TGF- β 1 del NO y por tanto, de sus efectos vasomotores. Otro factor que podría contribuir a la patogénesis de la HIE y en la trombocitopenia que se produce, es la disminución de la prostaciclina PGI₂, ya que tanto el VEGF como el TGF- β 1 estimulan su producción y existen estudios (Mills y cols., 1999) que han demostrado una disminución de la producción endotelial del PGI₂ incluso antes del inicio de la HIE. Purwosunu y cols., 2008, también demuestran que existen mayores niveles de sFlt-1, VEGF y endoglina, a mayor gravedad de la HIE. Munaut y cols 2008, tras someter a hipoxia a células del trofoblasto, no observan modificaciones en los niveles de endoglina, posiblemente siendo el aumento de sus niveles en gestaciones con preeclampsia a través de un mecanismo diferente a la hipoxia.

Makris y cols., 2007, realizan un estudio en monos babuinos, induciéndoles hipoxia a nivel de arterias uterinas al embolizarlas mediante angiografía, observando un aumento de sFlt-1 a nivel de sangre periférica, placenta y células mononucleares así como un aumento de TA (sistólica, diastólica) y proteinuria. Además se observa tras 2 semanas de hipoxia una plaquetopenia, sin signos de hemólisis y cambios histológicos a nivel renal iguales que los que ocurren en las gestantes con HIE.

Al estudiar las OVF en los distintos territorios, tanto a nivel materno como fetal de estas gestaciones, el sFlt-1 lo encontramos aumentado a peor circulación uteroplacentaria, a mayores resistencias en arteria umbilical y a menores resistencias a nivel de ACM por tanto a mayor redistribución fetal.

¿Por qué intentamos buscar relación entre los parámetros maternos del complejo VEGF con los parámetros de bienestar fetal, a pesar de que el feto presenta niveles mayores de VEGF_f y VEGF_t, pero además pensamos que son dos compartimentos diferentes, es decir, no hay *tránsfer*? Lo hacemos porque tenemos un acceso directo a la madre y no al feto y para obtener muestras de éste tendríamos que utilizar técnicas invasivas.

El $VEGF_f$ presenta una correlación negativa con los parámetros de la ACM y CCP, para lo que no tenemos explicación de forma aislada (sin descartar la participación de otras sustancias involucradas, este fenómeno podría ser reflejo de la correlación $sFlt-1$ y $VEGF_f$), sin embargo, cuando analizamos el cociente $VEGF_f/sFlt-1$ observamos que éste es mayor cuanto mayores son las resistencias a nivel de ACM, es decir, a menor potencial vasculogénico existe mayor redistribución de flujo o viceversa.

Cuando realizamos el estudio por grupos, no se objetivan algunas de las asociaciones, probablemente por la pérdida de poder estadístico.

Al realizar el estudio de forma global del complejo VEGF fetal con los parámetros de gravedad, observamos a nivel venoso que existe mayor cantidad de $sFlt-1$ a mayor resistencias a nivel de arterias uterinas, es decir, a peor circulación uteroplacentaria. También observamos a nivel arterial una relación negativa entre el $sFlt-1$ y los parámetros del CCP, es decir, a mayor cantidad de $sFlt-1$ menor cociente y por tanto mayor redistribución fetal.

Cuando se hace el estudio por grupos, se minimiza tanto el número de casos que las asociaciones que se observan son mínimas y no consistentes.

También se observa en el estudio global que existe más cantidad de $sFlt-1$ en arteria fetal cuanto más precoz es el parto y por tanto, mayor gravedad de la situación. Staff y cols 2009, observan en gestaciones con HIE que existe un perfil antiangiogénico mayor cuanto más precoz es el parto.

5.2 CIR Y Complejo VEGF

El desarrollo fetal adecuado, depende de una adecuada difusión de los nutrientes desde la madre al feto y por tanto, requiere una adecuada perfusión uterina, un adecuado intercambio transplacentario de nutrientes y residuos y una adecuada perfusión umbilical. Son necesarios cambios importantes en el flujo materno y fetal que se acomoden al rápido crecimiento fetal a medida que avanza la gestación. Con una invasión trofoblástica adecuada y el aumento en la capacidad de las arterias espirales se crea un lecho placentario con bajas resistencias.

En los CIR, la transferencia de oxígeno, glucosa y aminoácidos está

afectada, así como la respuesta insulínica pancreática fetal. La hipoinsulinemia relativa puede disminuir la transferencia placentaria de glucosa. Esto hace que el feto se encuentre en una situación donde el aporte de oxígeno y sustratos y por tanto la posibilidad de un metabolismo aeróbico y en consecuencia el crecimiento fetal estén limitados.

Al estudiar el complejo VEGF a nivel materno en las gestaciones con CIR en comparación con gestaciones control y con gestaciones con PEG, observamos que las gestaciones con CIR presentan niveles más elevados de $VEGF_f$ y sFlt-1 no siendo significativa la diferencia para el $VEGF_f$. Shibata y cols., 2005, no encuentran diferencias significativas en los niveles de sFlt-1 entre las gestaciones que desarrollan CIR con las gestaciones control, sin embargo, si que encuentran disminuida el PIGF. Sin embargo Tsatsaris y cols 2003 si que encuentran aumentado ligeramente el sFlt-1 en CIR en comparación con los controles aunque los niveles son menores que en las gestaciones que desarrollan HIE, al igual que en nuestros resultados. En nuestro estudio, no hemos podido obtener un punto de corte diagnóstico de sFlt-1 para CIR, que nos permita diferenciar estas gestantes de las gestantes control o con PEG.

Wathen y cols., 2006, observan que un aumento del sFlt-1 en semana 16-20 está asociado con mayor riesgo de desarrollar HIE pero no de CIR de forma aislada, precediendo este aumento 13 semanas antes de la clínica de HIE. Esto sugiere que si el aumento de sFlt-1 es un factor causante de CIR, está limitado a la placenta y no es detectable a nivel del suero materno en esa edad gestacional. Al igual que Thadani y cols., 2004 observan que el aumento de sFlt-1 en primer trimestre si que puede predecir las gestantes que desarrollarán HIE pero no PEG, sugiriendo este aumento de sFlt-1 precoz que la placentación en este momento ya se encuentra afectada. Erez y cols., 2008, determinan el cambio en los niveles de sFlt-1, s-Eng, PIGF entre primer y segundo trimestre en gestantes que desarrollan HIE, PEG y en controles y observan que en gestantes con HIE existe un aumento de sFlt-1 y s-Eng y una disminución de PIGF del primer al segundo trimestre y en gestantes que desarrollan un PEG únicamente existe un aumento de s-Eng.

Por tanto, la cuestión que nos planteamos, es , que las gestantes con CIR, no presentan enfermedad sistémica, a pesar de encontrar un aumento de sFlt-1 a nivel materno, por tanto nos puede hacer plantear varias cosas, que el sFlt-1 no es el causante de la lesión endotelial, o, que se necesitan niveles mayores de sFlt-1 para desarrollar la enfermedad (ya que las gestantes con HIE presentan de forma significativa niveles mayores de sFlt-1).

Al calcular el cociente $VEGF/sFlt-1$ en los tres grupos, observamos que las gestaciones con CIR son las que menor cociente presentan y por tanto, las que peor estado angiogénico presentan.

A nivel fetal, observamos que tanto en arteria como en vena, no existen diferencias significativas para ninguno de los 3 parámetros. Wallner y cols., realizan un estudio en gestantes con CIR y obtienen que las gestaciones con CIR presentan mayor cantidad de sFlt-1 a nivel tanto materno (acorde con nuestro estudio), como venoso, no existiendo diferencias a nivel arterial, llegando a la conclusión de que el feto no contribuye a los cambios en los factores angiogénicos. En nuestro estudio, los niveles de sFlt-1 a nivel arterial si que están aumentados aunque no de forma significativa en gestantes con CIR en comparación con las gestaciones control, observando un gradiente materno-fetal de sFlt-1, pero no un gradiente arterio-venoso de sFlt-1 y por tanto, el feto, probablemente no contribuya de forma significativa al aumento de sFlt-1 a nivel materno.

El doppler nos ayuda a distinguir los fetos PEG constitucionales de los CIR. Parece existir una secuencia de deterioro de la oxigenación y nutrición fetal (Baschat y Hecher 2004) concomitante con los cambios en la OVF, de manera que inicialmente se observaría un aumento de la resistencia en AU, reflejo del aumento de éstas a nivel placentario, lo que iniciaría la redistribución a nivel cerebral con disminución de las resistencias (brain-sparing effect). Posteriormente las OVF venosas se alterarían, lo que explica su mejor correlación con la acidosis fetal umbilical (Rizzo y cols., 1996). Finalmente la ausencia o inversión atrial en el Ductus venoso (DV) o la pulsatilidad a nivel umbilical, sería la manifestación de la descompensación

fetal y está asociado a una elevada probabilidad de muerte perinatal.

Ya hemos visto previamente que al realizar el estudio de todos los grupos en relación con el doppler, existe mayor cantidad de sFlt-1 a mayores resistencias a nivel de arteria umbilical y a menores resistencias a nivel de ACM, lo que sugiere una mayor redistribución fetal y por tanto, un mayor compromiso fetal desde el punto de vista hemodinámico.

Al realizar el estudio por grupos, no existe un patrón de comportamiento homogéneo entre el complejo VEGF materno con el doppler a nivel de arterias uterinas y a nivel fetal (ACM, AU) en los distintos grupos. Si que observamos a nivel de ACM, que es la zona vascular más sensible a las necesidades de O₂, se relaciona con un aumento de la inhibición de la vasculogénesis materna (aumento de sFlt-1), en las gestaciones control con PEG no observándose este fenómeno en el caso del CIR, donde sólo observamos un aumento de sFlt-1 a mayores resistencias en arterias uterinas.

A nivel fetal, observamos de forma global, que no existe ninguna relación significativa entre el complejo VEGF y los parámetros de gravedad. Cuando hacemos el estudio por grupos, observamos que en las gestaciones con PEG sigue sin existir ninguna relación significativa y en las gestaciones con CIR, observamos que existe más cantidad de sFlt-1 en arteria, a peor perfusión a nivel de arteria umbilical y de arterias uterinas, lo que sugiere una peor perfusión placentaria, asociada a un mayor potencial antiangiogénico en las gestaciones con CIR.

Levine y cols., 2004, en su estudio con pacientes preeclámpticas, observaron que aquellas que desarrollaron PEG, presentaban niveles de sFlt-1 materno mayores antes del inicio de la HIE que las que no desarrollaron PEG.

Malamitsi-Puchner y cols., 2005 en el estudio que realizan en gestantes con CIR, observan que los niveles de VEGF materno no tienen correlación con los percentiles de peso, pero si que obtienen una correlación negativa entre el VEGF a nivel fetal y los percentiles fetales, posiblemente por la hipoxia fetal crónica que estimula la síntesis de VEGF. En nuestros resultados obtenemos

una relación negativa entre el sFlt-1 materno con el peso del RN y cuando realizamos el estudio por grupos, en las gestaciones con CIR, además de presentar una correlación negativa con el peso del RN, también se observa una correlación negativa entre el sFlt-1 y el peso placentario, no observando estas relaciones en las gestaciones con PEG.

Lash y cols., 2001, analizan los niveles de VEGF y del sFlt-1 a nivel placentario en gestantes con CIR en comparación con gestantes control o gestantes con macrosomía y observan que no existen diferencias significativas en la expresión de los elementos del VEGF en ninguno de los 3 grupos.

5.3 Hipoxia fetal y complejo VEGF

Al considerar en su conjunto la muestra del estudio, hacemos un análisis de la hipoxia en la gestación. La hipoxia placentaria, es causa de varias complicaciones durante el embarazo. Situaciones como la HIE o el CIR, pueden venir acompañadas de hipoxia. Se sabe que la hipoxia puede producir la apoptosis de varios tipos de células como son las células del trofoblasto. Un alto porcentaje de apoptosis se ha visto en las células del trofoblasto tanto de gestaciones con CIR (Smith y cols., 1997) como en gestaciones con HIE (Heikkilä y cols.,2005).

En situación de normoxia el HIF-1 α está continuamente produciéndose y en presencia de Fe²⁺ y oxígeno, es continuamente degradado a través de la vía metabólica de la proteína VHL/ubiquitina/proteosoma. Cuando el oxígeno está limitado, la prolina-hidroxilasa se inhibe y el HIF-1 α se acumula. Este tras sufrir una translocación y unirse al HIF-1 β se unirá al elemento que responde a la hipoxia (HRE), estimulando la expresión de genes que expresan varias proteínas como la eritropoyetina (EPO), VEGF, LDH, factor inductor de la NOS (iNOS), GLUT-1 y enosala-1 (ENO) (LaManna y cols., 2004).

En general, la angiogénesis se produce en situaciones de hipoxia, como ocurre en las neoplasias, o en la retinopatía diabética. Valorando el desarrollo placentario desde el inicio de la gestación, que se produce en un ambiente de oxígeno disminuido, se podría pensar, que esto podría ser un estímulo para la

angiogénesis placentaria, y por tanto, para la producción de sustancias angiogénicas. Rodesch y cols., 1992, observan que la presión de oxígeno en el lado vellositario es menor (18mm Hg) comparado con el lado materno (40mm Hg) en semana 8-10 de gestación, pero aumenta hasta 60mm Hg cuando la sangre materna entra en el espacio intervelloso (a partir de semana 12 de gestación). Se podría hipotetizar que los niveles de oxígeno locales controlan la remodelación vascular a nivel de arterias uterinas. Sin embargo, Bahtiyar y cols., 2007, observan en ratas, que la inducción hipoxia crónica severa o inhibición de NO mediante L-NAME, da lugar a CIR.

Como ya hemos nombrado antes, Nagamatsu y cols 2004 al igual que Munaut y cols 2008, observan que las células del trofoblasto sometidas a bajos niveles de oxígeno, aumentan la producción de sFlt-1 en comparación con las células endoteliales de la vena umbilical y los fibroblastos. A su vez, los 3 tipos de células, producen un aumento de VEGF_f en respuesta a la hipoxia, y no se detecta en ellas el VEGF_f, sugiriendo que el sFlt-1 bloquea a este VEGF_f. Sin embargo esto no apoya la hipótesis de que la remodelación vascular uterina es dirigida por una situación de hipoxia, ya que son las células del trofoblasto (y éstas en situación de hipoxia sintetizan sFlt-1) las que convierten al sistema vascular uterino en un sistema de bajas resistencias. Considerando que las células endoteliales maternas son sustituidas por células del trofoblasto, parece que esto puede poner una restricción en la angiogénesis por las células endoteliales maternas. Por tanto, tiene que existir alguna discrepancia entre el concepto bien aceptado de angiogénesis y la remodelación vascular uterina.

Trollmann y cols., 2003, en su estudio ya comentado anteriormente, observan que ante una hipoxia aguda (asfixia intraparto) existe un aumento de VEGF y KDR pero no de sFlt-1, sin embargo en situación de hipoxia crónica como ocurre en la HIE si que observa un aumento tanto de VEGF como de sus 2 receptores. Sin embargo Bahtiyar y cols., 2007 observan en ratas que ante una hipoxia crónica no se alteran los niveles de sFlt-1, pero si que aumentan cuando se inhibe la producción de NO mediante la L-NAME.

La fuente más importante en la síntesis de sFlt-1 en las pacientes con HIE se

considera que es la placenta. Las células del trofoblasto aisladas de placentas de gestantes con HIE sintetizan mayor cantidad de sFlt-1 que las células del trofoblasto de placentas normales. El mecanismo por el cual las placentas con HIE sintetizan mayor cantidad de sFlt-1 no está claro. Lo que sí que está claro, es que las pacientes con HIE o CIR, presentan una situación de hipoxia que podría ser la causa de este aumento de sFlt-1, y como ya hemos observado en nuestros resultados, las pacientes con HIE, seguidas de las pacientes con CIR, presentan mayores niveles de sFlt-1 a nivel materno, que las gestaciones control.

Wathen y cols 2006, observan en mujeres que desarrollan HIE, que en semana 14 los niveles de sFlt-1 no están aumentados en comparación con gestantes control, sin embargo, en una segunda muestra en semana 19, sí que se encuentra aumentado.

Por tanto, la cuestión que queda sin contestar, es si la producción de sFlt-1 ocurre de forma primaria o secundaria. Está claro que la hipoxia estimula la síntesis de sFlt-1 por el trofoblasto (Hornig y cols., 2000). Si la hipoxia placentaria es un fenómeno precoz, debida a una alteración de la placentación, la síntesis del sFlt-1 sería secundaria a esta hipoxia. Sin embargo, parece bastante posible que el VEGF, PlGF y el sFlt-1 sean factores reguladores importantes de la placentación, de hecho, se ha visto que la administración de sFlt-1 exógeno in vitro, inhibe la invasión del citotrofoblasto. Maynard y cols., 2003, no observan cambios patológicos en las placentas de las ratas a las que se les administró el sFlt-1 exógeno, tal vez porque la administración de sFlt-1 fue en segundo trimestre y por tanto la invasión placentaria ya estaba establecida. Por tanto, por el hecho de que en algunos estudios se ha visto que el sFlt-1 ya está aumentado en primer trimestre (Thadhani y cols., 2004, Wathen y cols., 2006), podría indicarnos que hay una situación antiangiogénica desde principio de la gestación, y por tanto alterando la angiogénesis placentaria. Esta alteración de la placentación daría lugar a su vez a una hipoperfusión placentaria dando lugar a una situación de hipoxia, estimulando ésta la síntesis de sFlt-1 y por tanto, agravando la situación. También hay que tener en cuenta, que la alteración

de la expresión de estos factores angiogénicos podría estar ligado con factores genéticos (Dawson y cols., 2002), metabólicos (Wolf y cols., 2001, Seely y cols., 2003), factores inflamatorios (Wolf y cols., 2001, Kauma y cols., 2002) o autoinmunes (Dechend y cols., 2000).

En nuestro estudio analizamos parámetros tanto directos como indirectos de bienestar fetal que nos orientan ante una situación de hipoxia y correlacionamos estos parámetros con el complejo VEGF materno.

Nosotros consideramos parámetros directos de bienestar fetal el peso del RN y placentario, el índice de Apgar y el equilibrio ácido-base. No hay trabajos que estudien la asociación entre los parámetros del EAB o test de Apgar con el complejo VEGF.

Al valorar los parámetros directos, observamos que el sFlt-1 está aumentado a menor peso del RN y a peores índice de Apgar al primer y quinto minuto. Lu y cols., 2007 y Chaiworapongsa y cols., 2004 también observan la correlación negativa entre el peso del recién nacido y el sFlt-1.

Al valorar los parámetros indirectos de bienestar fetal, es decir, el doppler a nivel de la circulación materno-fetal, observamos que el sFlt-1 está aumentado cuanto peor es la circulación uteroplacentaria, existiendo también mayores niveles a mayor redistribución fetal, y por tanto, a mayor compromiso de éste.

Al estudiar la perfusión uterina de forma cualitativa, según la presencia o ausencia de notch, observamos que el sFlt-1 se encuentra más aumentado en aquellas gestaciones que presentan notch bilateral. La presencia de esta onda, también se ve relacionada con peores pesos en el RN y pesos placentarios.

Cuando analizamos los parámetros directos de bienestar fetal en relación con el complejo VEGF fetal, observamos que no existe relación entre los parámetros del VEGF y el peso del RN.

Por otro lado, al analizar el equilibrio ácido-base, observamos que existe un aumento de sFlt-1 en arteria umbilical a peor pH tanto arterial como venoso. Asimismo el pH arterial, se asocia de forma positiva con el cociente $\text{VEGF}_f/\text{sFlt-1}$ tanto arterial como venoso, lo que sugiere que existe peor pH

cuando existen niveles mayores de sFlt-1 así como menor potencial vasculogénico objetivado con el cociente.

Por otro lado, tanto el $VEGF_f$ como el sFlt-1 presentan una correlación negativa con el logaritmo del índice de Apgar al 5º minuto. Esto podría ser una relación espúrea sin más, sin embargo, esta relación también la observamos a nivel materno, lo que le da mayor consistencia a la asociación. Otra explicación que podríamos dar es que estos factores ($VEGF_f$ y sFlt-1) aumentan de forma paralela durante la gestación, manteniendo una situación estable en la angiogénesis (entre un factor inhibidor y un factor estimulador de la angiogénesis), sin embargo, en situaciones patológicas, este equilibrio entre ambos factores se puede perder, existiendo un aumento más rápido del sFlt-1, creando una situación más antiangiogénica y por tanto existiendo cocientes de $VEGF_f/sFlt-1$ menores. Aquí la correlación de ambos factores con el índice de Apgar nos podría estar reflejando un aumento del $VEGF_f$ en compensación al aumento del sFlt-1 ante una situación de hipoxia.

Cuando analizamos los parámetros indirectos de bienestar fetal y complejo VEGF fetal, observamos que no existe relación entre los parámetros del VEGF con el doppler a nivel de arterias uterinas y umbilical. Sin embargo, si que observamos una relación negativa entre el sFlt-1 de arteria umbilical con el IP e IR del CCP, es decir, a más sFlt-1 menor cociente cerebro-placentario y por tanto mayor redistribución. Schelembach y cols., 2007, observan en gestaciones con HIE y CIR que el sFlt-1 a nivel de vena umbilical se correlaciona de forma positiva con el IP a nivel de arteria umbilical, reflejando la severidad de la lesión a nivel de placenta, y por tanto, del aporte fetal de nutrientes. También observan que el VEGFR2 o KDR a nivel de vena umbilical, receptor que parece tener mayor función en mediar las señales del VEGF sin antagonizarlo, y que es expresado fundamentalmente por la célula endotelial, tiene una correlación negativa con el IP de arteria umbilical, reflejando una disfunción de la célula endotelial. Estos autores, a diferencia de nosotros, no encuentran correlación entre los parámetros del doppler con el sFlt-1 a nivel de arteria umbilical, llegando a la conclusión de que el aporte

fetal no es considerable.

Actualmente no hay tratamiento para la HIE y muchos casos acaban en partos prematuros por la gravedad de la situación. Si realmente el sFlt-1 tiene un papel importante en la fisiopatología de la preeclampsia, antagonizar sus efectos podría mejorar los síntomas. Se ha comprobado en algunos estudios con ratas que la administración exógena de VEGF acelera la mejoría a nivel renal en glomerulonefritis y trombosis microangiopáticas (Masuda y cols., 2001, Kim y cols., 2000). También se ha observado que la administración de VEGF mejora la clínica de de HTA, disfunción endotelial y nefropatía causada por tratamiento con ciclosporina (Kang y cols., 2001), así como se ha visto que la nicotina tiene propiedades proangiogénicas al inducir VEGF endógeno (Heeschen y cols., 2001). Además es conocido que el tabaco está asociado a una menor incidencia de preeclampsia (Newman y cols., 2001, Zhang y cols., 1999). Por tanto, periodos cortos de tratamiento con nicotina en casos de preeclampsia grave podría ser un tratamiento efectivo. Maynard y cols 2003, obtienen en estudios in Vitro que la administrar de VEGF o PlGF exógeno podría mejorar la disfunción endotelial. Por tanto, antagonizar el sFlt-1, podría ser una prometedora terapia para estas pacientes.

6.- CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

A continuación expondré las conclusiones en orden inverso a lo expuesto en los objetivos, es decir, enunciaré primero los específicos y luego los generales.

6.1 Específicas

- 1. En embarazos únicos existe con el avance de la gestación, un predominio del factor inhibidor del crecimiento vascular, objetivado por la asociación directa entre la edad gestacional y el sFlt-1 e inversa entre aquella y el cociente $VEGF_f/sFlt-1$.**
- 2. Las gestaciones con HIE presentan mayores concentraciones de sFlt-1 y menor cociente $VEGF_f/sFlt-1$ que las gestaciones con HTA y controles, estableciendo el siguiente orden de potencia para el sFlt-1: HIE < HTA < controles, siendo a la inversa con el cociente y por tanto siendo las gestaciones con HIE las que mayor perfil antiangiogénico presentan.**
- 3. En general, cuando estudiamos los parámetros de gravedad (repercusión orgánica) asociadas a cifras de presión, observamos que a mayor concentración del sFlt-1, empeora el perfil de dichos parámetros.**
- 4. Al estudiar el complejo VEGF a nivel materno-fetal, observamos que en las gestaciones con HIE, los 3 componentes del complejo VEGF aumentan al mismo tiempo en toda la circulación materno-fetal, mientras que en el resto de gestaciones sólo lo hace el $VEGF_f$, lo que podría reflejar que en las gestaciones con HIE existe patología tanto a nivel materno (HTA) como fetal (insuficiencia placentaria), no siendo así en el resto de los casos.**

5. Al estudiar las gestaciones con CIR en comparación con las gestaciones control, observamos, a semejanza con lo explicado en las HIE, que las gestaciones con CIR tiene mayores niveles de sFlt-1 y menores cocientes VEGF_f/sFlt-1, por tanto, un perfil más antiangiogénico.
6. A nivel materno, un mayor sFlt-1 se asocia a mayores resistencias en arterias uterinas y arteria umbilical así como con mayor vasodilatación cerebral. En conjunto, indica que el potencial vasculogénico se asocia a cambios hemodinámicos en la circulación uteroplacentaria, feto-placentaria y fetal.
7. No existe asociación entre el EAB en vasos umbilicales y el complejo VEGF materno, lo que sugiere que las variaciones agudas del EAB no influyen en el complejo VEGF.

6.2 Generales

1. En gestaciones con HIE y CIR, existe un claro perfil antiangiogénico, lo que explicaría el papel del complejo VEGF en la fisiopatología de ambos procesos.
2. Si bien no se observa una relación entre el complejo VEGF materno y la oxigenación fetal (EAB), sí que observamos un predominio de la inhibición del factor de crecimiento vascular endotelial en los casos de hipoxia crónica como es el CIR (peso menor al percentil 10 y doppler anómalo) y una asociación del potencial antiangiogénico materno, con la hemodinámica fetal y el peso del concepto y su placenta.
3. El complejo VEGF materno no es un indicador de hipoxia fetal bioquímica, pero sí de compromiso hemodinámico.

7.- BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

-Acharya G, Wilsgaard T, Berntsen GKR, Maltau JM, Kiserud T. Reference ranges for serial measurements of umbilical artery Doppler indices in the second half of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192: 937 - 44.

-Achen M.G, Stacker S.A. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int. J. Exp. Path.* 1998; 79: 255 -65.

-Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in Preeclampsia. *Cir Res* 2004; 95: 884 - 91.

-Ahmed A. Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for placental hypoxia in intrauterine growth restriction. *Lab Invest* 1999; 79: 151 - 70.

-Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen: a review. *Placenta* 2000; 21: S16 - 24.

-Ahmed A, Li XF, Dunk C, Whittle MJ, Rushton Di, Rollason T: Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors* 1995; 12: 235 - 43.

-Ahmed A, Perkins J. Angiogenesis and intrauterine growth restriction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 981 - 98.

-Ahmed A, Whittle MJ, Khaliq A. Differential expression of placenta growth factor (PlGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig* 1997; 4: A663.

- Alexander GR, Himes JJ, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 163 - 168.
- Ali KZ, Burton GJ, Morad N, Ali ME. Does hypercapillarization influence the branching pattern of terminal villi in the human placenta at high altitude? *Placenta* 1996; 17: 677 - 82.
- 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 - 42.
- Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM, Baek KH, Rosenzweig A, Spiegelman BM. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature* 2008; 451: 1008 - 12.
- Bahtiyar MO, Buhimschi C, Ravishankar V, Copel J, Norwitz E, Julián S, Guller S, Buhimschi IA. Contrasting effects of chronic hypoxia and nitric oxide synthase inhibition of circulating angiogenic factors in a rat model of growth restriction. *Am J Obstet and Gynecol* 2007; 196: 72.e1 - 72.e6.
- Bamberg C, Kalache K.D. Prenatal diagnosis of fetal growth restriction. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2004; 9: 387 - 94.
- Barleon B, Reusch P, Totzke F, Herzog C, Keck C, Martiny-Baron G, Marme D. VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis* 2001; 4: 143 - 54.
- Barleon B, Sozzani S, Zhou , Weich HA, Mantovani A, Marme D: Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87: 3336 - 43.

-Barton, JR, O'Brien, JM, Bergauer, NK, Jacques DL, Sibai BM. Mild gestational hypertension remote from term: progression and outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 979 - 83.

-Baschat A.A, Gembruch U, Reiss I, Gortner L, Weiner C.P Harman C.R. Absent umbilical artery end-diastolic velocity in growth-restricted fetuses: a risk factor for neonatal thrombocytopenia. *Obstet Gynecol* 2000; 96; 162 - 6.

-Baschat A.A, Gembruch U, Reiss I, Gortner L, Weiner C.P Harman C.R. Relationship between arterial and venous Doppler and perinatal outcome in fetal growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 16: 407 - 13.

-Baschat A.A, Hecher K. Fetal Growth Restriction due to Placental Disease. *Sem Perinatol* 2004; 28: 67 - 80.

-Baschat A.A, Weiner C.P. Umbilical artery Doppler screening for detection of the small fetus in need of antepartum surveillance. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 154 - 58.

-Bdolah Y, Palomaki GE, Yaron Y Bdolah-Abram T, Goldman M, Levine RJ, Sachs BP, Haddow. JE, Karumanchi SA. Circulating angiogenic proteins in trisomy 13. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 239 - 45.

-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.

-Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. 4th ed New York Springer Verlag, 2000; 947.

- Bhattacharjee G, Asplin IR, Wu SM, Gawdi G, Pizzo SV. The conformation-dependent interaction of α 2-Macroglobulin with vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 2000; 275: 26806 - 11.
- 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.
- Boutsikou, T, Malamitsi-Puchner, A, Economou, E, Boutsikou, M, Puchner, K. P. and Hassiakos, D. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in intrauterine growth restricted fetuses and neonates. *Early Hum Dev.* 2006; 82: 235 - 9.
- Bowers RW, Cooper KM, Gallaher MJ. Longitudinal analysis of serum sFlt-1 concentrations in normal pregnancy and Preeclampsia. *J Soc Gynecol Invest.* 2004; 11: 187A.
- Breier G, Damert A, Plate KH, Risau W. Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. *Thromb Haemostasis* 1997; 78: 678 - 83.
- Brogi E, Schatterman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest* 1996; 97: 469 - 76.
- Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of Preeclampsia. *A. Obstet Gynecol Annu.* 1972; 1: 177 - 91.
- Buhimschi CS, Norwitz ER, Funai E, Richman S, Guller S, Lockwood CJ, Buhimschi IA. Urinary angiogenic factors cluster hypertensive disorders and identify women with severe Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192: 734 -41.

- Campbell DM, McGillivray, I. Preeclampsia in second pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; 92: 131 - 40.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gerstsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declereq C, Pawling J, Moons L, Colleen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435 - 9.
- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T: synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; 7: 575 - 83.
- Cary DA, Mendelsohn FA. Effect of forskolin, isoproterenol and IBMX on angiotensin converting enzyme and cyclic AMP production by cultured bovine endothelial cells. *Mol Cell Endocrin* 1987; 53: 103 - 9.
- Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, Bujold E, Mee Kim Y, Goncalves LF, Gomez R, Edwin S. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of PIH: Young Investigator Award. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 190: 1541 - 7.
- Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 2004; 25: 103 – 13.
- Cheifetz, S. Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Letarte M.. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 19027 - 30.

-Clark BA, Halvorson L, Sachs B, Epstein FH. Plasma endothelin levels in PIH: elevation and correlation with uric acid levels and renal impairment. *Am J Obstet Gynecol.* 1992; 166: 962 - 8.

-Clark DE, Smith SK, Sharkey AM, Charnock-Jones DS: Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum Reprod* 1996; 11: 1090 - 8.

-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.

-Coleman M, McCowan L, North R. Mid-trimester uterine artery screening as a predictor of adverse pregnancy outcome in high risk. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001; 15: 7 - 12.

-Comino R. Hypertensive states of pregnancy in Spain., *Clin. Exper. Hypert.* 1986, B5. 217 - 30.

-Comino R, Barahona M. Bartha J. Hipertensión y Embarazo. Cádiz: Servicio de Publicaciones .Universidad de Cádiz, 1995-2000; 183: S1 - S23.

-Crescimanno C, Marzioni D, Persico MG, Vuckovic M, Mühlhauser J, Castellucci M. Expression of bFGF, PIGF and their receptors in the human placenta. *Placenta* 1995; 16: A.13.

-Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995; 82: 1598 - 610.

-Dawson LM, Parfrey PS, Hefferton D, Dicks EL, Cooper MJ, Young D, Marsden PA. Familial risk of preeclampsia in Newfoundland: a population-based study. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1901 - 6.

- Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Kreuzer J, Park JK, Theuer J, Juepner A, Gulba DC, Mackman N, Haller H, Luft FC. AT(1) receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. *Circulation* 2000; 101: 2382 - 7
- Dekker GA. Risk factors for PIH. *Clin Obstet Gynecol* 1999; 42: 422.
- Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T, Kotowski A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat* 1989; 136: 190 - 203.
- De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. The ultrastructure of acute atherosclerosis in hypertensive pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1975; 123: 164 - 74.
- DiPietro LA, Polverini PJ. Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin 1. *Am J Pathol* 1993; 143: 678 - 84.
- Divon M. Umbilical artery Doppler velocimetry: clinical utility in high risk pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 174: 10 - 4.
- Douglas KA, Redman CWG. Eclampsia in the United-Kingdom. *BMJ* 1994; 309: 1395 - 400.
- Duckitt, K Harrington D. Risk factors for PIH at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005; 330: 565 - 71.
- Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* 1995; 203: 80 -92.
- Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, Qiu Y, Bussolati B, Ahmed A. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to

promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol* 2000; 156: 2185 - 99.

-Erez O, Romero R, Espinoza J, Fu W, Todem D, Kusanovic JP, Gotsch F, Edwin S, Nien JK, Chaiworapongsa T, Mittal P, Mazaki-Tovi S, Than NG, Gomez R, Hassan SS. The change in concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma between the first and second trimesters in risk assessment for the subsequent development of preeclampsia and small-for-gestational age. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008; 21: 279 - 87.

-Fant ME, Weisoly D: Insulin and Insulin –like growth factors in human development: implications for the perinatal period. *Semin Perinatol* 2001; 25: 426 -35.

-Farré MT, Borrell A, Raveraw W, Azulay M, Cararach V, Fortuny A. Estudio Doppler de las arterias uterinas, predicción de complicaciones perinatales. *Prog Obstet Ginecol.* 2001; 44: 537 - 43.

-Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med.* 1999; 77: 527- 43.

-Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1358 - 66.

-Ferrara N, Carver-Moore K, Chen h, Dowd M, Lu L, O’Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439 - 42.

-Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrinol Rev* 1997; 18: 4 - 25.

- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280: C1358 - 66.
- Ferrazzi E, Bozzo M, Rigano S, Bellotti M, Morabito A, Pardi G, Battaglia FC, Galan HL. Temporal sequence of abnormal Doppler changes in the peripheral and central circulatory systems of the severely growth-restricted fetus. *Ultr Obstet Gynecol*. 2002; 19: 140 - 6.
- Ferriani RA, Ahmed A, Sharkey AM, Smith SK. Colocalization of acidic and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblast cell line JEG-3. *Growth Factors* 1994; 10: 259 - 68.
- Ferris TF. Pregnancy, PIH, and the endothelial cell. *N Engl J Med*. 1991; 325: 1439 - 40.
- Fisher KA, Luger A, Spargo BH, Lindheimer MD. Hypertension in pregnancy: clinical-pathological correlations and remote prognosis. *Medicine (Balt)*. 1981; 60: 267 - 76.
- Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 1997; 173: 206 - 10.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27 - 31.
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931 - 4.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995; 376(6535): 66 - 70.

- Fowler K.B, Stagno S, Pass R.F, Britt W.J, Boll T.J, Alford C.A. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N England J Med* 1992; 326: 663 - 67.
- 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.
- Friedman SA, Schiff E, Emeis JJ, Dekker GA, Sibai BM. Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe PIH. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 172: 202 - 3.
- Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E and Libby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *CIR Res* 1994; 75: 181- 9.
- Gardosi J, Mul T, Mongelli M, Fagan D. Analysis of birth weight and gestational age in antepartum stillbirths. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105: 524 - 30.
- Garite TJ, Clark R, Thorp JA. Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 481 - 7.
- Gaugler-Senden IP, Huijssoon AG, Visser W, Steegers EA, de Groot CJ. Maternal and perinatal outcome of PIH with an onset before 24 weeks' gestation Audit in a tertiary referral center. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 128: 216 - 21.

-Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placenta defects that occur in PIH. *J Clin Invest.* 1996; 97: 540 - 50.

-Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272: 23659 - 67.

-Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 2002 Jun 27; 417(6892): 954 - 8.

-Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway: requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 30336 - 43.

-Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD. Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 1981; 88: 876 - 81.

-Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. "Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2." *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4213 - 24.

-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.

-Goldstein I, Reece E.A, Pihu G, Bovicelli L, Hobbins JC. Cerebellar measurements with ultrasonography in the evaluation of fetal growth and development. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 1065 - 9.

-Gomez O, Martínez JM, Figueras F, del Río M, Borobio B, Coll O, Cararach V, Vanrell A. Uterine Doppler at 11-14 weeks gestation to screen for hypertensive disorders and associated complications in an unselected population. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005; 26: 490 - 4.

-Gougos, A. St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Bühring HJ, Bernabeu C, van Mourik JA, Letarte M. Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol* 1992; 4: 83 - 92.

-Green CJ, Lichtlen P, Huynh, Yanovsky M, Laderoute K.R, Schaffner W, Murphy B.J. Placenta growth factor gene expression is induced by hypoxia in fibroblasts: a central role for metal transcription factor-1. *Cancer Res* 2001; 61: 2696 - 2703.

-Griendling KK, Harrison DG, Alexander W. Book Hurst's The Heart. Chapter 7. Biology of the Vessel Wall 2004: 135 - 54.

-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.

-Gryglewski Rj, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* 1988; 12: 530 - 8.

-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.

-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.

-He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through Flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 1999; 274: 25130 - 5.

-He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS. Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 537 - 45.

-Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, Tsao PS, Johnson FL, Cooke JP. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat. Med* 2001; 7: 833 - 9.

-Heikkilä A, Tuomisto T, Häkkinen SK, Keski-Nisula L, Heinonen S, Ylä-Herttua S. Tumor suppressor and growth regulatory genes are overexpressed in severe early-onset Preeclampsia an array study on case-specific human preeclamptic placental tissue. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 2005; 84: 679 - 89.

-Helske S, Vuorela P, Carpen O, Hornig 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.

-Hertig A, Berkane N, Lefevre G, Toumi K, Marti HP, Capeau J, Uzan S, Rondeau E. Maternal serum sFlt1 concentration is an early and reliable predictive marker of preeclampsia. *Clin Chem* 2004; 50: 1702 – 3.

-Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. Combination of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of Preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004; 200: 957 - 65.

-Hippenstiel S, Krull M, Ikermann A, Risau W, Clauss M, Suttrop N. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274: 678 - 84.

-Hladunewich MA, Myers BD, Derby GC, Blouch KL, Druzin ML, Deen WM, Naimark DM and Lafayette RA. Course of preeclamptic glomerular injury after delivery. *AJP - Renal Physiology* 2008; 294: F614 - F620.

-Hornig C, Barleon B, Ahmad S, Vuorela P, Ahmed A, Weich HA. Release and complex formation of soluble VEGFR-1 from endothelial cell and biological fluids. *Lab Invest* 2000; 80: 443 - 54.

-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 al RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1806 - 14.

-Houck KA, Leung, D. W, Rowland AM, Winer J. Ferrara, N. *J. biol* 1992; 267: 26031 - 7.

-Innes KE, Weitzel L, Laudenslager M. Altered metabolic profiles among older mothers with a history of Preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2005; 59: 192 - 201.

-Ishioka S-I, Ezaka Y, Umemura K, Hayashi T, Endo T, Saito T. Proteomic analysis of mechanisms of hypoxia-induced apoptosis in trophoblastic Cells *Int. J. Med. Sci* 2007; 4: 36 - 44.

-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 in blunted by low dietary protein intake. *Pediatr Res* 2002; 51: 485 - 91.

-Jaffe R: First trimester utero-placental circulation: maternal-fetal interaction. *J Perinat Med* 1998; 26: 168 - 74.

-Jaffe R: Importance of angiogenesis in reproductive physiology. *Semin Perinatol* 2000; 24: 79 - 81.

-Jauniaux E, Burton GJ, Moscoso GJ, Hustin J: Development of the early human placenta: a morphometric study. *Placenta* 1991; 12: 269 - 76.

-Jelkmann W. Pitfalls in the measurement of Circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem* 2001; 4: 7 - 23.

-Kabbinnar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G, Griffing S, Bergsland E. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 60 – 5.

-Kaipainen A, Korhonen J, Pajusola K, Aprelikova O, Persico MG, Terman BI, Alitalo K: The related FLT4, FLT1, and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells. *J Exp Med* 1993; 178: 2077 -88.

-Kang D.H, Kim YG, Andoh TF, Gordon KL, Suga S, Mazzali M, Jefferson JA, Hughes J, Bennett W, Schreiner GF, Johnson RJ. Post-cyclosporine-mediated hypertension and nephropathy: amelioration by vascular endothelial growth factor. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 2001; 280: F727 - F736.

-Kaufmann P, Mayhew TM y Charnock-Jones DS. Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. *Placenta* 2004; 25: 114 - 26.

-Kauma S, Takacs P, Scordalakes C, Walsh S, Green K, Peng T. Increased endothelial monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 706 - 14.

-Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10705 - 9.

- Khaliq A, Dunk C, Jiang J, Shams M, Li XF, Acevedo C, Weich HA, Whittle M, Ahmed A. (1999) Hypoxia down-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for „placental hyperoxia“ in intrauterine growth restriction. *Lab Invest* 1999; 79: 151 - 70.

-Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol.* 1986; 93: 1049 - 59.

-Khong TY, Mott C: Immunohistologic demonstration of endothelial disruption in acute atherosclerosis in Preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993; 51: 193 -7.

-Khoury MJ, Erickson D, Cordero JE, McCarthy BJ: congenital malformations and intrauterine growth retardation: A population study. *Pediatrics* 1988; 82: 83 - 90.

-Kim, Y.G., Suga S, Kang DH , Jefferson JA , Mazzali M. Vascular endothelial growth factor accelerates renal recovery in experimental thrombotic microangiopathy. *Kidney Int* 2000; 58: 2390 - 9.

-King BF. Ultrastructural differentiation of stromal and vascular components in early macaque placental villi. *Am J Anat* 1987; 178: 30 - 44.

-Kingdom JC, Burrell S.J, Kaufmann P. Pathology and clinical implications of abnormal umbilical artery Doppler waveforms. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1997; 9; 271 - 6.

-Kingdom JC, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92: 35 - 43.

- Kingdom JC, Kaufmann P. Oxygen an placental villous development-origins of fetal hypoxia. *Placenta* 1997; 18: 613 - 21.
- Kingdom JC, Rodeck C.H, Kaufmann P. Umbilical artery Doppler—more harm than good?. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104: 393 - 6.
- 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.
- Koga K, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Ruimeng X, Hirata T. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with Preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2348 - 51.
- Kupfermine MJ, Peri H, Zwang E, Yaron Y, Wolman I, Eldor A: High prevalence of the prothrombin gene mutation in women with intrauterine growth restriction, abruptio placentae and second trimester loss. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79: 963 - 7.
- Lachmeijer AM, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arngrimsson R. Searching for Preeclampsia genes: the current position. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 105: 94 - 113.
- Lam CH, Lim KH, Karumanchi A. circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of Preeclampsia. *Hypertension* 2005; 46: 1077 - 85.
- LaManna JC, Chavez JC, Pichiule P. Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain. *The Journal of Experimental Biology* 2004; 207: 3163 - 9.

-Lash G, MacPherson A, Liu D, Smith D, Charnock-Jones S, Baker P. Abnormal fetal growth is not associated with altered chorionic villous expression of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 1093 - 8.

-Lash G, Taylor CM, Trew Aj, Cooper S, Anthony FW. Vascular endothelial growth factor and placental growth factor release in culture trophoblast cells under different oxygen tensions. *Growth Factors* 2002; 20: 189 - 96.

-Lavaque AJ, Yilmaz T, Ramos-Esteban J, Liggett P. Exudative age-related macular degeneration: vascular endothelial growth factor (VEGF). *ASCRS ASOA* 2006.

-Lee EU, Oh MJ , Jung JW, Lim JE, Seol HJ, Lee KJ, Kim HJ. The levels of circulating Vascular Endothelial Growth Factor and Soluble Flt-1 in Pregnancies Complicated by Preeclampsia A. *J Korean Med Sci* 2007; 22: 94 - 8.

-Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KY, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA. Soluble Endoglin an other circulating antiangiogenic factors in Preeclampsia A. *N Engl J Med* 2006; 355: 992 - 1005.

-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. Circulation angiogenic factors and the risk of Preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 50: 1702 - 1703.

-Levine RJ, Qian C, Maynard SE, Yu KF, Epstein FH, Karumanchi A. Serum sFlt1 concentration during Preeclampsia and mid trimestre blood pressure in healthy nulliparous women. *Am j Obstet Gynecol* 2006; 194: 1034 - 41.

-Levine RJ, Thadhani R, Qian C, Lam C, Lim KH, Yu KF, Blink AL, Sachs B, Epstein FH, Sibai B, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Urinary placental growth factor and risk of Preeclampsia. *JAMA*. 2005; 293: 77 - 85.

-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.

-Lin L, Balazy M, Pagano PJ, Nasjletti A. Expresión of prostaglandin H2-mediated mechanism of vascular contraction in hypertensive rats. Relation to lipoxygenase and prostacyclin synthase activities. *Cir Res* 1994; 74: 197 - 205.

-Livingston JC, Haddad B, Gorski LA, Neblett P, Ahokas RA, Ramsey R, Sibai BM. Placenta growth factor is not an early marker for the development of severe Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 1218 - 20.

-Loke YW, King A. Immunology of implantation. *Baillieres Best Pract Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 827.

-Lu F, Longo M, Tamayo E, Maner W, Al-Hendy A, Anderson G, Hankins GD, Saade GR. The effect of over-expression of sFlt-1 on blood pressure and the occurrence of other manifestations of Preeclampsia in unrestrained conscious pregnant mice. *Am J Obstet Gynecol*. 2007; 196: 396.e1-7; discussion 396.e7.

-Lyall, F, Greer, I.A, Boswell, F. Suppression of serum vascular endothelial growth factor immunoreactivity in normal pregnancy and in pre-eclampsia. Br. J. Obstet. Gynaecol 1997; 104: 223 - 8.

-Magee LA, Ornstein MP, von Dadelszen P. Fortnightly review: management of hypertension in pregnancy. BMJ 1999; 318: 1332 - 6.

-Makris A, Thornton C, Thompson J, Thomson S, Martin R, Ogle R, Waugh R, McKenzie P, Kirwan P and Hennessy A. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. Kidney Int 2007; 71: 977 - 984.

-Manning FA. General principles and applications of ultrasonography. In: Creasy RK, Resnik R, editors. Maternal-fetal medicine: principles and practice. Philadelphia: Saunders, 2004; 315 - 355.

-Manning FA. Intrauterine growth retardation. In, Fetal Medicine. Notwalk, CT, Appleton & Lange p. 317.

-Masuda Y, Shimizu A, Mori T, Ishiwata H. Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. Am. J. Pathol 2001; 159: 599 - 608.

-Mayhew TM: Changes in fetal capillaries during preplacental hypoxia: growth, shape remodelling and villous capillarization in placentae from high-altitude pregnancies. Placenta 2003; 24: 191 - 8.

-Mayhew TM: Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells. Placenta 2002; 23: 742 - 50.

-Mayhew TM, Ohadike C, Baker PN, Crocker IP, Mitchell C, Ong SS: Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by Preeclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta* 2003; 24: 219 - 26.

-Maynard SE, Epstein FH and Karumanchi SA. Preeclampsia and Angiogenic Imbalance. *Annual Review of Medicine* 2008; 59: 61 - 78.

-Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li Jianyi. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension and proteinuria in Preeclampsia. *J clin Invest* 2003; 111: 649 - 58.

-McAllister, K.A. Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold. Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet* 1994; 8: 345 - 51.

-McCowan LM, Harding JE, Roberts AB, Barker SE, Ford C, Stewart AW. A pilot randomized controlled trial of two regimens of fetal surveillance for small-for-gestational-age fetuses with normal results of umbilical artery Doppler velocimetry. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 81 - 6.

-McKeeman GC, Ardill JE, Caldwell CM; Hunter AJ, McClure N. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop. *Am J Obstet and Gynecol* 2004; 191: 1240 - 6.

-Millauer B, Witzigmann-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.

-Mills JL, DerSimonian R, Raymond E, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Clemens JD, Hauth JC, Catalano P, Sibai B, Curet LB, Levine RJ. Prostacyclin and thromboxane changes predating clinical onset of pre-eclampsia: a multicenter prospective study. *JAMA* 1999; 282: 356 - 362.

-Munaut C, Lorquet S, Pequeux C, Blacher S, Berndt S, Franckene F, Foidart JM. Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast. *Human Reprod* 2008; 23: 1407 - 15.

-Mutter WP and Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res* 2008; 75: 1 - 8.

-Nagamatsu T, Fujii T, Kusumi L, Zou M, Yamashita T, Osuga Y, Momoeda M, Kozuma S, Taketani Y. Cytotrophoblasts up regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduce oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of Preeclampsia. *Endocrinology* 2004; 145: 4838 - 45.

-Nagy JA, Vasile E, Feng D. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J. Exp. Med* 2002; 196: 1497 - 506.

-Ness RB, Roberts JM. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of Preeclampsia: an hypothesis and its implications. *Am j Obstet Gynecol* 1996; 175: 1365 - 70.

-Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9 - 22.

-Neufeld G, Kessler O, Vadasz Z, Gluzman-Poltorak Z. The contribution of proangiogenic factors to the progression of malignant disease: role of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001; 10(2): 339 - 56.

-Newman MG, Lindsay MK, Graves W. Cigarette smoking and pre-eclampsia: their association and effects on clinical outcomes. *Journal of Maternal-Fetal Medicine* 2001; 10(3): 166 - 70.

-Nilsson E, Salonen Ros H, Cnattingius S, Lichtenstein P. The importance of genetic and environmental effects for Preeclampsia and gestational hypertension: a family study. *BJOG* 2004; 111: 200 - 6.

-Odegard RA, Vatten LJ, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R . Preeclampsia and fetal growth. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 950 - 5.

-Ong CY, Liao AW, Cacho AM, Spencer K, Nicolaides KH. First-trimester maternal serum levels of placenta growth factor as predictor of Preeclampsia and fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 608 - 11.

-O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315 - 28.

-Ounsted M, Moar V.A, Scott A. Risk factors associated with small-for-dates and large for dates infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; 92: 226 - 32.

-Page EW. The relation between hydatid moles, relative ischemia of the gravid uterus and the placental origin of eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1939; 37: 291 - 3.

-Papageorghiou AT, Yu CK, Bindra R, Pondis G, Nikolaides KH. Multicenter screening for Preeclampsia and fetal growth restriction by transvaginal uterine Doppler at 23 weeks gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001; 18: 441 - 9.

-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.

-Powers RW, Roberts JM, Cooper KM, Gallaher MJ, Frank MP, Harger GF, Ness RB. Maternal serum soluble fms-like tyrosine kinase 1 concentrations are not increased in early pregnancy and decrease more slowly postpartum in women who develop Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193: 185 - 91.

-Polliotti BM, Fry AG, Saller DN, Mooney RA, Cox C, Miller RK. Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early onset preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 1266 - 74.

-Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 9: 677 - 84.

-Purwosunu Y, sekizawa A, Farina A, Wibowo N, Koide K, Okazaki S, Nakamura M, Okay T. Evaluation of physiological alterations of the placenta through analysis of cell-free messenger ribonucleic acid concentrations of angiogenic factors. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 124.e1 - 124.e7.

-Rajakumar A, Doty K, Daftary A, Harger G, Conrad KP. Impaired oxygen-dependent reduction of HIF-1 α and -2 α proteins in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 2003; 24: 199 - 208.

-Rajakumar A, Michael HM, Rajakumar PA, Shibata E, Hubel CA, Karumanchi SA, Thadhani R, Wolf M, Harger G, Markovic 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 woman. *Placenta* 2005; 26 (7): 563 - 73.

-RCOG. The investigation and management of the small for gestational age fetus. Guideline No. 31, 2002.

-Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 2004; 114: 744 - 54.

-Reece E.A, Goldstein I, Pihu G, Hobbins J.C. Fetal cerebellar growth unaffected by intrauterine growth retardation: a new parameter for prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157; 632 - 38.

-Regnault TR, Orbus RJ, de Vrijer B, Davidsen ML, Galan HL, Wilkeninq 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.

-Report of the Nacional High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet. Gynecol* 2000; 183: S1 - S23.

- Reshetnikova OS, Burton GJ, Teleshova OV: placental histomorphometry and morphometric diffusing capacity of the villous membrane in pregnancies complicated by maternal iron-deficiency anemia. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 724 - 27.
- Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the Placenta. *Biology of reproduction* 2001; 64: 1033 - 40
- Reynolds LP, Redmer DA. Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci* 1995; 73: 1839 - 51.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671 - 4.
- Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73 - 91.
- Rizzo G, Capponi A, Talone PE, Arduini D, Romanini C. Doppler indices from inferior vena cava and ductus venosus in predicting pH and oxygen tension in umbilical blood at cordocentesis. *Ultr Obstet Gynecol* 1996; 7: 401 - 10.
- Roberts JM. Preeclampsia: what we know and what we do not know. *Semin Perinatol* 2000; 24: 24 - 8.
- Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001; 357: 53 - 6.
- Roberts JM, Edep ME, Goldfien A, Taylor RN. Sera from preeclamptic women specifically activate human umbilical vein endothelial cells in vitro: morphological and biochemical evidence. *Am J Reprod Immunol.* 1992; 27: 101 - 8.

-Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 1200 -04.

-Robertson WB, Brosens I, Dixon HG. The pathological response of the vessels of the placental bed to hypertensive pregnancy. *J Pathol Bacteriol* 1967; 93: 581 - 92.

-Robertson WB, Khong TY, Brosens I, De Wolf F, Sheppard B, Bonnar J. The placental bed biopsy: a review of three european centres. *Am J Obstet Gynecol*. 1986; 155: 401 - 12.

-Robillard PY, Hulseley TC, Perianin J, Janky E, Miri EH, Pariernik E. Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet* 1994; 344: 973 - 5.

-Robinson H.P, Fleming J.E. A critical evaluation of sonar “ crown-rump length” measurements. *Br J Obstet Gynaecol* 1975; 82: 702 - 10.

-Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 283 - 5.

-Saftlas AF, Beydoun H, Triche E. Immunogenetic determinants of Preeclampsia and related pregnancy disorders: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2005; 106: 162 - 72.

-Saito S, Umekage H, Sakamoto Y , Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H: Increased T-Helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with Preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41: 297 - 306.

-Salafia CM, Pezullo JC, Ghidini A, Lopez-Zeno JA, Whittington SS. Clinical correlations of patterns of placental pathology in preterm Preeclampsia. *Placenta* 1998; 19: 67 - 72.

-Salafia CM, Pezullo JC, Minior VK, Divon MY: Placental pathology of absent nad reversed end-diastolic flow in growth restricted fetuses. *Obstet Gynecol* 1997; 90: 830 - 6.

-Sato TN , Arai K, Ishiharajima S. Role of glycosaminglycan and fibronectin in endothelial cell growth. *Exp Mol Pathol* 1987; 47: 202 - 10.

-Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376: 70 - 4.

-Saudan, P, Brown, MA, Buddle, ML, Jones, M. Does gestational hypertension become Preeclampsia?. *Br J Obstet Gynecol* 1990; 163: 460 - 5.

-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.

-Schelembach D, Beider E. Angiogenic factors in Preeclampsia. *J Soc Gyn Invest* 2003; 10: 316A.

-Schelembach D, Wallner W, Sengenberger R, Stiegler E, Mörtl M, Beckmann MW, Lang U. Angiogenic growth factor levels 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(4): 407 - 13.

-Seely EW, Solomon CG. Insulin resistance and its potential role in pregnancy- induced hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2393 - 2398.

-Shalabi F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertenstein M, Wu X-F, Breitman M, Schuh AC. Failure of blood island formation and vasculogenesis in flk-1 deficient mice. *Nature* 1995; 376 - 62.

-Shams M, Ahmed A. Localization of mRNA for basic fibroblast growth factor in human placenta. *Growth Factors* 1994; 11: 105 - 11.

-Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boocock CA, Brown KD, Smith SK. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J Reprod Fert* 1993; 99: 609 - 15.

-Shibata E, Rajakumar A, Powers RW, Larkin RW, Gilmour C, Bodnar W, Crombleholme WR, Ness RB, Roberts JM, Hubel CA. Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1 is increase in Preeclampsia but not in normotensive 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 T-H, Wang C-L, 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.

- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365: 785 - 99.
- Sibai B, El-Nazer A, Gonzalez-Ruiz, A. Severe Preeclampsia-eclampsia in young primigravid woman: Subsequent pregnancy outcome and remote prognosis. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 1011 - 16.
- Sibley CP, Pardi G, Cetin I, Todros T, Piccoli E, Kaufmann P. Pathogenesis of intrauterine growth restriction (IUGR)—Conclusions derived from a European Union Biomed 2 Concerted Action Project 'Importance of Oxygen Supply in Intrauterine Growth Restricted Pregnancies'—A Workshop Report. *Placenta* 2002; 16: S75 - S79.
- Signore C, Mills JL, Qian C, Yu K, Lam CH, Epstein FH, Karumanchi A, Levine RJ. Circulating Angiogenic Factors and Placental Abruption. *Obstet Gynecol* 2006; 108: 338 - 44.
- Simmons LA, Hennessy A, Gillin AG, Jeremy RW. Uteroplacental blood flow and placental vascular endothelial growth factor in normotensive and pre-eclamptic pregnancy. *Br J Obst Gynaecol* 2000; 107: 678 - 85.
- Simpson DA, Murphy GM, Bhaduri T, Gardiner TA, Archer DB, Stitt AW. Expression of VEGF gene family during retinal vaso-obliteration and hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 333 - 340.
- Skjaerven R, Vatten LJ, Wilcox AJ, Rønning T, Irgens LM, Lie RT. Recurrence of preeclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ* 2005; 331: 877 - 82.
- Smith S.C, Baker N.P, Symonds E.M. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 1997; 177: 1395 - 401.

-Smith GC, Crossley JA, Aitken DA, Jenkins N, Lyall F, Cameron AD, Connor JM, Dobbie R. circulating Angiogenic Factors in Early Pregnancy and the risk of Preeclampsia, Intrauterine Growth Restriction, Spontaneous Preterm Birth and Stillbirth. *Obstet and Gynecol* 2007; 109: 1316 - 24.

-Snijders RJM, Sherrod C, Gosden CM, Nicolaides KH: fetal growth retardation: associated malformations and chromosome abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 547 - 555.

-Soker S, Fidder 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.

-Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidder H, Charmahelli 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, Svahn CM, Neufeld G. Vascular endothelial growth factor is inactivated by binding to alpha 2-macroglobulin and the binding is inhibited by heparin. *J Biol Chem*. 1993; 268 (11): 7685 - 91.

-Staff AC, Braekke K, Harsem NK, Lyberg T, Holthe MR. Circulating concentrations of sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) in fetal and maternal serum during Preeclampsia. *Europ J Obstet & Gynecol and Reprod Biol* 2005; 122: 33 - 9.

-Staff AC, Harsem NK, Braekke K, Hyer M, Hoover RN, Troisi R. Maternal, gestational and neonatal characteristics and maternal angiogenic factors in normotensive pregnancies. *Eur J of Obstet and Gynecol and Reprod Biol* 2009; 143(1): 29 - 33.

- Stegeman JHJ. Placental development in the sheep and its relation to fetal development. *Bijdragen Tot De Dierkunde (Contrib Zool)* 1974; 44: 3 - 72.
- Stella CL, How HY, Sibai B. Thrombophilia and adverse maternal-perinatal outcome: controversies in screening and management. *Am J Perinatol* 2006; 23: 499 - 506.
- Stepan H, Krämer T, Faber R. Maternal plasma concentrations of soluble endoglin in pregnancies with intrauterine growth restriction *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(7): 2831 - 4.
- St-Jacques S, Forte M, Lye, S.J. Letarte, M. Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol. Reprod* 1994; 51: 405 - 13.
- Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, Kalluri R. Neutralization of Circulating Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by Anti-VEGF Antibodies and Soluble VEGF Receptor 1 (sFlt-1) Induces Proteinuria. *J Biol Chemistry* 2003; 278 (15); 12605 - 8.
- 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(5388): 468 - 71.
- Sutton MS, Theard MA, Bathia SJ, Plappert T: Changes in placental blood flow in the normal human fetus with gestational age. *Pediatr Res* 1990; 28: 383 - 387.

-Taylor CM, Stevens H, Nathony FW, Wheeler T. Influence of hypoxia on vascular endothelial growth factor and chorionic gonadotropin production in the trophoblast-derived cell lines: JEG, Jar and BeWo. *Placenta* 1997; 18: 451 - 8.

-Taylor RN, Crombleholme WR, Friedman SA, Jones LA, Casal DC, Roberts JM. High plasma cellular fibronectin levels correlate with bio-chemical and clinical features of Preeclampsia but cannot be attributed to hypertension alone. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165: 895 - 901.

-Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, Mc Master MT, Fisher SJ, North RA: Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: Evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 177 - 182.

-Taylor SG, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: A new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9: 272 - 4.

-Te Velde EA, Exalto N, Hesseling P, van der Linden HC: First trimester development of human chorionic villous vascularization studied with CD34 immunohistochemistry. *Hum Reprod* 1997; 12: 1577- 81.

-Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP, Ecker J, Karumanchi SA. First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for Preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 770 - 5.

-Thompson WD, Li WW, Maragoudaki SM. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol* 2000; 190: 330 - 7.

- 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.
- Todros T, Sciarrone A, Piccoli E, Guiot C, Kaufmann P, Kingdom J. Umbilical Doppler waveforms and placental villous angiogenesis in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 499 - 503.
- Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, Husain M, Letarte M. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 2005; 96(6): 684 - 92.
- Torry DS, Hinrichs M, Torry RJ. Determinants of Placental Vascularity. *Am J Reprod Immunol* 2004; 51: 257 - 68.
- Torry DS, Mukherjea D, Arroyo J, Torry RJ. Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation. *J Soc Gynecol Invest*. 2003; 10: 178 - 88.
- Torry DS, Wang HS, Wang TH, Caudle MR, Torry RJ: Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1539 - 44.
- Trollmann R, Amann K, Schooff E, Beinder E, Wenzel D, Rascher W, Dötsch J. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo: Up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 517 - 23.

- Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, Schaaps JP, Cabrol D, Frankenne F, Foidart JM. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 5555 - 63.
- Tseng J. J, Chou M.M. Hsieh M.M., Wen M. C, Ho S. C. and Hsu S. L. Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Placenta Growth Factor and Their Receptors in Placentae from Pregnancies Complicated by Placenta Accreta. *Placenta* 2006; 27; 70 - 78.
- Tuohy JF, James DK. Preeclampsia and trisomy 13. *Br J Obstet Gynaecol.* 1992; 99: 891 - 894.
- Unal ER, Robinson CJ, Johnson DD, Chang EY. Second-trimester angiogenic factors as biomarkers for future-onset Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197: 211.e1 - 211.e4.
- Van Dijk M, Mulders J, Poutsma A, Könst AA, Lachmeijer AM, Dekker GA, Blankenstein MA, Oudejans CB. Maternal segregation of the Dutch Preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat Genet* 2005; 37: 514 - 19.
- Van Rijn BB, Hoeks LB, Bots ML. Outcomes of subsequent pregnancy after first pregnancy with early –onset Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 723 – 8.
- Van Vugt J.M, Karsdorp V.H, Van Zalen-Sprock R.M, Van Geijn H.P. Fetal growth retardation and structural anomalies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991; 42: S79 - S83.

-Vatten LJ, Eskild A, Nilsen T, Jeansson S; Jenum PA, Staff AC. Changes in circulating level of angiogenic factors from the first to second trimester as predictors of Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 239.e1-239.e6.

-Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of Preeclampsia. *Nat Med* 2006; 12: 642 - 9.

-Verlohren S, Galindo A, Schelembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, Pape J, Dudenhausen JW, Denk B, Stepan H. An Automated method for determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assesment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201.

-Vintzileos AM, Fleming AD, Scorza WE, Wolf EJ, Balducci J, Campbell WA: Relationship between fetal biophysical activities and umbilical cord blood gas values. *Am J Obst and Gynecol* 1991; 165: 707-713.

-Vuckovic M, Ponting J, Terman BI, Niketic V, Seif MW, Kumar S: Expression of the vascular endothelial growth factor receptor, KDR, in human placenta. *J Anat* 1996; 188: 361 - 6.

-Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reprod* 1997; 56: 489 - 94.

-Vuorela P, Helske S, Hornig C, Alitalo K, Weich H, Halmesmaki E. Amniotic fluid--soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 353 - 7

-Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26988 - 95.

- Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 1996; 94: 1647 - 54.
- 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 retardation. *J Clin Endocrin Metab.* 2006; 91: 180 - 4.
- Weiner CP, Baschat AA. Fetal growth restriction: evaluation and management. In: James DK, Sheer PJ, Weiner P, Gonik B, (eds). *High Risk pregnancy management Options*. Saunders (Publ), London: 1999; 291 - 307.
- Weiner CP, Williamson RA: Evaluation of severe growth retardation using cordocentesis-Hematologic and metabolic alterations by etiology. *Obstet Gynecol* 1989; 73: 225 - 9.
- Wheeler T, Brockelsby JC, Wellings, RP. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor are raised in pre-eclamptic versus normotensive women. *J. Soc. Gynecol. Invest* 1997; 4: 194A.
- Wheeler T, Elcock CL, Anthony FW. Angiogenesis and the placental environment. *Placenta* 1995; 16: 289 - 96.
- Widmer M, Villar J, Benigni A, et al. Mapping the Theories of Preeclampsia and the Role of Angiogenic Factors: A Systematic Review. *Obstet Gynecol* 2007; 109: 168 - 80.

-Wolf M, Kettyle E, Sandler L, Ecker JL, Roberts J, Thadhani R. Obesity and preeclampsia: the potential role of inflammation 2001; *Obstet Gynecol* 98: 757 -762.

-Wolf M, Sandler L, Munoz K, Hsu K, Ecker JL, Thadhani R. First trimester insuline resistance and subsequent preeclampsia: a prospective study. *J clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1563 - 8.

-Wolf M, Shah A, Lam CH, Martinez A, Smirnakis K, MD, Epstein FH, , Taylor RN, Ecker JL, Karumanchi A, Thadhani R. Circulating levels of the antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. *Am J Obstet and Gynecol* 2005; 193: 16 - 22.

-Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients active angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig* 2003; 10: 82 - 93.

-Xiong X, Demianczuk NN, Buekens P, Saunders LD. Association of Preeclampsia with high birthweight for age. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 148 - 55.

-Xiong X, Demianczuk NN, Saunders LD, Wang FL, Fraser WD. Impact of Preeclampsia and gestational hypertension on birthweight by gestational age. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 203 - 9.

-Yogev Y, Xenakis EMJ, Langer O. The association between Preeclampsia and the severity of gestational diabetes: the impact of glycemic control. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1655 - 60.

- Yoshimatsu J, Matsumoto H Goto K, Shimano M, Narahara H, Miyakawa I. Relationship between urinary albumin and serum soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) in normal pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2006; 128(1-2): 204 - 8.
- Zhang J, Klebanoff M.A, Levine R.J, Puri, M, and Moyer P. The puzzling association between smoking and hypertension during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999; 181: 1407 - 13.
- Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype: one cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997; 99: 2152 - 64.
- Zhou Y, Genbacev O, Fisher SJ. The human placenta remodels the uterus by using a combination of molecules that govern vasculogenesis or leukocyte extravasation. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 995: 73 - 83.
- Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ. 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.
- Zygmunt M, Mazzuca D, Han V. Human chorionic gonadotropin (hCG) induces VEGF expression in vitro. *Placenta* 2000; 31: A23.