



Trabajo Fin de Grado

# Modelos experimentales de investigación en preeclampsia

Alumna: Patricia Rodríguez Cuesta

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla

2016





FACULTAD DE FARMACIA

GRADO EN FARMACIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

# Modelos experimentales de investigación en preeclampsia

**ALUMNA: PATRICIA RODRÍGUEZ CUESTA**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

TUTORES: ALFONSO MATE BARRERO Y CARMEN M<sup>a</sup> VÁZQUEZ CUETO

SEVILLA, JULIO DE 2016



## Resumen

La pre-eclampsia (PE) es un trastorno hipertensivo específico del embarazo que se produce después de las 20 semanas de gestación. Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y neonatal en todo el mundo, afectando al 3-5% de todos los embarazos. Este trastorno cursa con hipertensión, proteinuria y disfunción endotelial. Dada la dificultad para poder realizar ensayos en las mujeres embarazadas, se han realizado una gran variedad de modelos de experimentación tanto *in vitro* como *in vivo* con el fin de mejorar el manejo de la enfermedad.

Los modelos *in vitro* se realizan para identificar los marcadores bioquímicos de la enfermedad con la finalidad de promover terapias preventivas para la PE. De todos los modelos realizados, el más utilizado es el cultivo de líneas celulares BeWo. Este modelo no presenta total seguridad a la hora de extrapolar los datos a los estudios *in vivo*, pero tiene una gran reproducibilidad y estabilidad frente a los otros métodos propuestos.

Con respecto a los modelos de experimentación *in vivo*, se han realizado una gran variedad de estudios sobre animales de experimentación, normalmente en ratas, para investigar las posibles intervenciones que se pueden realizar en el tratamiento y prevención de esta enfermedad. Todos estos modelos propuestos tienen una limitación, que es la falta de reproducibilidad de las condiciones humanas durante un embarazo con PE. Pero a pesar de este inconveniente, los modelos *in vivo* han servido de gran ayuda para conocer la fisiopatología de la PE y poder actuar frente a ella.

**Palabras clave:** Pre-eclampsia, hipertensión, modelos en animales, trofoblasto, modelos *in vitro*.



## Abreviaturas

2-ME: 2-metoxiestradiol.

$\beta$ -hCG: Hormona  $\beta$  gonadotropina coriónica humana.

ADMA: Dimetilarginina asimétrica.

AT1: Receptor 1A de angiotensina.

AT1-AA: Receptor de angiotensina II tipo I.

AVP: Arginina vasopresina.

COMT: Catecol-o-metiltransferasa.

FGR: Restricción del crecimiento fetal.

HbF: Hemoglobina fetal libre.

HIF-1 $\alpha$ : Factor de transcripción inducido por hipoxia.

IFI-16: Proteína inducible del interferón gamma 16.

IUGR: Restricción del crecimiento intrauterino fetal.

L-NAME: Éster de metilo nitro-L-arginina.

NO: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintasa.

PAPP-A: Proteína A plasmática asociada al embarazo.

PE: Pre-eclampsia.

PIGF: Factor de crecimiento placentario.

PP13: Proteína placentaria 13.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

sEng: Endoglina soluble.

sFlt-1: Forma soluble de la tirosin quinasa 1.

SGHPL: Saint Georges Hospital Placental cell line.

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.



# Índice

|  |    |
|--|----|
| Resumen.....   | I  |
| Abreviaturas.....  | II |
| 1. Introducción.....   | 1  |
| 1. 1. Definición y características de la preeclampsia.....             | 1  |
| 1. 2. Prevalencia de la PE.....  | 2  |
| 1. 3. Clínica de la PE: signos y síntomas.....                         | 3  |
| 1. 4. Complicaciones de la PE.....                                     | 3  |
| 1. 5. Causas de la PE.....   | 4  |
| 1. 6. Predicción de la PE.....   | 4  |
| 1. 7. Prevención de la PE.....   | 5  |
| 2. Objetivos de la revisión.....                                       | 7  |
| 3. Metodología.....  | 8  |
| 4. Resultados y discusión.....   | 8  |
| 4. 1. Modelos <i>in vitro</i> de PE.....                               | 8  |
| Cultivos primarios de trofoblastos.....                                | 9  |
| Cultivos provenientes de explantes de las vellosidades.....            | 10 |
| Cultivos de líneas de células trofoblásticas.....                      | 11 |
| 4. 2. Modelos <i>in vivo</i> de PE.....                                | 13 |
| Modelos basados en la reducción de la perfusión uterina en PE.....     | 16 |
| Modelos de PE basados en la manipulación genética o farmacológica..... | 17 |
| 5. Conclusiones.....   | 28 |
| 6. Bibliografía.....   | 29 |

# 1. Introducción:

## 1.1. Definición y características de la preeclampsia.

La preeclampsia (PE) es un síndrome específico que se manifiesta en el periodo de gestación de la mujer. Afecta al 3-5% de las embarazadas y tradicionalmente se ha diagnosticado por un aumento de la presión arterial (presión sistólica mayor de 140 mmHg y/o presión diastólica mayor de 90 mmHg) en mujeres que anteriormente eran normotensas, y por la presencia de proteinuria (> 300 mg/día), aunque se puede considerar la presencia de PE sin la aparición de proteinuria, pero no es lo habitual (Mol y cols., 2015). La PE suele debutar a partir de las 20 semanas de gestación, y también puede incluir alguna disfunción en los órganos maternos, como insuficiencia renal, complicaciones hematológicas, afectación hepática, entre otras (Magee y cols., 2008).

En el desarrollo de la PE, y antes de las 20 semanas de gestación, se produce una alteración en la formación de la placenta, con una invasión defectuosa y superficial de los trofoblastos en las arterias espirales uterinas. Las arterias por lo tanto no se convierten en canales vasculares de gran capacitancia, sino que se mantienen estrechas y, se produce una hipoperfusión placentaria. Esta hipoperfusión placentaria está asociada a la presencia de algunos efectos adversos como pueden ser la restricción del crecimiento fetal, desprendimiento de la placenta, parto prematuro, entre otros (Brosens y cols., 2011). No se conoce muy bien porque se producen estos acontecimientos en el desarrollo de la circulación útero-placentaria en algunos embarazos, pero se conoce que factores ambientales, vasculares, inmunológicos y genéticos tienen un importante papel (Ilekis y cols., 2007).

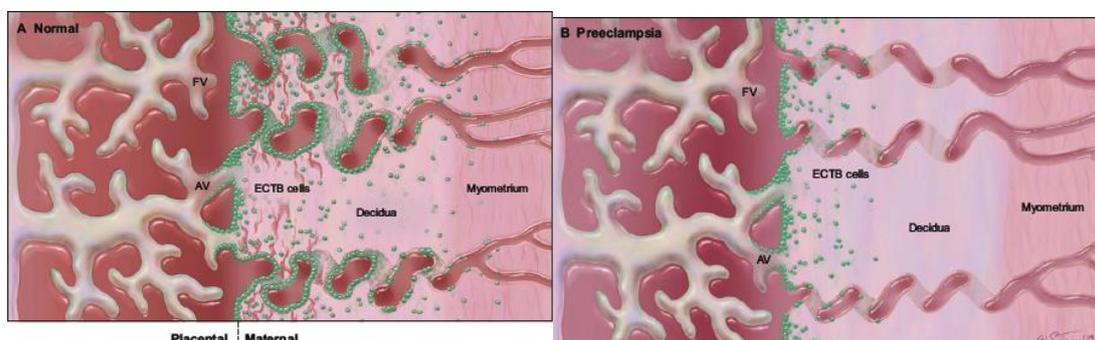


Figura 1. Invasión defectuosa de los trofoblastos en las arterias espirales uterinas en PE (tomado de Pennington y cols., 2012).

## 1.2. Prevalencia de la PE.

La prevalencia es aproximadamente entre el 5-10% de todos los embarazos, mientras que la incidencia oscila entre un 2-5%. Se han realizado numerosos estudios para ver la prevalencia de esta enfermedad y de ellos podemos obtener las siguientes conclusiones:

- ✚ **Estudio 1:** realizado a 262 pacientes primigestas que se encuentran ingresadas por PE grave en la zona de cuidados intensivos del Hospital Regional Universitario Carlos Haya de Málaga. Un 78% de las pacientes ingresadas fueron por PE grave, un 16% por síndrome HELLP y un 6% por eclampsia. 4 de las 262 pacientes que ingresaron murieron (mortalidad = 1,5%). Como conclusión se obtuvo que la tasa de mortalidad es baja pero que se producen en un porcentaje más alto las complicaciones de la PE (Curiel-Balsera y cols., 2011).
  
- ✚ **Estudio 2:** revisión del historial de 219 pacientes gestantes con un total de 21.890 partos desde el año 2002 y el año 2008. Estas pacientes presentaban las características típicas de PE. De estas 219 pacientes, 109 cursaron con PE grave, 28 de las cuales ingresaron en la UCI, 7 evolucionaron a eclampsia y 21 mujeres tuvieron que estar en observación. Con respecto a la morbilidad fetal, de las 109 gestantes se obtuvieron 119 recién nacidos, 78 fueron de gestantes únicas y 41 de gestantes múltiples. De todos los recién nacidos, el 65-70% fueron ingresados en la UCI y, el 35% tuvieron una morbilidad fetal muy grave sin llegar a la muerte fetal. La prevalencia de pre-eclampsia obtenida en este estudio fue de 0,49% (Rubio y cols., 2011).
  
- ✚ **Estudio 3:** revisión de todos los partos de mujeres con PE en 23 hospitales españoles. De este estudio se obtuvo que la incidencia de los estados hipertensivos del embarazo (EHE) es del 2,55%, donde destacaba la PE como principal causante de esta hipertensión gestacional. También se encontraron las variables epidemiológicas que pueden influir en la aparición de PE, como son: mujeres entre 19 y 45 años, con antecedentes de HTA, nulíparas, de raza caucásica, nivel educativo alto y con actividad laboral (Cortés Pérez y cols., 2009).

### **1.3. Clínica de la PE: signos y síntomas.**

Con respecto a la situación clínica de las pacientes, en su mayoría son asintomáticas y se diagnostica en la atención prenatal de rutina. Solo un 10-15% de las mujeres que presentan esta patología presentan resultados adversos (von Dadelszen y cols., 2011).

Las mujeres que presentan PE severa pueden presentar síntomas como cefalea, trastornos visuales (tales como visión borrosa y ceguera), dolor epigástrico, náuseas, vómitos, elevación de las transaminasas, hipertensión arterial severa (PAS  $\geq$  160 mmHg y PAD  $\geq$  110 mmHg), trombocitopenia ( $\leq$   $100 \times 10^9$  plaquetas/L), oliguria ( $\leq$  500 mL de orina/24 h) y proteinuria ( $\geq$  2g/ 24 h). También pueden ocurrir complicaciones neurológicas que cursan con convulsiones (eclampsia), accidente cerebrovascular, isquemia miocárdica reversible, edema pulmonar, deficiencia neurológica, desprendimiento de retina y encefalopatía posterior reversible (Curiel-Balsera y cols., 2011).

### **1.4. Complicaciones de la PE.**

Si la PE no se trata puede llegar a ser letal, esto es lo que ocurre en entornos de bajos recursos en los que la mayoría de los casos no se tratan, por lo tanto este síndrome es una de las principales causas de la mortalidad materna e infantil. Las mujeres pueden tener complicaciones graves como la eclampsia, rotura hepática, derrame cerebral, edema pulmonar, insuficiencia renal o el síndrome de HELLP (Mol y cols., 2015). Este síndrome se caracteriza por una anemia hemolítica microangiopática, disfunción hepática y trombocitopenia, con o sin proteinuria o hipertensión severa, que se presenta antes de las primeras 28 semanas de gestación. Tiene un inicio agudo y cursa con un rápido deterioro de la condición materna. También pueden producir complicaciones en el feto, como son restricción del crecimiento, muerte fetal, muerte neonatal y complicaciones asociadas a un parto prematuro (Habli y cols., 2009). Este parto prematuro puede causar un mayor riesgo de displasia broncopulmonar y parálisis cerebral, en niños nacidos de madres con PE.

Por ello, se está tratando de guiar a las personas para la gestión óptima de la PE, tanto en los entornos de bajos recursos como en los de altos recursos (Mol y cols., 2015).

### **1.5. Causas de la PE.**

La causa de la PE no está clara. Algunas mujeres padecen PE por una predisposición genética (Williams y Broughton, 2011). Algunos genes que se han relacionado con la aparición de la PE son: genes implicados en la trombofilia, inflamación, estrés oxidativo y aquellos implicados en el sistema renina-angiotensina (Mol y cols., 2015).

Además del componente hereditario, otros factores genéticos, ambientales e inmunológicos parecen alterar el desarrollo normal de la placenta. Esta alteración conlleva a un aumento de los niveles de las proteínas antiangiogénicas, por lo tanto se produce un desequilibrio entre los factores proangiogénicos (encargados del desarrollo vascular placentario y el mantenimiento de la función vascular) y los antiangiogénicos (antagonistas de los factores proangiogénicos). Este desequilibrio conduce a anomalías vasculares de la placenta y del sistema cardiovascular materno que desemboca en PE (Mateus, 2014).

### **1.6. Predicción de la PE.**

En la actualidad no se dispone de métodos validados para la predicción de la PE. Sí es posible distinguir entre las mujeres con alto riesgo y aquellas con bajo riesgo de sufrirla. Entre los factores de riesgo de la PE se encuentran: hipertensión en el embarazo, enfermedad renal crónica, diabetes (tipo I o tipo II) y trastornos autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico o el síndrome antifosfolípido (trastorno autoinmune en el cual se producen de forma persistente anticuerpos contra una gran variedad de fosfolípidos y proteínas transportadoras de fosfolípidos) (Bramham y cols., 2014). Otros factores pueden ser: mujeres primíparas o multíparas, edad mayor de 40 años, intervalo de embarazo de más de 10 años, índice de masa corporal (IMC) superior a 35 Kg/m<sup>2</sup> y/o síndrome de ovario poliquístico.

Las pruebas que se le suelen medir a una mujer para saber si padece o no PE son, la presión sanguínea (la sistólica y la diastólica) y la saturación de oxígeno. Además, entre las pruebas de laboratorio a realizar tenemos:

- La estimación simple de la cantidad de proteínas en orina. El método estándar de medición de las proteínas en orina es la cuantificación de las proteínas urinarias en una muestra de orina de 24 horas. Pero la recolección de orina de 24 horas es un inconveniente ya que significa un trastorno para el paciente y a veces, la recolección no es completa. Existe una correlación entre la relación proteína/creatinina en una muestra de orina al azar y, la cantidad de proteínas en 24 horas. La excreción normal de proteínas es menor de 100-150 mg/24 h, que equivale a una relación

proteína/creatinina menor de 1 (100-150 mg de proteínas: 1000-1500mg de creatinina). Una relación mayor de 2,5 sugiere la presencia de proteinuria. Por tanto la relación proteína/creatinina es usada para estimar el grado de proteinuria (Mol y cols., 2015).

- La monitorización de mujeres con PE, que incluye la evaluación de los parámetros hematológicos, como la hemoglobina y plaquetas, y pruebas bioquímicas, como la función hepática y renal. Esto se hace para observar la progresión de la enfermedad y diagnosticar el deterioro de la enfermedad.

Debido a que todas las pruebas antes mencionadas tienen una precisión limitada, para predecir complicaciones se han hecho intentos con el fin de integrar estas pruebas en modelos multivariados y así poder predecir los resultados adversos maternos dentro de las primeras 48 horas que la mujer se encuentra ingresada en el hospital con diagnóstico de PE (von Dadelszen y cols., 2011).

### **1.7. Prevención de la PE.**

La única cura en la PE es la eliminación de la placenta durante la inducción al parto, que puede producir como consecuencia una inmadurez del feto. Una vez inducido el parto, esa placenta puede ser utilizada para sucesivos estudios con el fin de obtener los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad (Koopmans y cols., 2009).

La prevención de la PE hoy en día es muy importante gracias al conocimiento de los factores de riesgo. En la tabla 1 aparecen las diferentes intervenciones para prevenirla.

Dentro de las intervenciones farmacológicas, se pueden administrar dos tipos de fármacos para la prevención de la PE, que son la aspirina y la heparina. En PE se produce una activación de las plaquetas y del sistema de coagulación como consecuencia al daño isquémico placentario, y se ocasiona un desequilibrio entre las prostaglandinas (que tiene propiedades vasodilatadoras) y los tromboxanos (que tienen propiedades vasoconstrictoras y activadoras de la agregación plaquetaria). Este desequilibrio a favor de la producción de tromboxanos explicaría la vasoconstricción característica de la fase clínica de la enfermedad. La aspirina inhibe a la enzima ciclooxigenasa, que sintetiza tromboxanos en las plaquetas y en el endotelio, por tanto, disminuye la síntesis de TX y la vasoconstricción. Por ello, se comprobó que la aspirina a bajas dosis reducía de forma moderada el riesgo relativo a padecer PE, un

parto precoz o gestaciones con complicaciones graves, y además no aumentaba el riesgo de hemorragias (Marín y cols., 2008).

| <u>Intervenciones farmacológicas:</u>  | <u>Población:</u>   |
|--|---|
| <b>Aspirina</b>                        | Mujeres con riesgo de PE, hipertensión gestacional y restricción en el crecimiento fetal. |
| <b>Heparina de bajo peso molecular</b> | Mujeres con un alto riesgo de sufrir disfunción de la placenta.                           |

| <u>Intervenciones no farmacológicas:</u> | <u>Población:</u>                                |
|--|--|
| <b>Calcio</b>                            | Mujeres con bajo calcio en la dieta.             |
| <b>Vitamina C y E</b>                    | Mujeres con un riesgo de padecer PE.             |
| <b>Magnesio</b>                          | Mujeres con un riesgo normal-alto de padecer PE. |
| <b>L – arginina y antioxidantes</b>      | } Mujeres con un bajo riesgo de padecer PE.      |
| <b>Vitamina D y calcio</b>               |  |
| <b>Dieta y estilos de vida</b>           |  |

**Tabla 1: Intervenciones para la prevención de la PE (tomada de Mol y cols., 2015).**

No obstante, el tema de la aspirina como un agente preventivo se encuentra abierto, ya que posteriormente otros estudios demostraron que no tenían tales beneficios. Por ello se suele indicar en mujeres con PE que tengan situación grave, siempre y cuando la paciente se encuentre debidamente informada (Roberts y Catov, 2007).

El segundo fármaco que se puede utilizar para la prevención de la PE es la heparina. Se prescribe para prevenir los riesgos cardiovasculares derivados de la PE, así como trombosis o pérdida fetal. Un estudio realizado en gestantes de riesgo sin trombofilia con un tratamiento profiláctico con dalteparina, mostró unos resultados muy buenos en cuanto a la reducción del 85% de presentar PE severa, retraso del crecimiento y desprendimiento de placenta (Rey y cols., 2009).

Por otra parte también se pueden realizar intervenciones no farmacológicas como son:

- ❖ La administración de calcio produce una reducción de la PE. Bajas concentraciones de calcio están asociados con la PE, por ello la OMS recomienda la administración de unos suplementos de calcio en las mujeres que se encuentren en la segunda mitad del embarazo. Estos suplementos son de 1,5-2 gramos al día. Esta hipótesis de la suplementación de calcio puede ser efectiva para la prevención de la PE, de hecho

actualmente se está realizando un ensayo aleatorizado en mujeres con esta patología para comprobar su eficacia.

- ❖ La vitamina D debe encontrarse en valores normales, ya que una deficiencia de la misma se asocia con riesgo de padecer diabetes gestacional y PE (Mol y cols., 2015).
- ❖ La L-arginina, precursor de la síntesis de óxido nítrico (NO), reduce el riesgo de PE cuando se administra con antioxidantes (Dorniak-Wall y cols., 2014). Este hallazgo se confirmó en un ensayo controlado aleatorio en las mujeres con alto riesgo de PE (Vadillo-Ortega y cols., 2011). Pero aún estos estudios no son decisivos, por lo cual deben de realizarse más ensayos que confirmen su uso en la prevención de la PE.
- ❖ Otro factor muy importante es la dieta y el estilo de vida. Una dieta rica en verduras, frutas y aceites vegetales se asoció con un menor riesgo de PE. Se han demostrado que la intervención en este ámbito hace que se reduzca la posibilidad a padecer PE (Allen y cols., 2014).

En 1964, Epstein mostró que las mujeres con PE u otros trastornos durante el embarazo, tenían un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular posteriormente en la vida. A los 2 años de haber padecido PE, un 30% de las mujeres sufrían hipertensión y, el 25% de esas mujeres padecían síndromes metabólicos (Veerbeek y cols., 2015). Posteriormente, un estudio realizado por Berks y cols., (2013) mostró que una mejora en los estilos y calidad de vida después de un embarazo con PE, mejoraba el riesgo cardiovascular entre un 4 y un 13%. Como mejora en el estilo de vida entendemos la realización de ejercicio físico y llevar a cabo una buena alimentación, entre otros.

## 2. Objetivos de la revisión:

El objetivo principal de esta revisión es profundizar en el conocimiento de los modelos experimentales, *in vivo* e *in vitro*, utilizados en la investigación de la PE. Este conocimiento es de vital importancia, en primer lugar, por la lógica falta de ensayos clínicos realizados en la mujer embarazada, ante el temor de daño tanto materno como fetal; y en segundo lugar, es importante para obtener un mayor entendimiento sobre la etiopatogenia de la enfermedad, lo cual nos conducirá a un mejor pronóstico, prevención y tratamiento de la misma.

### 3. Metodología:

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica usando como bases de datos, la biblioteca de la Universidad de Sevilla (<http://bib.us.es/>) y plataformas como *PubMed*, *ScienceDirect*, *MedlinePlus* y *Elvesier*. También se han buscado artículos en la plataforma *Google Scholar* con la finalidad de aportar nueva información y aclarar algunos conceptos de interés.

Entre las palabras claves indicadas tenemos: preeclampsia, *methods*, *mouse*, *hypertension and pregnancy*, *animal models*, placenta, proteinuria, *treatment opportunities*, *pravastatin*, *trophoblasts*, *arginine*, *nitric oxide*, *in vitro models*, *BeWo*, *aspirin*, *endothelium*, *prevention*, eclampsia y *angiogenic factors*.

### 4. Resultados y discusión:

A la hora de realizar estudios relacionados con la PE, se pueden realizar estudios en modelos *in vitro* o *in vivo*. Primero empezaremos estudiando los modelos *in vitro* y luego continuaremos con los *in vivo*.

#### 4.1. MODELOS *IN VITRO* DE PE

Como se indicó anteriormente, la PE es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad materna y neonatal, por lo tanto es importante identificar marcadores para predecir de forma más rápida la enfermedad, así como que promuevan el desarrollo de terapias preventivas de esta enfermedad. La investigación basada en el uso de modelos experimentales *in vitro* combinada con el uso de marcadores para la detección y el diagnóstico de la enfermedad, tiene sus beneficios, y demostraron ser muy eficaces en el tratamiento de algunas enfermedades como son la diabetes, la hipercolesterolemia o la leucemia, entre otras (Orendi y cols., 2011).

En el diseño experimental realizado en el estudio de la PE, los modelos más usados son los modelos *in vivo*, utilizando para ello animales, principalmente roedores. Sin embargo, estos modelos tienen un valor discutible, ya que hay grandes diferencias entre la morfología y fisiología de la placenta humana y la de estos animales. Por este motivo, se han desarrollado también modelos *in vitro*, en los cuales podemos usar tejido proveniente del humano (Geusens y cols., 2010). Uno de los fines de estos modelos es la evaluación de los medicamentos, para de esa forma ver su impacto en la fisiología de la placenta humana antes de realizar, en su caso, los preceptivos ensayos clínicos.

Existen varios modelos de estudios *in vitro* como son: los cultivos primarios de trofoblastos, los cultivos provenientes de explantes de las vellosidades y los cultivos de líneas de células trofoblásticas.

### CULTIVOS PRIMARIOS DE TROFOBLASTOS

Estas células se caracterizan por su capacidad de expresar biomarcadores con gran valor pronóstico de la PE. Dentro de este modelo experimental tenemos dos tipos diferentes de cultivos celulares: el cultivo de los trofoblastos extravelosos y el de los trofoblastos vellosos.

Antes de explicar los dos tipos de cultivo mencionados anteriormente, se va a hacer una pequeña alusión a la diferencia entre el trofoblasto extraveloso y el veloso. El trofoblasto extraveloso, fenotipo invasor, juega un papel muy importante en la adaptación de la decidua para sostener el embarazo. Este trofoblasto invade las paredes de las arterias uterinas espirales y adapta esos vasos en grandes conductos capaces de distribuir y soportar el incremento de flujo sanguíneo requerido en el segundo y tercer trimestre del embarazo. Una inadecuada transformación de las arterias espirales uteroplacentarias por el trofoblasto extraveloso invasor es un desencadenante de la PE (James y cols., 2006). A diferencia del trofoblasto veloso, que es el que da origen a las vellosidades coriónicas, implicadas en el intercambio de nutrientes entre la madre y el feto (Purizaca-Benites, 2008) (Figura 2).

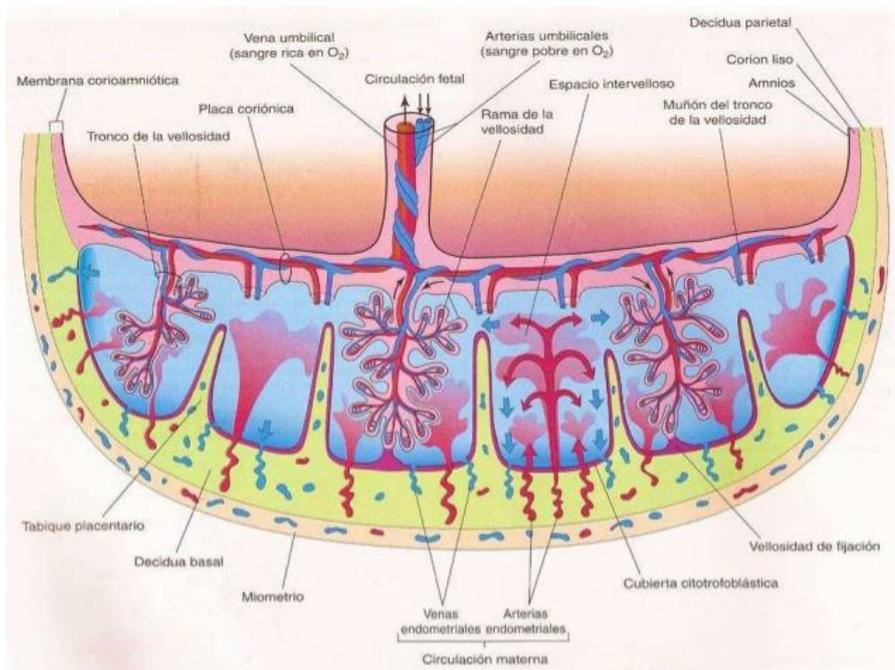


Figura 2. Esquema de un corte transversal de una placenta, que muestra la circulación placentaria, tanto materna como fetal (Persaud, 2009).

### **Trofoblasto extraveloso**

Quenby y cols. (2004), usando cultivos primarios de trofoblastos extravelosos, mostraron el efecto de la aspirina y la heparina sobre la PE, mencionado anteriormente en el apartado de prevención de la PE. Sin embargo, no se demostró correlación alguna de los efectos con los marcadores de la PE estudiados como la proteína placentaria 13 (PP13), el factor de crecimiento placentario (PIGF) y la proteína A plasmática asociada al embarazo (PAPP-A). La PP13 es una proteína que solo se produce en la placenta, es un buen marcador de la PE que se encuentra reducida en el primer trimestre del embarazo en las pacientes que van a desarrollar PE; el PIGF es una proteína angiogénica que se expresa en el tejido trofoblástico, y sus valores se encuentran disminuidos en pacientes con PE durante el primer trimestre; y la PAPP-A favorece la implantación y la invasión del trofoblasto: los niveles bajos de esta proteína se han relacionado con muerte fetal, bajo peso o prematuridad (Spencer y cols., 2008).

Se observó que este modelo experimental no es útil para el estudio de fármacos aplicados al tratamiento de la PE, por lo cual queda descartado en aquellos estudios designados para tal fin.

### **Trofoblasto veloso**

Los cultivos de trofoblastos velosos son más utilizados que los anteriores por presentar ventajas en su preparación, como es la productividad y su uso durante un largo periodo de tiempo.

Tanetta y cols., (2008) probaron los efectos de las vitaminas antioxidantes C y E en trofoblastos velosos. Los autores demostraron una apoptosis de estas células después de 96 horas en cultivos, debido a una pérdida del potencial de membrana mitocondrial y a la activación de las proteínas caspasas 9 y 3. Aún no existen evidencias sobre las correlaciones existentes entre los trofoblastos y los marcadores de la PE. Por lo tanto, se desconoce el posible uso de estos cultivos celulares en la investigación de futuros fármacos de uso en la PE (Orendi y cols., 2011).

## **CULTIVOS PROVENIENTES DE EXPLANTES DE LAS VELLOSIDADES**

Los explantes de las vellosidades son utilizados para estudiar procesos celulares tales como la proliferación, diferenciación y la apoptosis (Miller y cols., 2005). Se utilizan dos estrategias para este tipo de estudios:

- ✓ Los explantes de embarazos sin complicaciones se utilizan para estudiar los efectos de cualquier factor externo sobre la supervivencia del tejido, la función y la adaptación.
- ✓ Los explantes de placentas de pacientes con patologías clínicas reconocidas, tales como la restricción del crecimiento fetal (FGR) o la PE que se utilizan para comparar su función con los controles de su misma edad gestacional (Orendi y cols., 2011).

Estos estudios tienen un inconveniente destacado, y se trata de la baja disponibilidad del material fresco para realizar este tipo de estudios. Las vellosidades, a diferencia de los trofoblastos, no se pueden congelar y almacenar. Por lo tanto, estos estudios solo se pueden realizar después del parto y no se pueden repetir en otro momento. Este inconveniente podría subsanarse con el uso de la criopreservación de los explantes (Miller y cols., 2005).

### **CULTIVOS DE LÍNEAS DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS**

Estas líneas de células son utilizadas como sustitutas de los explantes de las vellosidades, así como del trofoblasto extraveloso. La necesidad de usarlas es para paliar la desventaja producida por la no proliferación del trofoblasto extraveloso en los cultivos primarios. Dentro de este grupo de líneas celulares, las más destacadas son las SGHPL (Saint Georges Hospital Placental cell lines, que derivan de los trofoblastos que han sido transfectadas con el virus SV40, un poliomavirus: virus de ADN que causa tumores), que son positivas para el antígeno leucocitario humano (HLA) (Orendi y cols., 2011). HLA es un gen de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad, cuya función es regular la liberación de citoquinas. Una disminución de la expresión de HLA afectaría al recambio de las arterias espirales y provocaría isquemia placentaria (Arenas y Mesa, 2008).

Otro grupo de células también usadas son las células de coriocarcinoma BeWo, obtenidas a través de una metástasis cerebral de un coriocarcinoma, trasplantadas en la mejilla de un hámster. Posteriormente, se obtienen la línea BeWo a base de estudios de ese hámster.

De estas dos líneas celulares, SGHPL y BeWo, la más utilizada es la BeWo, ya que es la que tiene mayor similitud en cuanto a las características con el trofoblasto veloso y la secreción de hormonas como la hormona del crecimiento humano, la progesterona y el estradiol (Orendi y cols., 2011).

## Células BeWo para evaluar los agentes terapéuticos

Actualmente, aún no existen terapias que puedan prevenir las manifestaciones de la PE. Por ello es muy importante ahondar en una investigación dirigida hacia ese fin.

Entre los potenciales agentes terapéuticos con eficacia en la prevención de la PE, como explicamos anteriormente, nos encontramos con la aspirina (a bajas dosis), la heparina de bajo peso molecular, el ácido fólico, las vitaminas C y E, el calcio, entre otros. Estos estudios se incluyen dentro del proyecto *Pregenesys*, en el cual se establecen modelos de cultivo celulares para evaluar los efectos de estos fármacos candidatos para prevenir dicha enfermedad (Orendi y cols., 2010).

Se analiza la expresión de unas proteínas específicas del sincitiotrofoblasto (capa más externa del trofoblasto embrionario, cuyas funciones son la secreción de la hormona  $\beta$  gonadotropina coriónica ( $\beta$ -hCG) y la producción de anticuerpos en el endometrio materno durante el desarrollo de la circulación sanguínea) como son la PP13 y la  $\beta$ -hCG. La  $\beta$ -hCG es una hormona proteica esencial para el desarrollo y sostenimiento de la gestación. Niveles bajos de esta hormona se han relacionado con abortos recurrentes y PE (Barrera y cols., 2008).

Orendi y cols., (2010) descubrieron que el tratamiento con forskolina (compuesto natural obtenido de *Coleus forskohlii*, que activa la enzima adenilato ciclasa, y por tanto, los niveles de AMPc) aumentó los valores de PP13 y de  $\beta$ -hCG y su expresión génica, así como la fusión en las células BeWo. Por todo esto, esta línea celular fue la que se utilizó para estudiar la diferenciación y la fusión del trofoblasto veloso, puesto que era la más apropiada. También realizaron una serie de estudios con la aspirina, la heparina y las vitaminas C y E, demostrando que la heparina fue la que tuvo menores efectos sobre las proteínas PP13 y de  $\beta$ -hCG, presentando a su vez un efecto beneficioso sobre los vasos sanguíneos sistémicos maternos. Además, demostraron que la aspirina a bajas dosis producía una disminución de la expresión de PP13, mientras que la  $\beta$ -hCG no se ve alterada.

En estudios *in vivo*, la reducción de PP13 en la placenta y de sus niveles de ARNm, se asocia con alto riesgo de padecer PE. Como consecuencia de estos estudios, cabe esperar que la aspirina, como agente preventivo, actuaría aumentando la expresión de la proteína PP13 y por tanto el riesgo de PE. Sin embargo, en la realidad esto no es así, por lo que puede especularse que el beneficio de la aspirina en torno a la reducción de la frecuencia y gravedad de la PE es independiente de la placenta y el trofoblasto veloso. Su efecto depende de la capacidad para aumentar el tamaño del sincitiotrofoblasto, aumentando la expresión de las proteínas PP13 y  $\beta$ -hCG.

Con respecto a la vitamina C como agente preventivo, también se realizaron estudios y se obtuvo que, la vitamina C afecta a la expresión de PP13 y  $\beta$ -hCG, produciendo un aumento de ambas que depende de la dosis administrada de vitamina C. Como esta vitamina aumenta los valores de PP13, se dice que tiene efectos beneficiosos contra la PE por su efecto estabilizante sobre el trofoblasto veloso (Orendi y cols., 2010).

### **Conclusiones de los experimentos con células BeWo**

Las células BeWo, células no primarias, no muestran una total seguridad a la hora de extrapolar los datos a estudios *in vivo*. Presentan una serie de ventajas que se encuentran relacionados con la reproducibilidad, estabilidad y proliferación de las células. Por tanto, su uso permite evaluar el efecto de los agentes terapéuticos sobre la expresión de las proteínas (Orendi y cols., 2011).

## **4.2. MODELOS *IN VIVO* DE PE**

Los modelos *in vivo* para prevenir y diagnosticar la PE son aquellos que se realizan normalmente en animales, dada la dificultad de realizar los estudios en mujeres embarazadas. El modelo de animal ideal se caracteriza por el desarrollo durante el embarazo materno de hipertensión, proteinuria, disfunción endotelial y un desequilibrio de los factores angiogénicos.

Uno de los fines ideales que debe perseguir estos modelos *in vivo* es que en su uso deben obtenerse resultados extrapolables a la mujer embarazada, y deben proporcionar datos adecuados sobre los resultados fetales.

Han sido propuestos una gran variedad de modelos de animales *in vivo* basados en diferentes experimentos, dentro de los cuales podemos encontrar los siguientes:

- ❖ Modelos basados en la reducción de la perfusión uterina en PE.
- ❖ Modelos de PE basados en la manipulación genética o farmacológica. Dentro de los cuales están: estudios de la óxido nítrico sintasa en ratones, modelos transgénicos de PE, modelos basados en la deficiencia de la catecol-o-metiltransferasa en ratones, modelos de PE en ratones BPH/5, modelos farmacológicamente inducidos, modelos basados en la alteración de la angiogénesis, modelos inmunológicos, modelos de PE inducidas por adriamicina, modelos relacionados con el sistema renina angiotensina, modelos de PE inducidos por insulina y los modelos basados en especies reactivas de oxígeno.

Los modelos en animales presentan una serie de inconvenientes, como puede ser el caso de los ratones, que ellos tienen una invasión del trofoblasto poco profunda, una gestación de tres semanas, y tres capas de trofoblastos, frente a una sola capa de trofoblastos característicos en la gestación humana. Por este motivo, los modelos en animales son menos útiles para los estudios de la invasión trofoblástica, la remodelación vascular y los procesos sobre la etiopatogenia de la PE.

Como se ha mencionado antes, estos modelos en animales deben reflejar con precisión la condición humana durante el embarazo y para asegurar este fin, se comparan estos estudios con estudios en animales que no están en la etapa de gestación. Debido a que estos modelos en animales presentan los inconvenientes mencionados anteriormente, hay que tener precaución a la hora de extrapolar los datos a la clínica de la mujer preeclámpsica. Sin embargo y a pesar de sus limitaciones, los modelos *in vivo* de animales han ayudado mucho en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en la PE.

A continuación pasaremos a describir los diferentes modelos de animales usados en el estudio de la PE:

### **MODELOS BASADOS EN LA REDUCCIÓN DE LA PERFUSIÓN UTERINA EN PE**

La reducción de la perfusión placentaria da lugar a una disfunción vascular e hipertensión, ligadas a la PE. Esta asociación se ha comprobado en una gran variedad de animales. Para demostrar estas evidencias se realizaron unos estudios en perros anestesiados para ver la oclusión parcial de la vena infrarrenal aorta abdominal (se encuentra por debajo de las arterias renales pero por encima de la bifurcación aórtica) que se producía durante la PE. Estos estudios no solo se han realizado en perros, sino también con buen éxito en conejos, monos rhesus, babuinos y ovejas. Los modelos realizados sobre babuinos son recientes y están dando buenos resultados, en comparación con los estudios realizados en monos rhesus que son más costosos, con más dificultad y con elevados problemas éticos y legales en muchos países. Por ello otros modelos en distintos animales se ven más favorecidos (McCarthy y cols., 2011).

Granger y cols., (2006) desarrollaron un modelo en ratas en el cual se reducía un 40% la perfusión útero-placentaria a través de la colocación de unos clips de plata en la aorta y en las arterias uterinas del ovario. Esta reducción se producía el día 14 de la gestación (que en estos animales dura 21 días). Este clip solo no es suficiente para inducir un estado preeclámpsico similar al humano, debido a un aumento compensatorio en la sangre uterina a

través de la arteria ovárica. Para solucionar este problema también se coloca unos clips de astilla tanto en el lado derecho como en el izquierdo de la arcada uterina al final del ovario. Como resultado a esta intervención, el día 19 de la gestación, se produce en el animal un aumento de la presión sanguínea, disminución de la tasa de filtración glomerular, aumento de la resistencia total periférica con disminución del índice cardíaco y de la presión renal (debido a la inducción de natriuresis), disminución del flujo plasmático renal, proteinuria, disfunción endotelial y restricción en el crecimiento fetal. Todos estos resultados se asocian con los signos y síntomas de una PE grave, unido a un desequilibrio de los factores angiogénicos y antiangiogénicos (en particular, producido por un aumento de la forma soluble de la tirosina quinasa 1 (sFlt-1) y de endoglin soluble (sEng), junto con una disminución del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del factor de crecimiento placentario (PlGF)), hipoxia placentaria producida por el factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) y, una reducción en la expresión de la hemo-oxigenasa 1 (HO-1) (McCarthy y cols., 2011).

### **MODELOS DE PE BASADOS EN LA MANIPULACIÓN GENÉTICA O FARMACOLÓGICA**

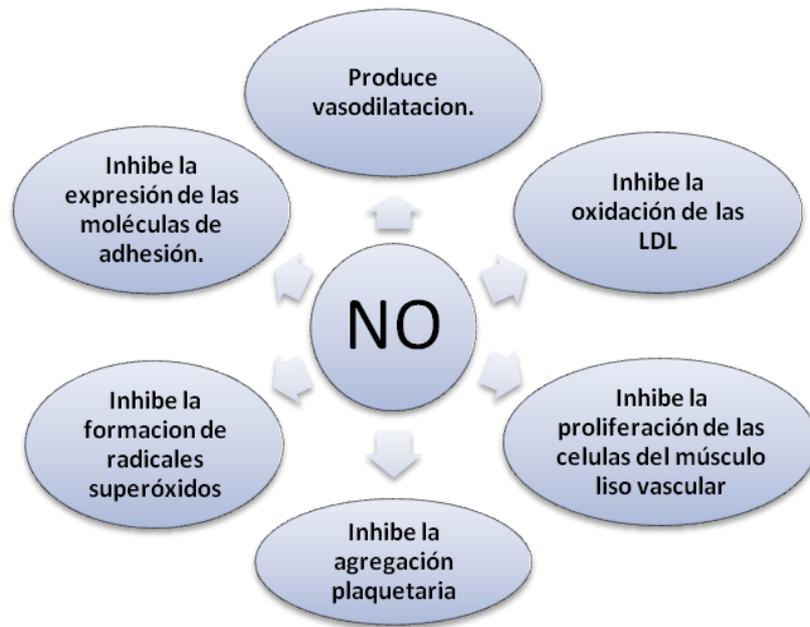
Otra alternativa a la hora de realizar estudios para el diagnóstico de esta enfermedad es a través de la manipulación genética de las proteínas y las enzimas específicas que están implicadas en los procesos fisiopatológicos de la PE.

#### **Estudios de la óxido nítrico sintasa en ratones**

El óxido nítrico (NO) es esencial para la formación de un endotelio sano y, en el embarazo promueve la invasión endovascular por los citotrofoblastos. Las arterias espirales maternas del útero al ser invadidas por el trofoblasto intersticial, producen NO para presentar una baja resistencia a la invasión.

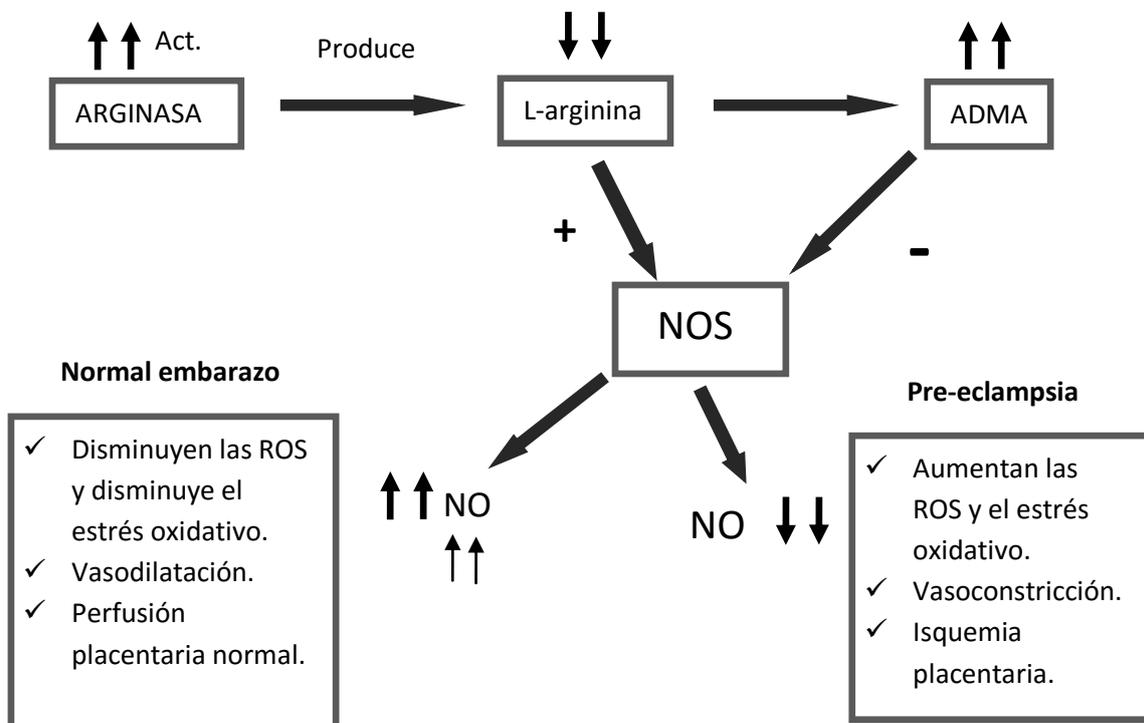
El NO es sintetizado, a través de dos aminoácidos (L-arginina y L-homoarginina), por una enzima llamada óxido nítrico sintasa (NOS), que pertenece a la familia de enzimas dependientes de calcio-calmodulina. La enzima NOS se expresa en el sincitiotrofoblasto y en las células endoteliales de la placenta durante el embarazo, por lo que es una enzima clave para la síntesis de NO en un embarazo normal.

Como podemos observar en la figura 3, entre las funciones de NO cabe destacar su acción inhibitoria de las moléculas de adhesión, ejerciendo un papel antiinflamatorio. En las pacientes con PE, se encuentran altos los niveles de moléculas de adhesión por lo que en esta enfermedad hay un componente antiinflamatorio importante.



**Figura 3. Acciones vasculares del NO (tomado de Khalil y cols., 2015).**

También es importante destacar la acción inhibitoria del NO sobre las especies reactivas de oxígeno (ROS), puesto que al aumentar las ROS, aumenta el riesgo de PE. Por tanto, gracias a la enzima NOS, se produce NO y se eliminan las ROS. Como se puede observar en la siguiente figura.



**Figura 4. Relación entre la L-arginina y el NO en la patogénesis de la PE (adaptada de Khalil y cols., 2015).**

La dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un metil derivado de la arginina que tiene un papel importante en la síntesis de NO puesto que es un inhibidor endógeno competitivo de la NOS; es decir, su mecanismo de acción es competir con la L-arginina por el sitio activo de la enzima (Khalil y cols., 2015). Diferentes estudios han demostrado que ADMA se encuentra elevada durante la PE (Reyna-Villasmil y cols., 2010).

Los niveles de NO producidos por la enzima NOS están determinados por tres factores, que son: la capacidad máxima de las células, el estado de fosforilación de la enzima y las concentraciones intracelulares de calcio.

Se han realizado estudios en los que se ha asociado la actividad de sEng con la PE, puesto que la sEng modifica la expresión y la actividad de NOS, y desencadena una disfunción endotelial que es característica en la patogénesis de esta enfermedad (Khalil y cols., 2015).

Un reciente estudio nos informó que las mujeres que habían sufrido PE y aquellas cuyos hijos habían tenido bajo peso al nacer, tenían alteraciones en los niveles de L-arginina, homoarginina y ADMA 10 años después de haber padecido esta enfermedad (Sandvik y cols., 2013).

También existen métodos para inducir el estado de PE a través de inyecciones en ratas o ratones del éster metílico de la nitro-L-arginina (L-NAME), que producen la inhibición de la NOS. Estas inyecciones se llevan a cabo durante diferentes momentos de la gestación y como resultados dieron los síntomas de PE, tales como hipertensión, proteinuria, disminución de la tasa de filtración glomerular y la restricción del crecimiento intrauterino fetal (IUGR). Al inhibir a la NOS, se bloqueaba la síntesis de NO y como consecuencia se producía un aumento de la presión arterial en estos animales. Se ha observado que el tratamiento con sildenafil (inhibidor de la 5-fosfodiesterasa) está dando resultados positivos en cuanto a la reducción de la hipertensión, proteinuria y muerte fetal, tanto en la PE temprana como en la que se desarrolla más tarde (Erlandsson y cols., 2015). Otro tratamiento también con éxito fue el resveratrol, polifenol con propiedades antioxidantes, que en las ratas L-NAME embarazadas produjeron una reducción también de la hipertensión y del estrés oxidativo en los tejidos de la placenta (Zou y cols., 2014).

Otro tipo de estudio realizado es la eliminación de la enzima NOS en ratones. Como resultado se observa que en las ratas sin la enzima NOS no se produce un desarrollo de hipertensión o PE durante el embarazo, de hecho, un estudio informó acerca de una disminución de la presión arterial en las ratas que pertenecían a este modelo de estudio.

## **Modelos transgénicos de PE**

Dentro de este tipo de modelos, se han realizado muchos estudios. Se demostró que cuando se apareaban las hembras transgénicas que tenían sobreexpresado el gen angiotensinógeno con los machos transgénicos que tenían sobreexpresado el gen renina, se producía un aumento de la presión arterial al final del embarazo, asociado con proteinuria, hipertrofia miocárdica, necrosis y edema en el examen histológico de la placenta. Si en vez de aparear las hembras transgénicas con sobreexpresión del gen angiotensinógeno con los machos transgénicos con sobreexpresión del gen renina, se hacía al revés, es decir, que las hembras tengan sobreexpresadas el gen renina y los machos el angiotensinógeno, este cambio no produce como resultado la aparición de PE. Estos resultados se explican a través de la hipótesis de “conflicto entre los padres”, que propone que el genoma materno alberga genes críticos para el desarrollo fetal mientras que el genoma paterno alberga genes críticos para el desarrollo de la placenta (McCarthy y cols., 2011).

También se llevó a cabo otro estudio en ratones a los que se le introdujo la interleuquina-4 (IL-4), que es un citoquina antiinflamatoria. Los ratones que tenían deficiencia en esta citoquina sufrían PE leve, incluyendo proteinuria, aumento de los niveles de las citoquinas proinflamatorias, hipertensión e inflamación de la placenta. Por otro lado, también se vio que los ratones que poseían IL-10 tenían los síntomas de PE mencionados con anterioridad (Erlandsson y cols., 2015). La IL-4 y la IL-10 participan en la implantación del embrión y en el desarrollo de la placenta, niveles bajos se han asociado con abortos espontáneos recurrentes durante el primer trimestre del embarazo (Challis y cols., 2009).

Un sólido modelo en la investigación de la etiología de la PE lo constituye los ratones transgénicos con el gen STOX1 (storkhead box 1), que se encuentra sobreexpresado en los ratones preeclámpsicos debido a una alteración de la expresión de este gen en el trofoblasto. La proteína codificada por este gen puede funcionar con una proteína de unión al ADN. Las mutaciones de este gen están asociadas con PE y con un aumento del estrés oxidativo. Los ratones transgénicos hembras embarazadas tienen el fenotipo humano de PE con todos sus síntomas (Erlandsson y cols., 2015).

## **Modelo basados en la deficiencia de catecol-o-metiltransferasa en ratones**

La catecol-o-metiltransferasa (COMT) es una enzima que convierte 17-hidroxiestradiol en 2-metoxiestradiol (2-ME). El 2-ME es un metabolito natural del estradiol que se genera en la placenta y que sus niveles aumentan en el tercer trimestre del embarazo humano normal.

Sin embargo se encuentra reducido en la placenta de las mujeres embarazadas con PE (Tal, 2012). En las mujeres con PE, la actividad de COMT se encuentra inhibida, por lo tanto no se sintetiza 2-ME y se desarrolla PE.

En este modelo se vio que una deficiencia de COMT en ratones en estado de embarazo desarrolla hipertensión, eleva la excreción urinaria de proteínas presentándose endoteliosis y otros cambios presentes en la fisiopatología de la PE. Los embriones nacían con bajo peso y las placentas demostraban sufrir aterosclerosis aguda y trombosis. Todas estas características de PE se vieron mejoradas con la administración de 2-ME (McCarthy y cols., 2011). 2-ME unido con una cierta cantidad de oxígeno facilita el desarrollo vascular y la oxigenación adecuada durante el embarazo.

### **Modelos de PE en ratones BPH/5**

Los ratones BPH/5 son un modelo genético de PE espontánea que presentan la enfermedad en sus diversos grados antes del embarazo y durante la etapa adulta. Presentan características similares a las de los humanos, incluyendo disfunción endotelial, lesiones glomerulares, proteinuria e hipertensión. Como tratamiento a estos síntomas se administra tempol, un antioxidante cuya función es inhibir la formación de ROS durante todo el embarazo, que se ha demostrado que disminuye la presión sanguínea y el estrés oxidativo (Erlandsson y cols., 2015). No obstante, el hecho de que las embarazadas humanas no presentan hipertensión antes de quedarse embarazadas, hace que haya que tener precaución a la hora de extrapolar los resultados obtenidos de este modelo. De hecho, aunque esta terapia fue un éxito en los ratones, los resultados no se han conseguido reproducir en humanos (McCarthy y cols., 2011).

Hay otra cepa de ratas, la “Dahl sensible a sal”, que presenta un aumento de la tensión arterial y afecciones renales en ratas que no se encuentran embarazadas. Por lo tanto, una camada de estas dos cepas de ratones/ratas, hace que la hipertensión preexistente aumente el riesgo de padecer PE durante la gestación.

### **Modelos farmacológicamente inducidos de PE**

Los modelos farmacológicamente inducidos se centran en los síntomas característicos de la enfermedad. Hay una gran variedad de estudios realizados en animales, sobre todo en ratas y ratones, en los que se ha ido viendo cómo respondían frente a la introducción de sustancias para simular la PE en ellos. Entre estos estudios tenemos:

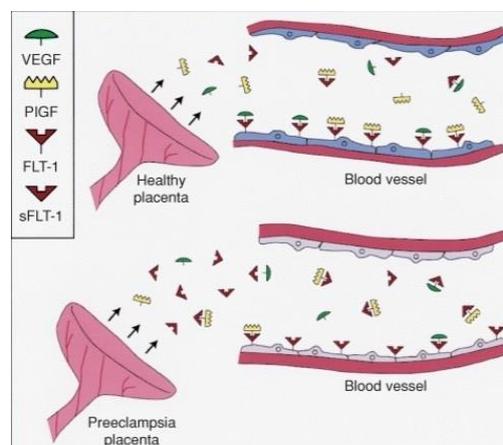
- ✚ Estudios basados en la introducción de hormonas peptídicas en las ratas tales como arginina vasopresina (AVP), que regula la retención de agua y la contracción de los vasos. Por lo tanto niveles altos de esta hormona produce un aumento de la tensión arterial similar a la preeclámpsica, asociado a endoteliosis glomerular, proteinuria e IUGR.
- ✚ Uno de los síntomas característicos de la PE es la oxidación de los ácidos grasos anormal y, para demostrar este hecho, lo que se hizo fue inyectar en una serie de ratas embarazadas la beta-2-glicoproteína (b2GPI), y como resultado de este estudios se produjeron en la rata los síntomas de PE.
- ✚ Activina A es un factor antiangiogénico producido por la placenta que está implicado en la fisiopatología de la PE, puesto que se encuentra elevado en ese estado. Cuando fue administrada en ratones gestantes, dio lugar a los síntomas de PE, mencionados en otros apartados.
- ✚ Modelo de PE en conejos basado en la inducción de la hemoglobina fetal libre. Durante la PE se produce un aumento de la producción y acumulación de la hemoglobina fetal libre (HbF), que conlleva daños en la barrera placentaria y su consiguiente disminución en la circulación materna. Esta acumulación de la HbF puede producir, en la semana 14 de gestación, la aparición de PE. Estos hechos fueron puesto en estudio mediante la administración específica en conejos de la HbF. Este modelo imita los efectos preeclámpsicos de la enfermedad (Erlandsson y cols., 2015).
- ✚ Modelos inducidos de PE en babuinos. Se basa en un modelo bastante comparable con las características humanas, aunque existen diferencias. Se realizaron estudios de NO, IL-10, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y sFlt-1. Los resultados obtenidos fueron con respecto a NO, se administró un inhibidor de NO, pero los efectos no tuvieron tanto éxito como se han visto en otros estudios con otros animales de experimentación. Sin embargo, los estudios realizados muestran que los anti-IL-10 producían un aumento de la presión arterial, mientras que en PE se observaba que se reducían los niveles de IL-10. Los resultados de la administración de TNF- $\alpha$  a bajas dosis fueron proteinuria e hipertensión (Erlandsson y cols., 2015). Se vio que esta vía de modelos comparativa tenía resultados similares que los humanos. Por lo tanto era una vía muy válida de experimentación.

## **Modelos basados en la alteración de la angiogénesis**

El embarazo requiere de una formación especial de un complejo de red vascular tanto materna como fetal, que se divide en tres estadios, en el primero se produce la vasculogénesis, que se define como la formación de nuevos vasos, y en los otros dos estadios ocurre la angiogénesis, tanto ramificada como no ramificada y, se define como la formación de nuevos lechos vasculares a partir de otros preexistentes. Los principales factores involucrados en el proceso de angiogénesis son: el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y las proteínas de la familia de la angiopoyetina (ANG). Y los factores involucrados en la angiogénesis de la placenta son VEGF, FGF y el factor de crecimiento placentario (PIGF), este último se expresa de forma selectiva en la placenta.

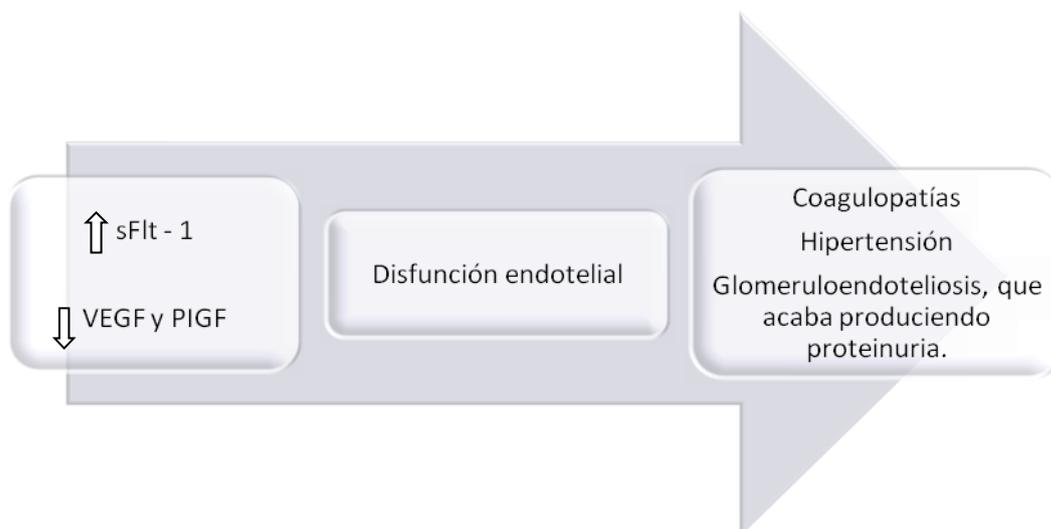
VEGF es un potente agente mitógeno que actúa solamente sobre las células endoteliales de la micro y macrovasculatura de las arterias, venas y vasos linfáticos, produciendo una disminución del tono vascular, regulación de la presión arterial y mantenimiento de la integridad de la barrera de filtración glomerular (Briones y cols., 2008).

En el suero de la mujer embarazada y en los vasos umbilicales se ha observado que se encuentra la forma soluble del Flt-1, también conocida como sFlt-1, que tiene una acción inhibitoria frente a los efectos de VEGF, por lo que se considera que forma parte de las proteínas antiangiogénicas (Powe y cols., 2011). También se ha observado que posee una acción inhibitoria frente a PIGF (Li y cols., 2015). Durante el estado preeclámpico, esta proteína antiangiogénica se encuentra elevada con respecto a las concentraciones normales y actúa uniéndose a estas dos proteínas e impide que éstas se unan a sus receptores endógenos, como se puede observar en la figura 5. Como consecuencia se produce una inhibición de la angiogénesis y función vascular (Barsoum y cols., 2011).



**Figura 5. Efecto de sFlt-1 sobre la VEGF y PIGF durante la PE (tomada de Karumanchi y cols., 2005).**

Maynard y cols., (2003) demostraron que si se administraba exógenamente sFlt-1 a ratas embarazadas, daba lugar a un aumento de la presión arterial, proteinuria y endoteliosis glomerular. Por lo tanto, un exceso de sFlt-1 juega un papel muy importante en la fisiopatología de la PE y estas concentraciones elevadas disminuyen rápidamente después del parto, lo que apoya aún más su implicación en la PE (Briones y cols., 2008).



**Figura 6. Relación del sFlt-1 en la fisiopatología de la PE (tomada de Briones y cols., 2008).**

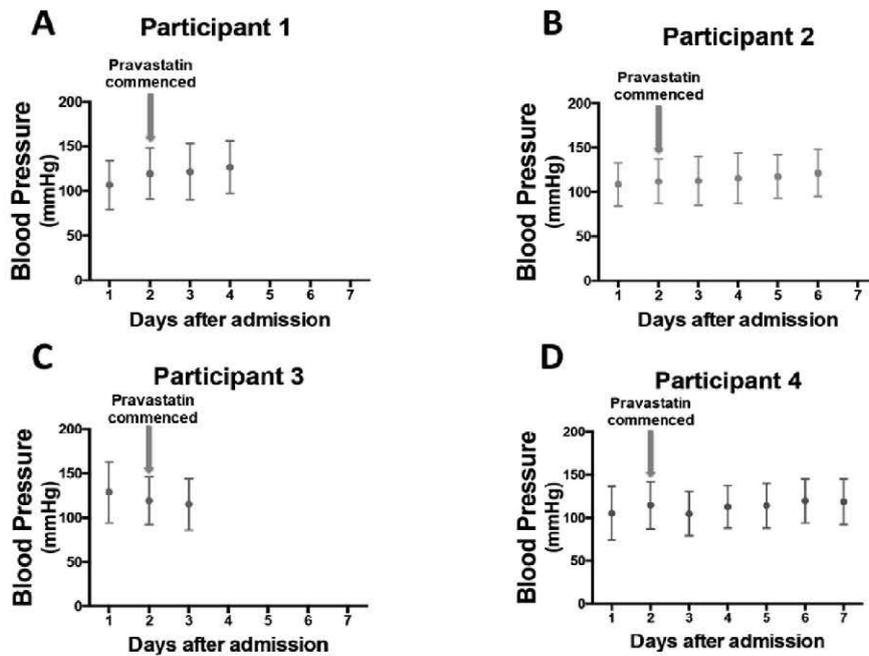
Otra molécula antiangiogénica es la forma soluble de la endoglina (sEng), que junto con sFlt-1 se encuentran elevadas en la circulación materna. Este aumento de sus niveles está asociado con un aumento de las complicaciones en el embarazo. sEng es una glicoproteína soluble proveniente de la Eng de la membrana celular que actúa como correceptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), y juega un papel muy importante en el mantenimiento de la función vascular y la homeostasis. Se demostró que el aumento de estas dos proteínas antiangiogénicas estaba producido por un aumento de la activación de la proteína inducible del interferón gamma 16 (IFI-16), que producía un aumento de los niveles de sFlt-1 y sEng. Estos resultados solo se observaron en embarazadas con PE, en embarazos normales no se producía dicha activación (Li y cols., 2015).

Para demostrar este hecho, Venkatesha y cols., (2006), hicieron unos estudios utilizando un tratamiento adenoviral, y vieron que se producía una restricción en el crecimiento del feto y endoteliosis. Estas manifestaciones fueron más severas en las ratas que recibieron ambos tratamientos, el tratamiento adenoviral y, sEng y sFlt-1. Estos daños fueron también observados en ratas que no estaban embarazadas y que solo fueron tratadas con el

tratamiento adenoviral. Por tanto, se demostró que sEng y sFlt-1 inducen el daño vascular observado en PE.

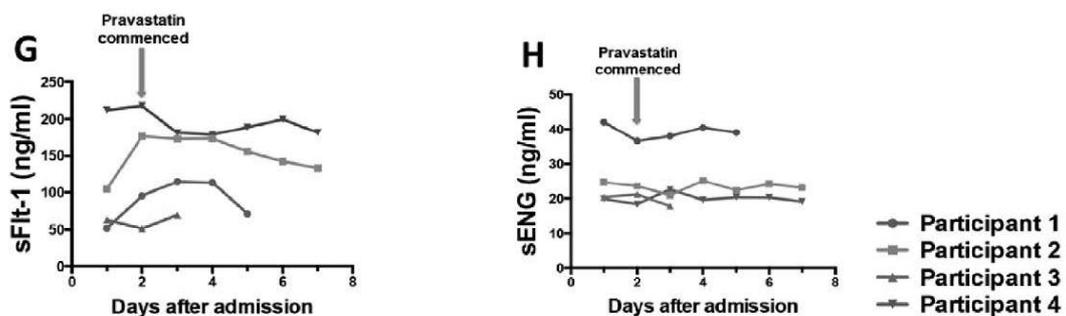
Estos estudios han sido de gran ayuda para ver el papel de los factores proangiogénicos y antiangiogénicos en el embarazo, tanto normal como preeclámpsico, puesto que la fisiopatología de la PE se basa en un desequilibrio entre los factores proangiogénicos y antiangiogénicos que se presentan en el embarazo y que es posible medir a partir de la semana 15 de gestación (Briones y cols., 2008).

También es importante destacar el papel de las estatinas (inhibidores de la HMG-CoA reductasa) en el tratamiento de la PE. Las estatinas tienen propiedades vasoprotectoras independiente de su efecto reductor de los niveles de colesterol. La primera estatina que se investigó fue la simvastatina, que reducía la secreción de sFlt-1 en la placenta y en las células del endotelio. Pero tiene un inconveniente, y es que la simvastatina es un fármaco que no se puede dar durante el embarazo ya que pertenece a la categoría X y producen malformaciones en el feto. Por lo tanto, el siguiente fármaco a estudiar fue la pravastatina, éste no produce malformaciones en el feto y su perfil farmacológico es seguro. La pravastatina es una molécula hidrofílica y le cuesta más trabajo pasar la barrera placentaria para llegar al feto, de ahí su seguridad. Se examinaron los efectos de la pravastatina en animales con PE y, se vio que producía una reducción de los niveles de sFlt-1, este efecto fue demostrado también en tejidos humanos primarios y en la placenta de mujeres con PE. Posteriormente se realizó un estudio piloto con cuatro mujeres con PE, que se encontraban en un periodo de gestación de más de 30 semanas. A estas mujeres se les administró 40 mg de pravastatina diaria por vía oral. Diariamente se vigilaban los marcadores de la enfermedad, así como la hipertensión y la proteinuria y, también se llevaba un seguimiento de los niveles de sEng y sFlt-1 en suero para ver si aumentaba, disminuía o se estabilizaba. Los resultados obtenidos fueron que en los días siguientes a la administración, todos los síntomas de las pacientes desaparecieron y no aparecieron nuevos síntomas en ellas. Una de las pacientes sí tuvo un aumento severo de la tensión arterial y necesitó de la administración de nifedipino para estabilizarla, pero las demás estaban estabilizadas y no necesitaron de ningún antihipertensivo después de comenzar el tratamiento con pravastatina (Brownfoot y cols., 2015) (Figura 7).



**Figura 7. Una dosis diaria de 40 mg de pravastatina estabilizó los niveles de tensión arterial de tres de las cuatro pacientes (tomada de Brownfoot y cols., 2015).**

Otros parámetros que se mejoraron con este tratamiento fueron la función hepática y la creatinina en orina, entre otros indicadores de PE. Los niveles de sFlt-1 y sEng, que se esperaban que estuvieran altos durante el embarazo con PE, se mantuvieron y se estabilizaron sus niveles en todas las participantes del estudio (Thandhani y cols., 2011) (Figura 8).



**Figura 8. La administración de pravastatina dio lugar a una reducción de los niveles de sFlt-1 y estabilizó los niveles de sEng (tomada de Brownfoot y cols., 2015).**

La pravastatina fue bien tolerada, todas las mujeres tuvieron a sus bebés sin alteraciones ningunas, lo que se observó es que nacían un poco prematuros pero no se producían daños fetales. Todas las mujeres fueron dadas de alta a los 4 días después de la cesárea recuperadas sin ningún tipo de complicaciones.

No obstante, este método tiene sus limitaciones, y es que el estudio se ha realizado con muy pocos pacientes. Hacen falta ensayos a mayor escala con un mayor número de participantes para poder obtener resultados significativos acerca de este método (Brownfoot y cols., 2015).

### **Modelos inmunológicos de la PE**

Un exceso de la respuesta inmunológica materna es clave para el desarrollo de un fenotipo de PE en mujeres. Se han realizado estudios experimentales con ratas en los que se administran citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) de los días 14 a 19 de gestación, y se observó que se produjo un aumento de la presión arterial con respecto a las embarazadas controles. Se relacionó este aumento de la presión arterial con un aumento de la producción de endotelina (ET), que posee propiedades vasoconstrictoras y, desempeña un papel importante en la hipertensión producida por TNF- $\alpha$ .

La interleuquina 6 (IL-6) es otra citoquina con propiedades pro-inflamatorias y que se ha observado que produce un aumento de la presión arterial y, una disminución de la función renal, características de la PE.

Además de realizarse estudios con citoquinas, también eran objeto de estudio los linfocitos Th1 activados, que también producían un aumento de la tensión arterial, proteinuria, aumento de la densidad glomerular y fibrosis glomerular en ratas que se encontraban en estado de gestación, entre la semana 10 y la 12.

### **Modelos de PE inducidos por adriamicina**

La adriamicina es una antraciclina que pertenece al grupo farmacológico de antibióticos. Se ha demostrado que su administración en ratas 4 o 5 semanas antes del embarazo produce cambios importantes, debido a la toxicidad de adriamicina. Este antibiótico es nefrotóxico e induce la producción de hipertensión, proteinuria e insuficiencia renal crónica. En resumen, este fármaco reproduce los síntomas de la PE de humanos en ratas. El tratamiento efectivo contra el aumento de la tensión arterial es el daltrobán, un fármaco antagonista del receptor de los tromboxanos; como éstos tienen un papel importante en la mediación de la PE, su bloqueo mejoró los síntomas hipertensivos. Otro tratamiento efectivo es la administración de L-arginina, sustrato de la enzima NOS, que reduce los niveles de la tensión arterial. Pero este modelo tiene un gran inconveniente, y es que se han realizado estudios a largo plazo en ratas que previamente se ha inducido la PE con este método y, se ha

observado que en los futuros embarazos este modelo se asocia con un daño renal persistente. Por lo tanto este estudio es de uso limitado debido a este inconveniente ya comentado (McCarthy y cols., 2011).

### **Modelos de PE relacionados con el sistema renina angiotensina**

Los anticuerpos contra el receptor tipo I de la angiotensina II (AT1-AA) son auto-anticuerpos que tienen las mujeres con PE y que, curiosamente, activan a dicho receptor AT1. Zhou y cols. (2008) administraron AT1-AA de mujeres con PE en ratones gestantes sanos, y como resultados del estudio, estos ratones desarrollaron PE. Cuando se le administró conjuntamente un fármaco antagonista del receptor AT1, como es por ejemplo el losartán, no se desarrolló la PE. Pero este método tiene un problema y es que no es fácil la manipulación farmacológica del sistema renina angiotensina, debido a la teratogenicidad que presentan los fármacos antagonistas de este eje, como ya se ha comentado.

Otro método es la administración de solución salina en concomitancia con un mineral corticoide exógeno, como puede ser el acetato de desoxicorticosterona, a ratas embarazadas. Los resultados fueron una elevación de los niveles de la presión arterial, un aumento de la excreción de proteínas y una disminución del peso y del número de crías. Sin embargo, no fueron cambios específicos en las ratas embarazadas, también se producían estos efectos en las ratas que no lo estaban. Por ello, este modelo no es el más idóneo para reproducir las características de la PE y, se utiliza para investigar los efectos potenciales de muchas intervenciones farmacológicas (Tinsley y cols., 2010).

### **Modelos de PE inducida por insulina**

Las mujeres diabéticas que se quedan embarazadas tienen una mayor incidencia a padecer trastornos hipertensivos durante el embarazo, aproximadamente un 5-10% es mayor la incidencia en este tipo de mujeres. Se pensó que una hiperinsulinemia crónica y un aumento de la resistencia a la insulina podrían inducir un estado de PE en ratas. Esto se consiguió a través de la administración de insulina por vía subcutánea en ratas, se asemejó el estado de PE en este tipo de mujeres diabéticas embarazadas. Como consecuencia, la producción total de NO fue disminuida, pero esto fue subsanado con un tratamiento con L-arginina, que aumentó los niveles de NO y los niveles de NOS renales. La L-arginina también mejoró el peso de las crías y no alteró los niveles de insulina en suero y glucosa.

### **Modelos de PE basados en las especies reactivas de oxígeno**

Nuestro organismo tiene unas defensas de antioxidantes frente a las ROS, cuando el equilibrio entre estos dos factores no está regulado y se encuentra en una mayor proporción las ROS, ocurre lo que se denomina como estrés oxidativo. Este estrés oxidativo produce un deterioro de la placenta, que es característico también como síntoma de la PE. Ésto fue demostrado en un estudio que se realizó en ratas embarazadas, a las que se les administró 1mg/kg de endotoxinas el día 14 de la gestación, y se vio que manifestaban síntomas de estrés oxidativo acompañado de síntomas preeclámpsicos como hipertensión y excreción elevada de albúmina en orina. El tratamiento de estos animales fue con un fármaco, la aspirina, que es un inhibidor de la ciclooxigenasa, que redujo todo lo que había aumentado la endotoxina (McCarthy y cols., 2011). Sin embargo, como mencionamos anteriormente, la aspirina no presenta una clara evidencia de reducir la PE, no se obtienen resultados uniformes, y además no es eficaz en todas las mujeres embarazadas con PE, sino que solo produce un efecto en las mujeres preeclámpsicas de alto riesgo (Roberts y Catov, 2007).

Otro tratamiento que se suele administrar es el tempol, un antioxidante cuya función es la inhibición de la formación de ROS durante la PE, como ya mencionamos en el apartado de modelos en ratones BPH/5. Con este fármaco se mejoró la hipertensión y la proteinuria, además de mejorar el crecimiento y la supervivencia del feto. El tratamiento con antioxidantes tuvo unos importantes resultados en animales, que no han podido ser reproducidos en mujeres con PE (McCarthy y cols., 2011).

### **Otros modelos de PE en animales**

Se investigaron otros factores que estaban relacionados con la PE y se vio que el estrés puede que esté asociado a la aparición de PE en mujeres embarazadas. Para demostrarlo se hizo un estudio en ratas embarazadas, a las que se les sometió a una situación de estrés, en este caso a un estímulo sonoro, entre los días 7 y 14 de la gestación. Este estrés produjo la reducción de la ganancia de peso que se produce durante el embarazo, hipertensión, aumento de la motilidad de los vasos, proteinuria y un menor peso del feto al nacer (Takiuti y cols., 2002). Se hizo otro estudio basado en la estimulación con frío en las plantas de las patas de las ratas y esta estimulación producía los síntomas de la PE. Estos métodos están basados en la estimulación del sistema nervioso simpático y apoyan su implicación en la PE. Se apoya que este sistema es partícipe parcialmente en el proceso, pero no es muy probable que sea el desencadenante de la PE (Kanayama y cols., 1997).

## 5. Conclusión:

Con respecto a los modelos *in vitro*, en los últimos años se ha realizado un gran avance en este campo para la prevención y diagnóstico de la PE. Así los sistemas de ensayo *in vitro* como explantes vellosos y líneas de células trofoblásticas pueden ayudar, en un futuro, a establecer una medicina personalizada para las mujeres embarazadas. Pero también hay que decir que estos modelos tienen dos serios inconvenientes, que son la incapacidad de evaluar cualquier efecto potencial de origen extraplacentario que pueda afectar posteriormente a la placenta, y la imposibilidad de detectar efectos adversos de los fármacos detectados en el mismo lugar o en otro lugar diferente al estudiado en los estudios *in vitro* (Orendi y cols., 2011).

Por otra parte, esta revisión demuestra que existen muchos modelos en animales que pueden reproducir las características de PE humanas durante el embarazo. Varían dependiendo de sus características y de su reproducibilidad. Sin embargo todos tienen algún inconveniente para reproducir la etiopatogenia y fisiopatología de la enfermedad en humanos. Una de las limitaciones que tienen estos métodos es que ninguno presenta las patologías que se producen en la placenta (McCarthy y cols., 2011). La placenta es un órgano con una alta diversidad entre las diferentes especies de animales. Por lo tanto, no existe un modelo en animales que reproduzca con total similitud las características de la placenta humana (Schmidt y cols., 2015).

Estos modelos, aunque no son muy buenos para reproducirlos en humanos, como acabamos de señalar, sí que han sido de gran ayuda para comprender la enfermedad y saber cómo es su etiología y progresión. Por tanto, como no hay modelos ideales de animales, se usan éstos, pero con precaución a la hora de extrapolar los datos a humanos (McCarthy y cols., 2011).

## 6. Bibliografía

- ❖ Allen R, Rogozinska E, Sivarajasingam P, Khan KS, Thangaratnam S. Effect of diet- and lifestyle-based metabolic risk-modifying interventions on preeclampsia: a meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2014; 93: 973-985.
- ❖ Arenas D, Mesa C. Genética de la preeclampsia. *Rev CES Med.* 2008; 22(2): 57-67.
- ❖ Barrera D, Chirinos M, García-Becerra R. Mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de la gonadotropina coriónica humana (hCG) durante el embarazo. *Rev Invest Clin.* 2008; 60(2): 124-132.
- ❖ Barsoum IB, Renaud SJ, Graham CH. Glycerol trinitrate inhibits hypoxia-induced release of soluble fms-like tyrosine kinase-1 and endoglin from placental tissues. *Am J Pathol.* 2011; 178: 2888-2896.
- ❖ Berks D, Hoedjes M, Raat H, Duvekot JJ, Steegers EA, Habbema JD. Risk of cardiovascular disease after pre-eclampsia and the effect of lifestyle interventions: a literature-based study. *BJOG.* 2013; 120: 924-931.
- ❖ Bramham K, Parnell B, Nelson-Piercy C, Seed PT, Poston L, Chappell LC. Chronic hypertension and pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2014; 348: g2301.
- ❖ Briones Vega CG, Meneses Calderón J, Moreno Santillán AA, González Díaz JI, Díaz de León Ponce M, Briones Garduño JC. Pre-eclampsia: Una nueva teoría para un viejo problema. *Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int.* 2008; 22(2): 99-104.
- ❖ Brownfoot F, Tong S, Hannan N, Binder N, Walker S, Cannon P, et al. Effects of Pravastatin on Human Placenta, Endothelium, and Women With Severe Preeclampsia. *Hypertension.* 2015; 66(3): 687-697.
- ❖ Brosens I, Pijnenborg R, Vercruyse L, Romero R. The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 204: 193.

- ❖ Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci.* 2009; 16(2): 206-215.
- ❖ Cortés Pérez S, Pérez Milán F, Gobernado Tejedor JA, Mora Cepeda P. Epidemiología de los estados hipertensivos del embarazo. *Clin Invest Gin Obst.* 2009; 36(4): 132-139.
- ❖ Curiel-Balsera E, Prieto-Palomino MA, Muñoz-Bono J, Ruiz de Elvira MJ, Galeas JL, Quesada García G. Analysis of maternal morbidity and mortality among patients admitted to Obstetric Intensive Care with severe preeclampsia, eclampsia or HELLP syndrome. *Med Intensiva.* 2011; 35(8): 478-483.
- ❖ Dorniak-Wall T, Grivell RM, Dekker GA, Hague W, Dodd JM. The role of L-arginine in the prevention and treatment of pre-eclampsia: a systematic review of randomised trials. *J Hum Hypertens.* 2014; 28: 230-235.
- ❖ Epstein FH. Late Vascular Effects of Toxemia of Pregnancy. *N Engl J Med.* 1964; 271: 391-395.
- ❖ Erlandsson L, Nääv Ä, Hennessy A, Vaiman D, Gram M, Åkerström B, et al. Inventory of Novel Animal Models Addressing Etiology of Preeclampsia in the Development of New Therapeutic/Intervention Opportunities. *AJRI.* 2015; 75(3): 402-410.
- ❖ Geusens N, Hering L, Verlohren S, Luyten C, Drijkoningen K, Taube M, et al. Changes in endovascular trophoblast invasion and spiral artery remodelling at term in a transgenic preeclamptic rat model. *Placenta.* 2010; 31: 320-326.
- ❖ Granger JP, LaMarca BB, Cockrell K, Sedeek M, Balzi C, Chandler D, et al. Reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model for studying cardiovascular renal dysfunction in response to placental ischemia. *Methods Mol Med.* 2006; 122: 383-392.
- ❖ Habli M, Eftekhari N, Wiebracht E, Bombrys A, Khabbaz M, How H, et al. Long-term maternal and subsequent pregnancy outcomes 5 years after hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP) syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 201: 385.

- ❖ Ilekiş JV, Reddy UM, Roberts JM. Preeclampsia-a pressing problem: an executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop. *Reprod Sci.* 2007; 14: 508.
- ❖ James JL, Stone PR, Chamley LW. The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy. *Human Reprod Update.* 2006; 12(2): 137-144.
- ❖ Kanayama N, Tsujimura R, She L, Maehara K, Terao T. Cold-induced stress stimulates the sympathetic nervous system, causing hypertension and proteinuria in rats. *J Hypertens.* 1997; 15(4): 383-389.
- ❖ Karumanchi A, Maynard SE, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP. Preeclampsia: A renal perspective. *Kidney Int.* 2005; 67(6): 2101–2113.
- ❖ Khalil A, Hardman L, O’Brien P. The role of arginine, homoarginine and nitric oxide in pregnancy. *Amino Acids.* 2015; 47(9): 1715-1727.
- ❖ Koopmans CM, Bijlenga D, Groen H, Vijgen S, Aarnoudse JG, Bekedam D, et al. Induction of labour versus expectant monitoring for gestational hypertension or mild pre-eclampsia after 36 weeks gestation (HYPITAT): a multicentre, open-label randomized controlled trial. *Lancet.* 2009; 374: 979-988.
- ❖ Li N, Fu Y, Chen W, Hu GQ, Zhou M, Yu SX, et al. IFI16 mediates soluble Flt-1 and endoglin production by trophoblast cells. *J Hypertens.* 2015; 33(8): 1658-1665.
- ❖ Magee LA, Helewa M, Moutquin JM, von Dadelszen P, and the Hypertension Guideline Committee, and the Strategic Training Initiative in Research in the Reproductive Health Sciences (STIRRHS) Scholars. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can.* 2008; 30: 1-48.
- ❖ Marín R, Gorostidi M, Baltar J. Prevención de la preeclampsia con Aspirina. *Hipertensión (Madr.).* 2008; 25(2): 43-46.
- ❖ Mateus J. Significancia del desenlace de los factores angiogénicos en preeclampsia. *Rev Peru Ginecol Obstet.* 2014; 60(4): 333-344.

- ❖ Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003; 111(5): 649-658.
  
- ❖ McCarthy FP, Kingdom JC, Kenny LC, Walsh SK. Animal models of preeclampsia; uses and limitations. *Placenta.* 2011; 32: 413-419.
  
- ❖ Miller RK, Genbacev O, Turner MA, Aplin JD, Caniggia I, Huppertz B. Human placental explants in culture: approaches and assessments. *Placenta.* 2005; 26: 439-448.
  
- ❖ Mol B, Roberts C, Thangaratinam S, Magee LA, De Groot C, Hofmeyr G. Pre-eclampsia. *The Lancet.* 2015; 387(10022): 999-1011.
  
- ❖ Orendi K, Kivity V, Sammar M, Grimpel Y, Gonen R, Meiri H, et al. Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia. *Placenta.* 2011; 32(1): 49-54.
  
- ❖ Orendi K, Gauster M, Moser G, Meiri H, Huppertz B. The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reproduction.* 2010; 140: 759-766.
  
- ❖ Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Schust DJ. Preeclampsia: multiples approaches for a multifactorial disease. *DMM.* 2012; 5: 9-18.
  
- ❖ Persaud M. *Embriología clínica.* 7ª ed. Ed. Panamericana: Elsevier; 2009.
  
- ❖ Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation.* 2011; 123: 2856-2869.
  
- ❖ Purizaca-Benites M. La placenta y la barrera placentaria. *Rev Per Ginecol Obstet.* 2008; 54: 270-278.

- ❖ Quenby S, Mountfield S, Cartwright JE, Whitley GS, Vince G. Effects of low molecular-weight and unfractionated heparin on trophoblast function. *Obstet Gynecol.* 2004; 104: 354-361.
- ❖ Rey E, Garneau P, David M, Gauthier R, Leduc L, Michon N, et al. Dalteparin for the prevention of recurrence of placental mediated complications in women without thrombophilia: a pilot randomized controlled trial. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 58-64.
- ❖ Reyna-Villasmil E, Briceño-Pérez C, Torres-Cepeda D. Marcadores bioquímicos para la predicción de la preeclampsia. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2010; 70(1): 53-66.
- ❖ Roberts JM, Catov JM. Aspirin for pre-eclampsia: compelling data on benefit and risk. *Lancet.* 2007; 369: 1765-1766.
- ❖ Rubio Lorente AM, González López AB, González Mirasol E, González de Merlo G. Morbimortalidad materna y fetal en pacientes con pre-eclampsia grave. *Prog Obstet Ginecol.* 2011; 54(1): 4-8.
- ❖ Sandvik MK, Leirgul E, Nygard O, Ueland PM, Berg A, Svarstad E, et al. Preeclampsia in healthy women and endothelial dysfunction 10 years later. *Am J Obstet Gynecol.* 2013; 209 (6): 569.e1–569.e10.
- ❖ Schmidt A, Morales-Prieto DM, Pastuschek J, Frohlich K, Markert UR. Only humans have human placentas: molecular differences between mice and humans. *J Reprod Immunol.* 2015; 108: 65-71.
- ❖ Spencer K, Cowans NJ, Nicolaidis KH. Low levels of maternal serum PAPP-A in the first trimester and the risk of pre-eclampsia. *Prenat Diagn.* 2008; 28: 7-10.
- ❖ Takiuti NH, Kahhale S, Zugaib M. Stress in pregnancy: a new Wistar rat model for human preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186(3): 544-550.
- ❖ Tal R. The role of hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha in preeclampsia pathogenesis. *Biol. Reprod.* 2012; 87: 134.

- ❖ Tannetta DS, Sargent IL, Linton EA, Redman CW. Vitamins C and E inhibit apoptosis of cultured human term placenta trophoblast. *Placenta*. 2008; 29: 680-690.
- ❖ Thadhani R, Kisner T, Hagmann H, Bossung V, Noack S, Schaarschmidt W, et al. Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation*. 2011; 124: 940-950.
- ❖ Tinsley JH, South S, Chiasson VL, Mitchell BM. Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and blood pressure in hypertensive pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298(3): 713-719.
- ❖ Vadillo-Ortega F, Perichart-Perera O, Espino S. Effect of supplementation during pregnancy with L-arginine and antioxidant vitamins in medical food on pre-eclampsia in high risk population: randomised controlled trial. *BMJ*. 2011; 342: d2901.
- ❖ Veerbeek JH, Hermes W, Breimer AY, van Rijn BB, Koenen SV, Mol BW, et al. Cardiovascular disease risk factors after early-onset preeclampsia, late-onset preeclampsia, and pregnancy-induced hypertension. *Hypertension*. 2015; 65(3): 600-606.
- ❖ Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006; 12(6): 642-649.
- ❖ Von Dadelszen P, Payne B, Li J, Ansermino JM, Broughton Pipkin F, Côté AM, et al. And the PIERS Study Group. Prediction of adverse maternal outcomes in pre-eclampsia: development and validation of the fullPIERS model. *Lancet*. 2011; 377(9761): 219-227.
- ❖ Williams PJ, Broughton Pipkin F. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011; 25: 405-417.
- ❖ Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, et al. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med*. 2008; 14(8): 855-862.
- ❖ Zou Y, Zuo Q, Huang S, Yu X, Jiang Z, Zou S, et al. Resveratrol inhibits trophoblast apoptosis through oxidative stress in preeclampsia-model rats. *Molecules*. 2014; 19: 20570–20579.