

FALLA REPRODUCTIVA DE ORIGEN ISQUÉMICO

¿Un nuevo síndrome en obstetricia?

Drs. Alfredo M Germain A⁽¹⁾, María Soledad Reyes S⁽²⁾,
Marta Sánchez M⁽¹⁾, Gloria Valdés S⁽³⁾.

1. Departamento de Obstetricia y Ginecología, Clínica Las Condes.
2. Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Ciencias de La Salud, Universidad Andrés Bello
3. Departamento de Nefrología Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

FALLA REPRODUCTIVA DE ORIGEN ISQUÉMICO

El estudio histológico del lecho placentario de una amplia variedad de condiciones clínicas, que incluyen el aborto simple y recurrente, preeclampsia, restricción del crecimiento fetal, óbito fetal, rotura prematura de membranas y recientemente parto prematuro ha evidenciado una deficiente transformación de las arteriolas espirales por el trofoblasto extraveloso. La frecuencia con que el lecho placentario de estas pacientes presenta una deficiente transformación es variable para cada condición, pero oscila entre un 15 y 70%⁽¹⁻⁷⁾.

Estos datos sugieren que un subgrupo de las pacientes con falla reproductiva exhibe un defecto en la placentación, representado por una reducción en la intensidad de la transformación vascular por el trofoblasto, lo que genera una reducción del flujo sanguíneo útero placentario.

Dependiendo de la intensidad del defecto primario, del momento en que se inicia y de la respuesta adaptativa de la madre, se evidenciará alguna de las formas clínicas de este espectro. A este grupo de condiciones le hemos denominado *Síndrome de falla reproductiva de origen isquémico*.

La importancia de este síndrome radica en su frecuencia (aproximadamente un 3-5% del total de embarazos) y la alta morbilidad y mortalidad perinatal reportada en este subgrupo de pacientes. Además, estudios recientes sugieren que hasta un 50% de estas pacientes presenta como desórdenes subyacentes trombofilias congénitas o adquiridas^(8,9). De tal manera que este enfoque sindrómico entorno a su mecanismo fisiopatológico proporciona al médico

clínico, una orientación tanto etiológica como de enfoque terapéutico.

En este capítulo revisaremos la formación de la placenta, la fisiopatología de este síndrome junto a su aproximación clínica y terapéutica.

PLACENTACIÓN Y PSEUDOVASCULOGENÉISIS

En mamíferos, la implantación y el desarrollo placentario (placentación) unen físicamente al embrión con su madre. La placentación tiene dos objetivos mayores: A) establecer un sostén estructural del embrión al útero. B) acercar la circulación materna y fetal de tal manera de permitir una adecuada transferencia de gases, nutrientes y productos de desecho. En la especie humana, después de la fertilización, las células más externas de la mórula dan origen al trofoblasto, células epiteliales especializadas que conformarán la placenta, y que durante la implantación invaden la decidua. Existen mecanismos especializados que median la adhesión del trofoblasto. Antes de la ovulación el cuerpo lúteo secreta progesterona y estrógenos, hormonas que preparan el endometrio para la unión y posterior implantación del embrión. Una importante modificación es la expresión de ligandos de oligosacáridos en las células epiteliales del útero y endometrio y que se unen a L-Selectina, moléculas expresadas por el trofoblasto. Este evento gatilla vías de señalización celular que aumentan la receptividad decidual para permitir una adhesión más estable⁽¹⁰⁾. Al final de este período, la placenta se estructura formando las vellosidades coriónicas flotantes y las de anclaje (Figura 1). Las primeras ocupan el espacio

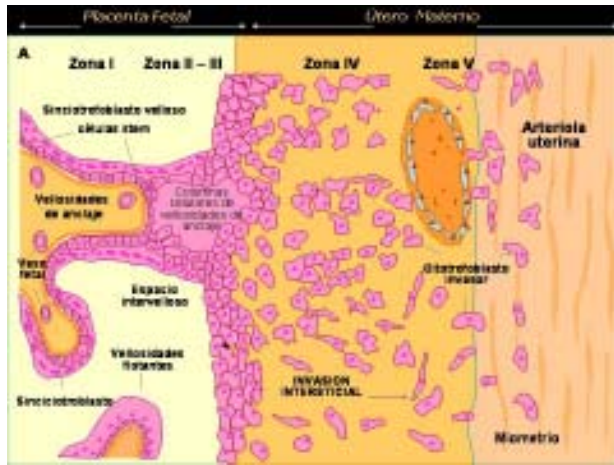


Figura 1. Esquema de invasión citotrofoblástica del intersticio uterino y arterias espirales. Sección longitudinal de vellosidades coriónicas de anclaje en la interface materno-fetal a las 10 semanas de gestación. Las células de anclaje actúan como puentes entre los compartimentos fetal y materno, mientras que las vellosidades flotantes se encuentran suspendidas en el espacio intervelloso, bañadas con el flujo sanguíneo materno. El citotrofoblasto en las vellosidades de anclaje (zona I) forma columnas celulares (zonas II y III). Luego invade la decidua y primer tercio del miometrio (zona IV) y la vasculatura materna (zona V), anclando el feto a la madre y permitiendo un aumento del flujo sanguíneo uterino. Adaptado desde Ref. 12.

intervelloso ("lagunas" llenas de sangre materna) y median los eventos de transporte de gases y nutrientes. Las vellosidades de anclaje en tanto, penetran la pared uterina para proporcionar un sostén físico al feto y aseguran una adecuada perfusión placentaria⁽¹¹⁾.

Por otra parte, las células madres del trofoblasto se fijan a la membrana basal que rodea el estroma de las vellosidades flotantes y de anclaje. En ambas, el trofoblasto se fusiona para generar una capa más externa denominada sincitiotrofoblasto; simultáneamente, en su estroma aparecen los vasos sanguíneos. Al trofoblasto que recubre ambos tipos de vellosidades se le denomina trofoblasto vellosito. En zonas discretas de estas vellosidades de anclaje, el trofoblasto rompe la membrana basal y forma "columnas celulares" Figuras 1 y 2. Dichas columnas están conformadas por una subpoblación de trofoblasto denominado trofoblasto extravelloso (o intermedio) el que prolifera, invade el miometrio y modifica los vasos sanguíneos arteriales uterinos⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Se ha denominado pseudovasculogénesis a la serie de eventos que se inician con la proliferación e invasión trofoblástica y finalizan en la transformación vascular. Este proceso puede subdividirse anatómicamente y funcionalmente en 5 zonas (de proximal a distal) que presentan diferentes características. En la figura 1 y tabla I se esquematiza la zona en que cada factor se expresa con mayor intensidad lo que sugiere un rol para ese agente en ese proceso específico.

Las bases moleculares que regulan el proceso de pseudo vasculogénesis no han sido establecidas completamente, pero integrinas como $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 1$ y VE-cadherin (vascular endothelial cadherin), moléculas de adhesión de tipo VCAM-1 (vascular endothelial cell adhesion molecule-1) y sistema de

proteasa/antiproteasa del tipo MMP-9 y PAI-1/PAI-2 han sido consideradas muy importantes. En modelos animales *knock-out* para estos factores, el más claramente vinculado a una anomalía severa en la placentación es el déficit de integrinas $\alpha v \beta 3$. Su deficiencia se asocia a una reducción de 50% en el tamaño de la camada y con un 10% de mortalidad fetal, y se acompaña de una clara reducción en la perfusión placentaria⁽¹³⁾ (Figuras 1 y 2, Tabla I). Recientemente se ha descrito el rol del factor de crecimiento HB-EGF (heparin binding EGF-like growth factor) durante la placentación e invasión trofoblástica. HB-EGF es un miembro de una familia de factores de crecimiento epidérmico (EGF) que incluye a proteínas que se unen a receptores tirosina quinasa de la familia de receptores HER (Human EGF Receptor). HB-EGF específicamente se une a HER-1 y HER-4. El tejido endometrial expresa HB-EGF en respuesta a hormonas esteroidales sexuales y durante la gestación temprana, sugiriendo un rol en la implantación del blastocisto. También es expresado en la placenta durante el primer trimestre del embarazo, en el trofoblasto vellosito y además se acumula en el citotrofoblasto extravelloso predominantemente en los sitios de invasión. Los factores EGF y TGF- α son también expresados en la placenta durante la gestación y estudios *in vitro* han demostrado que favorecen la invasión trofoblástica y estimulan la proliferación citotrofoblástica respectivamente⁽¹⁴⁾.

El perfil de expresión de HB-EGF se encuentra disminuido en placenta de mujeres con preeclampsia⁽¹⁵⁾ y aunque las funciones específicas durante el desarrollo trofoblástico no son totalmente conocidas, los estudios en cultivos de explantes coriónicos vellositos muestran que la línea trofoblástica al ser tratada con HB-EGF, se diferencia a un

TABLA I.
PATRONES DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN DURANTE
LA PSEUDO VASCULOGÉNESIS

	Zona I Célula Madre	Zona II - III Columnar	Zona IV Invasor	Zona V Intravascular
Citotrofoblasto				
Integrinas $\alpha_6\beta_4$	+	+	-	-
Integrinas $\alpha_v\beta_6$	-	-	+	+
E-cadherin	+	+	-	-
VE cadherin	-	+	+	+
VCAM-1	-	-	+	+
PECAM-1	-	-	+	+
NCAM-1	-	-	+	+
PAI-1	-	-	-	+
PAI-2	-	+	-	-

Esquema que ilustra las zonas en las cuales el citotrofoblasto expresa distintos patrones de moléculas de adhesión, y sugiere el rol de cada una de ellas durante las distintas etapas del proceso de invasión trofoblástica. Adaptado desde ref. 12.

fenotipo extraveloso lo que es marcado por una disminución de la subunidad α_6 de integrinas y acumulación de la subunidad α_1 . Recientemente se reportó que tres miembros de la familia de EGF regulan directamente los cambios celulares y moleculares asociados a la conversión fenotípica del citotrofoblasto humano desde uno epitelial a uno invasivo⁽¹⁴⁾. El EGF, TGF- α y HB-EGF estimulan el proceso con la misma efectividad. Todos se unen a HER-1, mientras que HB-EGF también lo hace a HER-4⁽¹⁶⁾. Sin embargo, en placenta, el perfil de expresión de familias individuales de HER y los miembros de la familia de EGF expresados por el trofoblasto u otros tipos celulares podrían influir las señalizaciones celulares a través de la unión a HER-4⁽¹⁴⁾.

El HB-EGF tiene efectos mitogénicos para variados tipos celulares, estimulando la migración de células musculares lisas; es quimiotáctico para células que expresan HER-4, tiene actividad angiogénica y es un factor de supervivencia celular evitando la apoptosis⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Se ha demostrado que promueve el crecimiento del trofoblasto veloso, no a través del incremento del número de células, sino que induciendo la diferenciación citotrofoblástica al fenotipo extraveloso y estimulando la motilidad celular, componente importante de la invasión. Cuando los tres factores de crecimiento endógenos son inhibidos con el correspondiente anticuerpo, la motilidad celular se reduce a niveles inferiores a los basales. Sin embargo, los tres factores deben ser

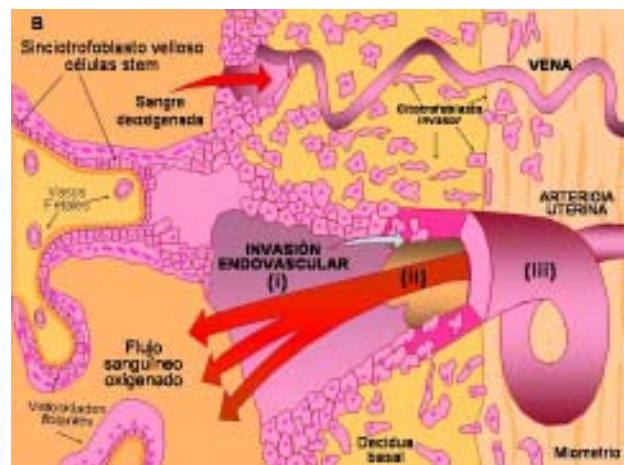


Figura 2. Diagrama de arteria espiral uterina durante la invasión trofoblástica en progreso (10-18 semanas).

Los segmentos endometriales y luego miometriales son modificados progresivamente. En la zona totalmente modificada: (i) en diámetro del vaso es mayor y el citotrofoblasto está presente en el lumen y ocupa la superficie completa de la pared del vaso; (ii) segmento de la arteria parcialmente modificado (invadido); (iii) área no modificada del vaso. Los vasos del tercio superficial del miometrio será modificada completamente cuando la invasión alcance su mayor extensión –mitad de la gestación– mientras que el segmento arterial más profundo mantendrá su estructura normal. Adaptado desde Ref.12

neutralizados para logran la inhibición de la motilidad, lo que sugiere la existencia de mecanismos compensatorios fisiológicos⁽¹⁴⁾.

Durante la placentación en el primer trimestre del embarazo HB-EGF endógeno puede jugar un rol clave en la formación de las vellosidades de anclaje nacientes. La remodelación de la vasculatura uterina asociada, puede también ser dependiente de HB-EGF ya que su disregulación está relacionada con el desarrollo de preeclampsia y en menor grado con restricción del crecimiento fetal. HB-EGF es normalmente expresado en placenta humana hasta la semana 35 de gestación, la reducción de sus niveles en la semana 20 en mujeres con preeclampsia o con recién nacidos pequeños para la edad gestacional sugiere una asociación entre la caída de los niveles de HB-EGF y la pobre invasión trofoblástica que ocurre en estos cuadros⁽¹⁵⁾.

De esta forma, el desarrollo de una vasculatura híbrida compuesta de trofoblasto y células endoteliales de origen materno requiere de un delicado balance entre líneas celulares de diferente tipo y origen.

Una interrogante clave es cómo el trofoblasto se orienta, encuentra el vaso sanguíneo y procede a su transformación. La atención se ha enfocado a dos áreas: (a) cambios en la presión parcial de oxígeno y (b) factores quimiotácticos derivados del endotelio materno.

• **Cambios en la presión parcial de oxígeno.** Se ha sugerido que el cambio celular que se produce en la columna vellositaria por el cual el trofoblasto prolifera y luego migra es modulado por la presión parcial de oxígeno en el espacio intercelular adyacente. A presiones parciales de oxígeno bajas, (2% O₂, como es el caso en el inicio de la columna, zona I, figura 1), el trofoblasto prolifera en forma intensa, pero no expresa las integrinas αvβ3 y αvβ1, necesarias para la invasión. Sin embargo, en presencia de presiones parciales mayores como ocurre más cerca del vaso sanguíneo, (8-20% O₂ zona IV y V figura 1) el trofoblasto adquiere un fenotipo claramente invasor evidenciando que el oxígeno modifica la proliferación y diferenciación celular^(12,20). El mecanismo que permite al trofoblasto sentir la tensión de oxígeno recién comienza a precisarse. Una clave que revela el núcleo de este sistema es el descubrimiento de proteínas llamadas factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIFs). Estas, regulan la actividad de varios genes cuando el nivel de oxígeno es bajo, lo que ocurre en diversas condiciones fisiológicas y patológicas. Los HIFs consisten en proteínas en cuya estructura se distinguen 2 sub-unidades (HIF-1α, HIF-1β). En modelos animales

se demostró que las células mantienen relativamente constantes las concentraciones de la sub-unidad β, por el contrario las de la sub-unidad α varían, disminuyendo cuando la concentración de oxígeno son normales y aumentando a la vez que se genera hipoxia. Estas fluctuaciones se logran parcialmente a través de la regulación de la destrucción de la misma sub-unidad α-1. Cuando la tensión de oxígeno es normal, la HIF-1α es “marcada” para su destrucción mediante la adición de ubiquitina, proceso mediado por la proteína supresora tumoral von Hippel-Lindau (VHL) en presencia de elongina B y C, lo que ocurre posterior a la hidroxilación de residuos de prolina y asparragina de la sub-unidad, reacciones catalizadas por enzimas oxígeno-dependientes, prolil-hidroxilasa y asparraginil hidroxilasa^(21,22). Se ha observado que HIF-1 en placenta tiene un inusual perfil de expresión. Durante los estados tempranos de gestación, su expresión es elevada y decrece marcadamente alrededor de las 10-12 semanas cuando se cree que la pO₂ intra placentaria aumenta⁽²³⁻²⁵⁾. Esto ocurre paralelo a la caída de TGFβ-3 un inhibidor de la diferenciación del trofoblasto, lo que sugiere que los eventos de diferenciación regulados por la pO₂ son mediados por HIF-1α que modifica la transcripción de TGFβ-3⁽²⁶⁾.

• **Factores derivados del endotelio materno.** Existe evidencia para plantear el rol del endotelio en: a) quimiotaxis del trofoblasto, b) interacción primaria del trofoblasto con el endotelio y c) mantención de la vasodilatación arteriolar. Todo esto requiere de un endotelio sano y funcional. Se conoce que (en sistemas in vitro) el factor de crecimiento derivado del endotelio (VEGF) ejerce un rol quimiotáctico sobre la migración trofoblástica⁽²⁷⁾. Este factor así como sus receptores (Flt-1/KDR) se encuentran distribuidos en el citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto y su secreción aumenta en respuesta a la hipoxia⁽²⁸⁾, lo que ha sido confirmado en estudios realizados en modelos animales en los cuales se reporta un aumento en la producción de sFlt1 (receptor soluble sin dominio citosólico) durante la preeclampsia e incluso previo a la fase clínica, capturando VEGF y PlGF libres privando a la vasculatura normal de señales angiogénicas esenciales para la mantención y supervivencia celular (Figura 2)⁽²⁹⁾. En células endoteliales el VEGF aumenta la expresión del sistema de integrinas pro-invasor (αvβ3 y αvβ1)⁽³⁰⁾ y en combinación con óxido nítrico (NO) modula la aparición de moléculas de adhesión, importantes en el proceso de transformación vascular⁽³¹⁾. En forma

interesante, como se discutirá más adelante, la heparina intensifica la activación de VEGF favoreciendo su acción. Finalmente, la mantención de la vasodilatación arteriolar facilita la transformación vascular, y en este proceso también NO y factores relajadores derivados del endotelio son muy importantes.

FUNCION ENDOTELIAL

La investigación desarrollada en las últimas dos décadas ha establecido que la fina capa de células endoteliales cumple una extraordinaria variedad de funciones, constituyendo un complejo órgano endocrino, paracrino y autocrino que modula el tono vascular, proliferación de células musculares lisas, respuesta inflamatoria, regulación inmunológica, integración y transducción de señales locales y sistémicas, metabolismo de aminas circulantes y lipoproteínas, y la secuencia de la hemostasia – coagulación (revisado en 32).

Esta amplia gama de funciones se encuentra regulada principalmente a nivel transcripcional, y son inducidas por la interacción del endotelio con distintos agentes físicos y químicos, como fuerzas hemodinámicas, componentes del plasma y citoquinas, a los que responde a través de la síntesis y liberación de moléculas vasoactivas y trombo reguladoras. Estos incluyen óxido nítrico (NO), prostaciclina, endotelina, factores de crecimiento, interleukinas, moléculas de adhesión y factores fibrinolíticos⁽³²⁾.

Otras sustancias liberadas por el endotelio que influyen la regulación del tono vascular, son los vasoconstrictores endotelina-1, tromboxanos y prostaglandinas H₂, los vasodilatadores como la prostaciclina y el sistema de calicreína-cinina. El vasodilatador primordial NO es un radical libre soluble, secretado no sólo por las células endoteliales sino también por macrófagos y neuronas cerebrales específicas. Se sintetiza a partir de L-Arginina, oxígeno molecular y nicotinamida-adeninaducleótido fosfato (NADPH) como cofactor, por acción de la enzima sintasa de NO (NOS) que tiene tres isoformas. Está presente en forma constitutiva en las células endoteliales (eNOS) y en las neuronas (nNOS). Los estímulos que activan la eNOS incluyen un incremento en la concentración plasmática de iones de calcio en presencia de calmodulina, trombina, ADP, bradicinina, sustancia P, agonistas muscarínicos y roce tangencial entre otros. El roce

tangencial (*shear stress*) generado por el contacto de la sangre con la capa endotelial, estimula a la eNOS y es responsable de la vasodilatación mediada por flujo. En arterias sanas se observa dilatación dependiente de endotelio en respuesta a estímulos vasoactivos, como la isquemia y la administración de acetilcolina. Esto constituye un importante mecanismo de autorregulación, mediante el cual se incrementa la perfusión miocárdica en respuesta a una mayor demanda (Figura 3).

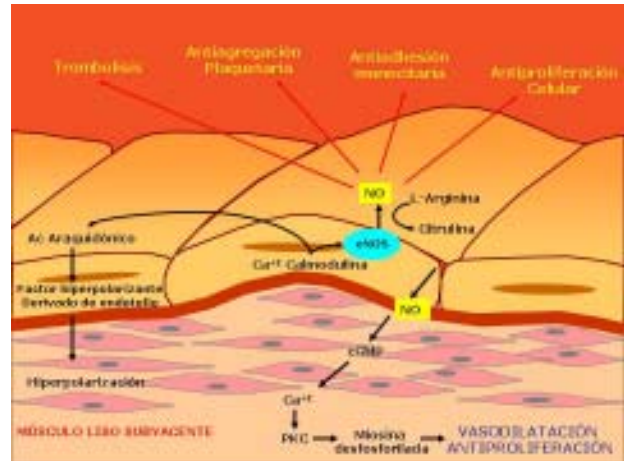


Figura 3. El esquema ilustra la interacción entre el endotelio y diversos factores circulantes, hemodinámicos que llevan a la producción de NO y que se traducen en actividad antiagregante plaquetaria, fibrinolítica, antiproliferativa y antiadhesión de la pared vascular. El NO liberado difunde además al tejido muscular liso subyacente y se une al grupo hem de la guanil ciclasa, activando esta enzima a través de una cascada de cinasas. El incremento resultante en la concentración de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) genera disminución de la concentración de calcio intracelular induciendo relajación y por lo tanto, vasodilatación e inhibición de la proliferación celular, a través de la activación de proteínas quinasas sensibles que fosforilan otras proteínas tales como los canales iónicos y enzimas⁽³²⁾.

Hoy, el *síndrome de disfunción endotelial* se entiende como la incapacidad del vaso sanguíneo de aumentar su diámetro en respuesta a un estímulo conocido, ocasionado por una insuficiente generación de agentes vasodilatadores de origen endotelial. Esta anomalía ha sido recientemente reconocida como un evento precoz y clave en la patogénesis de estados caracterizados por vasoespasmos, vasoconstricción, inflamación, adhesión de leucocitos, trombosis y proliferación vascular anormal, incluyendo hipertensión, aterosclerosis y vasoconstricción

coronaria. Numerosos estudios experimentales han demostrado que un endotelio sano ejerce potentes efectos antiaterogénicos y antitrombóticos.

La producción de NO por la eNOS tiene una peculiar dependencia de niveles plasmáticos de L-Arginina, aminoácido previamente sólo considerado como precursor de síntesis proteica, urea y creatina. La mayoría de las células obtiene la L-Arginina necesaria desde el medio extracelular a través de transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT-1 y 2). Los estudios han mostrado que la precisa localización celular de estos transportadores es la responsable de lo que se ha denominado la “*paradoja de la arginina*”, en la cual la síntesis endotelial de NO puede ser regulada por concentraciones variables de L-Arginina extracelular, a pesar de que los niveles intracelulares exceden en varios órdenes de magnitud la Km de eNOS para L-Arginina. Además tanto la Km aparente de la enzima como la de los transportadores coinciden con las concentraciones de L-Arginina extracelular. Los análisis inmunohistoquímicos han demostrado que CAT-1, eNOS y caveolina-1 (proteína estructural de la membrana plasmática), se encuentran co-localizadas en cavidades de la superficie celular (caveolas), sugiriendo una canalización preferente de L-Arginina extracelular hacia eNOS. Esta cinética y ubicación singular han permitido que se utilice la suplementación con L-Arginina como método para

favorecer la disponibilidad de NO. Los estudios en animales han mostrado que la suplementación con L-Arginina mejora la dilatación dependiente de endotelio, disminuye la agregación plaquetaria y adhesión de monocitos. En pacientes con enfermedad coronaria aterosclerótica, la mayoría de los estudios muestra que la administración de L-Arginina mejora la función endotelial⁽³³⁾.

Formas de evaluación de la función endotelial

El estudio de la disfunción endotelial es un ejemplo exitoso de la aplicación clínica derivada del entendimiento de la biología vascular. Idealmente, la técnica para evaluar la disfunción endotelial debe constituir un método seguro, no invasivo, disponible, económico, confiable y reproducible, que se correlacione con la extensión del daño subclínico, permita realizar el diagnóstico, estratificación del riesgo y evaluación de la respuesta al tratamiento que se implemente. Se requeriría de un grupo de tests para valorar íntegramente los diferentes aspectos de las funciones antiaterogénicas del endotelio normal, que incluyan la evaluación de la respuesta vasomotora y de marcadores circulantes de función endotelial. La mayoría de los métodos para valorar la función endotelial *in vivo* examina la habilidad del endotelio para causar vasodilatación en respuesta a un estímulo farmacológico o fisiológico que incrementa la liberación de NO (Tabla II).

TABLA II.
MARCADORES Y ANÁLISIS PARA EVALUAR FUNCIÓN ENDOTELIAL⁽³²⁾

- **Pruebas funcionales para medir vasodilatación dependiente de endotelio:**
 - Coronariografía con infusión intra-arterial de acetilcolina.
 - Plestimografía venosa de brazo.
 - Método coronario - tomografía por emisión de positrones.
 - Método con ultrasonido - ultrasonido vascular de alta resolución en arteria braquial
- **Evaluación directa de NO y sus metabolitos en plasma y orina**
- **Marcadores circulantes de función endotelial:**
 - Dimetilarginina asimétrica (ADMA.)
 - Endotelina-1.
 - Factor de Von Willebrand.
 - tPA.
 - PAI-1.
 - Moléculas de adhesión:
 - * ICAM-1
 - * VCAM-1
 - * E- selectina.
 - * P-selectina.

La ultrasonografía vascular de alta resolución de la arteria braquial es un método no invasivo que ha emergido como una técnica útil para el estudio de la función endotelial mediada por NO. Se ha establecido que los mejores predictores de una reducción de la respuesta vasodilatadora en arteria braquial es la disfunción endotelial en arterias coronarias y la presencia de cardiopatía coronaria, lo que sugirió la validez de este método no invasivo en pacientes de alto riesgo. Posteriormente, se ha determinado una excelente correlación con la extensión y severidad de aterosclerosis coronaria.

La fisiología del endotelio, síndrome de disfunción endotelial, formas de evaluación –y su valor predictivo– y las distintas medidas de intervención destinadas al tratamiento, han sido recientemente revisadas por nuestro grupo⁽³²⁾.

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

Durante la gestación fisiológica se mantiene la normotensión a pesar del incremento del volumen sanguíneo materno y de los factores hipertensógenos como renina, en base a la activación de sistemas vasodilatadores. Numerosos sistemas vasodilatadores han sido implicados que incluyen al sistema caliceína-cininas, prostaglandinas, angiotensina 1-9 y NO, todos agentes producidos en el endotelio materno o por el trofoblasto. Esto explica la tendencia al aumento de la dilatación mediada por flujo (DMF) entre el embarazo inicial y el segundo y tercer trimestre, el que se revierte en el post parto cuando retorna a las cifras iniciales⁽³⁴⁾. En la evaluación ultrasonográfica de función endotelial realizada por nuestro grupo en una población chilena, un subgrupo de 8 embarazadas jóvenes, con historia reproductiva normal fueron evaluadas en forma longitudinal en cuatro períodos del embarazo y post parto tardío (6 semanas). Todas las pacientes tuvieron un embarazo fisiológico con parto de término y recién nacidos normales. Entre las 6 a 7⁺⁶ semanas observó una dilatación de $8.6 \pm 1.5\%$, la que tendió a aumentar a $12.0 \pm 1.3\%$ entre las 14 a 15⁺⁶ semanas, a $11.1 \pm 2.0\%$ entre las 24 a 27⁺⁶ semanas y a $13.5 \pm 2.4\%$ entre las 32 a 38⁺⁶ semanas. A las 6 semanas de post-parto la DME fue $9.9 \pm 1.4\%$, evidenciando una tendencia al aumento durante la gestación normal⁽³⁵⁾. Estos resultados son concordantes con los datos obtenidos en otras poblaciones^(36,37).

Disfunción endotelial y SFROI. Dada la importancia del endotelio en el inicio de las enfermedades vasculares y en la interacción entre el trofoblasto y el endotelio de las arterias espirales, se ha sugerido recientemente que en algunos subgrupos de pacientes la disfunción endotelial sea un fenómeno primario, a consecuencia del cual se produce una placentación defectuosa⁽³⁸⁾. La patogenia de la disfunción endotelial observada en preeclampsia es múltiple y consecuencia de factores maternos o primarios y de origen placentario o secundarios (Figura 4). Entre los maternos que se consideran “predisponentes” a la preeclampsia existe una serie de condicionantes como trombofilias congénitas o adquiridas, hiperhomocisteinemia, diabetes mellitus, hipertensión arterial crónica y síndrome metabólico. Estas condiciones preexistentes generan disfunción endotelial e interfieren en la interacción del endotelio materno con el trofoblasto fetal. Los factores placentarios se producen por la liberación a la circulación de fragmentos de tejido trofoblástico isquémico, que se adhieren al endotelio y generan disfunción endotelial. Además, en respuesta a la isquemia trofoblástica existe aumento de citocinas e intermediarios reactivos del oxígeno que contribuyen a la disfunción endotelial⁽³⁹⁻⁴¹⁾ (Figura 5).

La preeclampsia representa un modelo en el cual la placentación podría verse dificultada no sólo por defectos en los factores locales que impiden una adecuada pseudovasculogénesis trofoblástica ya mencionados, sino también obstaculizada como consecuencia de una anomalía en la función endotelial. Nuestro grupo, en una cohorte de pacientes con historia de abortos recurrentes, preeclampsia severa y mujeres que cursaron con embarazos normales (grupo control), mostró que el 39%, 44% y 0% de las pacientes presentaban disfunción endotelial en el período no gestacional, respectivamente. El origen de esta condición pregestacional es aún desconocida y nuestra hipótesis es que en algunas de estas pacientes, existe una disminución en la biodisponibilidad de NO a consecuencia de una alteración en el metabolismo de la L-Arginina⁽⁴²⁾ (Figura 4).

Debe además considerarse que la isquemia placentaria reduce el aporte de oxígeno y/o nutrientes sobre el feto lo que representa un potencial factor de riesgo cardiovascular en la vida adulta. Alteraciones en el crecimiento placentario y la resistencia vascular, alteraciones en el transporte de nutrientes y metabolismo hormonal en la placenta, tendrían importantes efectos en las adaptaciones fetales y

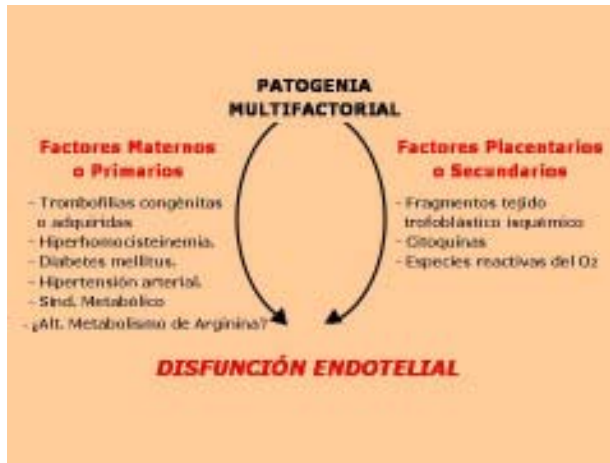


Figura 4. Disfunción endotelial en SFROI. La patogénesis de la disfunción endotelial en SFROI es multifactorial y consecuencia de factores maternos o primarios dentro de los que se consideran predisponentes los ilustrados en el esquema y que pueden interactuar con factores de origen placentarios o secundarios que adhieren al endotelio en respuesta a la isquemia ^(32, 42).

serían centrales en lo que se conoce como la “Hipótesis de orígenes fetales de enfermedades del adulto” o “programación fetal”. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que el crecimiento postnatal acelerado sería de mayor relevancia. De forma experimental se ha establecido que incrementos en la tasa de crecimiento causado por una dieta hipercalórica durante la infancia, aunque sea por períodos breves, tienen efectos adversos a largo plazo y en estudios observacionales se asocia este crecimiento acelerado con mayor riesgo cardiovascular en la vida adulta^(43,44).

En la actualidad se incrementan las evidencias que muestran el riesgo posterior al que podrían estar expuestas las mujeres que cursaron con complicaciones gestacionales. La investigación revela interesantes datos que relacionan las complicaciones vasculares, metabólicas e inflamatorias maternas durante el embarazo con incrementos en el riesgo de enfermedad vascular posterior. Las mujeres que han tenido recién nacidos de bajo peso o complicaciones como preeclampsia, parecieran estar con un riesgo varias veces aumentado de mortalidad por causas cardiovasculares y deberían ser monitoreadas en otros factores de riesgo en forma precoz^(45,46). Apoyando esta teoría, se ha demostrado que mujeres con historia de preeclampsia tienen alteraciones en los parámetros lipídicos (con patrón aterogénico) y mayor susceptibilidad a la oxidación de las lipoproteínas de

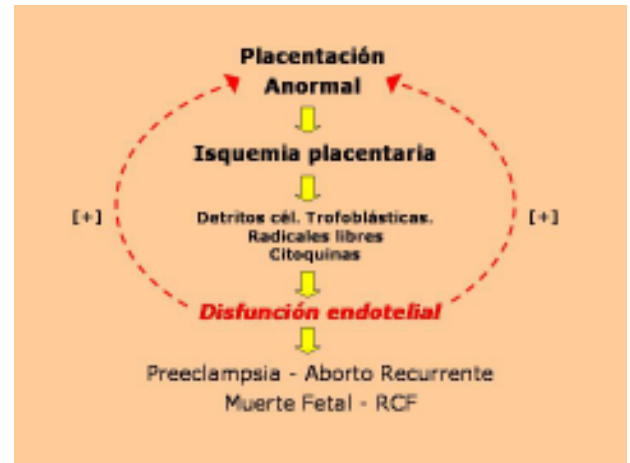


Figura 5. Falla reproductiva de origen isquémico. Hipótesis. La isquemia placentaria, generada por la placentación anormal, produce liberación de factores nocivos que adhieren al endotelio, favoreciendo una disfunción endotelial preexistente la que a su vez dificulta aún más el proceso de placentación ^(32, 42).

baja densidad que difieren significativamente de aquellas sin historia de preeclampsia⁽⁴⁷⁾. Como ya se mencionó, la isquemia placentaria y liberación de moléculas pro-oxidantes e inflamatorias tiene efectos nocivos sobre la vasculatura materna susceptible y posterior al embarazo la disfunción microvascular permanece en una fase subclínica hasta que, con el incremento de la edad y la exposición a factores de riesgo clínicos como obesidad, sedentarismo, uso de tabaco, hacen que el cuadro clínico cardiovascular se manifieste⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾. Nuestros datos indican que estas pacientes tienen una mayor prevalencia de historia familiar de enfermedad vascular (datos no publicados).

De tal modo, estrategias que permitan comprender el proceso de disfunción endotelial en la etapa reproductiva, y revertir parte de las anomalías, pueden tener un impacto desde el punto de vista de la salud cardiovascular en la vida adulta.

EVALUACIÓN ULTRASONOGRÁFICA DOPPLER Y AUMENTO DE LA RESISTENCIA VASCULAR UTERINA

Como se mencionó, el defectuoso desarrollo del proceso de pseudo vasculogénesis resulta en una inadecuada remodelación de las arterias espirales maternas, llevando a un aumento en la resistencia vascular de carácter persistente, con lo que la

perfusión placentaria no logra cubrir las demandas del feto en crecimiento.

Con la introducción del Doppler color y las pruebas de ultrasonido transvaginal, como método de evaluación no invasivo, ha sido posible investigar de forma más eficiente la circulación útero placentaria durante la gestación temprana⁽⁵²⁻⁵⁵⁾. Los estudios realizados han confirmado que hay un incremento en la velocidad y volumen de flujo sanguíneo, disminución en la resistencia de las arterias uterinas y un dramático descenso en la resistencia de la arteria umbilical durante la primera mitad del embarazo normal. Existe en particular, un marcado cambio hacia finales del primer trimestre entre las 11-16 semanas de gestación. La coordinación de estos cambios refleja la dinámica materno-fetal que resulta crítica para el adecuado desarrollo de la unidad feto-placentaria. Diferentes estudios evidencian la utilidad del estudio de esos cambios que ocurren precozmente durante el embarazo y su correlación con el resultado obstétrico, varias semanas más tarde⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾.

Evaluaciones con ultrasonido Doppler color entre las 12 y 16 semanas de gestación demuestran que aquellas pacientes que presentan escotaduras bilaterales y un aumento del promedio del índice de resistencia de las arterias uterinas evidencian un aumento en el riesgo de desarrollar preeclampsia, restricción del crecimiento fetal y parto prematuro (Razón de odds = 43.54; IC 95% [5.84 - 324.7]; 8.6 IC [4.0 - 20] y 2.38 IC [1.7 - 4.0] respectivamente)⁽⁶⁰⁾. De estos hallazgos se desprende que, en población de riesgo, las medidas de prevención pueden ser más efectivas si se implementan antes de las 20 semanas de gestación (cuando la placenta está aún en formación). Algunos estudios han investigado la relación entre índices de resistencia evaluados mediante Doppler con las características histológicas de placentas de embarazos normales y de los que cursan con preeclampsia, confirmando una menor transformación vascular en embarazadas con preeclampsia. Sin embargo, la mayoría de tales ensayos se ha efectuado durante el tercer trimestre de embarazo o en placentas obtenidas después del parto, mucho después que la invasión trofoblástica ha finalizado^(61, 62).

Recientemente, fuerte evidencia en relación a la precocidad en la ocurrencia de los eventos que determinan el desarrollo de complicaciones gestacionales y de la utilidad de la evaluación ultrasonográfica temprana como herramienta de estudio del grado de invasión trofoblástica endovascular, la constituye el análisis histológico de

productos de la concepción obtenidos de embarazos interrumpidos por razones no médicas, entre las 10 y 14 semanas de gestación. Al separar las poblaciones de pacientes en relación al grado de invasión endovascular de la decidua y la resistencia vascular uterina utilizando ultrasonido Doppler. En términos cuantitativos se demostró un mayor porcentaje de vasos sanguíneos deciduales con invasión trofoblástica adecuada en los especímenes obtenidos de pacientes que presentaron un bajo índice de resistencia de arterias uterinas previo a la interrupción del embarazo, comparado con aquel observado en mujeres con un alto índice de resistencia vascular⁽⁷⁾.

Adicionalmente, los estudios ultrasonográficos han demostrado que el grado de la invasión trofoblástica durante el intervalo gestacional de 19 a 26 semanas inferidos a partir de los índices de resistencia uterina, afectan el resultado obstétrico y el peso de nacimiento^(7,60,63-65).

En embarazos no complicados con preeclampsia, el momento de desaparición de las escotaduras que indican aumento de la resistencia uterina durante el transcurso del primer al segundo trimestre de embarazo está significativamente correlacionado con el peso del recién nacido. La presencia de un bajo índice de resistencia en la circulación uterina entre las 11 y 14 semanas de gestación está asociado con un mayor peso de nacimiento, mientras que la presencia de escotaduras bilaterales entre las 18-23 semanas, que sugieren una pobre invasión trofoblástica de las arterias espirales maternas, se asocian a pesos del recién nacido más bajos⁽⁶⁶⁾. Se reporta que la prevalencia de recién nacidos pequeños para la edad gestacional es aproximadamente el doble en aquellas gestaciones en las que la caída de la resistencia uterina ocurre en forma tardía o se mantiene en el segundo trimestre, comparado con la prevalencia observada en embarazadas en las cuales dicha caída ocurre entre las 11-14 semanas de gestación, estableciéndose que estas últimas tienen un 60% de menor riesgo de un parto con un recién nacido pequeño para la edad gestacional⁽⁶⁵⁾. Así, se sugiere que incluso en embarazos sanos, la variación longitudinal del patrón de flujo arterial uterino y la ausencia de escotaduras diastólicas tempranas tienen una significativa trascendencia: mientras más temprana es la reducción de la resistencia uterina, se obtiene una más exitosa placentación, mayor peso de nacimiento y una menor frecuencia de complicaciones en el embarazo^(7,61,63).

Datos recientes apoyan la teoría de que un alto índice de resistencia vascular uterina y la presencia

de escotaduras contribuyen de forma independiente al peso de nacimiento, y que por lo tanto, la medición de estos dos parámetros refleja aspectos distintos de la respuesta vascular: el índice de resistencia reflejaría la impedancia al flujo sanguíneo mientras que las escotaduras revelan la distensibilidad de los vasos, es decir su capacidad de respuesta⁽⁵⁶⁻⁵⁷⁾, por lo que se sugiere que los programas de monitoreo con Doppler deberían utilizar una combinación de estas dos variables en la selección de pacientes para programas de prevención primaria o secundaria.

Adicionalmente al estudio de la resistencia vascular uterina a las 25 semanas, existe evidencia que en pacientes normotensas con escotaduras bilaterales existe una menor DMF que en pacientes controles, lo que además se acompaña de menores niveles de de nitritos/nitros en plasma evidenciando que la menor dilatación mediada por flujo puede estar relacionada con una menor síntesis de NO⁽⁶⁷⁾.

Finalmente, estudios observacionales confirman la presencia precoz (23-25 semanas de gestación) de disfunción endotelial en mujeres con escotadura en las arterias uterinas y que posteriormente desarrollan complicaciones como preeclampsia y restricción del crecimiento fetal, lo que apoya la teoría de que la disfunción endotelial es un factor adicional requerido para la manifestación de preeclampsia⁽⁶⁸⁾. El grado del defecto observado fue al menos tan severo como el descrito en pacientes con presencia de factores de riesgo cardiovascular⁽⁶⁹⁾. Más aún, una dilatación mediada por flujo reducida (<5%) precede el desarrollo de preeclampsia en alrededor de 10 semanas sugiriendo un rol de tipo causal o bien un marcador adicional de los eventos iniciales más que una consecuencia de la preeclampsia establecida. Esta asociación lleva a considerar que el valor predictivo del ultrasonido Doppler transvaginal puede ser optimizado como test de evaluación de riesgo de desarrollo de complicaciones al ser combinado con el estudio de la función endotelial materna permitiendo además implementar en forma temprana medidas terapéuticas.

La evaluación con ultrasonido Doppler ha mostrado tener un buen valor predictivo para preeclampsia y retardo del crecimiento intrauterino en la población general⁽⁷⁰⁻⁷²⁾, si bien algunos estudios han encontrado resultados opuestos^(59,73,74) generando debate acerca de su utilidad pronóstica. Adicionalmente, aún existe controversia en relación a las intervenciones y esquemas más frecuentemente implementados frente a flujos uterinos anormales detectados durante el segundo trimestre del

embarazo⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾. Estos reportes contradictorios pueden explicarse por los diferentes criterios utilizados en relación a la definición de preeclampsia y restricción del crecimiento fetal; los métodos de Doppler implementados (de onda continua v/s onda pulsada); características de la población estudiada; valores de puntos de corte utilizados en identificar los casos positivos/negativos; la edad gestacional al momento de examen y a la administración de diferentes tratamientos.

INTERVENCIONES PREVENTIVAS EN PACIENTES CON SFROI

Antiagregantes plaquetarios. La débil vasodilatación asociada con la ausencia o insuficiente invasión de las arterias espirales, resulta en el desarrollo de microtrombosis la que a su vez causa lesiones endoteliales con alteraciones en los mecanismos de regulación y síntesis de prostaglandinas, particularmente prostaciclina PGI₂, un vasodilatador y del vasoconstrictor tromboxano A₂ (TXA₂). La síntesis de estos compuestos es mediada por la acción de la enzima ciclooxigenasa (COX) y la aspirina es un inhibidor de ella. Disminuyendo la producción de TXA₂, se modifica la relación PGI₂/TXA₂ y se tiende a reestablecer el balance fisiológico alterado por la falla en la pseudovasculogénesis (revisado en la referencia 77). La administración continua de aspirina a dosis en rangos que van de 0.3 a 1.5 mg/kg/día pareciera inhibir la actividad de COX plaquetaria más efectivamente que la actividad de la enzima en células endoteliales. Estas últimas son nucleadas y pueden resintetizar la enzima, en cambio las plaquetas al ser anucleadas permanecen con la enzima inactiva. Sólo la formación de nuevas plaquetas puede renovar la síntesis de TXA₂ pero resultan incapaces de producirlo debido a que la administración de aspirina es mantenida. Por el contrario la células endoteliales renuevan PGI₂ considerablemente rápido. De acuerdo a esto, es importante prescribir un tratamiento profiláctico con aspirina en embarazos en los cuales las mujeres tienen síndrome antifosfolípidos. Sin embargo, la terapia con bajas dosis de aspirina resulta inefectiva en pacientes con enfermedades como la hipertensión crónica, nefropatía, transplante renal o diabetes mellitus⁽⁷⁸⁾.

Por otro lado, la ausencia de evidencia que apoye el uso de bajas dosis de aspirina en mujeres que presentan alteración de la resistencia uterina entre las 22 y 24 semanas de gestación⁽⁷⁹⁾, indica que es necesario comenzar el tratamiento lo más precozmente posible debido a las bases fisiopa-

tológicas ya revisadas. El tratamiento debe continuarse hasta las 35 semanas o por lo menos una semana antes de la fecha programada para el parto. En algunos casos, el tratamiento puede iniciarse antes de la concepción como en el caso de enfermedades autoinmunes en las que se combina con anticoagulantes como heparina.

La dosis óptima que debe ser utilizada no ha sido establecida. Lo habitual es comenzar con dosis de 100 a 150 mg/día basándose en el peso materno y el resultado de tiempo de sangría evaluado antes de iniciar el tratamiento (menor a 8 minutos). Luego de 10 a 15 días, tal prueba debe repetirse para realizar los ajustes necesarios en la dosis. Una variación en el tiempo de sangría mayor a 2 minutos antes y después de iniciado el tratamiento demuestra un grado de eficacia como terapia antiagregante, reduciendo el riesgo de desarrollo de complicaciones de origen isquémico⁽⁸⁰⁾. Sin embargo, cabe preguntarse la utilidad de la administración de aspirina a la luz de las observaciones que indican un reducido efecto y que la administración de heparinas de bajo peso molecular y otros suplementos como la L-Arginina pueden mejorar aún más la pseudovasculogénesis, utilizando mecanismos de acción adicionales que pueden ser de mayor utilidad.

Anticoagulantes. El uso de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) o heparina no fraccionada han sido utilizados en forma aditiva al manejo con aspirina, en pacientes con vasculopatía de placenta con o sin trombofilias. La seguridad y efectividad de estas opciones es aún tema de controversia⁽⁸¹⁻⁸³⁾. Ensayos clínicos controlados, que han evaluado una combinación de heparina no fraccionada y bajas dosis de aspirina, revelan que la intervención es significativamente más efectiva en prevenir pérdidas fetales en mujeres con síndrome antifosfolípidos que la aspirina sola. Sin embargo, otro estudio controlado que evaluó la efectividad de HBPM y aspirina en la prevención de abortos asociados al síndrome antifosfolípidos, no mostró mejoría en la tasa de nacidos vivos al compararla con la obtenida al tratar con aspirina⁽⁸⁴⁾.

Datos sobre tratamiento de mujeres portadoras de trombofilias congénitas y abortos recurrentes, son predominantemente obtenidos de estudios no controlados e incluyen pequeñas series de pacientes tratadas principalmente con HBPM (Tabla III).

Nuestros datos en una cohorte de 28 pacientes con trombofilias congénitas y adquiridas muestran que la administración de HBPM se asocia a un 95% de embarazos sin complicaciones maternas del

embarazo (comparado con 100% de complicaciones en las gestaciones previas) y 91% de éxito reproductivo (recién nacido vivo > 28 semanas) comparado con un 25% en las gestaciones previas.

Los estudios prospectivos y randomizados están aún en curso, pero estos datos son promisorios aunque en pacientes muy seleccionadas. Estudios colaborativos y retrospectivos recientes, que incluyeron un considerable número de casos, han revelado un adecuado perfil de seguridad en el uso de HBPM^(85,86).

El uso de heparina en la práctica obstétrica tiene dos grandes indicaciones: 1. Mejorar el resultado obstétrico en mujeres con trombofilias. 2. En aquellas en las que las gestaciones previas han sido complicadas por SFROI. También es utilizada para prevenir y tratar la trombosis venosa que es la mayor causa de mortalidad materna en países desarrollados⁽⁸⁷⁾. Estas indicaciones se basan en la premisa de que algunas de las complicaciones son causadas por trombosis e infarto placentario y que la trombopprofilaxis con heparina podría prevenir estos procesos. Sin embargo datos recientes han desafiado estos fundamentos, encontrándose que no todas las trombofilias están asociadas con trombosis placentaria⁽⁸⁸⁾. La trombofilia más estudiada es el síndrome antifosfolípidos que se caracteriza por la presencia de anticuerpos anticardiolipina. El estudio histológico de placentas y deciduas obtenidas durante el primer trimestre de embarazo de pacientes con el síndrome, ha revelado escasa asociación con patología trombótica en esos tejidos. Existe evidencia de que el síndrome antifosfolípidos puede estar relacionado con inhibición directa de la invasión trofoblástica y sería ésta, más que la trombosis intervéllosa (que es un indicador morfológico más tardío), el primer eslabón en la génesis de las complicaciones observadas⁽⁸⁹⁻⁹²⁾.

En adición a sus efectos anticoagulantes, la heparina también se une a factores de crecimiento que son considerados importantes en la invasión trofoblástica y desarrollo de la placenta. Por ejemplo, una deficiente señalización de HB-EGF durante la placentación afecta la sobrevida, diferenciación e invasión del trofoblasto, genera una menor perfusión placentaria e hipertensión en la preeclampsia⁽¹⁵⁾. Los factores VEGF, PGF y HGF son importantes reguladores de la invasión del trofoblasto extravéllosa. El activador endógeno de estos factores de crecimiento es el heparan sulfato, proteoglicano constituyente de la matriz extracelular. Tanto HB-EGF, como VEGF, PGF y EGF tienen sitios de unión

TABLA III.
ESTUDIOS OBSERVACIONALES EN PREVENCIÓN DE UN POBRE RESULTADO OBSTÉTRICO
EN PACIENTES CON TROMBOFILIA

Autor – Año (nº pacientes)	Historia Obstétrica	Tratamiento	Nacidos vivos normales
Brenner - 2000 n = 50	AH	Enoxiparina (+ AA en SAF)	46/61 (75%)
Grandone - 2002 n = 25	AH – PE – RCF	HBPM o AA o HNF	29/31 (93%)
Kupfermine - 2001 n = 33	Complicaciones gestacionales	40 mg Enoxiparina o AA	30/33 (91%)
Germain – 2004 Û n = 28	SFROI	Nadroparina o Deltaparina	27/28 (95%)
Riyazi - 1998 26 casos/ 19 controles*	Complicaciones gestacionales	40 mg Enoxiparina o AA	>peso nacimiento en grupo HBPM
Carp – 2003 37 casos/ 48 controles*	AH	40 mg Enoxiparina	70% vs 44% en controles

AH = aborto habitual; PE = preeclampsia; RCF; restricción del crecimiento fetal; HBPM = Heparina de bajo peso molecular; AA = aspirina; HNF = heparina no fraccionada. Û En preparación. * Controles históricos.

para heparan sulfato. Al producirse la unión se gatilla la activación del factor de crecimiento, el que se une a su receptor específico produciendo su acción. Este proceso puede ser farmacológicamente activado utilizando HBPM. La evidencia que sustenta este mecanismo de acción ha sido dilucidado recientemente. En experimentos con trofoblasto extraveloso obtenido de corion de placentas humanas de término, la administración de HBPM en dosis equivalentes a las terapéuticas (7500 U cada 12 horas), evita la diferenciación del trofoblasto favoreciendo su invasividad^(93,94). Por lo tanto, cualquier diferencia en la capacidad de unión de HBPM o heparina no fraccionada con los factores de crecimiento puede explicar los diferentes efectos sobre la invasión trofoblástica observados en los estudios *in vitro*.

Adicionalmente a su efecto sobre la activación de factores de crecimiento estudios *in vitro* realizados en plasma obtenido de pacientes con síndrome

antifosfolípidos, reportan una significativa reducción, dosis-dependiente, en la unión de las células trofoblásticas con inmunoglobulinas G, al adicional al medio de cultivo HBPM. Esto logra el reestablecimiento de la invasión y diferenciación del trofoblasto, efecto no observado al utilizar aspirina⁽⁹⁵⁾.

En el intertanto, es recomendable que mujeres con trombofilias, en el siguiente embarazo debería ofrecérseles HBPM a dosis terapéuticas iniciadas en forma temprana luego de diagnosticado el embarazo y continuándolas durante toda la gestación hasta 6 semanas post parto⁽⁹⁶⁾.

Finalmente, el rol del uso de esquemas antitrombóticos debe ser evaluado mediante estudios clínicos prospectivos en orden a mejorar los resultados en grandes poblaciones de mujeres que experimentan SFROI y que por lo tanto entreguen evidencia acerca del uso de HBPM en esta condición. **L-Arginina.** La vía de la L-Arginina-NO actúa en la regulación de la circulación uteroplacentaria. En las

gestaciones normales, los niveles plasmáticos de L-Arginina disminuyen y en aquellas que presentan desórdenes relacionados con la placentación como preeclampsia y restricción del crecimiento fetal, los niveles plasmáticos de L-Arginina son incluso menores⁽⁹⁷⁾. En la rata preñada, la restricción en la ingesta de L-Arginina durante la gestación genera una reducción en el peso fetal y placentario y una alta mortalidad perinatal⁽⁹⁸⁾. En el modelo natural de restricción de la captación celular de L-Arginina, “*la intolerancia a la proteína lisúrica*” se ha reportado una deficiencia crónica de NO y en los pocos embarazos documentados, se observa una frecuencia de hasta un 50% de desórdenes relacionados con la placentación⁽⁹⁹⁾. Durante el embarazo, la síntesis de NO aumenta y en modelos animales, la inhibición de la síntesis de NO reduce el crecimiento fetal y genera un síndrome similar a la preeclampsia, el que puede ser revertido por la suplementación de L-Arginina^(100,101). En mujeres no embarazadas, el aumento de la disponibilidad de NO utilizando liberadores de NO o la inhibición de la degradación de GMPc, el segundo mensajero de NO, ha sido asociado con un alto flujo sanguíneo uterino⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾. Durante las gestaciones tempranas o tardías los liberadores de NO mejoran el flujo sanguíneo de las arterias uterinas y la perfusión fetal, mientras que en gestaciones tardías la administración de L-Arginina reduce la presión arterial sistémica, mejora el crecimiento fetal y el flujo sanguíneo de las arterias uterinas⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾. Recientemente se ha reportado que en placenta de gestaciones con retardo del crecimiento intrauterino, los niveles de expresión de los transportadores de aminoácidos catiónicos 1 y 2 (CAT-1 y CAT-2) están reducidos, lo que si bien podría ser una consecuencia de la isquemia placentaria y no la causa del problema, entrega elementos para sostener el rol de estos sistemas de transporte de L-Arginina en el crecimiento fetal⁽¹⁰⁷⁾. Más aún, al suplementar pacientes con restricción del crecimiento fetal con L-Arginina, la velocidad de crecimiento y la frecuencia de restricción de crecimiento fetal mejoran en forma importante⁽¹⁰⁸⁾. Los efectos benéficos observados durante la suplementación con L-Arginina parecen deberse a la mejoría en la disponibilidad de NO, ya sea aumentando su síntesis o desplazando sustancias que limitan su acción.

Dimetilarginina asimétrica. Un inhibidor endógeno de NOS. Estudios han mostrado que la deficiente biodisponibilidad de NO, que genera disfunción endotelial, podría deberse a un aumento de los niveles

plasmáticos de inhibidores endógenos competitivos de la NOS. Se han identificado a N^G-N^G-dimetilarginina asimétrica (ADMA) y su estereoisómero SDMA, ambos se encuentran en plasma y orina, aunque ADMA presenta niveles hasta 10 veces mayores que SDMA⁽¹⁰⁹⁾.

ADMA, que fue descrita a inicios de la década de los 90, ha concitado gran interés, ya que sus niveles están inversamente correlacionados con la función endotelial y positivamente asociados con factores de riesgo cardiovascular y preeclampsia^(68,110-113). Fisiológicamente, ADMA es sintetizada a través de metilación de residuos de arginina, por acción de la enzima arginina N-metiltransferasa y es secretada, como paso obligado en el recambio proteico. ADMA es producida normalmente en muchos tipos celulares incluyendo las células endoteliales y es removida por excreción renal en la orina y por su catabolismo. Se cataboliza a citrulina por acción de la enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH), de la que se han caracterizado dos isoformas, DDAH I y II⁽¹¹⁴⁾.

ADMA es un buen candidato como regulador fisiológico de la NOS. En adición a su efecto inhibitor sobre NOS, se ha demostrado que compite con el transporte L-Arginina a través de las membranas de células endoteliales⁽¹¹⁵⁾ y puede además alterar la producción de NO reduciendo la disponibilidad de L-Arginina.

En pacientes con aterosclerosis, las concentraciones plasmáticas de ADMA son consideradas un predictor independiente de futuros eventos cardiovasculares⁽¹¹⁶⁾. Se ha descrito en células endoteliales en cultivo que la reducción de la actividad de DDAH, determina un alza de ADMA, en presencia de LDL oxidadas y TNF- α ⁽¹¹⁷⁾ y la inhibición farmacológica de DDAH con L-NMNA causa vasoconstricción de segmentos vasculares, sugiriendo que los cambios en la concentración de ADMA a través de esta vía son relevantes para el control del tono vascular⁽¹¹⁸⁾. Sin embargo, los datos disponibles acerca de su metabolismo son limitados. Líneas de investigación recientes plantean que los efectos vasculares de aumento en las concentraciones de ADMA plasmáticos no sólo son mediados por la simple inhibición de la síntesis de NO, situación que se daría cuando los incrementos son agudos, sino que la acumulación mantenida activaría a la enzima convertidora de angiotensina y generar un aumento del estrés oxidativo a través del receptor de angiotensina tipo II, eventos que determinan la generación de lesiones vasculares⁽¹¹⁹⁾.

Aunque la información de embarazos humanos es compleja, se ha observado que durante la gestación normal, las concentraciones de ADMA maternas caen aproximadamente hasta la semana 24 de gestación donde se incrementan para alcanzar los niveles preconcepcionales que se mantienen hasta el término del embarazo⁽¹²⁰⁾. Estos cambios se asocian con la caída inicial y subsiguiente alza en el tono vascular y presión sanguínea de la madre durante una gestación normal^(120,121), lo que puede ser explicado por un aumento en la actividad de DDAH. Se ha observado que los niveles de ADMA son significativamente menores en el primer y tercer trimestre de embarazo en comparación con mujeres no embarazadas^(121,122), sugiriendo que la reducción en los niveles circulantes de ADMA facilitan la vasodilatación inducida por NO durante el embarazo normal. Además que los niveles de ADMA sean mayores en pacientes con preeclampsia, incluso en forma previa a la aparición de hipertensión, apoya esta hipótesis⁽⁶⁸⁾. Se ha reportado recientemente que las concentraciones de ADMA son 3 a 4 veces mayores en el plasma fetal que en el materno⁽¹²³⁾. La implicancia clínica de estos hallazgos es desconocida. Aunque previamente se ha evidenciado que las concentraciones de ADMA están aumentadas en mujeres con preeclampsia establecida, los niveles de ADMA están incrementados en aquellas pacientes con escotaduras bilaterales de arterias uterinas, muchas de las cuales desarrollan preeclampsia en forma precoz durante el embarazo, incluso antes de que se manifiesten los signos clínicos del síndrome hipertensivo. Esto sugiere un rol de tipo causal en la preeclampsia⁽⁶⁸⁾. Sin embargo, en este estudio no todas las mujeres con ADMA plasmáticos aumentados desarrollaron el cuadro clínico, aunque todas las que sí lo hicieron tuvieron niveles superiores a 1.45 mmol/L. En estas últimas, existe una notable correlación inversa entre la DMF y las concentraciones de ADMA. El por qué de esta aparente sensibilidad diferente y aumentada del endotelio de pacientes que desarrollan preeclampsia frente a elevados niveles de ADMA no ha sido dilucidado.

Nuestros datos apoyan el beneficio de la suplementación con L-Arginina en pacientes que presentaron defectos de placentación. Esta intervención se basó en la hipótesis de que un subgrupo de pacientes con preeclampsia severa en gestaciones previas o abortos recurrentes presentan disfunción endotelial como factor primario durante el período no gestacional, y que estas pacientes en ausencia de una causa establecida, se beneficiarían de un aumento de la vía L-Arginina-NO a través de

la suplementación de L-Arginina. En gestaciones tempranas, mejoraría la función endotelial, la placentación y el flujo sanguíneo uteroplacentario y su uso a largo plazo durante el embarazo podría relacionarse con un mejor resultado materno y perinatal.

Durante la primera fase de nuestro estudio, se realizó la evaluación a mujeres con antecedentes de preeclampsia severa (n = 29), de aborto habitual (n = 36) y un grupo control (n = 22). Se realizaron estudios en el día +10 del ciclo ovulatorio, lo que fue comprobado ecográficamente según el desarrollo de tejido endometrial y el aspecto ultrasonográfico del ovario. Se evaluó el promedio del índice de pulsatilidad y de resistencia de arterias uterinas mediante ultrasonografía Doppler color, seguido de estudio de función endotelial con ultrasonografía de arteria braquial para determinar la vasodilatación mediada por flujo en respuesta a hiperemia (dependiente de endotelio) y posterior a la administración de nitroglicerina sublingual para evaluar la vasodilatación independiente de endotelio. Los grupos fueron comparables en variables de edad e índice de masa corporal. Las presiones arteriales diastólicas y sistólicas fueron significativamente mayores –aunque siempre dentro de los rangos normales– en el grupo con historia previa de preeclampsia comparada con los controles y aquellas con historia de aborto habitual. Respecto de la evaluación de índice de resistencia y de pulsatilidad, no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos, sin embargo la evaluación de la función endotelial, reveló una significativa menor vasodilatación mediada por endotelio en el grupo de mujeres con historia de preeclampsia e incluso menor en las con historia de aborto habitual comparada con los controles, presentando un compromiso severo (<4.5%) el 40 % y 50% en preeclámpticas y abortadoras habituales respectivamente.

Nuestros resultados confirman que en pacientes con mala historia obstétrica de origen isquémico, es factible pesquisar en estado no grávido, alteraciones vasculares reflejadas en una menor respuesta vasodilatadora del endotelio, las que en el embarazo podrían representar una anormalidad que limita la pseudovasculogénesis trofoblástica.

El paso siguiente fue intervenir en forma prospectiva, doble ciego, aleatoria, controlada con placebo y *cross-over* a 16 mujeres con FROI y disfunción endotelial severa de etiología desconocida, sin trombofilias congénitas ni adquiridas. Las pacientes que mostraban ciclos menstruales

ovulatorios fueron suplementadas con L-Arginina por vía oral (0.1 g/kg/día) o placebo durante 3 ciclos menstruales con un período de *wash-out* intermedio. El día 24 de cada ciclo menstrual (día teórico de la implantación), se evaluó la dilatación mediada por flujo en arteria braquial, resistencia vascular uterina y el grosor endometrial mediante ultrasonografía Doppler además de la relación L-Arginina/ADMA. La suplementación con L-Arginina generó una mejoría significativa de la función endotelial desde $-0.1 \pm 1.1\%$ a $11.8 \pm 2.7\%$ (promedio \pm ES, $p < 0.05$) y un incremento de la relación L-Arginina/ADMA en un 53.4% respecto a los niveles basales y en un 42% comparado con placebo. No encontramos diferencias significativas en la resistencia vascular uterina ni en el grosor endometrial. La falta de aumento en la dilatación arterial apoya la hipótesis de que estas modificaciones (que se observan durante el embarazo) no son el resultado directo sobre las arterias uterinas, sino que sobre la invasión trofoblástica. Nuestros resultados indican que en pacientes con antecedentes de FROI y disfunción endotelial de origen no precisado en periodo no gestacional, la suplementación con L-Arginina es capaz de mejorar la disfunción endotelial. Este efecto es probablemente mediado a través de la remoción del inhibidor endógeno de eNOS, la ADMA como lo refleja la variación de la razón L-Arg/ADMA observada. Esto apoya nuestra hipótesis de que un metabolismo anormal de la L-Arginina puede estar presente en algunas pacientes con FROI y, que en ellas la prevención secundaria durante la planificación de un embarazo o la gestación temprana podría reducir la recurrencia de FROI⁽⁴²⁾.

Posteriormente, se realizó una intervención de similar diseño en 17 embarazadas con aumento de la resistencia vascular uterina y escotaduras bilaterales persistentes evaluadas con ultrasonido transvaginal en dos tiempos separados por 2 semanas (semana -2 y 0), 15 de ellas tenían antecedentes de SFROI en gestaciones previas. La función endotelial se evaluó con ultrasonografía de arteria braquial. Ninguna de las pacientes incluidas presentaba trombofilias congénitas ni adquiridas. Se les suplementó con L-Arginina 0.1 g/kg/día desde las 10.1 ± 0.9 (promedio \pm ES) semanas de gestación hasta el parto. Luego de dos semanas de intervención, el promedio de presión arterial y el índice de resistencia de arterias uterinas disminuyó significativamente y la vasodilatación mediada por endotelio aumentó de forma significativa. Todas las mujeres tuvieron partos de término (38.0 ± 1.1

semanas de edad gestacional) excepto una (parto a las 35 y media semanas de gestación) con un recién nacido de peso normal (3540 g) y sólo una desarrolló preeclampsia moderada. La tolerancia materna a la suplementación fue adecuada y los recién nacidos no presentaron efectos adversos al parto ni durante los 2 a 48 meses de seguimiento⁽¹²⁴⁾.

Nuestros datos muestran que el aumento agudo de la vía L-Arginina-NO aminora las adaptaciones locales y sistémicas del embarazo. Mientras que la mejoría de resultado perinatal si bien puede representar una remisión espontánea, es sugerido un efecto benéfico de L-Arginina, debido a que nueve de las 17 mujeres previamente presentaron dos o más complicaciones relacionadas con la placentación y las pacientes con esta historia clínica tienen tasas de preeclampsia o pérdidas de 40% a 60%, respectivamente. Más aún, todas las mujeres incluidas en esta intervención presentaron escotaduras bilaterales en forma temprana, índice asociado a una razón de odds (OR) de 42.02, 8.61 y 2.38 para preeclampsia, restricción del crecimiento fetal y parto prematuro, respectivamente⁽⁷⁵⁾. Estos datos apoyan la recomendación de desarrollar ensayos clínicos de suplementación con L-Arginina, como ha sido sugerido también por otros autores^(125,126). El mecanismo subyacente que media los efectos benéficos de la suplementación con L-Arginina sobre la resistencia vascular uterina, puede involucrar un aumento en la producción de NO así como una mayor pseudovasculogénesis trofoblástica, mejorando la placentación. La evaluación clínica, determinaciones de ADMA, L-Arginina y nitritos plasmáticos aún en curso nos ayudarán en la comprensión de su modo de acción.

Como ya fue mencionado, el efecto benéfico de la suplementación con L-Arginina sobre los vasos sanguíneos se debe a un aumento en la producción de NO. Adicionalmente también podría tener efecto sobre los vasos sanguíneos fetales. Sin embargo, es posible que tenga un efecto sobre el trofoblasto. Aunque la expresión de eNOS por el trofoblasto es un tema aún controversial^(127,128), se ha observado una menor actividad de NO e incremento del grado de estrés oxidativo en placentas de embarazadas preeclámpticas⁽¹²⁶⁾. Nuestros datos preliminares demuestran que la suplementación con L-Arginina a largo plazo -20 semanas- presenta una mayor expresión de eNOS en células endoteliales de arteria umbilical (Figura 6). Esto apoya el rol suplementación con L-Arginina en mejorar las adaptaciones vasculares materno fetales. Sobre el trofoblasto, la

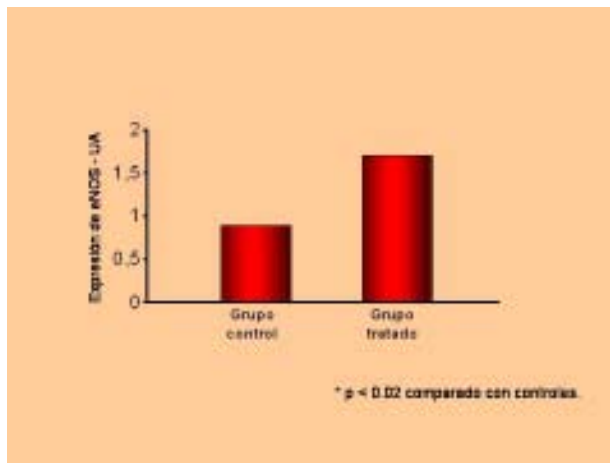


Figura 6. Efecto de la suplementación a largo plazo con L-Arginina sobre la expresión de eNOS. Medición con inmunohistoquímica de la expresión de eNOS en arteria umbilical de pacientes con aumento de la resistencia vascular en las arterias uterinas tratadas con L-Arginina durante 20 semanas comparada con grupo control no tratado.

administración de L-Arginina podría aumentar la producción de NO por el trofoblasto lo que puede: a) favorecer la migración/invasión dado su efecto estimulador (en células endoteliales) de la expresión de integrinas $\alpha v\beta 3$, clave en el proceso de invasión trofoblástica^(13,30); b) en conjunto con VEGF-HGF, podría estimular la migración del trofoblasto^(31,129,130) y c) modificar el patrón de moléculas de adhesión de tal manera de favorecer la adhesión del trofoblasto al endotelio de las arteriolas uterinas^(13,30,31,131). Nuestros datos preliminares en sistemas de invasión *in vitro* han demostrado que la adición de L-Arginina es capaz de aumentar la proliferación e invasión del trofoblasto.

Sin embargo, existen otros mecanismos que también podrían estar jugando un importante rol. En las primeras evaluaciones de los efectos obtenidos durante estudios de suplementación con L-Arginina se observó que: a) en adultos con enfermedades cardiovasculares, las modificaciones de la función endotelial no son exclusivamente producidos por administración de L-Arginina sino que también por la administración de su isómero D-Arginina⁽¹³²⁾, que no es sustrato de NOS y b) en un modelo animal de hipertensión inducida durante el embarazo (hiperinsulinemia crónica exógena), la administración de L-Arginina evita tanto el aumento de la presión

arterial como la restricción del crecimiento observada⁽¹³³⁾. Sin embargo, no se demostró un aumento de la síntesis de NO. Esto sugiere que los efectos pueden ser mediados por mecanismos NO independientes.

Se ha documentado la existencia de varios otros mecanismos para la acción y los efectos benéficos obtenidos con el uso de L-Arginina (Figura 7):

- A. Efectos vasculares o no vasculares mediados por la secreción de insulina, IGF-1 o HCG (gonadotropina coriónica)⁽¹³⁴⁻¹³⁶⁾.
- B. Aumento de la producción de: Poliaminas (putrescina, cadaverina, espermidina y espermina), Glutamato y Agmatina. Estos agentes que están activamente involucrados en el crecimiento, proliferación y desarrollo celular y en la regulación de la actividad de la NOS. En trofoblasto humano de primer trimestre existen altos niveles de poliaminas comparados con el tercer trimestre. Se ha reportado que la putrescina inhibe la actividad de NOS en una línea celular el trofoblasto (beWo), lo que podría indicar un rol en el proceso de placentación^(137,138).
- C. Efecto antioxidante directo. L-Arginina favorecería la síntesis de tetrahidrobioterina (BH_4) y la actividad de NOS, disminuyendo la producción de radical superóxido⁽¹³⁹⁻¹⁴⁰⁾.
- D. Aunque la evidencia es aún escasa, se ha postulado que L-Arginina podría influir la actividad /expresión de varias enzimas involucradas en el metabolismo del aminoácido, como la sobre expresión de arginasas y/o en las enzimas que regulan la síntesis y degradación del inhibidor endógeno ADMA (PMRT-I y DDAH-II)⁽¹⁴¹⁻¹⁴³⁾.

Es claro que la estructuración anormal de la placenta (después de las 20 semanas) no puede ser revertida y la intervención posterior al defecto placentario establecido es pobre. Se requieren estrategias de prevención primaria o secundaria y el tratamiento de los desórdenes relacionados con la placentación tales como aborto recurrente, muerte fetal, preeclampsia, parto prematuro, restricción del crecimiento fetal, que deben considerar la intervención sobre la disfunción endotelial materna, previo a un embarazo planificado o en etapas tempranas de la gestación.

Necesitamos aún varios años de investigación básica y clínica antes de que estas estrategias destinadas a modificar la pseudovasculogénesis puedan ser implementadas en forma no restringida.

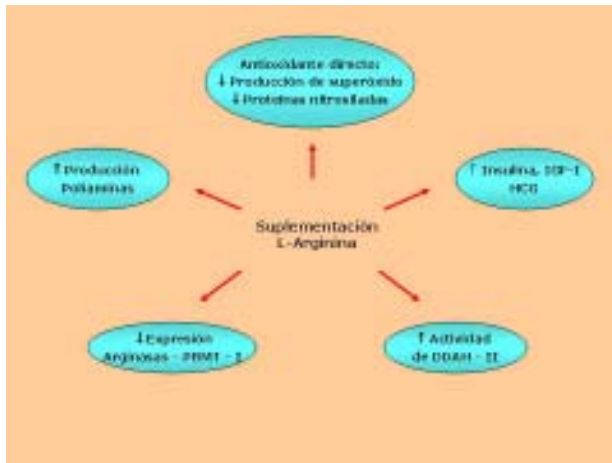


Figura 7. Posibles mecanismos de acción de L-Arginina.

El efecto beneficioso observado al aumentar las concentraciones plasmáticas de L-Arginina a través de la suplementación oral, no sólo se limita a un aumento en la producción de óxido nítrico, sino que involucra acciones tales como: estimulación de liberación, entre otros, de insulina –con efecto vasodilatador–; aumento en la producción de poliaminas; actividad antioxidante directa y potencialmente influye la actividad/expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de L-Arginina ⁽¹³⁸⁻¹⁴⁴⁾.

BIBLIOGRAFÍA

1. Michel MZ, Khong TY, Clark DA, Beard RW. A morphological and immunological study of human placental bed biopsies in miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol.* 1990 Nov; 97(11):984-8.
2. Khong TY, Sawyer IH. The human placental bed in health and disease. *Reprod Fertil Dev.* 1991;3(4):373-7.
3. Pijnenborg R. The origin and future of placental bed research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998 Dec;81(2):185-90.
4. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol.* 1994 Aug;101(8):669-74.
5. Arias F, Victoria A, Cho K, Kraus F. Placental histology and clinical characteristics of patients with preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol.* 1997 Feb; 89(2):265-71.
6. Germain AM, Carvajal J, Sanchez M, Valenzuela GJ, Tsunekawa H, Chuaqui B. Preterm labor: placental pathology and clinical correlation. *Obstet Gynecol.* 1999 Aug;94(2):284-9.
7. Prefumo F, Sebire NJ, Thilaganathan B. Decreased endovascular trophoblast invasion in first trimester pregnancies with high-resistance uterine artery Doppler indices. *Hum Reprod.* 2004 Jan;19(1):206-9.
8. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Falt G, Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med.* 1999 Jan 7;340(1):9-13.
9. Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertil Steril.* 1999 Nov;72(5):765-74.
10. Fazleabas AT, Kim JJ. Development. What makes an embryo stick? *Science.* 2003 Jan 17; 299 (5605): 355-6.
11. Cross JC, Wesb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: Key pieces of development puzzle. *Science* 1994; 266: 1508-1518.
12. Damsky CH, Fisher SJ. Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Oct; 10(5):660-6.
13. Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, Rayburn H, Crowley D, Ullman-Cullere M, Ross FP, Collier BS, Teitelbaum S, Hynes RO. Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest.* 1999 Jan;103(2):229-38.
14. Leach RE, Kilburn B, Wang J, Liu Z, Romero R, Armant DR. Heparin-binding EGF-like growth factor regulates human extravillous cytotrophoblast development during conversion to the invasive phenotype. *Dev Biol.* 2004 Feb 15;266(2):223-37.
15. Leach RE, Romero R, Kim YM, Chaiworapongsa T, Kilburn B, Das SK, Dey SK, Johnson A, Qureshi F, Jacques S, Armant DR. Pre-eclampsia and expression of heparin-binding EGF-like growth factor. *Lancet.* 2002 Oct 19;360(9341):1215-9.
16. Elenius K, Paul S, Allison G, Sun J, Klagsbrun M. Activation of HER4 by heparin-binding EGF-like growth factor stimulates chemotaxis but not proliferation. *EMBO J.* 1997 Mar 17;16(6):1268-78.
17. Iwamoto R, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000 Dec;11(4):335-44.
18. Raab G, Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Dec 9;1333(3):F179-99.
19. Michalsky MP, Kuhn A, Mehta V, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor decreases apoptosis in intestinal epithelial cells in vitro. *J Pediatr Surg.* 2001 Aug; 36(8):1130-5.
20. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science.* 1997 Sep 12; 277(5332):1669-72.
21. Marx J. Cell biology. How cells endure low oxygen. *Science.* 2004 Mar 5;303 (5663):1454-6.

22. De Marco CS, Caniggia I. Mechanisms of oxygen sensing in human trophoblast cells. *Placenta*. 2002 Apr;23 Suppl A:S58-68.
23. Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*. 2000 Mar-Apr;21 Suppl A:S25-30.
24. Caniggia I, Winter JL. Adriana and Luisa Castellucci Award lecture 2001. Hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic pregnancies—a review. *Placenta*. 2002 Apr;23 Suppl A:S47-57.
25. Schaffer L, Scheid A, Spielmann P, Breyman C, Zimmermann R, Meuli M, Gassmann M, Marti HH, Wenger RH. Oxygen-regulated expression of TGF-beta 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation. *Placenta*. 2003 Nov;24(10):941-50.
26. Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest*. 1999 Jun;103(12):1641-50.
27. 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 Feb;7(2):205-10.
28. Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta*. 1997 Nov;18(8):657-65.
29. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003 Mar;111(5):649-58.
30. Murohara T, Witzensbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 May;19(5):1156-61.
31. Radisavljevic Z, Avraham H, Avraham S. Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/Nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000 Jul 7;275(27):20770-4.
32. Reyes MS, Cuevas AM, Romanik MC, Valdés G, Germain AM. Función endotelial: Evaluación Ultrasonográfica e Implicancias Fisiopatológicas. *Rev Chil Ultrasonog* 2003; 6(3):72-94.
33. Preli RB, Klein KP, Herrington DM. Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. *Atherosclerosis*. 2002; 162(1):1-15.
34. Lyall F, Greer IA. The vascular endothelium in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Rev Reproduction* 1996; 1: 107-16.
35. Germain AM, Irribarra V, Valdés G y col. Evaluación ultrasonográfica de la función endotelial en niños y adultos chilenos. *Rev. Méd. Chile* 2004;132(4):437-444.
36. Dorup I, Skajaa K, Sorensen KE. Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium-dependent flow-mediated vasodilation. *Am J Physiol*. 1999 Mar;276 (3 Pt 2):H821-5.
37. Savvidou MD, Kametas NA, Donald AE, Nicolaides KH. Non-invasive assessment of endothelial function in normal pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2000 Jun;15(6):502-7.
38. Ness RB, Robert MJ. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: An hypothesis and its implication. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 1365-1370.
39. Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest*. 1996 Jan 15;97(2):540-50.
40. Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun SH, Fisher SJ. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in preeclampsia. *Am J Pathol*. 1997;151(6):1809-18.
41. Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM, Zhou Y. Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am J Pathol*. 2000 Jan;156(1):321-31.
42. Germain AM, Irribarra V, Faundez L, Valdés G. ¿Puede prevenirse la preeclampsia a través del reconocimiento de la disfunción endotelial primaria y de su manejo con L-Arginina? ¿Cómo ayuda el ultrasonido Doppler? *Rev Chil Ultrasonog*. 2001; 4 (3): 72-78.
43. Singhal A, Lucas A. Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis? *Lancet*. 2004 May 15;363(9421):1642-5.
44. Godfrey KM. The role of the placenta in fetal programming—a review. *Placenta*. 2002 Apr;23 Suppl A:S20-7.
45. Smith GC, Pell JP, Walsh D. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129.290 births. *Lancet*. 2001 Jun 23;357(9273):2002-6.
46. Smith GD, Harding S, Rosato M. Relation between infants' birth weight and mothers' mortality: prospective observational study. *BMJ*. 2000 Mar 25;320(7238):839-40.
47. Gratacos E, Casals E, Gomez O, Llorba E, Mercader I, Cararach V, Cabero L. Increased susceptibility to

- low density lipoprotein oxidation in women with a history of pre-eclampsia. *BJOG*. 2003 Apr;110(4):400-4.
48. Sattar N, Greer IA. Pregnancy complications and maternal cardiovascular risk: opportunities for intervention and screening? *BMJ*. 2002 Jul 20;325(7356):157-60.
 49. Anastasiou E, Lekakis JP, Alevizaki M, Papamichael CM, Megas J, Souvatzoglou A, Stamatelopoulos SF. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Care*. 1998 Dec;21(12):2111-5.
 50. Chambers JC, Fusi L, Malik IS, Haskard DO, De Swiet M, Kooner JS. Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia. *JAMA*. 2001. 28;285(12):1607-12.
 51. Agatista PK, Ness RB, Roberts JM, Costantino JP, Kuller LH, McLaughlin MK. Impairment of endothelial function in women with a history of preeclampsia: an indicator of cardiovascular risk. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Apr; 286(4):H1389-93.
 52. Deutinger J, Rudelstorfer R, Bernaschek G. Vaginosonographic velocimetry of both main uterine arteries by visual vessel recognition and pulsed Doppler method during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1988 Nov;159(5):1072-6.
 53. Jaffe R, Warsof SL. Transvaginal color Doppler imaging in the assessment of uteroplacental blood flow in the normal first-trimester pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1991 Mar;164(3):781-5.
 54. Jurkovic D, Jauniaux E, Kurjak A, Hustin J, Campbell S, Nicolaides KH. Transvaginal color Doppler assessment of the uteroplacental circulation in early pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1991 Mar;77(3):365-9.
 55. Thaler I, Manor D, Itskovitz J, Rottem S, Levit N, Timor-Tritsch I, Brandes JM. Changes in uterine blood flow during human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1990 Jan;162(1):121-5.
 56. Hollis B, Prefumo F, Bhide A, Rao S, Thilaganathan B. First-trimester uterine artery blood flow and birth weight. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2003 Oct;22(4):373-6.
 57. Lees C. Uterine artery Doppler: time to establish the ground rules. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2000 Dec;16(7):607-9.
 58. Hollis B, Mavrides E, Campbell S, Tekay A, Thilaganathan B. Reproducibility and repeatability of transabdominal uterine artery Doppler velocimetry between 10 and 14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001 Dec; 18(6):593-7.
 59. North RA, Ferrier C, Long D, Townend K, Kincaid-Smith P. Uterine artery Doppler flow velocity waveforms in the second trimester for the prediction of preeclampsia and fetal growth retardation. *Obstet Gynecol* 1994 Mar; 83(3):378-86.
 60. Harrington K, Goldfrad C, Carpenter RG, Campbell S. Transvaginal uterine and umbilical artery Doppler examination of 12-16 weeks and the subsequent development of pre-eclampsia and intrauterine growth retardation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1997 Feb; 9(2):94-100.
 61. Lin S, Shimizu I, Suehara N, Nakayama M, Aono T. Uterine artery Doppler velocimetry in relation to trophoblast migration into the myometrium of the placental bed. *Obstet Gynecol*. 1995 May; 85(5 Pt 1):760-5.
 62. Aardema MW, Oosterhof H, Timmer A, van Rooy I, Aarnoudse JG. Uterine artery Doppler flow and uteroplacental vascular pathology in normal pregnancies and pregnancies complicated by pre-eclampsia and small for gestational age fetuses. *Placenta*. 2001 May;22(5):405-11.
 63. Campbell S, Black RS, Lees CC, Armstrong V, Peacock JL. Doppler ultrasound of the maternal uterine arteries: disappearance of abnormal waveforms and relation to birthweight and pregnancy outcome. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000 Aug; 79(8):631-4.
 64. van den Elzen HJ, Cohen-Overbeek TE, Grobbee DE, Wladimiroff JW. The predictive value of uterine artery flow velocity waveforms in miscarriage in older women. *Br J Obstet Gynaecol*. 1993 Aug; 100(8):762-4.
 65. Martin AM, Bindra R, Curcio P, Cicero S, Nicolaides KH. Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by uterine artery Doppler at 11-14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001 Dec; 18(6):583-6.
 66. Prefumo F, Guven M, Ganapathy R, Thilaganathan B. The longitudinal variation in uterine artery blood flow pattern in relation to birth weight. *Obstet Gynecol*. 2004 Apr;103(4):764-8.
 67. Brodzki J, Lanne T, Stale H, Batra S, Marsal K. Altered vascular function in healthy normotensive pregnant women with bilateral uterine artery notches. *BJOG*. 2002 May;109(5):546-52.
 68. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frölich JC, Vallance P, Nicolaides. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet* 2003; 361: 1511-17.
 69. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992 Nov 7; 340 (8828):1111-5.
 70. Bower S, Schuchter K, Campbell S. Doppler ultrasound screening as part of routine antenatal scanning: prediction of pre-eclampsia and

- intrauterine growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol.* 1993 Nov; 100(11):989-94.
71. Bower S, Bewley S, Campbell S. Improved prediction of preeclampsia by two-stage screening of uterine arteries using the early diastolic notch and color Doppler imaging. *Obstet Gynecol.* 1993 Jul; 82(1):78-83.
 72. Haddad B, Uzan M, Breart G, Uzan S. Uterine Doppler wave form and the prediction of the recurrence of pre-eclampsia and intra-uterine growth retardation in patients treated with low-dose aspirin. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1995 Oct;62(2):179-83.
 73. Irion O, Masse J, Forest JC, Moutquin JM. Prediction of pre-eclampsia, low birthweight for gestation and prematurity by uterine artery blood flow velocity waveforms analysis in low risk nulliparous women. *Br J Obstet Gynaecol.* 1998 Apr;105(4):422-9.
 74. Goffinet F, Aboulker D, Paris-Llado J, Bucourt M, Uzan M, Papiernik E, Breart G. Screening with a uterine Doppler in low risk pregnant women followed by low dose aspirin in women with abnormal results: a multicenter randomised controlled trial. *BJOG.* 2001;108(5):510-8.
 75. Coomarasamy A, Papaioannou S, Gee H, Khan KS. Aspirin for the prevention of preeclampsia in women with abnormal uterine artery Doppler: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2001;98(5 Pt 1):861-6.
 76. Duley L, Henderson-Smart D, Knight M, King J. Antiplatelet drugs for prevention of pre-eclampsia and its consequences: systematic review. *BMJ.* 2001 Feb 10;322(7282):329-33.
 77. Uzan S. Aspirin and prevention of vascular complications: there are still indications. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2000; 15(1):4-6.
 78. Heyborne KD. Preeclampsia prevention: lessons from the low-dose aspirin therapy trials. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Sep;183(3):523-8.
 79. Subtil D, Goeusse P, Houfflin-Debarge V, Puech F, Lequien P, Breart G, Uzan S, Quandalle F, Delcourt YM, Malek YM; Essai Regional Aspirine Mere-Enfant (ERASME) Collaborative Group. Randomised comparison of uterine artery Doppler and aspirin (100 mg) with placebo in nulliparous women: the Essai Regional Aspirine Mere-Enfant study (Part 2). *BJOG.* 2003 May;110(5):485-91.
 80. Dumont A, Flahault A, Beaufile M, Verdy E, Uzan S. Effect of aspirin in pregnant women is dependent on increase in bleeding time. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Jan;180(1 Pt 1):135-40.
 81. Rai R, Cohen H, Dave M, Regan L. Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antiphospholipid antibodies). *BMJ* 1997; 314: 253-257.
 82. Brenner B, Hoffman R, Blumenfeld Z, et al. Gestational outcome in thrombophilic women with recurrent pregnancy loss treated by enoxaparin. *Thromb Haemost* 2000; 83: 693-697.
 83. Riyazi N, Leeda M, de Vries J, et al. Low-molecular-weight heparin combined with aspirin in pregnant women with thrombophilia and a history of preeclampsia or fetal growth restriction: a preliminary study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 80: 49-54.
 84. Farquharson RG, Quenby S, Greaves M. Antiphospholipid syndrome in pregnancy: a randomized, controlled trial of treatment. *Obstet Gynecol* 2002 Sep;100(3):408-13.
 85. Lepercq J, Conard J, Borel-Derlon A, Darmon JY, Boudignat O, Francoual C, Priollet P, Cohen C, Yvelin N, Schved JF, Tournaire M, Borg JY. Venous thromboembolism during pregnancy: a retrospective study of enoxaparin safety in 624 pregnancies. *BJOG.* 2001 Nov;108(11):1134-40.
 86. Sanson BJ, Lensing AW, Prins MH, Ginsberg JS, Barkagan ZS, Lavenne-Pardonge E, Brenner B, Dulitzky M, Nielsen JD, Boda Z, Turi S, Mac Gillavry MR, Hamulyak K, Theunissen IM, Hunt BJ, Buller HR. Safety of low-molecular-weight heparin in pregnancy: a systematic review. *Thromb Haemost.* 1999 May;81(5):668-72.
 87. Lewis G, Drife J. Why mothers die 1997-1999. London (UK):RCOG Press;2001.
 88. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet.* 2003 Mar 15;361(9361):901-8.
 89. Salafia CM, Cowchock FS. Placental pathology and antiphospholipid antibodies: a descriptive study. *Am J Perinatol.* 1997 ;14(8):435-41.
 90. Salafia CM, Parke AL. Placental pathology in systemic lupus erythematosus and phospholipid antibody syndrome. *Rheum Dis Clin North Am.* 1997 Feb;23(1):85-97.
 91. Sebire NJ, Fox H, Backos M, Rai R, Paterson C, Regan L. Defective endovascular trophoblast invasion in primary antiphospholipid antibody syndrome-associated early pregnancy failure. *Hum Reprod.* 2002 Apr;17(4):1067-71.
 92. Sebire NJ, Backos M, El Gaddal S, Goldin RD, Regan L. Placental pathology, antiphospholipid antibodies, and pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients. *Obstet Gynecol.* 2003 Feb;101(2):258-63.
 93. Quenby S, Mountfield S, Cartwright JE, Whitley GS, Vince G. Effects of low-molecular-weight and unfractionated heparin on trophoblast function. *Obstet Gynecol.* 2004 Aug;104(2):354-61.
 94. Weitz JI. Heparan sulfate: antithrombotic or not? *J Clin Invest.* 2003;111 (7):952-4.
 95. Di Simone N, Caliendo D, Castellani R, Ferrazzani S, De Carolis S, Caruso A. Low-molecular weight heparin restores in-vitro trophoblast invasiveness and differentiation in presence of immunoglobulin G

- fractions obtained from patients with antiphospholipid syndrome. *Hum Reprod.* 1999 Feb;14(2):489-95.
96. Sedano M, Germain AM. Síndrome anticuerpos antifosfolípidos y trombofilias genéticas. En: *Guía Perinatal*. Ed. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. 2003, Capítulo 23, pág. 333-357.
 97. Jerath V, Woniya A, Leslie KK. L-arginine and nitric oxide levels in pregnancy: Possible correlation with preterm labor and preeclampsia. *J Soc Gynecol Invest* 1999; 6 Suppl: 120A.
 98. Paul MY, Milner JA. Arginine deficiency during gestation and lactation in the rat. *J Nutr* 1981; 111:184-193.
 99. Kayanoki Y, Kawata S, Yamasaki E, Kiso S, Inoue S, Tamura S, Taniguchi N, Matsuzawa Y. Reduced nitric oxide production by L-arginine deficiency in lysinuric protein intolerance exacerbates intravascular coagulation. *Metabolism* 1999;48 (9):1136-1140.
 100. Salas SP, Altermatt F, Campos M, Giacaman A, Rosso P. Effects of long-term nitric oxide synthesis inhibition on plasma volume expansion and fetal growth in the pregnant rat. *Hypertension* 1995; 26:1019.
 101. Vosatka RJ, Hassoun PM, Harvey-Wilkes KB. Dietary L-arginine prevents fetal growth restriction in rats. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178 (2):242-246.
 102. Ramsay B, de Belder A, Campbell S, Mondaca S, Martin JF. A nitric oxide donor improves uterine artery diastolic blood flow in normal early pregnancy and in women at high risk of pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 76-78.
 103. Sher G, Fisch JD. Vaginal sildenafil (Viagra): a preliminary report of a novel method to improve uterine artery blood flow and endometrial development in patients undergoing IVF. *Hum Reprod* 2000; 15: 806-809.
 104. Facchinetti F, Longo M, Piccinini F, Neri I, Volpe A. L-arginine infusion reduces blood pressure in preeclamptic women through nitric oxide release. *J Soc Gynecol Invest* 1999; 6: 202-207.
 105. Cacciatore B, Halmesmaki E, Caja R, Teramo K, Ylikorkala O. Effects of transdermal nitroglycerin on impedance to flow in the uterine umbilical, and fetal middle cerebral arteries in pregnancies complicated by preeclampsia and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179 (1):140-145.
 106. Amit A, Thaler I, Paz Y, Itskovitz-Eldor J. The effect of a nitric oxide donor on doppler flow velocity waveforms in the uterine artery during the first trimester of pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998;11(2):94-98.
 107. Casanello P, Sobrevia L. Intrauterine growth retardation is associated with reduced activity and expression of the cationic amino acid transport systems y+/hCAT-1 and y+/hCAT-2B and lower activity of nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res.* 2002; 91(2):127-34.
 108. Sieroszewski P, Suzin J, Karowicz-Bilinska A. Ultrasound evaluation of intrauterine growth restriction therapy by a nitric oxide donor (L-arginine). *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2004;15(6):363-366.
 109. Miyasaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99:1141-1146
 110. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric Dimethylarginine: A novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in Hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98: 1842-1847.
 111. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002;106 (8):987-92.
 112. Stühlinger MC, Abbasi F, Chu J, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA.* 2002; 287:1420-1426.
 113. MacAllister RJ, Rambašek MH, Vallance P, Williams D, Hoffmann KH, Ritz E. Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 1996; 11: 2449-2452.
 114. Leiper J, Santa María J, Chubb A. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distribution and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J.* 1999 ;343: 209-14.
 115. MacAllister RJ, Fickling SA, Whitley GS, Wallace P. Metabolism of methylarginines by human vasculature: implications for the regulation of nitric oxide synthesis. *Br J Pharmacol* 1994; 112:43-8.
 116. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358:2127-28.
 117. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99: 3092-95.
 118. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol.* 1996; 119: 1533-40.
 119. Suda O, Tsutsui M, Morishita T, Tasaki H, Ueno S,

- Nakata S, Tsujimoto T, Toyohira Y, Hayashida Y, Sasaguri Y, Ueta Y, Nakashima Y, Yanagihara N. Asymmetric Dimethylarginine Causes Arteriosclerotic Lesions in Endothelial Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice. Involvement of Renin-Angiotensin System and Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:1-7.
120. Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:551-56.
 121. Maeda T, Yoshimura T, Okamura H. Asymmetric Dimethylarginine, an Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthase, in Maternal and Fetal Circulation. *J Soc Gynecol Investig* 2003;10:2-4.
 122. Fickling SA, Williams D, Wallance P, Nussey SS, Whitley GS. Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Lancet* 1993; 342:242-3.
 123. Petterson A, Hedner T, Milson I. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77(8): 808-13.
 124. Germain AM, Valdes G, Romanik MC, Reyes MS. Evidence Supporting a Beneficial Role for Long-Term L-Arginine Supplementation in High-Risk Pregnancies. *Hypertension.* 2004 Jul;44(1):e1.
 125. Noris M, Todeschini M, Cassis P, Pasta F, Cappellini A, Bonazzola S, Macconi D, Maucci R, Porrati F, Benigni A, Picciolo C, Remuzzi G. L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. *Hypertension.* 2004 Mar;43(3):614-22.
 126. Alexander BT, Llinas MT, Kruckeberg WC, Granger JP. L-arginine attenuates hypertension in pregnant rats with reduced uterine perfusion pressure. *Hypertension.* 2004 Apr;43(4):832-6.
 127. Lyall F, Bulmer JN, Kelly H, Duffie E, Robson SC. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide. *Am J Pathol.* 1999 Apr;154(4):1105-14.
 128. 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: 2152-2164.
 129. Cartwright JE, Holden DP, Whitley GS. Hepatocyte growth factor regulates human trophoblast motility and invasion: a role for nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1999 Sep;128(1):181-9.
 130. Lash GE, Cartwright JE, Whitley GS, Trew AJ, Baker PN. The effects of angiogenic growth factors on extravillous trophoblast invasion and motility. *Placenta.* 1999 Nov;20(8):661-7.
 131. Coukos G, Makrigrannakis A, Amin K, Albelda SM, Coutifaris C. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 is expressed by a subpopulation of human trophoblasts: a possible mechanism for trophoblast-endothelial interaction during haemochorial placentation. *Mol Hum Reprod.* 1998 Apr;4(4):357-67.
 132. Quyyumi AA. Does acute improvement of endothelial dysfunction in coronary artery disease improve myocardial ischemia? A double-blind comparison of parenteral D- and L-arginine. *J Am Coll Cardiol.* 1998 Oct;32(4):904-11.
 133. Burszty M, Podjarny E, Dahan R, Raz I, Bernheim J. Insulin-induced hypertension, L-arginine, and endothelial nitric oxide synthase in pregnant rats. *Hypertens Pregnancy.* 2003;22(3):267-74.
 134. Giugliano D, Marfella R, Verrazzo G, Acampora R, Coppola L, Cozzolino D, D'Onofrio F. The vascular effects of L-Arginine in humans. The role of endogenous insulin. *J Clin Invest.* 1997 Feb 1; 99(3):433-8.
 135. Battaglia C, Salvatori M, Maxia N, Petraglia F, Facchinetti F, Volpe A. Adjuvant L-arginine treatment for in-vitro fertilization in poor responder patients. *Hum Reprod.* 1999 Jul;14(7):1690-7.
 136. Rossmanith WG, Hoffmeister U, Wolfahrt S, Kleine B, McLean M, Jacobs RA, Grossman AB. Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta. *Mol Hum Reprod* 1999 May; 5(5):487-94.
 137. Sooranna SR, Das I. The inter-relationship between polyamines and the L-arginine nitric oxide pathway in the human placenta. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jul 6;212(1):229-34.
 138. Wu G, Morris SMJ. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998;336:1-17
 139. Loscalzo J. What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation.* 2000 May 9;101(18):2126-9.
 140. Jablecka A, Checinski P, Krauss H, Micker M, Ast J. The influence of two different doses of L-arginine oral supplementation on nitric oxide (NO) concentration and total antioxidant status (TAS) in atherosclerotic patients. *Med Sci Monit.* 2004 Jan;10(1):CR29-32.
 141. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615.
 142. Igor B. Buchwalow, Thomas Podzuweit, Vera E. Samoilova, Maren Wellner, Hermann Haller, Stephanie Grote, Susanne Aleth, Werner Boecker, Wilhelm Schmitz and Joachim Neumann. An in situ evidence for autocrine function of NO in the vasculature. *Nitric oxide* 2004; 10:203-212.
 143. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl.* 2003;4(4):33-40.