

11217
100



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

MARCADORES DE ACTIVACION ENDOTELIAL Y SU RELACION CON EL GRADIENTE CLINICO DE LA ENFERMEDAD HIPERTENSIVA INDUCIDA POR EL EMBARAZO

TESIS DR. J. ROBERTO AHUED AHUED
DIRECTOR GENERAL
PROFESOR TITULAR

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN:
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
PRESENTA INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

DR. OSVALDO MIRANDA ARAUJO



DIRECCION DE ENSEÑANZA

ASESORES: DR. J. ROBERTO AHUED AHUED

DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

TESIS CON
CALIA DE ORIGEN

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por ser fuente infinita de fuerza e inspiración

A mi padre como figura omnipresente ,con fe y voluntad sin límite

A mis hermanos , porque SI QUEDA UN MINUTO DE SOL LO DEDICARÉ A TI

A mis pacientes en cuya mirada siempre me he visto vivo

A mis Profesores por su vocación ciega

A mis compañeros de viaje por el amor a la vida y esperanza del buen puerto

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

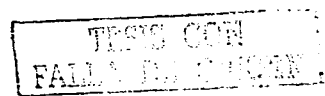
Introducción.....	1
Antecedentes.....	2
Justificación.....	12
Hipótesis.....	14
Metodología.....	15
Resultados.....	25
Discusión.....	40
Conclusiones.....	43
Aspectos éticos.....	44
Bibliografía.....	46

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
VENEZUELA

Introducción.

La preeclampsia es un síndrome de origen desconocido, caracterizado por hipertensión y proteinuria. Aparece de manera usual en el tercer trimestre del embarazo y ocurre de modo más frecuente en primigrávidas. La preeclampsia se puede complicar con condiciones que amenazan la vida de la embarazada e incluyen el desarrollo de convulsiones, insuficiencia hepática, falla renal y coagulopatía. La preeclampsia es una de las causas principales de morbilidad materna en todo el mundo (1,2) y en el caso de México, se ha reportado como la causa principal de muerte (25% de las muertes maternas) (3). También se relaciona con resultados perinatales pobres que afectan al producto y que obedecen a tasa alta de prematuros y a retraso en el crecimiento intrauterino.

La preeclampsia usualmente se desarrolla de manera progresiva, aunque su curso clínico puede ser muy variable. La detección de proteinuria, que generalmente refleja el grado de daño al producto, solamente es posible detectarla, en la mayoría de los casos, una vez que la hipertensión se ha establecido. La mortalidad perinatal se triplica cuando la proteinuria se suma a la hipertensión y la cantidad de proteína excretada se correlaciona de manera directa con la mortalidad perinatal y con el grado de afectación del crecimiento fetal (4,5,6). Las mujeres que desarrollan hipertensión después de la semana 20 de gestación, sin proteinuria tienen riesgo incrementado para desarrollar preeclampsia, sin embargo, no son tratadas de modo integral, es decir un seguimiento adecuado y monitoreo por medio de un tratamiento tanto médico como nutricional, debido a todas las dudas que existen alrededor de este padecimiento (7,8).



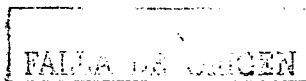
El estrés producido por la presión aumentada en el interior de los vasos sanguíneos es un estímulo potente para producir vasodilatación arterial durante el embarazo y se ha demostrado que este tipo de vasodilatación está inhibido en vasos arteriales de mujeres con embarazos complicados por preeclampsia (25) .

La preeclampsia puede reflejar también un estado donde la síntesis del óxido nítrico es deficiente. (26,27) El mecanismo fisiopatológico es la falla en la vasodilatación y la disminución en las características vasculares reactivas de un embarazo normal, que es en parte regulado por el óxido nítrico.

Antecedentes.

La preeclampsia es una enfermedad multisistémica de etiología desconocida. Entre las manifestaciones clínicas se encuentran presión arterial elevada, proteinuria y edema. (16)

Información actual que existe en torno al origen de la preeclampsia, ha permitido señalar algunos defectos en la invasión del trofoblasto y en la remodelación de la arquitectura de las arterias espirales uterinas, que se manifiesta como aumento en la resistencia vascular local en la interfase uteroplacentaria (9). Lo anterior resulta en disminución de la perfusión uteroplacentaria debido a la imposibilidad de formar conductos sanguíneos de baja presión, que son indispensables para el intercambio adecuado. Se supone que esta condición, obliga a la placenta a liberar una serie de compuestos con acción primaria sobre el endotelio vascular y que resultan en vasoespasmo sistémico (10,11). Algunos marcadores de daño endotelial incluyen incremento de inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), que es sintetizado



casi exclusivamente en las células del endotelio y es un marcador molecular de la activación del endotelio vascular (12,13). Se acepta en general que algunas especies reactivas de oxígeno causan, al menos en parte, las anomalías endoteliales mencionadas (14). Estos compuestos tóxicos pueden ser derivados de la peroxidación de triacilglicéridos y de ácidos grasos no esterificados, ambos compuestos, han sido encontrados aumentados en el suero de pacientes con preeclampsia (15). Los principales compuestos tóxicos, también conocidos como radicales libres, que causan el daño son los superóxidos. Estos radicales libres causan el daño en el sitio donde se producen, únicamente salen de la célula en forma de agua oxigenada (H_2O_2). En condiciones normales donde se lleva a cabo un sistema de antioxidación eficaz, éstos radicales libres son bloqueados antes de que lleven a cabo la oxidación. Esto se lleva a cabo por medio de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Una característica central en la preeclampsia es la sensibilidad aumentada en las arteriolas a sustancias presoras, que se constituye en otra evidencia de la existencia de disfunción endotelial vascular, esto se puede observar en la reducción de la liberación de vasodilatadores como el factor de relajación derivado del endotelio, es decir el óxido nítrico o un precursor nitroso lábil del óxido nítrico.

En condiciones fisiológicas el endotelio es la frontera con los productos de la sangre y por el otro lado, regula la actividad del músculo liso de la pared vascular. En la membrana del endotelio existe transporte de nutrimentos, productos de desecho, moléculas reguladoras y de comunicación.

Se ha propuesto que el daño endotelial es un mecanismo que explica la preeclampsia. Esta lesión se ha asociado a la presencia de factores citotóxicos en el plasma de mujeres preeclámplicas, que podría provenir de la placenta, sin embargo existe duda si el daño endotelial es la causa directa o la consecuencia de esta enfermedad. (16).

Cuando se presenta el daño endotelial, la producción de sustancias vasodilatadoras y anticoagulantes se reduce, además estas células se expresan con nuevas funciones. Por ejemplo, se activan tanto la síntesis de procoagulantes como la cascada de coagulación con el objetivo de reparar el daño que se está llevando a cabo, y por esta razón se comienzan a depositar plaquetas y coágulos en ese mismo sitio, lo que podría explicar el componente de coagulopatía característico de la enfermedad.

Uno de los primeros endotelios dañados en la preeclampsia son los de los circuitos renales, llamado endoteliosis glomerular. También se presenta una reducción del volumen de plasma total. Todo esto antecede a la hipertensión.(80.)

Los signos clínicos prominentes en la preeclampsia, el edema, y la disfunción de la capilaridad glomerular son consistentes en la pérdida de las funciones normales de transporte endotelial.

La evidencia bioquímica de daño endotelial en mujeres embarazadas preeclámplicas se puede observar por un aumento en fibronectina y el antígeno del factor VIII, dos factores que se conocen son liberados por células endoteliales

dañadas. Además se ha reportado la presencia de actividad mitogénica en el suero de mujeres preeclámpticas que excede los niveles presentes en el suero de mujeres control. Indicadores sensibles demuestran que la coagulación anormal ocurre en un porcentaje mucho más alto en mujeres con este desorden. Las relaciones de la actividad del antígeno del factor VIII, cuenta de plaquetas y B-tromboglobulina circulante son anormales en alta proporción de las mujeres con preeclampsia.(80)

Oxido nítrico y preeclampsia

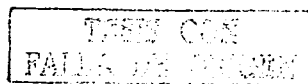
El óxido nítrico (NO) es un pequeña molécula lipofílica que rápidamente se difunde fuera de la célula hacia células blanco que se encuentren cerca, ahí se unen al grupo heme de la guanilato ciclasa citosólica y causan activación enzimática incrementando así la velocidad de conversión del trifosfato de guanosin (GTP) al monofosfato guanosin cíclico (GMPc)(18)

El NO es producido a partir de la L-arginina por medio de un mecanismo donde interviene el NADPH y oxígeno. En este proceso se produce L-citrulina y óxido nítrico. Esto se lleva a cabo en el citoplasma de las células es un proceso compartimentalizado.

El óxido nítrico a pesar de ser una especie de oxígeno, no es un radical libre, por lo que no tiene efectos como los que tienen estas especies, además de no ser bloqueado por sistemas antioxidantes. Cuando el NO se une al superóxido se forma el peroxinitrilo (NO₃), esta especie sí es un radical libre y puede salir de la célula y causar algún tipo de daño como lo hacen las especies reactivas del oxígeno.

El NO es un vasodilatador potente derivado del endotelio vascular y participa de manera central en el control del flujo sanguíneo a los tejidos (17). El NO también puede ser sintetizado por el cerebelo, hepatocitos, macrófagos y plaquetas, y puede funcionar tanto como vasodilatador como neurotransmisor, inhibidor de la síntesis de ácido desoxirribonucleico, como agente citotóxico y citostático e inhibidor de la agregación de plaquetas. La acción del NO sobre el músculo liso es mediado por GMPc, que resulta de la activación de la guanilato ciclasa por el NO. El incremento en los niveles del GMPc causa relajación muscular por medio de la aceleración de la unión intracelular del calcio libre. El GMPc también inhibe la agregación plaquetaria y la adhesión a la superficie endotelial vascular. (18). El NO se ha propuesto como un mediador central del tono miogénico y de la resistencia vascular en la circulación periférica (19) y en la circulación uterina (20,21,22). La concentración de cGMP en el plasma se incrementa durante el embarazo normal, pero no cuando se desarrolla preeclampsia (23,24). De manera adicional, se ha demostrado que la administración de hidralazina, un fármaco utilizado para tratar la hipertensión en el embarazo, incrementa la concentración sérica de cGMP, lo que puede indicar la inducción de la ruta activada bajo condiciones normales por el NO .

En el embarazo existe presión aumentada en el interior de los vasos sanguíneos, lo que constituye un estímulo para producir vasodilatación en las arterias y se ha encontrado que en los vasos de mujeres con preeclampsia esta vasodilatación se encuentra inhibida. Esta observación es consistente con los reportes en los que se señala que las mujeres con preeclampsia tienen capacidad reducida para producir NO (26,18,27). En estudios previos encontraron que la infusión intravenosa de L-



arginina reduce la presión arterial en mujeres embarazadas, en asociación con concentraciones incrementadas de L-citrulina, lo que indica la metabolización de la L-arginina por la NO sintetasa. La disminución en la presión sanguínea observada, fue mayor en mujeres con preeclampsia.(27) En contraste con estas observaciones, en otro estudio no encontró disminución en la presión arterial en mujeres afectadas por preeclampsia a las que se dieron infusiones de L-arginina, a pesar de que sí se observó incremento en las concentraciones plasmáticas de cGMP. (28) Este es el único reporte en la literatura que contradice los estudios en humanos y animales y que relacionan el metabolismo del NO con la patogénesis de la preeclampsia.

El papel regulador del NO sobre el flujo sanguíneo uteroplacentario podría ser más relevante que el que tiene sobre la circulación periférica (29). Los estudios *in vitro* en los que se ha utilizado perfusión doble de cotiledones placentarios sugiere que la reducción en la producción basal de NO provoca vasoconstricción fetoplacentaria que se traduce en hipoxia tisular (30). Este estudio ha sido corroborado por el hecho de que la infusión de L-arginina en mujeres con resistencia vascular incrementada en la circulación uteroplacentaria y asociada a retardo en el crecimiento intrauterino resulta en disminución significativa de la resistencia vascular uterina y que se correlaciona con marcadores de producción incrementada de NO (31).

El NO es un inhibidor potente de la activación plaquetaria. Las plaquetas expresan la NO sintetasa constitutiva. La actividad de las plaquetas ha sido reportada como disminuida en la preeclampsia (32). La infusión de L-arginina en mujeres embarazadas disminuye la agregación plaquetaria, debido a la función que tiene el óxido nítrico en la inhibición de la activación plaquetaria. Sin embargo esto no

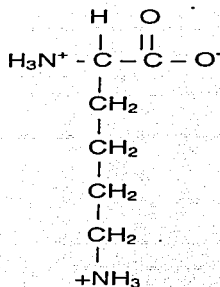
sucedió cuando la mujer estaba afectada por preeclampsia (33). A pesar de que la L-arginina no reduce la agregación plaquetaria en el estudio mencionado, otros autores han propuesto la utilización de donadores de óxido nítrico para el tratamiento del síndrome HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets: Hemólisis, Enzimas hepáticas elevadas y baja de plaquetas) , que es la complicación clínica más temida de la preeclampsia, en la que de modo característica existe plaquetopenia (34). El bloqueo farmacológico de la síntesis de óxido nítrico en ratas preñadas, produce un cuadro parecido a la preeclampsia incluyendo hipertensión, proteinuria, trombocitopenia y retraso en el crecimiento intrauterino(35,36,37,38,39). Estos resultados también se han obtenido en changas (40).

Existen algunos inhibidores del óxido nítrico, el principal que se ha probado en varios estudios ha sido el L-NAME(N-omega-nitro-L-arginina metil ester). Este compuesto es un análogo de la L-arginina y se ha utilizado en varios estudios para probar que la inhibición de óxido nítrico produce hipertensión y signos que representan preeclampsia en ratas y puercos de guinea. (37)La suplementación con L-arginina en la rata embarazada, normaliza los efectos de la inhibición de síntesis de NO por N-omega-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) sobre la presión arterial, proteinuria y restricción de crecimiento (41).

Papel fisiológico de la L-arginina

La arginina es un aminoácido no esencial de funciones básicas, formado en el ciclo de la urea y esencial para la síntesis de óxido nítrico.(83)

Estructura



La L-arginina es necesaria en el ciclo de la urea, para eliminar el amonio derivado del metabolismo de aminoácidos, ya que éste es un aminoácido que puede participar en la aportación de energía. También es precursor de diferentes poliaminas y es el donador del grupo amido para la síntesis de creatina en el músculo. De manera adicional, la L-arginina es el sustrato de la óxido nítrico sintetasa (NOS) (42). Se conocen al menos tres diferentes isoformas de la NOS e incluye a las formas constitutivas del endotelio (eNOS) y de las neuronas (nNOS) y a la forma inducible (iNOS), que se expresa en macrófagos y músculo liso (43,44). La isoforma que resulta de interés para este estudio es la eNOS. La relevancia de la eNOS para explicar la hipertensión asociada al embarazo, se ha reforzado con el estudio del ratón knockout para eNOS y que se caracteriza por presencia de hipertensión y ausencia del factor endotelial de relajación, es decir el óxido nítrico. (45) Sin embargo, la L-arginina puede contribuir a la producción de NO por cualquiera de las

isoformas de la NOS, incluyendo las isoformas constitutivas presentes en las plaquetas y las isoformas inducibles presentes en las células mencionadas. . En este estudio, se refiere a la NOS de manera genérica, dado que la L-arginina puede actuar como sustrato de cualquiera de las isoformas mencionadas.

La NOS endotelial tiene un Km para la L-arginina en el rango micromolar en condiciones in vitro, en donde se suplementa calcio y otros cofactores en condiciones fisiológicas. La concentración de L-arginina en plasma es suficiente para servir como sustrato de la NOS endotelial. La concentración normal de L-arginina en plasma se encuentra en el rango de 30 a 100 μ M y la concentración intracelular, se eleva al rango mM en el endotelio. De este modo, es una conclusión que la concentración del aminoácido no es un factor limitante en la síntesis de NO. Esta conclusión se encuentra documentada en diferentes estudios de cinética enzimática in vitro y no toma en cuenta la presencia de diferentes inhibidores competitivos endógenos de la NOS. Otros factores que pueden modificar la actividad enzimática están relacionados con patologías específicas o condiciones fisiológicas en las que de modo característico, la demanda por el aminoácido se encuentra aumentada. Lo anterior podría ser ejemplificado en condiciones de deficiencia en el consumo de proteína o en la desnutrición crónica, que se manifiestan en retraso en cicatrización de heridas o con impacto en el crecimiento (46). El embarazo puede ser catalogado como una condición en la que podría presentarse un estado de deficiencia de arginina. Esto es debido a que la arginina es indispensable para el desarrollo de la glándula mamaria y la lactancia, en modelos animales experimentales. Por esta razón, es posible que la

deficiencia de arginina durante el embarazo pueda resultar en lactancia inadecuada.
(84)

Otra razón podría ser la síntesis incrementada de NO, esto necesariamente condiciona incremento en el consumo de este aminoácido, que se agregarán a la demanda del producto en crecimiento. El embarazo se caracteriza también por eliminación aumentada de ácido orótico en la orina, lo que constituye un indicador metabólico de deficiencia de ornitina y arginina en esta condición.(85) Siguiendo por la misma observación, la concentración sérica de arginina se incrementa en el postparto inmediato (29,51) Todo lo anterior lleva a la posibilidad de que las limitaciones en la disponibilidad de la L-arginina durante el embarazo podrían estar relacionadas con una síntesis disminuida de NO en el síndrome de la preeclampsia.

El síndrome de la preeclampsia, es todavía la causa mayor de morbilidad materna y perinatal, está caracterizada por un incremento en la sensibilidad a presores y en la resistencia periférica, así como cambios patológicos consistentes con una perfusión pobre a las camas vasculares. Evidencia de que las anomalías de la capa endotelial pudiera estar involucrada en la preeclampsia, incluyen la elevación de los niveles de fibronectina, factor VIII, reducción en los niveles de metabolitos de las prostaciclina y anomalías histológicas en el endotelio de las arterias umbilicales en embarazos con preeclampsia.

Justificación.

La preeclampsia usualmente se desarrolla de manera progresiva, aunque su curso clínico puede ser muy variable. La detección de proteinuria, que generalmente refleja el grado de daño al producto, es posible detectarla una vez que la hipertensión se ha establecido, esto sucede en la mayoría de los casos. Las mujeres que desarrollan hipertensión después de la semana 20 de gestación, sin proteinuria tienen riesgo incrementado para desarrollar preeclampsia, sin embargo, no son tratadas de forma integral con un equipo de médicos, enfermeras y nutriólogos. La preeclampsia se puede complicar con condiciones que amenazan la vida de la embarazada e incluyen el desarrollo de convulsiones, insuficiencia hepática, falla renal y coagulopatía. La preeclampsia es una de las causas principales de morbimortalidad materna en todo el mundo (1,2) y en el caso de México el 25% de las muertes maternas es por esta misma causa(3). También se relacionan con resultados perinatales pobres que afectan al producto y que obedecen a una tasa alta de prematuros y retraso en el crecimiento intrauterino.

El estudio ha sido diseñado para probar la suplementación de L-arginina en mujeres con riesgo de desarrollar preeclampsia en el embarazo. Se calculó una cantidad de L-arginina que se ha comprobado es segura y no causa toxicidad. Como se mencionó anteriormente, el consumo del aminoácido L-arginina ha mostrado mejorar la función endotelial y de modo asociado, la función cardiovascular.

Es por lo anterior, que cualquier esfuerzo para disminuir la preeclampsia o sus complicaciones asociadas, podría repercutir en el ámbito de la salud materno infantil. Si el estudio resultara que produce efectos benéficos para las pacientes, habría un gran descubrimiento y la apertura de un campo de acción para diversas profesiones, especialmente para el nutriólogo. De esta manera se podría hacer toda una recomendación de suplementación de L-arginina a mujeres embarazadas, esto podría ser a través de la misma barra de este estudio. También se podrían abrir varios campos de investigación de campo sobre la frecuencia y cantidad de consumo de este aminoácido dentro de la población. Esto a través de la evaluación del consumo actual de este aminoácido en estas mujeres, por medio de recordatorios de 24 horas, para poder a largo plazo, diseñar y validar un cuestionario de frecuencia de alimentos con un contenido alto en arginina. Y quizá más adelante intentar diseñar una dieta donde se alcancen cantidades suficientes de arginina por medio de solo alimentos, sin requerir de ningún suplemento.

Hipótesis.

Los marcadores de daño endotelial se correlacionan de manera directa con la evolución clínica de la enfermedad hipertensiva y de modo inverso con la concentración sérica de L-arginina y de metabolitos urinarios del NO.

Objetivos general y específico

Objetivo general:

- Evaluar la relación entre la concentración sérica de L-arginina con la función endotelial vascular de mujeres con diferentes estadios clínicos de enfermedad hipertensiva asociada al embarazo.

Objetivos específicos:

- Cuantificar la concentración de L-arginina sérica en mujeres embarazadas con diferentes estadios clínicos de enfermedad hipertensiva.
- Cuantificar los metabolitos de óxido nítrico en orina de mujeres embarazadas con diferentes estadios clínicos de la enfermedad hipertensiva asociada al embarazo.
- Correlacionar las mediciones anteriores con los marcadores de daño en el endotelio vascular: fibronectina, endotelina, cuenta de plaquetas y factor VIII.

Metodología

Población de estudio: Mujeres embarazadas con ≥ 20 semanas de gestación que asistan a consulta en el INPer.

Diseño del estudio

Tipo de investigación: Experimental

Tipo de diseño: Casos y controles (autocontroles) anidados en una cohorte

Características del estudio

Método de observación: transversal

Tipo de análisis: analítico

Temporalidad: retrospectivo

Criterios de Inclusión y Exclusión:

La cohorte de pacientes se establecerá en el INPer haciendo tamizaje dirigido a mujeres embarazadas primigestas con ≥ 20 semanas de gestación. Todas las mujeres que son aceptadas en el estudio deberán continuar y terminar su embarazo en el INPer. La edad gestacional máxima para admitir a una mujer en el estudio será 34 semanas.

Criterios de exclusión.

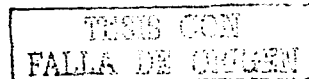
- Gestación múltiple
- Malformación fetal mayor
- Hipertensión preexistente

- Enfermedad renal preexistente
- Diabetes Mellitus
- Enfermedad autoinmune
- Cáncer de cualquier tipo o historia de cáncer en parientes en primer grado
- Enfermedad materna preexistente que requirió medicación.

Cálculo de la muestra y análisis estadístico.

En un estudio piloto previo realizado en el INPer, se encontró que el 37% de las mujeres en las que se detectó hipertensión después de la semana 20 de gestación y en las que no demostró proteinuria, progresaron a la preeclampsia. Tomando este dato de la incidencia de la enfermedad, hemos considerado que el objetivo será disminuir en 50% la incidencia de la preeclampsia en aquellas mujeres sujetas a la suplementación con la barra alimenticia. Esta será la población de partida para esta sección del estudio y en la que estratificaremos a las mujeres conforme a su evolución clínica. Cada mujer será su propio control y serán seguidas a lo largo del embarazo en su progresión a la preeclampsia. La estratificación se hará en términos de aquellos casos en los que las mujeres desarrollen el cuadro clínico, habiendo partido de mediciones normales, así como controles para poder hacer la comparación.

Para fines del presente estudio se formarán 4 grupos de evolución de la enfermedad:



- I. Embarazo normal: este grupo será seleccionado al final del estudio ya que se realice el corte transversal y se tomen las pacientes necesarias para realizar las comparaciones entre mediciones.
- II. Preeclampsia. Se separarán de acuerdo a las Normas Institucionales en Preeclampsia leve y severa en dos grupos.
- III. Eclampsia. Se clasifica con los mismo síntomas de la preeclampsia y la presencia de convulsiones.
- IV. HELLP.

Se espera una correlación entre las variables de daño endotelial (evidencia de plaquetopenia, factor VIII, fibronectina, endotelina) y concentración de metabolitos de óxido nítrico en orina de al menos 0.8, con poder de 0.9 y con un alfa de 0.01. De acuerdo a estos números, requeriremos de 13 sujetos en cada grupo de evolución de la enfermedad en los que sea posible demostrar evolución.

Según cifras del INPer, se reciben 4,200 embarazos, de los cuales en 1999 se identificaron más de 700 casos con preeclampsia. Más de 400 de esos casos fueron diagnosticadas durante su vigilancia prenatal en el INPer. Conforme a estos datos, la factibilidad del estudio se encuentra asegurada con la población vista en el INPer.

Los grupos mencionados anteriormente se integrarán de la muestra total del protocolo de suplementación de arginina, sin importar de qué grupo de suplementación provengan, así como también se incluirán muestras de pacientes que asistan al Instituto Nacional de Perinatología y se encuentren en algún estadio de la enfermedad.

El análisis de las muestras se llevará a cabo, se realizará la evaluación de los resultados y con base en los observado se discutirá la relación entre los grupos de desarrollo de la enfermedad y los grupos de intervención de las barras de suplementación.

Definición de Variables en estudio

Variables independientes

La variable primaria en estudio será el desarrollo del daño endotelial medido por la progresión hacia la preeclampsia (presión arterial sistólica ≥ 140 mm Hg y/o diastólica ≥ 90 mm Hg y proteinuria (≥ 300 mg de proteína en orina de 24 h), evidencia de plaquetopenia, fibronectina, , e incremento de factor VIII circulante.

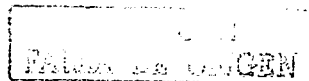
Variables dependientes.

La variable secundaria para este estudio son las mediciones bioquímicas de metabolitos de óxidos nítrico en orina.

La siguiente variable a medir es la arginina en plasma, esto es para también poder hacer una relación con la evolución de la enfermedad y las concentraciones del aminoácido.

Daño endotelial:

- Metabolitos urinarios de NO.



La cuantificación de metabolitos urinarios de NO en orina de 24 horas será utilizado como un indicador de la síntesis de NO ya que casi todo el NO es oxidado a nitrato, que se mantiene estable en la orina y es susceptible de ser cuantificado (56). De manera aproximada, el 16% de la eliminación urinaria de nitratos corresponde al metabolismo del NO, que se lleva a cabo en la circulación esplácnica en su mayoría (56). Se ha reportado que las mujeres afectadas con preeclampsia excretan concentraciones disminuidas de los metabolitos del NO, de manera comparativa con embarazadas no afectadas, esto ha sido atribuido a la producción disminuida de NO en los casos con preeclampsia (57,58). La cuantificación de metabolitos plasmáticos de NO en la preeclampsia y en el embarazo normal ha dado resultados muy variables y la explicación más plausible puede ser atribuida a las alteraciones en la depuración renal de estos compuestos (59). De manera adicional, la ingestión diaria de diferentes fuentes de nitratos en la dieta, modifica directamente la cantidad urinaria que se excreta (60). Desafortunadamente, en nuestro estudio no contamos con un seguimiento estrecho que permita el cálculo de los nitratos en la dieta y eso debe ser reconocido como una debilidad en la selección del marcador de metabolismo de NO. El único control que será utilizado en este estudio es la evaluación de frecuencia de alimentos y recordatorio de 24hrs que serán aplicados a la entrada al estudio, con lo que interpretaremos posibles variaciones de las cifras de las pacientes. El consumo diario de nitratos se anticipa que sea muy equivalente en la población en estudio y de cualquier modo, la asignación aleatoria debería cancelar posibles diferencias. La utilización de diferentes índices de producción de NO, como podría ser la eliminación pulmonar de NO o la concentración de cGMP en plasma u

orina, son igualmente variables y no ofrecen ventajas en este mismo sentido ya que su producción depende de factores diversos (péptido natriurético auricular, etc) que también se modifican en la preeclampsia (61,62,63,28). Los nitratos pueden ser reducidos a nitritos, que a su vez pueden interactuar con sustratos dietéticos, como aminas y amidas, para producir componentes N-nitroso , o nitrosaminas y nitrosamidas. Esta conversión, conocida como N-nitración, ha sido demostrado que ocurre en la saliva así como el estómago, colon y vesícula.

Los nitratos se encuentran presentes en una variedad de alimentos, pero las fuentes dietéticas principales son los vegetales y el agua para tomar. Los nitratos de sodio y potasio son utilizados en los procesos de salado, ahumado, curado y embutido de los alimentos; también le dan el color a los embutidos de color rosa. (Krausse pag.873)

- γ Fibronectina: una glicoproteína adhesiva, puede circular en plasma actuando como opsonina o puede encontrarse como proteína en la superficie de la célula mediando interacciones adhesivas en la célula.(p.601 Encyclop.Miller-Keane). Debido a que una de sus funciones es actuar como adhesivo para las plaquetas en un sitio de daño, esperaríamos encontrar los niveles circulantes de fibronectina disminuyendo según evoluciona la preeclampsia.
- γ Factor VIII: es un factor de coagulación antihemofílico. Esperaríamos encontrarlo disminuido conforme avanza el síndrome de la preeclampsia ya que estaría actuando en el sitio del daño y los niveles circulantes disminuirían.

- Endotelina: es un mitógeno liberado por el endotelio. Es el vasoconstrictor más potente.
- Cuenta de plaquetas: son también llamados trombocitos, tienen forma de disco, no tienen núcleo y tienen una membrana muy frágil, tienden a adherirse a superficies dañadas. En promedio hay 250,000 por milímetro cúbico de sangre. Son formadas en la médula espinal. El ritmo de su producción parece estar nivelado por la cantidad de oxígeno en la sangre y la presencia de derivados de ácidos nucleicos liberados de tejidos dañados. Las funciones de las plaquetas están relacionados con la coagulación y la formación de ateromas. Debido a su capacidad para adherirse y agregarse las plaquetas pueden reparar pequeños daños en los vasos sanguíneos para prevenir la salida de sangre. (86)
- Arginina en plasma

Variables clínicas

Preeclampsia.

Se reserva al incremento de la presión arterial , acompañado de proteinuria con o sin edema.

El diagnóstico de Preeclampsia se realizará después de la semana 20 de gestación.

- 1) Preeclampsia leve: 140/90 mm Hg con proteinuria definida.
- 2) Preeclampsia severa se puede apoyar en los siguientes datos:

(TA > 160/110 mmHg, proteinuria > 5.0 g en 24 horas, incremento de creatinina en suero > 1.2 mg/dL, Plaquetas < a 100,000 células /mm³, ↑ enzimas hepáticas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), oliguria, disturbios visuales o cerebrales, hiperreflexia).

Proteinuria : Se define como la excreción urinaria de 0.3 g (300 mg) o más de proteínas en una muestra de 24 horas. El uso de una tira diagnóstica en orina no se considera el criterio diagnóstico para este estudio. Deberá evaluarse a partir de la medición de orina de 24 horas.

Oliguria: Diuresis 20-30 mL por hora durante 2 horas.

Variables confusoras.

A continuación se describen aquellas variables que constituyen elementos confusores en el momento de analizar las variables en estudio. A pesar de su valor, no anticipamos que ninguna de ellas modifique la interpretación del estudio, dado su diseño aleatorizado. Las pacientes que presenten algunas de las características siguientes no pretenden ser excluidas del estudio.

Edad

Los desordenes hipertensivos del embarazo son más comunes en mujeres arias. El riesgo para desarrollar preeclampsia se incrementa 3 a 4 veces por arriba en mujeres embarazadas de más de 35 años de edad (64). Para los objetivos de este estudio no se pondrá límite de edad en las pacientes.

Estado de nutrición

La dieta y el uso pregestacional de suplementos vitamínicos podría influenciar el desarrollo del embarazo y modificar las variables en estudio, incluyendo la concentración sérica de arginina, vitamina C, vitamina E y excreción urinaria de metabolitos de NO. Al momento de ingreso de la paciente al estudio, se realizará encuesta alimentaria, en la que se enfatizará la búsqueda de consumo de alimentos ricos en nitratos, así como alimentos enriquecidos en L-arginina y vitaminas C y E.

Peso esperado para la talla y edad gestacional

Se tomarán en cuenta las tablas de Arroyo y col. (65)

Historia familiar de preeclampsia.

Se interrogará de manera dirigida a las pacientes para identificar casos en los que exista antecedente familiar en rama directa de preeclampsia. Es bien sabido que la preeclampsia es más común en familiares directos de un caso que desarrolló hipertensión asociada al embarazo. La incidencia de preeclampsia entre hermanas de mujeres que desarrollaron la enfermedad en el primer embarazo se ha reportado de hasta 4 veces más grande que en poblaciones comparables. La incidencia de preeclampsia es mayor en hermanas, hijas y nietas de mujeres que desarrollaron eclampsia, en comparación con las sobrinas.

Historia de abortos previos

Se interrogará de manera dirigida la presencia de abortos previos. Esto obedece a que se ha identificado que aquellas mujeres que han experimentado un aborto inducido, tienen un riesgo menor para desarrollar preeclampsia (66,67).

Uso de anticonceptivos de barrera.

Se interrogará a las pacientes a su ingreso acerca de sus prácticas anticonceptivas. Es conocido que aquellas pacientes que utilizan dispositivos de barrera, tienen riesgo incrementado para desarrollar preeclampsia. (68,69).

Tabaquismo

El tabaquismo también será considerado, dado que algunos estudios han mostrado que esta práctica confiere protección para el desarrollo de preeclampsia por un mecanismo desconocido (70,71,72,73,74). El tabaquismo no será utilizado para incluir o excluir a las pacientes en este estudio.

RESULTADOS:

Estandarización de los procedimientos

Como se menciona en el protocolo del estudio, los primeros 3 meses fueron dedicados a la estandarización de los investigadores que realizan las mediciones, tanto de los médicos residentes como de las nutriólogas.

Selección de pacientes

Se elaboró una hoja de llenado que incluye de manera clara los criterios de inclusión y exclusión para una mejor selección de pacientes al estudio. Anexo #1

Indicadores Clínicos

Se realizó una historia clínica, en donde se obtuvieran datos sobre antecedentes de salud, enfermedades actuales, consumo de medicamentos, información ginecológica e información nutricia relevante (problemas gastrointestinales, alergias o intolerancias alimentarias, etc.) . Además, se hizo un examen físico para detectar

cualquier signo y/o síntoma asociado a algún problema de mala nutrición, ya sea de deficiencia o exceso de nutrimentos.

Indicadores Antropométricos:

La evaluación antropométrica permitió conocer la composición corporal de la paciente para determinar si había depleción o exceso de músculo y/o tejido adiposo. Algunos de los indicadores son variables confusoras dentro de este estudio, por lo que es necesario descartar posibles diferencias entre las pacientes de ambos grupos, tanto al ingreso como al egreso.

Las mediciones antropométricas que se realizaron a las pacientes de este estudio incluyen: peso, talla, circunferencia media de brazo y pliegue cutáneo tricipital. Además se obtuvo el peso pregestacional y el peso habitual pregestacional de las pacientes. Estas mediciones se utilizaron para interpretar los siguientes indicadores:

- Índice de Masa Corporal pregestacional (IMC)
- Porcentaje de peso para la talla pregestacional (% P/T)
- Porcentaje de peso para la talla para la edad gestacional (% P/T y EG)
- Ganancia de Peso

- **Circunferencia de Brazo (CB)**
- **Área Muscular de Brazo (cAMB)**
- **Pliegue Tricipital (PT)**

Indicadores Bioquímicos

Los datos bioquímicos que se utilizaron en la evaluación del estado de nutrición de las pacientes, fueron los que pudieran ser obtenidos del expediente médico del hospital, por lo que dependía de qué pruebas de laboratorio le habían realizado a cada una de las pacientes. Entre las mediciones de interés para evaluar el estado nutricional se encuentran: hemoglobina, hematocrito, albúmina, cuenta de linfocitos, leucocitos, y glucosa en sangre.

Métodos analíticos.

Las muestras de orina fueron desproteinizadas y los metabolitos de NO primero fueron reducidos a nitrito utilizando nitrato reductasa, seguido de determinación de nitritos con la reacción de Greiss (75). Los metabolitos de NO se reportaron en $\mu\text{m}/\text{mg}$ creatinina. Los coeficientes de variación son de <7% y <12% para el intraensayo y el interensayo, respectivamente.

Pruebas de laboratorio.

Todos los datos provenientes de las pruebas de laboratorio se vaciaron en los formatos de seguimiento diseñados para tal fin (Anexo # 5)

Tratamiento de muestras

Se tomaron muestras de sangre y de orina a cada paciente que ingrese al estudio. El esquema general del tratamiento de las muestras se presenta en el (Anexo # 6) De la sangre se utilizarán dos componentes: el plasma y el suero. Para la obtención del plasma la sangre se obtuvo en tubos *vacutainer* con EDTA (morados) y para la obtención de suero, la recolección se hizo en tubos *vacutainer* sin aditivo (rojos). Se recolectó la suficiente sangre para llenar 2 tubos con EDTA de 3ml y 1 tubo sin aditivo de 5ml.

Las muestras de orina son de dos tipos: a) una muestra solicitada al momento de la consulta, y b) la recolección de orina de 24 horas previas a la cita. De la toma de muestras son responsables las enfermeras.

El destino de las muestras recolectadas será el que a continuación se describe:

- A) TUBO 1 CON EDTA: Este tubo se agita ligeramente al momento de tener la muestra buscando que el anticoagulantes se mezcle con la sangre. Posteriormente se centrifugará para separar el plasma del resto de los componentes de la sangre. Una vez centrifugado se podrá recolectar el plasma de la parte superior de los separados del tubo. Este plasma se alicuotará, rotulará y almacenará a -70°C para ser analizado. En esta muestra se cuantificará L-Arginina, L-Citrulina, Vitamina C, Vitamina E, Creatinina, Ácido Úrico, Factor VIII de coagulación y ADMA.
- B) TUBO 2 CON EDTA: Este tubo será llevado al área de Hematología para determinación de Biometría Hemática. Además, sangre de este tubo se utilizará para la obtención de leucocitos por separación (*Lymphoprep*).
- C) TUBO 1 SIN ADITIVO: Este tubo se dejará reposar durante algunos minutos para permitir la formación del coágulo. Posteriormente se centrifugará para separar el suero del resto de los componentes de la sangre. Una vez centrifugado se podrá recolectar el suero de la parte superior de los separados del tubo. Este suero se alicuotará, rotulará y almacenará a -70°C para ser analizado. En esta muestra se cuantificará L-Arginina, Factor VIII de coagulación.
- D) ORINA DEL MOMENTO: Una vez recolectada la orina, se introducirá un tira de reactiva para detección de proteínas. Según la clave de coloración de este sistema se determinará la presencia o ausencia de proteína en la orina. Se registrará el dato en cada consulta.

E) **ORINA DE 24 HORAS:** El volumen de esta orina deberá ser registrado. Posteriormente, la orina se homogeneizará, centrifugará, alicuotará y almacenará hasta el momento en que se hagan las determinaciones respectivas. Se cuantificará lo siguiente: creatinina, nitratos, nitritos, citrulina y arginina.

Variables a medir

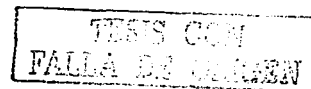
A continuación se enlistan las variables que se medieron, en qué fluido biológico, la técnica o equipo y la institución responsable de realizar dicha medición.

Cuadro 1.

Medición	Fluido biológico	Técnica/ Equipo	Institución Responsable
L-arginina	Plasma	HPLC	INPer
Plaquetas	Plasma	Cuenta de plaquetas	INPer
Metabolitos NO	Orina	Analizador bioquímico automatizado	UIA
Endotelina	Plasma	ELISA	INPer
Fibronectina	Plasma	ELISA	INPer
Factor VIII	Plasma	ELISA	INPer

Descripción de la muestra.

Donde:



PEL: Preeclampsia Leve

PES: Preeclampsia Severa

La distribución de la muestra fue la siguiente:

Grupo normal: 8 pacientes.

Grupo de preeclampsia leve: 8 pacientes

Grupo de preeclampsia severa: 7 pacientes

Grupo de eclampsia: 4 pacientes

Grupo de HELLP: 1 paciente

Tabla 1.

Evolución Normal del embarazo.

Medición	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv.Stand.
Plaquetas $\times 10^4/\text{ml}$	8	13.80	32.10	23.86	6.1
Fibronectina $\mu\text{g}/\text{mg}$	8	1.80	4	2.92	.84
Endotelina ng/ml	8	2.20	2.90	2.52	.27

Tabla 2.

Evolución a Preeclampsia leve.

Medición	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv.Stand.
Plaquetas x 10 ⁻⁴ /ml	8	16.5	221.0	46.68	.70
Fibronectina µg/mg	8	1.30	2.30	1.79	.31
Endotelina ng/ml	8	1.80	2.5	2.07	.22

Tabla 3.

Evolución a Preeclampsia severa.

Medición	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv.Stand.
Plaquetas x 10 ⁻⁴ /ml	7	11.20	22.80	15.85	5.6
Fibronectina µg/mg	7	.85	1.20	1.02	.12
Endotelina	7	1.0	2.6	1.87	.59

ng/ml					
-------	--	--	--	--	--

Tabla 4.

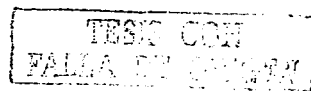
Evolución a Eclampsia.

Medición	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv.Stand.
Plaquetas x 10 ⁴ /ml	4	7.5	12.3	10.2	2.07
Fibronectina µg/mg	4	.72	.90	.79	.07
Endotelina ng/ml	4	1.30	2.30	1.75	.47

Tabla 5.

Evolución a HELLP.(Haemolisis, Elevated Liver enzymes, Plaquetopenia)

Medición	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv.Stand.
Plaquetas x 10 ⁴ /ml	1	2.5	2.5	2.5	--
Fibronectina µg/mg	1	.65	.65	.65	--

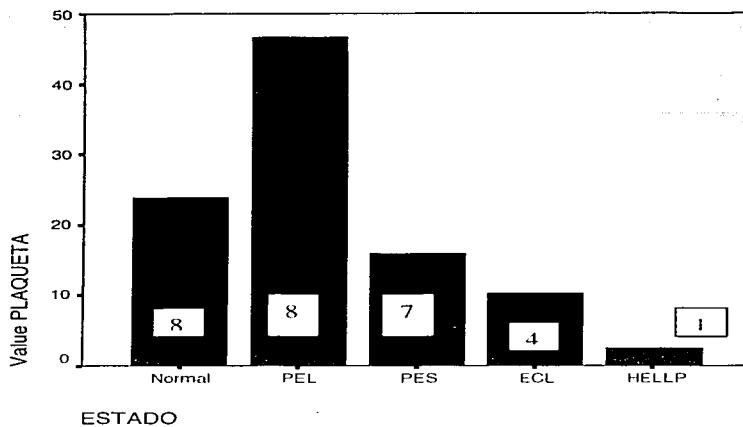


Endotelina ng/ml	1	2.40	2.40	2.40	--
---------------------	---	------	------	------	----

Figura 1.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estandar
PLAQUETAS	5	2.50	46.68	19.8180	16.9268

TRABAJOS CON
FALLA DE URGEN



Donde:

PEL: Preeclampsia Leve

PES: Preeclampsia Severa

ECL: Eclampsia

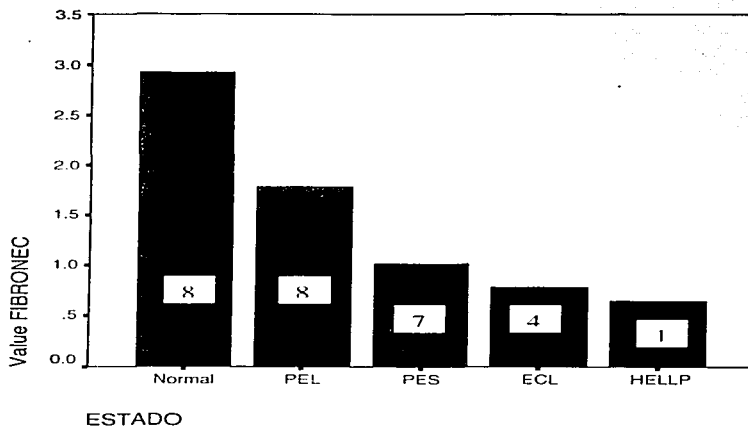
HELLP: Síndrome de HELLP (Haemolisis, Elevated Liver enzymes, Plaquetopenia)

En esta figura podemos observar el comportamiento de las plaquetas de acuerdo a la evolución de la enfermedad. Con excepción de los niveles en la Preeclampsia leve, se puede observar una tendencia hacia la plaquetopenia según va empeorando la enfermedad, esto es congruente con la bibliografía. Estos niveles demuestran el daño en el endotelio que va evolucionando según va empeorando el estado del síndrome de la preeclampsia. Lo que habría que evaluar son los niveles elevados en el estado de evolución en la preeclampsia leve, estos son resultados que no se esperaban y son dignos de ser observados para cuando la muestra se complete a lo esperado. Sin embargo debido a que la muestra en esta ocasión fue de 8 sujetos y la

muestra esperada es de 13, podemos esperar que la tendencia si es hacia una elevación.

Figura 2.

N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
FIBRONECTINA 5	.65	2.92	1.4340	.9402



Donde:

PEL: Preeclampsia Leve

PES: Preeclampsia Severa

ECL: Eclampsia

HELLP: Síndrome de HELLP (Haemolisis, Elevated Liver enzymes, Plaquetopenia)

En esta figura podemos observar la tendencia a la disminución en los niveles circulantes de fibronectina que son congruentes con algunas revisiones bibliográficas. Así mismo van de acuerdo a lo que se espera como resultado de un daño en el endotelio, medido a través de marcadores de coagulación como lo es la fibronectina.

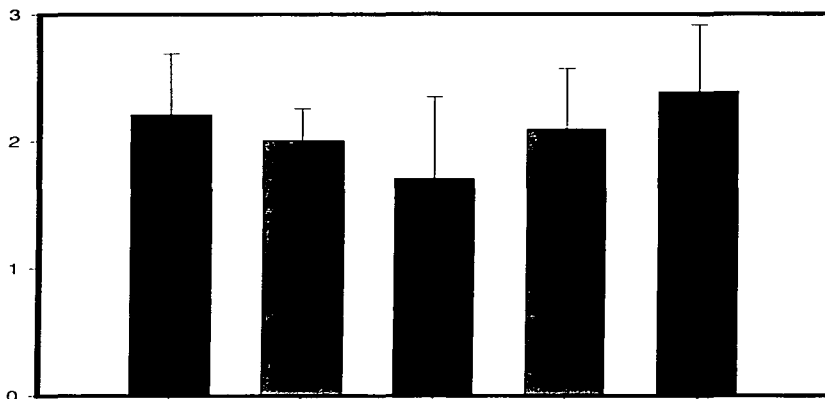
Tabla 3.

Descriptivos Endotelina.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estandar
Embarazo Normal	16	1.10	2.90	2.2125	.4770
Preeclampsia Leve	12	1.75	2.50	2.0067	.2525
Preeclampsia Severa	14	.95	2.80	1.7064	.6432
Eclampsia	11	1.30	2.90	2.0964	.4750
HELLP	5	1.85	3.20	2.3900	.5273

7 5 CON
FALLA

Endotelina.



Discusión:

El presente trabajo es un estudio retrospectivo, transversal y analítico donde se correlacionaron variables bioquímicas y hematológicas indicativas de lesión endotelial con las diversas formas del gradiente clínico de la enfermedad hipertensiva asociada al embarazo.

En la fisiopatología de la preeclampsia se ha considerado que el daño endotelial desempeña un papel central. De esta manera se han utilizado diferentes marcadores de activación y daño endotelial que se han correlacionado con el espectro de manifestaciones del padecimiento, tales como la cuantificación de plaquetas, concentraciones séricas de fibronectina, niveles circulantes del inhibidor del activador del plasminógeno 1, relación entre los inhibidores del activador del plasminógeno 1 y 2, productos derivados de la peroxidación lipídica, entre otros. Otros enfoques se han

orientado a la búsqueda de marcadores más específicos de la activación/daño endotelial, tales como factores de crecimiento o moléculas de adhesión celular, como la VCMA-1 o el factor de coagulación VIII y algunos péptidos derivados del daño endotelial. Todos ellos se incrementan en pacientes con preeclampsia de manera previa a la aparición de las manifestaciones clínicas.

Actualmente se considera al endotelio un tejido complejo con múltiples funciones entre ellas la prevención de la coagulación y la modulación del tono vascular. A sus efectos inhibidores de la trombogénesis se le ha descrito un componente pasivo donde el papel más importante se le atribuye a la adhesión intercelular donde la fibronectina proporciona estabilidad de unión célula-célula, aislando a los elementos sanguíneos del subendotelio trombogénico. Dentro de los mecanismos activos se mencionan: trombomodulina y su papel en la activación de la proteína C; las moléculas similares a la heparina acentuando los efectos de la antitrombina III; metabolización del ADP plaquetario inhibiendo su agregación; la síntesis de prostaciclina con efectos vasodilatadores y antiagregantes plaquetarios y la síntesis de óxido nítrico a partir del substrato L-arginina y la acción de la óxido nítrico sintetasa, molécula con efectos vasodilatadores y antiagregantes plaquetarios. Luego de la lesión endotelial queda expuesto el subendotelio vascular trombogénico por naturaleza, principalmente el colágeno fibrilar, fibronectina y elastina. La adhesión plaquetaria ocurre después del daño endotelial, fijándose al subendotelio a través de la fibronectina y el factor de Von Willebrand, propiciándose el consumo de tales factores por lo que se han utilizado como marcadores de daño endotelial. Se ha demostrado que los vasos de mujeres con preeclampsia generan menos

prostaciclina que vasos similares de pacientes embarazadas sanas. El NO actúa de manera sinérgica con la prostaciclina en sus efectos vasodilatadores y antiagregantes plaquetarios. La producción de NO disminuye con la disfunción endotelial secundaria al daño ya sea por inmunocomplejos, productos derivados de la peroxidación lipídica, formas reactivas de oxígeno y citocinas con efecto parácrino. Las plaquetas expresan NOS constitutiva y su actividad ha sido reportada disminuída en la preeclampsia. La infusión de L-arginina (sustrato de la NOS) disminuye la agregación plaquetaria, pero no cuando la mujer tiene preeclampsia. El estrés oxidativo como génesis de la disfunción endotelial es especialmente interesante en virtud de la similitud entre los cambios lipídicos de la preeclampsia y aquellos de aterosclerosis.

La activación del sistema de coagulación en las pacientes con preeclampsia tiene un espectro de manifestaciones donde el caso más severo es la CID , con desaparición de los factores procoagulantes, la aparición intravascular de productos de la degradación de fibrina y daño a órganos blando mediados por la formación de microtrombos. En las formas leves, sólo indicadores sensibles de la activación de la coagulación están presentes . La disminución de la cuenta plaquetaria es una de tales manifestaciones y es usualmente evidente sólo si se realizan cuantificaciones seriadas. Un nivel elevado de los productos de la degradación de la fibrina es un indicador sensible de la coagulación intravascular. Redeman y cols. Realizaron medición seriada del número de plaquetas en pacientes con riesgo de preeclampsia y encontraron una disminución en la cuenta plaquetaria coincidiendo con la aparición de signos clínicos de la enfermedad. En el presente trabajo se mostró consumo

plaquetario y de fibronectina asociados a daño endotelial que se correlaciona con el gradiente clínico de gravedad de la enfermedad hipertensiva asociada al embarazo. Asimismo, se han demostrado signos de disfunción plaquetaria, reducción en los niveles séricos de antitrombina III, reducción en la relación VIII activo y antigénico presentes en formas leves de preeclampsia y que preceden a la aparición de las manifestaciones clínicas. La etiología de los cambios en los factores de coagulación es aún controversial; el daño vascular secundario al vasoespasmo puede iniciar las manifestaciones aunque probablemente este mecanismo juegue un papel intensificando la activación de los sistemas de coagulación en la preeclampsia severa y su forma es menos clara en variantes leves del padecimiento. Los signos de disfunción endotelial también anteceden a la enfermedad clínica y la activación de las plaquetas y otros componentes de la cascada de coagulación son consecuencias bien reconocidas de la activación endotelial. El incremento de la activación en el sistema de coagulación se manifiesta como daño a órgano blanco mediado por la formación de microtrombos, lo cual se ha demostrado en placenta, glomérulo e hígado y ha sido demostrado por trabajos de algunos investigadores (Arias, Mancilla-Jiménez). Los cambios recientes en la cascada de coagulación: relación entre VIII activo y antigénico, así como la trombocitopenia se correlacionan mejor con el pronóstico fetal y con los índices de restricción del crecimiento intrauterino. Las manifestaciones clínicas de la preeclampsia-eclampsia se explican, al menos en parte, por la activación exagerada del sistema de coagulación así como la disminución relativa de los vasodilatadores sistémicos: ambos fenómenos secundarios al daño endotelial.

Los resultados del presente trabajo muestran claramente la evidencia clínica de uno de los eventos fisiopatológicos, la activación del sistema de coagulación, disminución en la cuenta de plaquetas y en la concentración de fibronectina, ambos secundarios a consumo por daño endotelial y agregación plaquetaria, hechos que se correlacionan con el gradiente clínico de la preeclampsia-eclampsia.

Existe evidencia en la literatura de la importancia relativa de los factores vasodilatadores y vasoconstrictores sistémicos y principalmente uteroplacentarios en relación a la fisiopatología de la preeclampsia, se han estudiado: prostaciclina y NO (vasodilatadores) y tromboxano A2 y la endotelina (vasoconstrictores y agregantes plaquetarios). La importancia del incremento en los factores presores arteriales se ha documentado sólo en algunos trabajos. Actualmente se considera de mayor importancia los factores vasodilatadores y se ha considerado a la preeclampsia como una condición caracterizada por un déficit relativo de compuestos vasodilatadores entre ellos el NO.

En este estudio se determinaron las concentraciones de uno de los vasoconstrictores más potentes que se conocen, la endotelina, producto de la síntesis activa del endotelio, así como una correlación con las diversas formas clínicas de la preeclampsia-eclampsia. La endotelina es una molécula derivada de las células endoteliales y su síntesis se incrementa en caso de daño endotelial y tiene entre sus efectos fisiopatológicos incrementar el tono de la vasculatura sistémica y de manera secundaria aumenta la adhesión plaquetaria. Al menos desde un punto de vista teórico, la gravedad del padecimiento debería asociarse a un incremento de las concentraciones de endotelina; sin embargo, en el presente estudio se mostró que

las pacientes con preeclampsia leve y severa presentaron menor concentración sérica de endotelina, lo que puede ser una manifestación de la preponderancia del déficit de factores vasodilatadores en estas formas clínicas del padecimiento y existe evidencia que el déficit de óxido nítrico puede ser la molécula implicada tanto en la vasodilatación sistémica como en el efecto antiagregante plaquetario. Por otro lado, en los casos de eclampsia y síndrome de HELLP el componente vasoconstrictor cobra importancia, evidenciándose como un incremento en las concentraciones séricas de endotelina y que se puede correlacionar con la gravedad clínica de estas formas del espectro preeclampsia-eclampsia y que puede traducir un mayor daño en la función endotelial que se manifiesta como un incremento de los factores presores sistémicos como la endotelina y la disminución real de los factores vasodilatadores. En el presente estudio también se correlacionó el número de plaquetas y la concentración sérica de fibronectina con las diversas formas de preeclampsia. En la literatura médica existe información en lo relativo al incremento en la activación del sistema de coagulación que se traduce en una disminución progresiva en el número de plaquetas a medida que se incrementa la gravedad del padecimiento y en relación a los controles lo que desde el punto de vista fisiopatológico traduce un incremento en la adherencia plaquetaria al subendotelio expuesto por daño endotelial, activación de la función secretora, formación de microtrombos y consumo de fibronectina. Este hecho fisiopatológico se mostró en los resultados del presente estudio donde se apreció disminución progresiva de las concentraciones de fibronectina en relación a los controles y de manera directa con el gradiente clínico de la enfermedad hipertensiva asociada al embarazo.

Aspectos Eticos

Este estudio ha sido diseñado de acuerdo a las recomendaciones emitidas por el American College of Obstetrician and Gynecologists (79).

El riesgo de la suplementación oral de L-arginina a mujeres embarazadas y sus productos parece ser inexistente. La literatura publicada al respecto no reporta efectos tóxicos o indeseables aún con cantidades de L-arginina más altas que las que serán utilizadas en este estudio por espacio de más de seis meses. Los estudios publicados sobre el efecto de la infusión intravenosa de L-arginina no reportan ningún efecto colateral, excepto que disminuyen la presión arterial sistémica. El único efecto no deseado del consumo de las barras que serán utilizadas es su efecto sobre la solidez de las heces, sin que lleguen a ser semilíquidas y obedece a su contenido en fibra. Las mujeres serán estudiadas en un período en el que la embriogénesis ya se encuentra terminado, razón por la que cualquier efecto teratogénico tampoco es probable.

Se utilizarán todos los procedimientos disponibles para proteger o minimizar los riesgos potenciales a las pacientes en seguimiento. Se pondrá especial énfasis en la confidencialidad de la información. A cada paciente se le asignará un código que será utilizado en todas formas de captura y la lista de apertura de códigos será mantenida aparte por uno de los investigadores involucrados. Todas las pacientes

continuarán bajo la vigilancia de su médico obstetra y nutriólogo a lo largo de la gestación y el estudio.

El Comité de Ética Institucional designará a un monitor externo que tendrá acceso a los códigos y resultados. Su función será exclusivamente determinar en diferentes cortes del estudio, si alguna de las maniobras está resultando de beneficio para las pacientes, y así, interrumpir el proyecto y asignar a todas las pacientes a ese tratamiento.

Es importante enfatizar también, que la compañía que fabrica la barra HeartBar no participará de ninguna manera distinta a la fabricación de las distintas barras que utilizaremos en el estudio y no proveerá ningún soporte económico para el mismo.

Bibliografía.

1. Centers for Disease Control and Prevention (1995) Maternal Mortality-United States, 1982-1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 47:705-708.
2. Berg, C.J., Atrash, H.K., Koonin, L.M., Tucker, M. (1996) Pregnancy-related mortality in the United States, 1987-1990. *Obstet. Gynecol.* 88: 161-167.
3. Angulo-Vazquez, J., Ornelas Alcantar, J., Rodriguez Aria, E.A., Inigo Riesgo, C.A., Torres Gomez, L.G. (1999) Maternal mortality at the gynecologic-obstetric hospital of the western national medical center, Mexico. A 12-year review. *Ginecol. y Obstet. De Mexico* 67: 419-424. [in Spanish]
4. MacGillivray, I. (1953) Some observations on the incidence of preeclampsia. *J. Obstet. Gynecol.* 65: 536-542.
5. Tervila, L., Goecke, C., Timonen, S. (1973) Estimation of gestosis of pregnancy (EPH-gestosis) *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 52: 235-245.
6. Friedman, E.A., Neff, R.K. (1977) Pregnancy outcome as related to hypertension, edema, and proteinuria. In *Hypertension in Pregnancy* M.D. Lindheimer, A.I. Katz, F.P. Zuspan, eds). John Wiley, New York.
7. Dekker, G.A., Sibai, B.M. (1991) Early detection of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165: 160-172.
8. Sibai, B.M., Gordon, T., Thom, E. et al. (1995) Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women. A prospective multicenter study. The National Institutes of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172: 642-648.
9. Meekins, J.W., Pijenburg, R., Hanssens, M., McFadyen, I.R., Van Asshe, A. (1994) A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 101: 669-674.
10. Roberts, J.M., Redman, C.W. (1993) Pre-eclampsia: more than pregnancy induced hypertension. *Lancet* 341: 1447-1451.
11. Page, N.M., Woods, R.J., Gardiner, S.U. et al. (2000) Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature* 405: 797-800.
12. Halligan, A., Bonnar, J., Sheppard, B., Darling, M. Walshe, J. (1994) Haemostatic, fibrinolytic and endothelial cell variables in normal pregnancies and preeclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 101: 488-492.
13. Reith, A., Booth, N.A., Moore, N.R., Cruickshank, D.J., Bennett, B. (1993) Plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in normal pregnancies, pre-eclampsia and hydatiform mole. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 100: 370-374.

14. Davidge, S.T., Stranko, C.P., Roberts, J.M. (1996) Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174: 1008-1013.
15. Hubel, C.A., McLaughlin, M.K., Evans, R.W., Hauth, B.A., Sims, C.J., Roberts, J.M. (1996) Fasting serum triglycerides, free fatty acids, and malondialdehyde are increased in preeclampsia, are positively correlated and decrease within 48 hours post partum. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174: 975-982.
16. Arachavaleta-Velasco, F., Hernández-Guerrero, C., Ahued-Ahued, R., Vadillo-Ortega, F., (2000) Evidence of endothelial cytotoxic compounds in placental extracts from preeclamptic women, *J. Soc. Gynecol. Invest.* 7:114-117.
17. Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacologic Reviews* 43: 109-142.
18. Seligman, S.P., Buyon, J.P., Clancy, R.M., Young, B.K., Abramson, S.B. (1994) The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171: 944-948.
19. Conrad, K.P., Joffe, G.M., Kruszyna, H., Kruszyna, R., Rochelle, L.G., Smith, R.P., Chavez, J.E., Mosher, M.D. (1993) Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J.* 7: 566-571.
20. Ni, Y., Meyer, M., Osol, G. (1997) Gestation increases nitric oxide-mediated vasodilatation in rat uterine arteries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 176: 856-864.
21. Ashworth, J.R., Barker, P.N., Warren, A.Y., Johnsom, I.R. (1999) Mechanisms of endothelium-derived relaxation in myometrial resistance vessels and their alteration in preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy* 18: 57-71.
22. Kublickiene, K.I., Nisell, H., Poston, L., Kruger, K., Lindblom, G. (2000) Modulation of vascular tone by nitric oxide and endothelin 1 in myometrial resistance arteries from pregnant women at term. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182: 87-93.
23. Boccardo, P., Soregaroli, M., Aiello, S., Noris, M., Donadelli, R., Lojaco, A., Benigni, A. (1996) Systemic and fetal-maternal nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 103: 879-886.
24. Lopez-Jaramillo, P., Narvaez, M., Calle, A., Rivera, J., Jacome, P., Ruano, C., Nava, E. (1996) Cyclic guanosine 3',5' monophosphate concentrations in preeclampsia: effect of hydralazine. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 103: 33-38.
25. Cockell, A.P., Poston, L. (1998) Flow-mediated vasodilatation is enhanced in normal pregnancy but reduced in preeclampsia. *Hypertension* 30: 247-251.
26. Cameron, I.T., Van Papendorf, C.L., Palmer, R.M.J. et al. (1993) Relationship between nitric oxide synthesis and increase in systolic blood pressure in women with hypertension in pregnancy. *Hypertens. Pregnancy* 12: 85-97.
27. Facchinetti, F., Longo, M., Piccinini, F., Neri, I., Volpe, A. (1999a) L-arginine infusion reduces blood pressure in preeclamptic women through nitric oxide release. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 6: 202-207.
28. Gunewald, C., Carlstrom, K., Kumlien, G., Ringqvist, A., Lundberg, J. (1998) Exhaled oral and nasal nitric oxide during L-arginine infusion in preeclampsia. *Gynecol. Obstet. Investig.* 46: 232-237.
29. Anumba, D.O.C., Ford, G.A., Boy, R.J., Robson, S.C. (1999) Stimulated nitric oxide release and nitric oxide sensitivity in forearm arterial vasculature during

- normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 181: 1479-1485.
30. Byrne, B.M., Howard, R.B., Morrow, R.J., Whiteley, K.J., Adamson, S.L. (1997) Role of the L-arginine nitric oxide pathway in hypoxic fetoplacental vasoconstriction. *Placenta* 18: 627-634.
 31. Neri, I., Mazza, V., Galassi, M.C., Volpe, A., Facchinetti, F. (1996) Effects of L-arginine on utero-placental circulation in growth-retarded fetuses. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 75: 208-212.
 32. Delacretaz, E., de Quay, N., Waeber, B. et al. (1995) Differential nitric oxide synthase activity in human platelets during normal pregnancy and preeclampsia. *Clin. Sci.* 88: 607-610.
 33. Facchinetti, F., Neri, I., Piccinini, F., Marietta, M., Torelli, U., Bruschetti, P.L., Volpe, A. (1999b) Effect of L-arginine load on platelet aggregation: a comparison between normotensive and preeclamptic pregnant women. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 78: 515-519.
 34. deBelder, A., Lees, C., Martin, J. et al. (1995) Treatment of HELLP syndrome with nitric oxide donors. *Lancet* 345: 124-125.
 35. Yallampalli, C., Garfield, R.E. (1993) Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169: 1316-1320.
 36. Diket, A.L., Pierce, M.R., Munshi, U.K., Voelker, C.A., Eloby-Childress, S., Greenberg, S.S., Zhang, X.J., Clark, D.A., Miller, M.J. (1995) Nitric oxide inhibition causes intrauterine growth retardation and hind-limb disruptions in rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172: 1943-1950.
 37. Buhimschi, I., Yallampalli, C., Chwalisz, K., Garfield, R.E. (1995) Preeclampsia-like conditions produced by nitric oxide inhibition: effects of L-arginine, D-arginine and steroid hormones. *Human Reprod.* 10: 2723-2730.
 38. Molnar, M., Suto, T., Toth, T., Hertelendy, F. (1994) Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170: 1458-1466.
 39. Edwards, P.D., Topping, D., Kontaridis, M.I., Moldawer, L.L., Copeland, E.M., III, Lind, D.S. (1997) Arginine-enhanced enteral nutrition augments growth of a nitric oxide-producing tumor. *J. Parenteral Enteral Nutr.* 21: 215-219.
 40. Hennessy, A., Gillen, A.G., Duggin, G.G., Horvath, J.S., Tiller, D.J. (1999) *Clin. Experimen. Pharm. Physiol.* 26: 849-852.
 41. Helmbrecht, G.D., Farhat, M.Y., Lochbaum, L., Brown, H.E., Yadgarova, K.T., Eglinton, G.S., Ramwell, P.W. (1996) L-arginine reverses the adverse pregnancy changes induced by nitric oxide synthase inhibition in the rat. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175: 800-805.
 42. Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.
 43. Andrew, P.J., Mayer, B. (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 43: 521-531.
 44. Bredt, D.S. (1999) Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radical Res.* 31: 577-596.

45. Huang, P.L. (2000) Lessons learned from nitric oxide synthase knockout animals. *Sem. Perinatol.* 24: 87-90.
46. Barbul, A. (1990) Arginine and immune function. *Nutrition* 6: 59-62.
47. Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S. (1992) Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J. Cardiovascular Pharm.* 20 (Suppl. 12) S60-62.
48. Fickling, S.A., Williams, D., Vallance, P., Nussey, S.S., Whitley, G. St. J. (1993) Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Lancet* 342: 242-243.
49. Chen, B.M., Xia, L.W., Zhao, R.O. (1997) Determination of N(G),N(G)-dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography B. Biomed. Sci. Applic.* 692: 467-471.
50. Holden, D.P., Fickling, S.A., Whitley, G.S., Nussey, S.S. (1998) Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178: 551-556.
51. Pettersson, A., Hedner, T., Milsom, I. (1998) Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia. *Acta Obstet. Gynec. Scand.* 77: 808-813.
52. Maxwell, A.J., Zapien, M.P., Stone, P.H. (2000c) Improvement in exercise capacity and quality of life in patients with stable angina by a medical food. *Vascular Medicine, in Press.*
53. Wichman, K., Ryden, G., Wichman, M. (1984) The influence of different positions on Korotkoff sounds on the blood pressure measurements in pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.* 118: 25-28.
54. National High Blood Pressure Education Program Working Group Consensus Report on high blood pressure in pregnancy. (1990) *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163: 1689-1712.
55. Hughes, E.C. (1972) *Obstetrics-Gynecological Terminology.* F.A. Davis, Philadelphia, PA p. 422-423.
56. Castillo, L., de Rojas, T.C., Champman, T.E., Vogt, J., Burke, J.F., Tannenbaum, S.R., Young, V.R. (1993b) Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult men. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 193-197.
57. Begum, S., Yamasaki, M., Mochizuki, M. (1996) Urinary levels of nitric oxide metabolites in normal pregnancy and preeclampsia. *J. Obstet. Gynecol. Res.* 22: 551-559.
58. Davidge, S.T., Stranko, C.P., Roberts, J.M. (1996) Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174: 1008-1013.
59. Roberts, J.M., Davidge, S.T. (1997) Plasma nitrites as an indicator of nitric oxide production: Unchanged production or reduced renal clearance in preeclampsia? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 176: 954-955.
60. Viinikka, L. (1996) Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* 56: 577-581.

61. Manninen, A., Vuorinen, P., Laippala, P., Tuimala, R., Vapaatalo, H. (1994) Atrial natriuretic peptide and cyclic guanosine-3',5'-monophosphate in hypertensive and during nifedipine treatment. *Pharm. Tox.* 74: 153-157.
62. Schneider, F., Lutun, P., Baldauf, J.J., Quirin, L., Dreyfus, M., Ritter, J., Tepe, J.D. (1996) Plasma cGMP concentrations and their relationship with changes in blood pressure levels in pre-eclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 75: 40-44.
63. Chapman, A.B., Abraham, W.T., Zamudio, S., Coffin, C., et al. (1999) Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int.* 54: 2056-2063.
64. Saftlas, A.F., Olson, D.R., Franks, A.L. et al. (1990) Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States, 1979-1986. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163: 460-465.
65. Casanueva, E., Kaufer-Horwitz, M., y col. *Nutriología Médica., México: Médica Panamericana, 1995: 106.*
66. Strickland, D.M., Guzick, D.S., Cox, K. et al. (1986) The relationship between abortion in the first pregnancy and the development of pregnancy-induced hypertension in subsequent pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 154: 146-148.
67. Seidman, D.S., Ever-Hadani, P., Stevenson, D.K. et al. (1989) The effect of abortion on the incidence of pre-eclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 33: 109-114.
68. Marti, J.J., Herrman, U. (1977) Immunogestosis. A new concept of "essential" EPH gestosis, with special consideration of the primigravid patient. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 128: 489-493.
69. Klonoff-Cohen, H.S., Savitz, D.A., Cefalo, R.C., McCann, M.F. (1989) An epidemiologic study of contraception and preeclampsia. *JAMA* 262: 3143-3147.
70. Klonoff-Cohen, H., Edelstein, S., Savitz, D. (1993) Cigarette smoking and preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 81: 541-544.
71. Underwood, P., Kesler, K., O'Lane, J., Callagan, D.A. (1967) Parental smoking empirically related to pregnancy outcome. *Obstet. Gynecol.* 29: 1-8.
72. Russell, C., Taylor, R., Law, C. (1968) Smoking in pregnancy, maternal blood pressure, pregnancy outcome, baby weight and growth, and other related factors: A prospective study. *Br. J. Prev. Soc. Med.* 22: 119-126.
73. Marcoux, S., Brisson, J., Fabia, J. (1989) The effect of cigarette smoking on the risk of preeclampsia and gestational hypertension. *Am. J. Epidemiol.* 130: 950-957.
74. Duffus, G., MacGillivray, I. (1968) The incidence of preeclamptic toxemia in smokers and non-smokers. *Lancet* 1: 994-995.
75. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and ¹⁵N nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138.
76. Stein, W.H., Morre, S. (1954) The free amino acids of human blood plasma. *J. Biol. Chem.* 211: 915-959.

77. Lee, P.L.Y. (1974) Single column system for accelerated amino acid analysis of physiological fluids using five lithium buffers. *Biochem. Med.* 10: 107-121.
- 78.
79. ACOG Committee Opinion Number 213 (1998) Ethical considerations in research involving pregnant women.
80. Roberts, J.M., Taylor, R.M., Musci, T.J., Rodgers, G.M., Hubel, C.A., McLaughlin, M.K., (1989) Preeclampsia: An endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:1200-4.
81. Habitch, J. *Bol Oficina Sanit Panam* (1974) 375.
82. Moshfegh A, Borud L, Perloff, B, LaComb R. Improved Method for the 24-hour Dietary Recall for Use in National Surveys. *FASEB Journal* 1999 13(4):A603. Que según el formato con el que estás citando quedaría: Moshfegh A et al. *FASEB J.* (1999) A603.
83. Mahan, K.L., Escott-Stump, Krause's Food, Nutrition, & Diet Therapy, 10th ed., Philadelphia (2000):55.
84. Pau, M.Y., Milner, J.A. (1981), Arginine deficiency during gestation and lactation in the rat, *J.Nutr.* 112:1827-1833.
85. Zieve, L. (1986), Conditional deficiencies ornithine or arginine, *J.Am.Coll.Nut.*, 5:167-176.
86. Miller-Keane, *Encyclopedia & Dictionary of Medicine, Nursing, & Allied Health*, 6th ed., Philadelphia (1997): 1262.