

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO



# **Evaluación del perfil de citoquinas en plasma de pacientes con embarazo preeclámptico y fisiológico**

*Ana Adélia Ribeiro Dias Pires*

**Tesis para optar al grado de magíster en Ciencias Médicas mención**

**Inmunología**

**Directora de tesis:** Dra. Mercedes López Nitsche

**Co director de tesis:** Dr. Mauro Parra Cordero

2013

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

**ANA ADÉLIA RIBEIRO DIAS PIRES**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas mención Inmunología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 26 de Julio de 2013.

---

**PROF. DRA. MERCEDES LOPEZ N.**

DIRECTORA DE TESIS

Laboratorio de Regulación e Inmunología del Cáncer, Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

---

**PROF. DR MAURO PARRA C.**

Co DIRECTOR DE TESIS

Programa de Medicina Materno Fetal, Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

---

**PROF. DRA. MARGARITA VEGA**

---

**PROF. DR. JUAN CARLOS AGUILLÓN**

---

**PROF. DR. ARTURO FERREIRA**

---

**PROF. DRA. GITTITH SÁNCHEZ**

**PRESIDENTE COMISIÓN**

**A DIOS, por estar incondicionalmente presente  
en los insignificantes pasos que doy  
en este inmenso universo ...**

**Cita personal**

**“Estoy convencido de mis propias limitaciones,  
y esta convicción es mi fortaleza”**

**Mahatma Gandhi**

## AGRADECIMIENTOS

*“ (...)Gracias la vida que me ha dado tanto, me ha dado la risa, me ha dado el llanto, así yo distingo dicha de quebranto, los dos materiales que forman mi canto (...)”*

No podría incurrir con mejor descripción de mi proceso de tesis que la realizada por Violeta Parra.

Estoy profundamente agradecida de todos los que contribuyeron a mi aprendizaje científico y dejo acá el reconocimiento a los que participaron en este avance académico: mis colegas, profesores, tutores y todos los que me han aportado de forma directa o indirecta al mayor conocimiento. Ciertamente me es difícil nombrar a todos en estas escuetas líneas. Sin embargo, me gustaría citar a algunas personas que fueron más participativas durante este proceso, de manera que sientan que su mayor participación queda plasmada en esta tesis.

Fabián Tempio fue el primero que me recibió y fue un apoyo indispensable en esta tesis, ayudándome desde el diseño experimental hasta la realización de la misma. Bárbara Pesce, que tan amablemente me apoyaba en mis dudas y me ayudó a realizar los experimentos. Felipe Falcón y Leonel Muñoz que fueron indispensables con sus conocimientos de análisis estadístico. A Cristian Falcón que con sus ideas, me ayudó a pensar en soluciones a los problemas que se presentaron. A mi tutora Mercedes López que con su conocimiento y humanidad me ayudó en todos los aspectos en esta tesis, desde el personal hasta lo técnico. A mi tutor Mauro Parra que me ha enseñado mucho durante este proceso.

Adicionalmente me gustaría agradecer al Dr Flávio Salazar y a la Dra Molina que me han aportado con la experiencia para solucionar los impases que me han sido presentados. A todos los colegas y personal técnico del laboratorio tanto de la Dra López como del Dr Salazar, como la Jimena Gatica, Carolina Behrens, Marisol Briones, Tamara García, Iván Flores, Carolina Ortiz, Claudio Perez, Patricia Guerrero y tantos otros nombres que tendré que dejar en anonimato, sin embargo reconociendo la importancia de TODOS, absolutamente todos que me han ayudado en el desarrollo de esta tesis.

Más allá del importante desarrollo académico, en esta ocasión me gustaría enfatizar a algo más abstracto e inmensurable, MIS LECCIONES DE VIDA.

Cuando entré a este magíster había llegado recién de Brasil, después de haber dejado todo lo que era seguro en mi vida para aventurarme en el abismo de la incertidumbre en un nuevo país. Indudablemente esto me ha hecho madurar, pero en este desafío he tenido apoyo y es por eso que mi profundo agradecimiento va a todos los que estuvieron a mi lado en estos momentos tan difíciles. A mi marido Sebastián, compañero de tantas batallas, 12 años juntos son los que me motivan a seguir, y sin él este abismo habría sido mucho más amedrentador de lo que fue. A mis padres, Antonio y Fátima, que me apoyan incondicionalmente; sin ellos no sería la mitad de lo que soy hoy. A mis tres amados hermanos, Guto, Alexandre y Bernardo, que me hacen recordar todos los días qué tan lindo es el concepto de la fraternidad. A la familia de mi marido, que me ha acogido como a una hija y me han hecho sentirme en casa. A mis amigos en Chile, sin ellos seguramente los días habrían sido menos alegres y muchos más grises. Por último, a mi querida maestra, Max Tovar, que me ha dado soporte incondicional en todo este proceso, sin ella me hubiera estancado en las dificultades que se presentaron en mi camino.

Adicionalmente quiero agradecer a estas mismas dificultades, sin las cuales no sabría el verdadero significado de **PERSERVERAR**. Agradezco a la ausencia absoluta de control, que me permitió conocer el real concepto de la **HUMILDAD**. Además siento un profundo agradecimiento a mis fracasos, sin ellos no sabría **REINCORPORARME** y **PERDONARME**.

Recordando el **SENTIR**, otro gran aprendizaje en esta jornada, con esta tesis experimenté la rabia, el dolor, la alegría, el fracaso, la frustración, la amistad, el compañerismo y tantos otros sentimientos que hoy *“forman mi canto”*, y agradezco inmensamente a cada uno de ellos.

En lugar de destaque agradezco a **DIOS**, y todos los caminos que tomo para llegar a **ÉL**; a través del Grande Misterio, la Madre Tierra, el Padre Cielo, elementos, elementales, hermano de las estrellas y a cada una de las enseñanzas chamánicas y cósmicas que participan de mi vida. Agradezco a **ÉL** por estar siempre a mi lado, y por sentirlo presente cotidianamente, a pesar de mi valor e insignificancia en este inmenso Universo.

Por último agradezco haber aprendido a **AGRADECER**, una jornada personal muy profunda que sólo yo conozco. Gracias a esto, hoy quiero a todas las cosas buenas y malas que me han pasado, juntas escriben mi historia.

“¡Gracias a la Vida!”

## Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	9
<b>Resumen</b> .....	12
<b>Abstract</b> .....	13
<b>Introducción</b> .....	14
Sistema Inmune y embarazo .....	14
Mecanismo de Tolerancia Materno Fetal .....	16
Citoquinas y Perfiles Linfocitarios en el embarazo Preeclámptico y Fisiológico...19	
IFN- $\gamma$ .....	20
IL-17A .....	21
TNF- $\alpha$ .....	21
IL-1 $\beta$ .....	22
IL-6 .....	23
IL-8 .....	23
IL-10 .....	24
IL-18 .....	24
TGF- $\beta$ .....	25
<b>Hipótesis</b> .....	27
<b>Objetivos</b> .....	28
Objetivo General .....	28
Objetivos Específicos .....	28
<b>Materiales y Métodos</b> .....	29
Muestras .....	29
Pacientes .....	29
Criterios Clínicos .....	30
Metodología .....	31
Análisis Estadístico .....	32
<b>Resultados</b> .....	33
La concentración de IL-18 aumenta progresivamente en el embarazo Fisiológico.. 38	

La concentración de IL-18 no se presenta alterada previamente a los síntomas de la preeclampsia .....	39
La concentración de IL-18 es menor en mujeres con Preeclampsia Severa .....	41
La menor concentración de IL-18 está asociada al uso de medicamentos en la preeclampsia .....	43
La menor concentración de IL-18 está asociada a la ausencia de trabajo de parto en la preeclampsia .....	44
La concentración de TGF- $\beta$ 1 está disminuida en el embarazo al ser comparada con mujeres no embarazadas .....	45
La concentración de TGF- $\beta$ 1 no está alterada previamente a los síntomas de la enfermedad .....	46
La concentración de TGF- $\beta$ 1 está aumentada en mujeres con preeclampsia en el momento del parto al ser comparada con parto de embarazo fisiológico .....	48
La concentración de TGF- $\beta$ 1 no se asocia al uso de medicamentos en las mujeres preeclámpticas .....	49
La concentración de TGF- $\beta$ 1 no se asocia a la presencia o ausencia de trabajo de parto en las mujeres preeclámpticas .....	50
<b>Conclusiones</b> .....	54
<b>Discusión</b> .....	55
<b>Referencias</b> .....	64

## Abreviaturas

**β-HCG:** Subunidad Beta de la Gonadotropina Corionica Humana (**H**uman **C**horionic **G**onadotropin Beta)

**CD4:** Cúmulo de **D**iferenciación 4. Correceptor de señalización y adhesión de linfocitos T restringido a MHC-II

**CD8:** Cúmulo de **D**iferenciación 8. Correceptor de señalización y adhesión de linfocitos T restringido a MHC-I

**CD14:** Cúmulo de **D**iferenciación 14. Correceptor de LPS.

**CD16:** Cúmulo de **D**iferenciación 16. Receptor de porción Fc de Inmunoglobulinas.

**CD56:** Cúmulo de **D**iferenciación 56. Glicoproteína de membrana involucrada en la función de adhesión celular.

**CD163:** Cúmulo de **D**iferenciación 163. Receptor de tipo scavenger

**CD209:** Cúmulo de **D**iferenciación 209. Receptor de reconocimiento de glicoproteínas con alto contenido de manose. También conocido como **DC-SIGN** (**D**endritic **C**ell-**S**pecific **I**ntercellular adhesion molecule-3-**G**rabbing **N**on-integrin)

**DAMPS:** Patrones moleculares asociadas al daño (***D**amage **A**ssociated **P**atterns*)

**DC:** Célula Dendrítica (***D**endritic **C**ells*)

**dNK:** Células Asesinas Naturales deciduales (**d**ecidual **N**atural **K**iller cells)

**FasL:** Ligando del receptor de apoptosis FAS. (CD95L)

**FoxP3:** **F**orkhead **b**ox **P**3. Factor de transcripción presente en células inmunes, principalmente linfocitos reguladores.

**HLA:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad en Humanos (**H**uman **L**eukocyte **A**ntigen)

**IDO:** Indoleamine 2,3-dioxygenase. Enzima catalizadora de Triptofano.

**IFN-α:** Interferon-alpha

**IFN-γ:** Interferon-gamma

**IL:** Interleuquina

**IMC:** Índice de Masa Corporal

**LPS:** Lipopolisacárido

**LT:** Linfocitos T

**MHC:** Complejo Principal de Histocompatibilidad (**M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex)

**MgSO<sub>4</sub>:** Sulfato de Magnesio

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear  $\kappa$ B. (**N**uclear **F**actor -  $\kappa$ B). Factor de transcripción.

**NK:** Células Asesinas naturales (**N**atural **K**iller cells)

**NKT:** Células T Asesinas Naturales (**N**atural **K**iller **T** Cells)

**PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos (**P**atogen **A**ssociated **M**olecular **P**atterns)

**PBMC:** Células mononucleares de sangre periférica (***P**eripheral **B**lood **M**ononuclear cell*)

**PD-L1:** Ligando de muerte programada tipo 1 (**P**rogrammed **D**eath **L**igand 1)

**PE:** Preeclampsia

**PGF:** Factor de Crecimiento Placentario (**P**lacental **G**rowth **F**actor)

**pNK:** Células Asesinas Naturales Periféricas (**p**eripheral **N**atural **K**iller cells)

**PRR:** Receptor de reconocimiento de patrones (**P**attern **R**ecognition **R**eceptor). Receptor de reconocimiento de PAMPs y DAMPs.

**TGF- $\beta$ 1:** Factor de transformación y crecimiento beta 1 (***T**ransforming **G**rowth **F**actor **B**eta 1*)

**T<sub>H</sub>:** Linfocitos T Helper (***T** **H**elper lymphocytes*)

**T<sub>H</sub> 1:** Linfocitos T Helper tipo 1 (***T** **H**elper lymphocytes type 1*)

**T<sub>H</sub> 2:** Linfocitos T Helper tipo 2 (***T** **H**elper lymphocytes type 2*)

**T<sub>H</sub>3:** Linfocitos T Helper 3 (***T** **H**elper lymphocytes type 3*)

**T<sub>H</sub>17:** Linfocitos T Helper tipo 17 (***T** **H**elper lymphocytes 17*)

**TLR:** Receptor tipo Toll

**Treg:** Linfocitos T reguladores

**Treg FoxP3:** Linfocitos T reguladores Foxp3

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral –  $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$* )

**VEGF:** Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor)

**VEGF-R:** Receptor de Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor **R**eceptor)

## Resumen

El feto semi alogénico necesita coexistir con el sistema inmune materno durante todo el embarazo. Esta es una condición que ha intrigado a los científicos hace mucho y hasta la fecha no se conocen por completo los mecanismos de tolerancia materno-fetal. Entre las patologías del embarazo, la preeclampsia es la principal causa de morbimortalidad materna y fetal en todo el mundo, con una prevalencia de 3-5% de los nacimientos. A pesar de ser reconocida como una enfermedad de etiología multifactorial, se ha planteado que el aumento de la respuesta inflamatoria puede estar relacionado, al inicio o al desarrollo de la preeclampsia. Sin embargo, los estudios inmunológicos previos a los síntomas clínicos son escasos. El objetivo de este estudio fue determinar el perfil de citoquinas plasmáticas durante el 1<sup>er</sup> trimestre y 2<sup>o</sup> trimestre del embarazo y al momento del parto.

**Metodología:** La toma de muestras se realizó en el 1<sup>er</sup> trimestre, 2<sup>o</sup> trimestre y en el momento del parto. Un total de 86 pacientes con embarazo fisiológico fueron incluidas en el estudio (46 en el 1<sup>er</sup> trimestre, 20 en el 2<sup>o</sup> trimestre y 20 en el parto). Para el embarazo preecláptico, un total de 63 pacientes fueron incluidas en el estudio {22 en el 1<sup>er</sup> trimestre, 11 en el 2<sup>o</sup> trimestre y 30 en el parto (10 con preeclampsia moderada y 20 con preeclampsia severa)}. Como control se analizaron 20 pacientes no embarazadas. Las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-18, TGF- $\beta$ 1 e IL-10 fueron determinadas en plasma mediante el uso del kit FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria).

**Resultados:** IL-18 es regulada hacia abajo durante el 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> trimestre del embarazo fisiológico, llegando a concentraciones similares a las de mujeres no embarazadas en el momento del parto. TGF- $\beta$ 1 está disminuida en todo el embarazo fisiológico al comparar con mujeres no embarazadas. IL-18 se presentó disminuida en parto de preeclampsia severa, estando este resultado directamente relacionado al uso de medicamentos (corticoide y/o Sulfato de Magnesio) y al parto por cesárea. TGF- $\beta$ 1 se demostró aumentada en el parto de mujeres con preeclampsia, independiente de la vía de parto o uso de medicamentos. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10 presentaron porcentaje importante de muestras no detectable por el método. Ninguna de las citoquinas estudiadas fue relacionada a la predicción clínica de la preeclampsia.

**Conclusiones:** El aumento de TGF- $\beta$ 1 en el parto preecláptico relaciona esta citoquina a los síntomas de la enfermedad. La disminución de IL-18 en plasma de las pacientes preeclápticas es asociada al tratamiento medicamentoso y a la ausencia de trabajo de parto, sin alteraciones directas relacionadas a la enfermedad. Las citoquinas estudiadas no se presentaron alteradas previamente a los síntomas clínicos de la preeclampsia.

## Abstract

The semi allogenic fetus needs to coexist with the maternal immune system throughout pregnancy. This is a condition that has puzzled scientists for a long time and so far the mechanisms of maternal-fetal tolerance are not fully understood. Among the pathologies of pregnancy, preeclampsia is the leading cause of maternal and fetal morbi-mortality worldwide, with a prevalence of 3-5% of births. Despite being recognized as a multifactorial disease, it has been proposed that increased inflammatory response may be related to the initiation or development of preeclampsia. However, immunological studies before clinical symptoms are rare. The aim of this study was to determine the plasma cytokine profile in preeclamptic women by quantifying various cytokines in the plasma during the 1st trimester, 2nd trimester of pregnancy and at delivery.

**Methodology:** The samples were collected in the 1st trimester, 2nd trimester and at the time of delivery. A total of 86 patients with physiological pregnancy were included in the study (46 in the 1st trimester, 20 in the 2nd trimester and 20 at delivery). For preeclamptic pregnancy, a total of 63 patients were included in the study {22 in the 1st trimester, 11 in the 2nd trimester and 30 at delivery (10 with mild preeclampsia and 20 with severe preeclampsia)}. As a control we analyzed 20 non-pregnant patients. The cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-18, TGF- $\beta$ 1 and IL-10 in plasma were determined using the FlowCytomix  $\text{\textcircled{R}}$  kit (BenderMedSystem, Austria).

**Results:** IL-18 is down-regulated during the 1st and 2nd trimester of physiological pregnancy, reaching levels similar to those of non-pregnant women at the time of delivery. TGF- $\beta$ 1 is decreased in all physiological pregnancy when compared with non-pregnant women. IL-18 was decreased in severe preeclampsia, this result being directly related to the use of drugs (corticosteroids and / or magnesium sulfate) and cesarean delivery. TGF- $\beta$ 1 showed an increase at delivery in women with preeclampsia, independent of the route of delivery, or use of medications. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-10 showed a significant percentage of samples not detectable by the method. None of the cytokines studied was related to clinical prediction of preeclampsia.

**Conclusions:** The increase of TGF- $\beta$ 1 in preeclamptic delivery related this cytokine to the symptoms of the disease. The decrease of IL-18 in plasma of preeclamptic patients is associated with drug treatment and the absence of labor, and not directly related to the disease. There was no change in the cytokines studied previous to clinical symptoms of preeclampsia

## Introducción

### Sistema Inmune y Embarazo

El embarazo fisiológico es una entidad que ha intrigado a los científicos desde hace muchos siglos. En éste suceden diversos cambios fisiológicos en el organismo de la mujer, promoviendo transformaciones anatómicas, bioquímicas, endocrinas y metabólicas que permiten el crecimiento del feto hasta el momento el parto. Con el avance del conocimiento inmunológico el desafío para comprender las leyes que rigen este estado ha aumentado considerablemente, ya que a pesar del feto ser un tejido semi alogénico, éste es capaz de crecer y desarrollarse en el útero materno sin presentar rechazo inmunológico.

Este importante mecanismo de tolerancia materno fetal es posible por el correcto desarrollo de la placenta y por los cambios locales uterinos que permiten la regulación en la interface materno fetal. En condiciones fisiológicas, el desarrollo placentario se inicia con la invasión embrionaria al endometrio uterino, fenómeno que ocurre entre el 5° a 7° día después de la fecundación, etapa del estadio embrionario denominada blastocisto (Zhang et al., 2013). Las células que componen la camada superficial del blastocisto se denominan trofoblastos y son estas células que van formar la placenta y las membranas fetales. Posteriormente a la implantación del blastocisto, las células trofoblásticas invaden las arterias espiraladas endometriales, llegando hasta el miometrio, la capa muscular del útero, lo que permite desarrollar arterias de alta capacitancia en la placenta (Juch et al., 2012). Además de este importante mecanismo de alteración de la vasculatura local, la invasión del blastocisto al endometrio promueve cambios de la función tisular de este tejido uterino, que recibe desde ese momento el nombre de decidua (Zhang et al., 2013).

La preeclampsia es la principal causa de morbimortalidad materna y fetal en todo el mundo, con una prevalencia de 3-5% de los nacimientos (Saito et al., 2007). La definición

clásica de este síndrome es una presión arterial aumentada ( $>140 / 90$  mmHg) asociado a proteinuria ( $>300$  mg de albúmina en 24 horas de volumen urinario) en mujeres previamente sanas, con embarazo desde 20 semanas y que puede afectar hasta 48 horas post parto (Barra et al., 2012). Adicionalmente, pudiese aparecer preeclampsia sobreagregada a hipertensión arterial crónica y/o lesiones renales previas, además de presentaciones clínicas atípicas (Barra et al., 2012).

Las presentaciones clínicas de la preeclampsia varían, existiendo dos subtipos de la enfermedad, la preeclampsia moderada y la preeclampsia severa.

La preeclampsia severa es un subtipo más grave de la enfermedad. Para ser clasificada como modalidad severa, la paciente debe presentar por lo menos una de las siguientes características: presión arterial sistólica superior a 160 mmHg y/o presión arterial diastólica superior a 90 mmHg, proteinuria mayor que 5 g en orina de 24 horas, presentación previa a las 34 semanas de embarazo, restricción de crecimiento fetal intrauterino o cuadros más graves asociados a convulsión (Eclampsia) o síndrome HELLP (elevación de enzimas hepáticas, plaquetopenia, y hemólisis) (Barra et al., 2012).

Múltiples factores etiológicos parecen estar involucrados en la fisiopatología de esta enfermedad., sin embargo el hecho más trascendental es el mal desarrollo de la placenta en el primer trimestre del embarazo. En la preeclampsia, la invasión trofoblástica a las arterias espiraladas es insuficiente, no alcanzando la capa muscular uterina (Young et al., 2010). Esta pobre invasión trofoblástica desarrolla arterias de baja capacitancia, lo que provoca que el aporte de nutrientes y oxígeno a la placenta sean insuficientes, fenómeno que se hace especialmente evidente al final del embarazo, cuando ocurre un aumento en la demanda, relacionada con el crecimiento exponencial del feto. Estas alteraciones desarrollarían disfunciones endoteliales y alteraciones inflamatorias sistémicas que pueden ser vitales para la aparición de la preeclampsia (Young et al., 2010).

A pesar de estos importantes conocimientos sobre su fisiopatología, la etiología de la preeclampsia todavía no es aclarada. Existen tres importantes teorías que podrían explicar esta disfunción trofoblástica: la primera correlaciona el estrés oxidativo con la preeclampsia, lo cual podría afectar la funcionalidad local de trofoblasto, impidiendo su correcta invasión a la vasculatura endometrial (Ilhan et al., 2002). La segunda teoría sería un desequilibrio de factores angiogénicos, teoría apoyada por diversos reportes en la literatura que determinan disminución de la expresión de receptores de crecimiento vascular endotelial (VEGF-1 y VEGF-2) en placenta (Young et al., 2010), además de un aumento de receptores de factores de crecimiento vascular soluble, antagonizando la acción de los factores que promueven la vasculogénesis (Parra et al., 2013). Por último, la tercera teoría se basa en el desequilibrio inmunológico, ya que diversos estudios apuntan a que también podría desarrollarse un desbalance en la interacción del sistema inmune materno y fetal, lo cual estaría cumpliendo un rol fundamental en el inicio y/o en la mantención de esta enfermedad. (Dekker and Sibai, 1999; Saito and Sakai, 2003; Hahn et al., 2006).

### **Mecanismos de tolerancia materno-fetal**

La tolerancia materno-fetal se basa en un componente anatómico y un componente inmunológico. El contacto de células de la madre con células fetales ocurre básicamente en dos sitios anatómicos: las vellosidades placentarias y la decidua (Erlebacher A., 2013-b). Las vellosidades son parte de la vasculatura fetal donde ocurre la absorción de nutrientes provenientes de la sangre materna que baña el espacio intervilloso. Por otro lado, la decidua es un tejido materno altamente especializado que recubre toda la cámara interna uterina, siendo el principal sitio de contacto de la interface materno-fetal

(Erlebacher A., 2013-b).

En la decidua del primer trimestre, las células Natural Killer (NK), son las más numerosas, representando cerca de 70% de la población inmunológica de este tejido, los macrófagos corresponden a 20% y las células T varían de 10-20%. Células dendríticas (DCs), células B y células NKT son más raras. (Erlebacher A., 2013-a)

Es importante resaltar que las células inmunes deciduales son fenotípicamente distintas a las células de la periferia. En el caso de las NK deciduales (dNK), éstas presentan un perfil CD56<sup>bright</sup> y CD16<sup>-</sup>, que corresponde solamente a 10% del perfil de NK periféricas (pNK); adicionalmente, secretan una variedad distinta de quimioquinas, citoquinas y factores angiogénicos (Erlebacher A., 2013-a). Del punto de vista funcional, se sabe que las dNK son cruciales para la correcta invasión trofoblástica, permitiendo el remodelamiento vascular a través de la secreción de IFN- $\gamma$  (Erlebacher A., 2013-a). Además de estas evidencias, se conoce que, a pesar de poseer gránulos de perforina y granzima, la actividad citotóxica de las dNK es baja, probablemente secundario a la secreción de IL-10 por parte de las células deciduales (Erlebacher A., 2013-a).

En el caso de los macrófagos, estos también son fenotípicamente distintos a los macrófagos de la periferia, sin embargo, los estudios con este tipo celular no son tan contundentes como ocurre con las dNK. Se observa que poseen CD14<sup>+</sup>, marcadores similares a monocitos periféricos y CD209<sup>+</sup>, una lectina de tipo C (Houser et al., 2012). A pesar de que se ha encontrado macrófagos deciduales CD209<sup>-</sup>, la mayoría expresa factores relacionados al remodelamiento vascular y al clearance de debris apoptóticos, como fibronectina, componentes del colágeno, metaloproteinasas y receptor scavenger CD163<sup>+</sup> (Houser et al., 2012). La función de los dos subtipos de macrófagos CD209<sup>+</sup> y CD209<sup>-</sup> no está totalmente dilucidada, pero se ha observado que ambos son capaces de producir IL-

10, después de la estimulación de agonistas de PRRs, como por ejemplo LPS (Houser et al., 2012).

Las células T deciduales corresponden a 10 a 20% de la población de células inmunes de la decidua, entre éstas, cerca de 45 a 75% son linfocitos T CD8<sup>+</sup> y entre 30-45% son linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Además, 5% de los TCD4<sup>+</sup> son Foxp3<sup>+</sup>, relacionado a perfil regulatorio (Erlebacher A., 2013-a). En el año 2012, Rower y sus colaboradores demostraron la existencia de células T reguladoras (Treg) Foxp3<sup>+</sup> específicas para antígenos fetales. Estas células eran generadas durante el embarazo murino y se mantenían detectables hasta 100 días después del parto. Adicionalmente, cuando las ratonas tenían un segundo embarazo del mismo macho o recibían células LTCD4<sup>+</sup> de ratonas embarazadas previamente, se generaban estos linfocitos T reguladores más tempranamente. Curiosamente, también se detectó Treg específicas para antígenos fetales en linfonodos uterinos de ratonas infértiles después de la cópula, sin embargo en menor número que en el embarazo. Estos hallazgos sugieren que las Treg pueden ser generadas por antígenos del semen y durante el embarazo (Rower et al., 2012).

Es importante recordar que la tolerancia materno-fetal también se debe a condiciones locales y a la expresión de moléculas por las células fetales, principalmente el trofoblasto. Otros diversos factores que contribuyen a esta tolerancia inmunológica son: disminución de la densidad de células dendríticas (DCs) en la decidua humana; aumento de quimioquinas que impiden el homing de las DCs; ausencia de vasos linfáticos o linfonodos en la decidua (Erlebacher, 2013-b); ausencia de expresión de HLA clásicos con expresión de HLA no clásicos (Juch et al., 2012); expresión de Fas ligando por los trofoblastos (Hammer A., 2011); secreción de citoquinas inmunoreguladoras por las células del estroma decidual; producción de indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) e inhibición de las células T por la expresión de PD-L1 (Erlebacher, 2013-b).

Como hipótesis causal de la mantención del embarazo fisiológico, Huppertz y sus colaboradores en 2003 plantean que normalmente ocurre apoptosis del trofoblasto en la placenta, generando liberación de una gran cantidad de antígenos y detritus a la circulación materna, los que serían fagocitados por células presentadoras de antígenos que producirían citoquinas inmunosupresoras como IL-10 disminuyendo la generación y respuesta de linfocitos T<sub>H1</sub> (Voll et al., 1997; Steinman et al., 2003; Abraham et al., 2004). Sin embargo, en la preeclampsia las condiciones hipóxicas, el aumento de la inflamación y el estrés oxidativo inducirían la necrosis placentaria, liberándose antígenos y detritus del trofoblasto a la circulación materna, que serían reconocidos como señales de alarma, siendo estas captadas, fagocitadas y presentadas por células presentadoras de antígenos, induciendo la generación de citoquinas inflamatorias, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12.

### **Citoquinas y perfiles linfocitarios en el embarazo fisiológico y preeclampsia**

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> liberan citoquinas que determinan la diferenciación a distintos perfiles de linfocitos T helper (T<sub>H</sub>) siendo los más estudiados en la preeclampsia los perfiles T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub>. Los linfocitos T<sub>H1</sub> son responsables por un perfil pro-inflamatorio con producción principalmente de IFN- $\gamma$ , en cambio los T<sub>H2</sub> serían principalmente secretores de IL-4, IL-13, IL-9 e IL-5, promoviendo por lo tanto una función más moduladora, manteniendo la tolerancia en la barrera materno-fetal (Saito et al., 2010).

La relación T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub> en el embarazo ha sido estudiada desde la década de los 80 y 90 y la inversión de esta relación en la preeclampsia fue reproducida por diversos autores a lo largo de estos años (Saito et al., 1999); sin embargo, este paradigma ha cambiado debido a nuevas evidencias. Estudios con ratones knockout para las cuatro citoquinas primordiales del perfil T<sub>H2</sub>, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 mostraron una evolución normal en el embarazo,

apoyando la idea de que las citoquinas de tipo  $T_H2$  no serían cruciales para el desarrollo de un embarazo normal (Fallon et al., 2002). En contrapartida, la administración de citoquinas  $T_H1$  como IL-2 e IFN- $\gamma$  en ratones con embarazos tempranos, inducen aborto (Lin et al., 2009).

Debido a estos hallazgos se iniciaron investigaciones para dilucidar la importancia de otros perfiles de  $LTCD4^+$  en la fisiología del embarazo y en sus patologías. Santner-Nan et al. (2009) demostraron un aumento de la razón de los perfiles linfocitarios TregFoxP3/ $T_H17$  en el final del tercer trimestre de embarazos normales, pero no en mujeres con preeclampsia, lo que apunta la importancia de esos dos subtipos celulares en la patología de esa enfermedad. En otro estudio, se observó una disminución de Treg en sangre periférica y en biopsias placentaria de pacientes con preeclampsia en comparación con embarazos normales (Sasaki et al., 2007).

Por lo tanto, la antigua relación  $T_H1/T_H2$  está siendo remplazada por una que incluye  $T_H1/T_H2/T_H17/Treg$ . La importancia de los  $T_H17$  y Treg en la fisiología del embarazo y en la fisiopatología de la preeclampsia todavía está en estudio, pero algunos reportes sugieren que su rol estaría principalmente relacionado con la implantación correcta de la placenta (Saito et al, 2010).

### INF- $\gamma$

Debido al clásico paradigma  $T_H1/T_H2$  en la preeclampsia, IFN- $\gamma$  es una citoquina de mucho interés en el estudio de esta patología, por ser la citoquina ícono del perfil  $T_H1$ . Por otra parte, es importante resaltar que ésta también es producida por NK, NKT y el trofoblastos durante el primer trimestre (Curry et al., 2008). A pesar de haber sido extensamente estudiada en este contexto, su función en el embarazo no está totalmente esclarecida, así como tampoco se conoce por completo su participación en la regulación de

la función placentaria (Banerjee et al., 2005). Del punto de vista patológico, IFN- $\gamma$  es clásicamente documentada como sobre expresada en plasma de pacientes con preeclampsia (Arriaga-Pizano et al., 2005; Murphy et al., 2009), sin embargo otros autores no observaron diferencias en IFN- $\gamma$  plasmática (Jonsson et al., 2006). No obstante, esta citoquina cumple un importante papel en el embarazo fisiológico; estudios en humanos relacionaron ésta con la implantación embrionaria (Murphy et al., 2009) y en modelo murino, se determinó disfunciones placentarias y en las arterias espiraladas con dNK knockout para IFN- $\gamma$ , dichas disfunciones fueron revertidas por la reconstitución con dNK wild type (Ashkar et al., 2001). Otros estudios indican que IFN- $\gamma$  sería crucial para el remodelamiento vascular en estadios tempranos del embarazo (Miyazaki et al., 2003).

### IL-17A

IL-17A es la citoquina ícono del perfil T<sub>H</sub>17, el perfil pro-inflamatorio más recientemente estudiado en la preeclampsia. Esta citoquina del punto de vista fisiológico está relacionada a la vasculogénesis y a la promoción de factores angiogénicos (Pongcharoen et al., 2007). Se ha descrito un aumento progresivo de esta citoquina en plasma de mujeres con embarazo fisiológico, llegando a su mayor nivel en el momento del parto (Martinez-García et al., 2010).

Del punto de vista patológico, existe un sinnúmero de reportes que relacionan los perfiles T<sub>H</sub>17 y la citoquina IL-17 a patologías del embarazo humano, como el aborto de repetición y la preeclampsia (Lee et al., 2011; Saito et al., 2011; Santner-Nanan et al. 2009; Toldi et al., 2011).

### TNF- $\alpha$

En el caso de TNF- $\alpha$ , otra citoquina clásicamente inflamatoria, diversos reportes

determinaron un aumento de ésta en suero de mujeres preeclámpticas, no así en embarazos fisiológicos (Sharma et al., 2007 / Conrad et al., 1998 / Cackovic et al., 2008). Esta función patológica de TNF- $\alpha$  es atribuida por lo menos en parte, a un rol en la muerte celular programada y en la citotoxicidad evidenciada en cultivos de trofoblastos (Yui et al., 1996 / Haider et al., 2009). Adicionalmente, se ha determinado que TNF- $\alpha$  participa en la regulación de la expresión de la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina humana coriónica ( $\beta$ -HCG), disminuyendo la producción y liberación de ésta por las células trofoblásticas (Leisser et al, 2006). Por otra parte, ha sido relacionada con la disminución de la actividad invasiva de los trofoblastos en el primer trimestre del embarazo, sugiriendo que elevadas concentraciones de esta citoquina pudiese afectar el desarrollo placentario y la mantención del embarazo (Haider et al., 2009).

Sin embargo, esta citoquina también cumple un rol fisiológico, ya que TNF- $\alpha$  está implicada en la apoptosis de células musculares lisas de la vasculatura de las arterias espiraladas, favoreciendo la invasión por parte de los trofoblastos (Boyle et al., 2003). Además, parece cumplir otros roles como la diferenciación de los trofoblastos extravelosos (Haider et al, 2009).

### IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  fue determinada previamente en el endometrio y en la decidua humana (Huang H.Y., 2006; Hanna et al., 2000). Se sabe que ésta cumple una función importante en la fisiología gestacional, ya que presenta un rol benéfico en la implantación embrionaria y decidualización (Huang, H.Y. 2006), además de incrementar la actividad enzimática de los trofoblastos, favoreciendo su invasión (Huang, H.Y., 2006). En estudios previos el aumento de esta citoquina en suero fue observada en la preeclampsia (Amash et al., 2010), sin embargo diversos otros autores no fueron capaces de observar diferencia de esta

citoquina en la preeclampsia (Molvarec et al., 2011 / Kang et al., 2012). No estando el patrón de presentación de esta citoquina claramente determinada en esta enfermedad.

### IL-6

IL-6 es otra citoquina pro-inflamatoria que actúa en procesos agudos y crónicos. Es producida por diversos tipos celulares como DCs, macrófagos, linfocitos, fibroblastos, células epiteliales, trofoblastos, entre otras (Prins et al., 2012). En la fisiología reproductiva se ha relacionado a cambios de su expresión en el endometrio durante las diferentes etapas del ciclo hormonal femenino, además de tener efectos en el proceso de implantación (Prins et al., 2012). Diversos reportes muestran un aumento de IL-6 en mujeres preeclámpticas (Molvarec et al., 2011 / Szarka et al., 2010).

### IL-8

IL-8 es conocida como una citoquina pro-inflamatoria que actúa como quimioattractor de células inmunes principalmente neutrófilos y cumple importante rol en la respuesta inmune innata en la presencia de invasión por bacterias y otros patógenos (Mukaida et al., 1998). Es producida por trofoblastos, células deciduales estromales, linfocitos deciduales, dNK entre otras (Naruse et al., 2010). IL-8 es conocida como importante regulador de la invasión trofoblastica, tanto *in vitro* como *in vivo* (Hanna et al, 2006). Esta citoquina está incrementada durante el primer trimestre del embarazo (Naruse et al., 2010) favoreciendo la implantación gracias al aumento de la producción de metaloproteinasas de matriz tipo 2 y 9 que degradan la matriz extracelular (Jovanović et al., 2010).

Sin embargo, en la preeclampsia se ha observa un aumento durante las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Szarka et al., 2010; Molvarec et al., 2012).

### IL-10

IL-10 es una citoquina muy estudiada durante el embarazo. Sus funciones anti-inflamatorias, se relacionan a: (i) efecto en  $T_H1$  y macrófagos, a través de la disminución de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, (ii) interferencia en la presentación antigénica, (iii) inhibición directa e indirecta de NK y linfocitos  $TCD8+$  (Hanna et al., 2000). En la preeclampsia es reconocida clásicamente por sus efectos protectores, promoviendo equilibrio inmunológico (Kalkunte et al., 2011). Diversos estudios relacionan la disminución de esta citoquina con abortos recurrentes, parto prematuro y preeclampsia (Hennessy et al, 1999; Raghupathy et al., 1999; Plevyak et al., 2002; Makhseed et al., 2003)

### IL-18

IL-18 es conocida como una citoquina pro-inflamatoria producida por macrófagos, DCs, células epiteliales entre otros tipos celulares (Amash et al., 2007). Activa células Natural Killer y participa en el desarrollo del perfil de linfocitos  $T_H1$  (Li et al., 2009), además de inducción de la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias, como  $IFN-\gamma$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-8$  y  $TNF-\alpha$  (Poletini et al., 2012). A pesar de esto, su concentración durante el embarazo fisiológico todavía no ha sido determinada. Recientemente, algunos estudios han mostrado que puede estar relacionada con el desarrollo de procesos inflamatorios durante el embarazo, que se asocian a parto prematuro y a preeclampsia (Lédée et al, 2011). Sin embargo, en la preeclampsia sus hallazgos son contradictorios. En 2010, Roland y sus colaboradores encontraron una IL-18 disminuida en el suero de mujeres con preeclampsia, mientras el grupo de Amash (2010), Szarka (2010) y Molvarec (2012) determinó un aumento de esta citoquina en preeclampsia.

### TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  es descrita clásicamente como una citoquina regulatoria, producida por diversos tipos celulares, incluso linfocitos reguladores T<sub>H</sub>3 (Raghupathy R., 2001). Sin embargo, en el embarazo ha sido descrita como la responsable de la inhibición de la invasión trofoblástica a las arterias espiraladas (Mano et al., 2011 / Lash et al., 2005). Son pocos los reportes de esta citoquina en el embarazo. Lygnos y sus colaboradores en 2006 no determinaron cambios en la concentración de TGF- $\beta$  en los tres trimestres del embarazo, así como tampoco en el momento del parto, mientras que otros grupos describían que esta citoquina aumentaba en el final del tercer trimestre al comparar con el primer trimestre. Diversos autores describen que TGF-  $\beta$  aumenta en el suero de mujeres con preeclampsia (Feizollahzadeh et al., 2012; Enquobahirie et al., 2005; Madzili et al., 2003; Benian et al., 2002; Djurovic et al., 1997), sin embargo otros reportes que no relacionan TGF- $\beta$  a preeclampsia (Hennessy et al., 2002 / Szarka et al., 2010).

El estudio del rol inmunológico en preeclampsia es bastante antiguo y muchos autores fueron capaces de determinar aumento de citoquinas pro-inflamatorias en plasma o suero de mujeres con preeclampsia. Sin embargo, todavía existen discordancias en cuanto a concentración de las citoquinas en la circulación materna, ya que los estudios presentan resultados contradictorios. Es difícil determinar cuáles serían las causas de estas discrepancias, factores inherentes al diseño del estudio, como etnia de las pacientes o genotipo entre otros, pudieran influenciar en estos resultados. Por otro lado, muchos trabajos son realizados con pacientes con preeclampsia establecida, por lo tanto, muchas pacientes ya habían recibido distintos tratamientos, los cuales muy raramente son considerados como criterio de diferenciación en los grupos de estudio. Adicionalmente, otro criterio muy poco evaluado en los reportes es la presencia o no de trabajo de parto, lo

que podría también estar alterando los perfiles de citoquinas en suero.

Adicionalmente, a pesar del extenso estudio del rol del sistema inmunológico en la preeclampsia existen muy pocos reportes previos a los síntomas de la enfermedad. En 2002, Djurovic y sus colaboradores estudiaron citoquinas en plasma de mujeres sanas en la semana 18 de embarazo, observando cuáles de estas pacientes habían desarrollado preeclampsia, sin embargo no fueron capaces de observar diferencias previas al desarrollo de la enfermedad para las citoquinas IL-1- $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ . Un poco más tarde, Kronborg en 2011 estudió las pacientes en 4 grupos distintos: embarazo con menos de 25 semanas, entre 26-29 semanas, entre 30-35 semanas y en más 36 semanas, observando TNF- $\alpha$  aumentado en el grupo de 26-29 semanas e IL-6 aumentado en el grupo después de 36 semanas en las pacientes que posteriormente desarrollaron la enfermedad.

Es impresionante que a pesar de tantos años de estudio, una revisión extensa de la bibliografía, demuestra resultados divergentes y muchas veces contrapuestos. Por lo que aún no está claro para la comunidad científica cómo participa el sistema inmune en la preeclampsia.

En base a los antecedentes presentados y la importancia que posee el sistema inmune en el embarazo fisiológico y preecláptico es que proponemos la siguiente hipótesis de trabajo:

## **Hipótesis:**

**“Mujeres embarazadas con preeclampsia presentan un aumento de citoquinas séricas pro-inflamatorias previo a los síntomas clínicos de la enfermedad, a diferencia de mujeres con embarazo fisiológico que presentan un aumento de citoquinas séricas anti-inflamatorias”.**

## Objetivos

### Objetivo General:

Determinar si el patrón de citoquinas séricas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, es estadísticamente diferente entre mujeres con embarazo preecláptico y mujeres con embarazo fisiológico.

### Objetivos Específicos:

1. Determinar si la concentración sérica de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-18) y anti-inflamatorias (TGF- $\beta$ 1 e IL-10) es estadísticamente diferente entre mujeres que desarrollaron embarazo preecláptico y fisiológico, previos a los síntomas clínicos de la enfermedad (primer y segundo trimestre del embarazo)
2. Determinar si la concentración sérica de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-18) y anti-inflamatorias (TGF- $\beta$ 1 e IL-10) es estadísticamente diferente entre mujeres con embarazo preecláptico y fisiológico, durante los síntomas clínicos de la enfermedad (momento del parto)

## **Materiales y Métodos**

En este estudio se evaluaron las muestras obtenidas de una cohorte de pacientes embarazadas que participaron de evaluaciones en la Unidad de Medicina Fetal del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, el cual fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Todas las pacientes fueron sometidas a previa firma del consentimiento informado.

### **Muestras**

Las muestras de plasma fueron obtenidas por punción venosa periférica en tubos vacutainer con EDTA (B&D, USA). La toma de muestras, tanto de embarazo fisiológico como de pacientes con preeclampsia se realizó en el primer trimestre del embarazo (entre 12-14 semanas de embarazo), segundo trimestre (entre 22-24 semanas de embarazo) y en el momento del parto. En seguida éstas fueron, inmediatamente centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm y el plasma obtenido fue alicototado y criopreservado a  $-80^{\circ}$  hasta el momento del análisis.

### **Pacientes**

Un total de 86 pacientes con embarazo fisiológico fueron incluidas en el estudio: 46 pacientes con embarazo en el primer trimestre, 20 pacientes con embarazo en el segundo trimestre y 20 pacientes con parto de embarazo fisiológico.

Un total de 63 pacientes con embarazo preecláptico fueron incluidas en el estudio: 22 con embarazo en el primer trimestre, 11 paciente con embarazo en el segundo trimestre

y 30 pacientes con partos preeclámpticos, entre éstos 10 con parto de preeclampsia moderada y 20 pacientes con parto de preeclampsia severa.

Adicionalmente se evaluó el plasma de 20 pacientes no embarazadas para estudio de grupo control.

Entre las pacientes con embarazo fisiológico, el grupo del primer trimestre posee rango de edad entre 15 y 40 años, con promedio de 29 años. El grupo del segundo trimestre posee edad entre 15 y 40 años, con promedio de 27 años. Las mujeres en parto poseen edad materna entre 21 a 40 años, y promedio de 29 años. El parto se realizó entre 37 y 41 semanas, con un promedio de 39 semanas de embarazo.

Entre las pacientes con embarazo preeclámptico, el grupo del primer trimestre posee rango de edad entre 17 y 38 años, con promedio de 29 años. El grupo del segundo trimestre posee edad materna entre 17 y 35 años, con promedio de 28 años. En las pacientes en el momento del parto, el grupo de preeclampsia moderada posee rango de edad entre 20 y 37 años, con promedio de 30 años. El grupo de preeclampsia severa posee edad materna entre 17 y 42 años con promedio de 29 años. Adicionalmente el parto de mujeres con preeclampsia moderada fue entre 36 y 40 semanas de embarazo con promedio de 38 semanas de embarazo y el parto de las pacientes con preeclampsia severa fue entre 26 y 40 semanas, con promedio de 32 semanas de embarazo.

### **Criterios Clínicos**

Todas las pacientes con toma de muestras en el primer y segundo trimestre del embarazo se presentaban sin manifestaciones clínicas de la enfermedad. Adicionalmente, se realizó un análisis prospectivo de cohortes para determinar que pacientes desarrollaron preeclampsia y clasificar en los diferentes grupos. Sin embargo, las pacientes en el momento del parto presentaban manifestaciones clínicas de la enfermedad, habiendo sido

realizado para este grupo un estudio retrospectivo para la clasificación en los diferentes subgrupos de parto.

Las pacientes evaluadas son previamente sanas y todas cumplieron los criterios de exclusión establecidos en este estudio.

#### Criterios de exclusión

- Patologías asociadas (Hipertensión arterial previa, Diabetes, cardiopatía, parasitosis, infección urinaria en el momento del parto, enfermedades reumatológicas)
- Patologías obstétricas
- Embarazo múltiple.
- IMC > 35
- Consumo de tabaco, drogas o alcohol durante el embarazo

Pacientes clasificadas como preeclampsia moderada cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- Proteinuria moderada: >300 mg/24 hrs.; < 5 g/24 hrs.
- Presión arterial > 140/90 ; < 160/110 mm.Hg

Pacientes clasificadas como preeclampsia severa cumplieron por lo menos uno de los siguientes criterios de inclusión:

- Proteinuria > 5 g/24 hrs o proteinuria en muestra urinaria aislada de 3+
- Presión Arterial > 160/110 mmHg
- Restricción de crecimiento fetal
- Lesión de órgano blanco
- Eclampsia
- HELLP

#### **Metodología**

Para la determinación de citoquinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IFN- $\gamma$ ,

IL-17 e IL-18) y reguladoras (TGF- $\beta$ 1 e IL-10) en plasma se utilizó el kit FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria) técnica de citometría cuantitativa que permite la detección de un panel de citoquinas, en volúmenes pequeños de muestras. Su procedimiento se realizó según la metodología propuesta por el fabricante.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton&Dickison, USA) del Programa de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Una vez obtenidos los datos, estos se analizaron en el software FlowCytomix Pro 3.0.

### **Análisis Estadísticos**

El modelo de estudio propuesto es Cohorte Anidado Caso-Control retrospectivo, para las pacientes en el momento del desarrollo de la enfermedad, y estudio cohorte prospectivo para las pacientes de 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> trimestre del embarazo. Los grupos de estudio son grupos no pareados.

Los resultados de las citoquinas TGF- $\beta$ 1 e IL-18 fueron sometidos a las pruebas de normalidad del Lilliefors test y Shapiro-wilk test. Tras determinar que en ambos testes las muestras se comportaban como no normales, se aplicó el Mann Whitney test, para análisis estadísticos de los diferentes grupos en estas dos citoquinas.

Los resultados de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10 fueron analizados con prueba de hipótesis para dos proporciones, considerando como variable el porcentaje de muestras detectables en cada uno de los grupos.

El nivel de significancia del *p value* se fijó como inferior a 0,05. El software utilizado para el análisis fue GraphPad Prism 5.0.

## Resultados

Para determinar el perfil inmunológico de mujeres embarazadas que desarrollaron preeclampsia, mujeres con embarazo fisiológico y mujeres no embarazadas, se evaluaron las citoquinas IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-17, IL-10 y TGF- $\beta$ 1 en plasma de los tres diferentes grupos de pacientes.

De las citoquinas analizadas, IL-18 y TGF- $\beta$ 1 fueron detectables en todas las muestras, sin embargo las otras 7 citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-10) presentaron concentraciones séricas por debajo de la sensibilidad del método en un porcentaje importante de las muestras. En la tabla 1 es posible observar la sensibilidad del método para las nueve citoquinas elegidas.

Sensibilidad del FlowCytomix®		
INF- $\gamma$ : 1,6 pg/mL	IL-18: 3,34 pg/mL	TNF- $\alpha$ : 3,2 pg/mL
IL-1 $\beta$ : 4,2 pg/mL	TGF- $\beta$ 1: 10 pg/mL	IL-8: 0,5 pg/mL
IL-6: 1,2 pg/mL	IL-17A: 2,5 pg/mL	IL-10: 1,9 pg/mL

Tabla1: Sensibilidad del FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria) para cada citoquina estudiada.

Al evaluar las citoquinas cuyo rango de detección se encontraba por debajo de la sensibilidad de método, pero que sin embargo eran detectables, encontramos algunos hallazgos interesantes. En la tabla 2 se detallan los resultados obtenidos para las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-17A e IL-10. En ésta se observa que en las pacientes no embarazadas, solamente las citoquinas IL-8 e IL-17A fueron detectables, aunque en un bajo porcentaje, sin embargo IL-6 que posee 0% de detección en este grupo presenta mayor detección en grupo de parto (80% en parto de embarazo fisiológico y 43% en parto de preeclampsia). Adicionalmente es interesante observar otros patrones de respuesta como por ejemplo IL-8 que presenta 47,83% de detección en el primer trimestre del embarazo fisiológico *versus* 27,27% de muestras detectables en este mismo trimestre del embarazo preecláptico.

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biomédicas con mención en Inmunología

<b>Control no embarazado (n=20)</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-8</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IL-10</b>	<b>IL-17 A</b>	<b>INF-<math>\gamma</math></b>
Porcentaje Detectable	0%	0%	20%	0%	0%	45%	0%
Rango de detección (pg/mL)	---	---	11,54 - 3702,21	---	---	3,74 - 49,02	---
Mediana (pg/mL)	---	---	14,755	---	---	11,11	---
<b>Embarazo fisiológico 1er Trimestre (n=46)</b>							
Porcentaje Detectable	8,70%	4,35%	47,83%	2,17%	2,17%	8,70%	6,52%
Rango de detección (pg/mL)	7,05-23,00	1,49 - 4,77	0,50 - 4457,35	19,69	3,79	6,3-11,9	1,7 - 6,19
Mediana (pg/mL)	8,2	3,13	1,53	---	---	6,33	2,35
<b>Embarazo PE 1er Trimestre (n=22)</b>							
Porcentaje Detectable	0%	18,18%	27,27%	0%	4,55%	4,55%	0%
Rango de detección (pg/mL)	---	1,23 - 2,32	0,62 - 5,01	---	17,51	2,75	---
Mediana (pg/mL)	---	1,54	1,4	---	---	---	---
<b>Embarazo fisiológico 2º Trimestre (n=20)</b>							
Porcentaje Detectable	20%	15%	15%	0%	5%	10%	5%
Rango de detección (pg/mL)	5,00 - 14,36	1,22 - 3,02	1,78 - 1453,12	---	2,48	3,72 - 3,93	1,82
Mediana (pg/mL)	7,06	1,64	8,44	---	---	3,83	---
<b>Embarazo PE 2º Trimestre (n=11)</b>							
Porcentaje Detectable	18,19%	0%	0%	0%	9,09%	9,09%	0%
Rango de detección (pg/mL)	10,15 - 32,93	---	---	---	10,99	4,79	---
Mediana (pg/mL)	21,54	---	---	---	---	---	---
<b>Parto Embarazo Fisiológico (n=20)</b>							
Porcentaje Detectable	5%	80%	10%	5%	5%	35%	5%
Rango de detección (pg/mL)	40,71	1,59- 42,64	8,24 - 9,67	17,07	33,38	5,92 - 501,66	111,88
Mediana (pg/mL)	---	3,73	8,955	---	---	10,29	---
<b>Parto PE Moderada +Severa (n=30)</b>							
Porcentaje Detectable	3,33%	43%	13,33%	0%	3,33%	33,33%	3,33%
Rango de detección (pg/mL)	14,11	1,67 - 48,11	13,11 - 38,31	---	62,06	4,57 - 70,88	72,85
Mediana (pg/mL)	---	11,32	21,485	---	---	5,925	---

**Tabla 2: Porcentaje de muestras detectables, rango de detección y mediana para las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-17 e IL-10 en los diferentes grupos del estudio.** Cuantificación de las citoquinas en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). Las citoquinas fueron medidas en plasma de mujeres con embarazo de primer y segundo trimestre y durante el trabajo de parto. PE: Preeclampsia

Para realizar el análisis estadístico de los resultados mostrados en la tabla 2 se utilizó la prueba de hipótesis para dos proporciones, considerando como variable el porcentaje detectable (Figura 1).

En la figura 1A, se observa que en embarazo fisiológico IL-1 $\beta$  es detectable en los tres trimestres, con un peak en el segundo trimestre. En el caso del embarazo preeclámptico este sigue un patrón similar al fisiológico para el segundo trimestre y el momento del parto, también presentando un peak en el segundo trimestre, sin embargo no presentó muestras detectables en el primer trimestre. Al comparar el embarazo fisiológico con el embarazo preeclámptico no se observó diferencias significativas.

En el caso de IL-6, para un embarazo normal se observó un incremento del porcentaje de detección de esta citoquina a lo largo del embarazo, siendo mayor al momento del parto. Para embarazo patológico se observa aumento del porcentaje de detección entre el primer trimestre y el momento del parto, destacando que en el segundo trimestre el 100% de las muestras fueron no detectables. Adicionalmente se observó que las mujeres con embarazo preeclámptico presentan un aumento significativo del porcentaje de detección de IL-6 en el primer trimestre al comparar con el primer trimestre del embarazo fisiológico (Figura 1B).

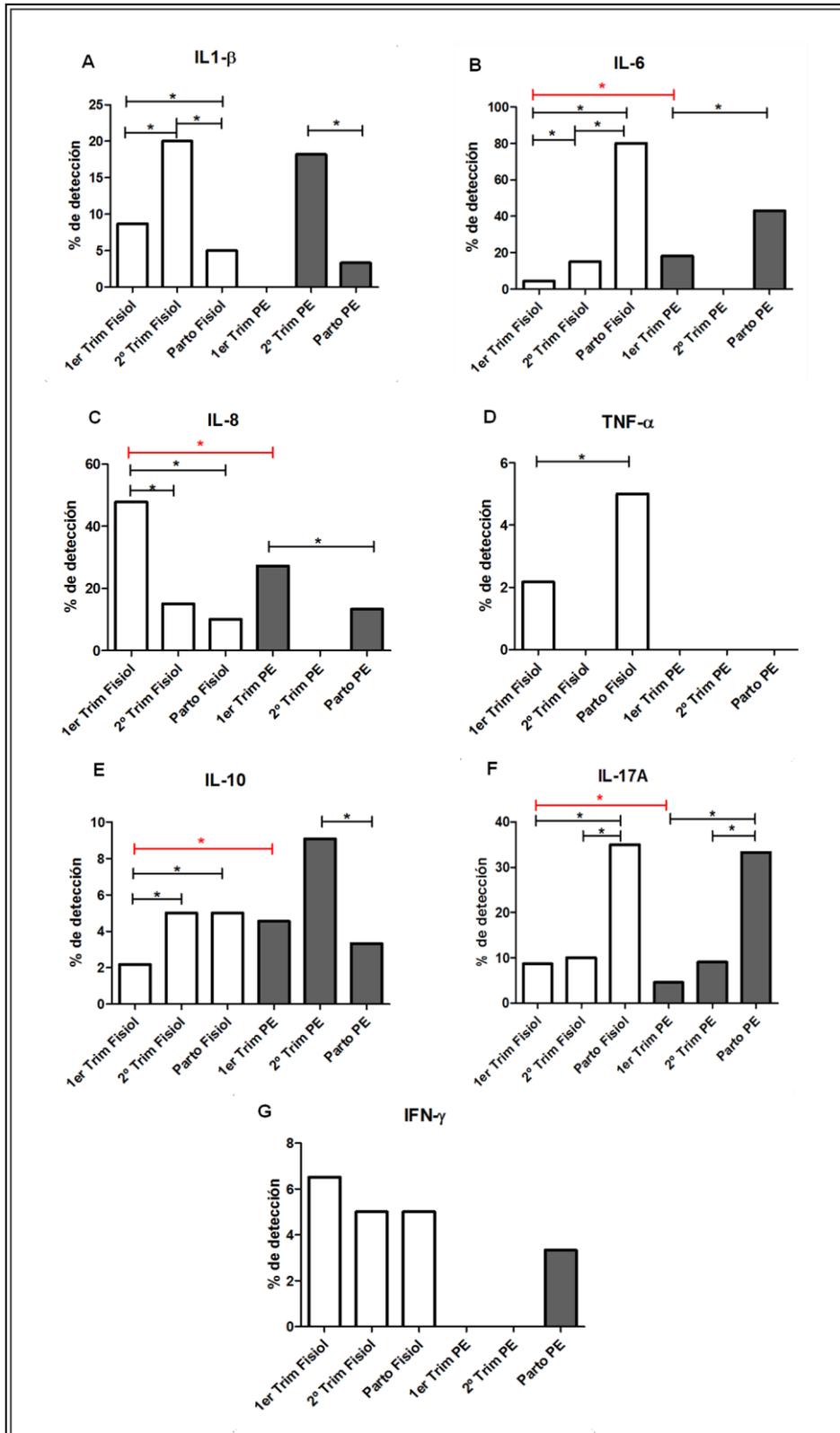
A diferencia de lo evidenciado para IL-6, en la figura 1C se observa que el porcentaje de detección de IL-8 va disminuyendo a lo largo del embarazo fisiológico. Para el embarazo preeclámptico, el primer trimestre fue significativamente mayor que el parto. Sin embargo al comparar el primer trimestre del embarazo fisiológico con el primer trimestre del embarazo preeclámptico, el grupo de pacientes que cursaron embarazos normales poseen mayor porcentaje de detección de IL-8.

En la figura 1D se observa que TNF- $\alpha$  presentó resultados no detectables en todos los trimestres del embarazo preeclámptico. Sin embargo, en el embarazo fisiológico se pudo observar incremento significativo entre el primer trimestre y el momento del parto.

La figura 1E demuestra que IL-10 está disminuida en el primer trimestre del embarazo fisiológico, cuando se compara al segundo trimestre y al momento del parto. Adicionalmente, al comparar con el embarazo patológico, se observa que el primer trimestre del embarazo fisiológico presenta porcentaje de detección significativamente menor que el primer trimestre del embarazo preeclámptico. En el caso del embarazo patológico, IL-10 está aumentada en el segundo trimestre, cuando es comparada al momento del parto.

Los resultados de la IL-17A (Figura 1F) demuestran que el porcentaje de detección de esta citoquina está aumentada en el parto fisiológico cuando es comparado al primer trimestre y al segundo trimestre de este mismo grupo de pacientes. El mismo resultado se observa para el embarazo preeclámptico, donde IL-17A al momento del parto presenta porcentaje de detección significativamente mayor. Adicionalmente, se observó diferencias entre el porcentaje de detección de IL-17A entre el primer trimestre de embarazo fisiológico y el primer trimestre de embarazo preeclámptico.

En el caso de IFN- $\gamma$  (Figura 1G), no se observó diferencias significativas a lo largo del embarazo fisiológico. En el grupo del embarazo preeclámptico, solamente fue detectable al momento del parto, sin diferencias cuando fue comparado con el embarazo fisiológico.



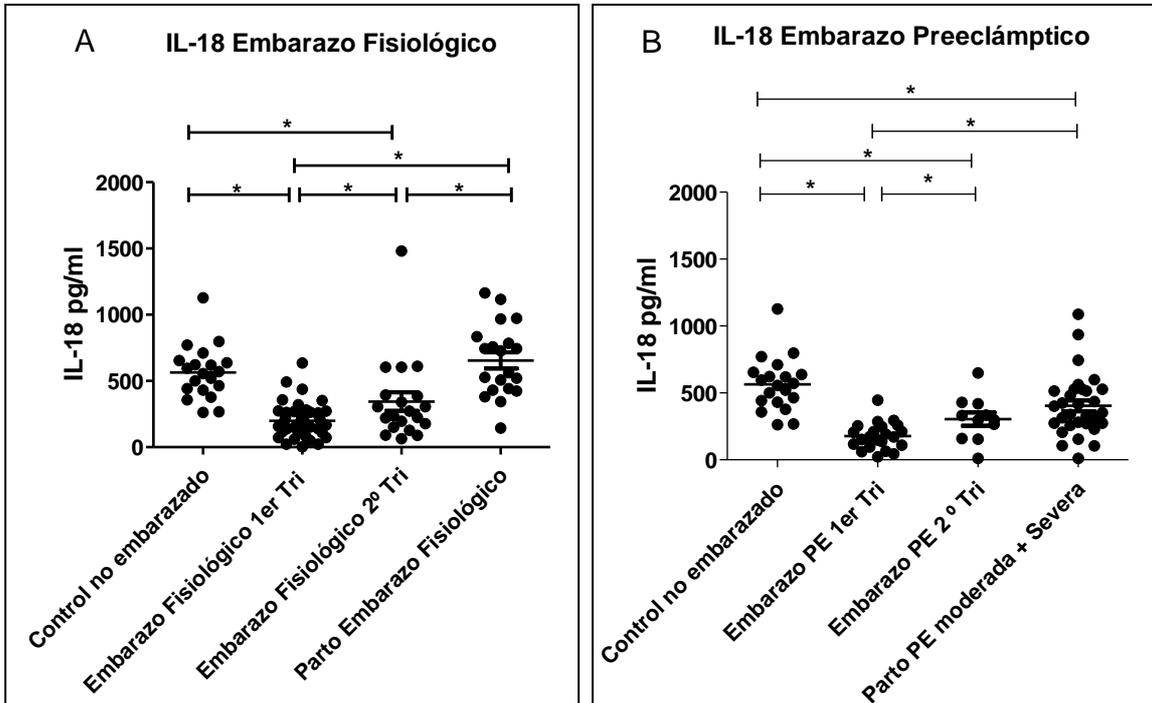
**Figura 1: Porcentaje de detección de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-17A e INF- $\gamma$  en los diferentes grupos del estudio.** Cuantificación de las citoquinas en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). Las citoquinas fueron medidas en plasma de mujeres con embarazo de primer y segundo trimestre y durante el trabajo de parto. Fue determinado el porcentaje de muestras detectables en los diferentes grupos. A): IL-1 $\beta$ , B): IL-6 C): IL-8, D): TNF- $\alpha$ , E): IL-10 F): IL-17A y G): INF- $\gamma$ . Tri: Trimestre, PE: Preeclampsia, Fisiol: Fisiológico.

En el caso de las citoquinas IL-18 y TGF- $\beta$ 1, estas fueron detectables en todas las muestras, pudiendo realizar análisis de las concentraciones séricas.

El control no embarazo evaluado en este estudio es el mismo grupo de paciente en los gráficos 2A y 2B para las concentraciones de IL-18, así como para los gráficos 9A y 9B para las concentraciones de TGF- $\beta$ 1.

Primeramente observamos la dinámica de IL-18 en el embarazo fisiológico (Figura 2A) y embarazo preecláptico (Figura 2B). En la figura 2A, se observa que los niveles de IL-18 en el primer trimestre del embarazo se encuentran disminuidos al compararlos con mujeres no embarazadas, presentando un aumento significativo de esta citoquina en el segundo trimestre, llegando en el momento del parto a valores similares al encontrado en las mujeres no embarazadas.

En el caso de la Figura 2B, se observa el comportamiento de IL-18 en mujeres que desarrollaron embarazo preecláptico, detectando bajos niveles de IL-18 en el primer trimestre y aumento de ésta en el segundo trimestre del embarazo, resultados similares al encontrado en la cinética del embarazo fisiológico para estos dos trimestres (Figura 2A). Sin embargo, las mujeres que presentan partos con preeclampsia mantienen niveles similares entre el segundo trimestre y el momento del parto (Figura 2B).

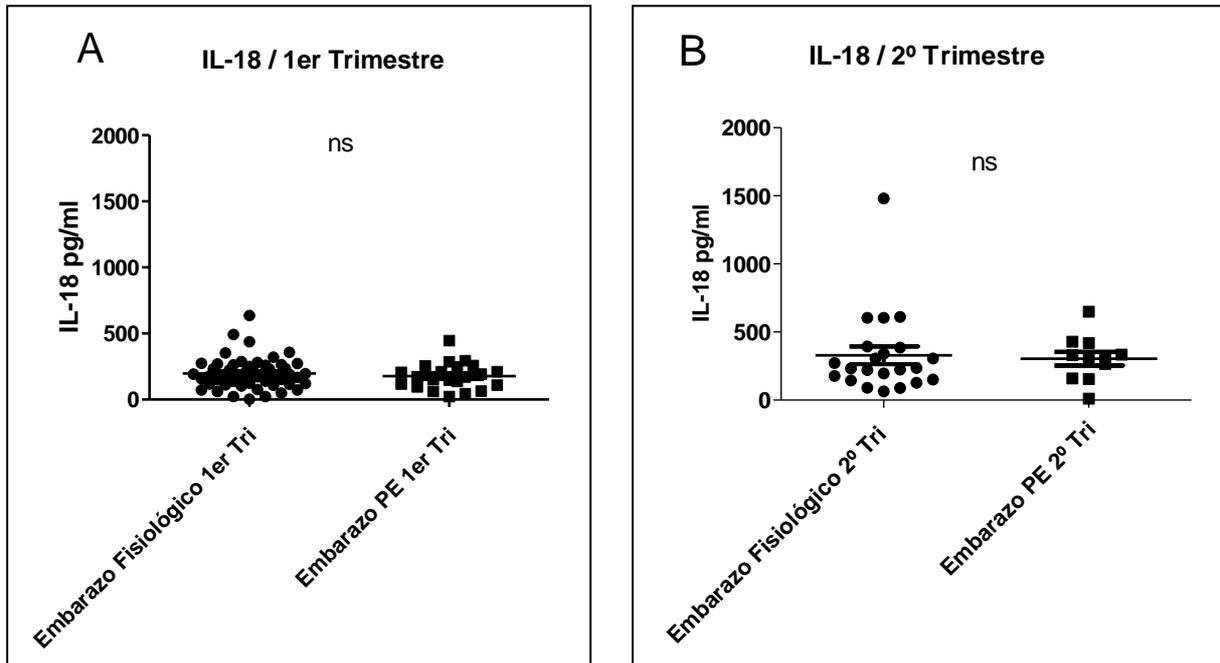


**Figura 2: Niveles de IL-18 en el embarazo fisiológico y preecláptico.**

*IL-18 disminuye en las primeras etapas del embarazo fisiológico, normalizando sus niveles en el momento del parto. IL-18 se presenta disminuida en todas las etapas del embarazo preecláptico al comparar con control no embarazado.*

Cuantificación de IL-18 en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). IL-18 fue medida en plasma de mujeres no embarazadas, con embarazo de primer y segundo trimestre y durante el trabajo de parto. A): Concentraciones de IL-18 en plasma de mujeres con embarazo fisiológico. B): Concentraciones de IL-18 en plasma de mujeres con embarazo preecláptico. PE: Preeclampsia. Tri: Trimestre. \* $P < 0,05$ .

Con el fin de evaluar si los niveles séricos de IL-18 se pudiesen comportar como un factor predictivo de la enfermedad, se tomó muestras de pacientes sanas en el primer y segundo trimestre del embarazo y a través de un análisis prospectivo se determinó cuales de estas pacientes desarrollaron la enfermedad. Al comparar el embarazo fisiológico y embarazo preecláptico en el primer trimestre (Figura 3A) y en el segundo trimestre del embarazo (Figura 3B) no se observó ninguna diferencia estadística que pudiese sugerir la predicción de la enfermedad por el análisis de esta citoquina.

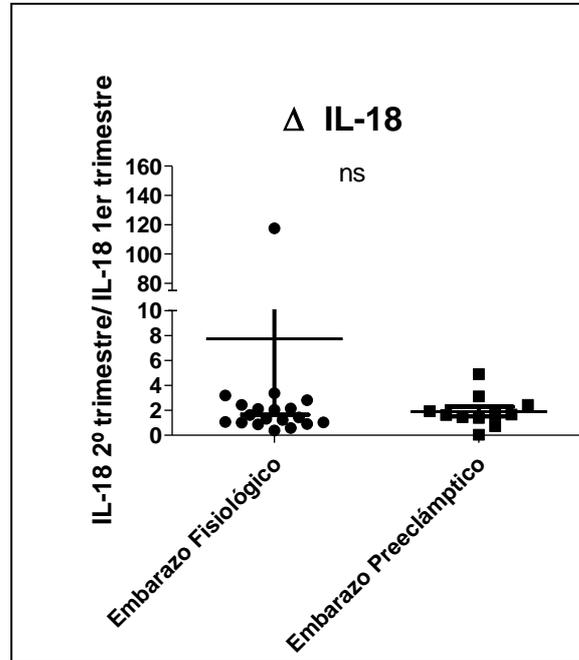


**Figura 3. Comparación de los niveles séricos de IL-18 entre mujeres con embarazo preecláptico y fisiológico.**

*La concentración de IL-18 no presentó diferencias entre embarazo fisiológico y preecláptico previo a los síntomas clínicos de la enfermedad.*

Identificación de IL-18 en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria) A): Comparación de IL-18 en el 1<sup>er</sup> trimestre en embarazo fisiológico y embarazo preecláptico. B): Comparación de IL-18 en el 2<sup>o</sup> trimestre del embarazo fisiológico y embarazo preecláptico. No significativo: ns. PE: Preclampsia. Tri: Trimestre.

Como pudimos observar previamente (Figura 2), tanto en el embarazo fisiológico como en el embarazo preecláptico, existe un aumento de la concentración de IL-18 en el segundo trimestre al compararla con el primer trimestre. Sin embargo, los niveles de esta citoquina no varían entre los grupos que desarrollan la enfermedad *versus* el grupo que sigue un embarazo fisiológico (Figura 3). Como consecuencia, tratando de buscar un factor predictivo de la enfermedad, observamos la razón de cambio de IL-18 entre las pacientes que presentaron muestras tomadas en los dos trimestres de embarazo (grupo pareado), sin embargo, tampoco se observó una diferencia de la razón de aumento de IL-18 entre el segundo trimestre y el primer trimestre que pudiese sugerir el desarrollo de la enfermedad (Figura 4).

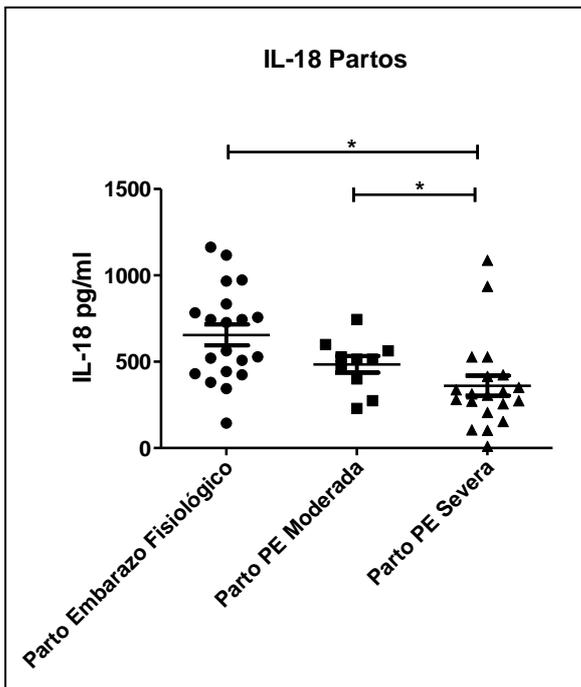


**Figura 4. Razón de cambio de IL-18 entre 1er y 2º trimestre del embarazo fisiológico y preecláptico.**  
*La razón de cambio de IL-18 no presentó diferencias entre embarazo fisiológico y preecláptico previo a los síntomas clínicos de la enfermedad.*

Identificación de IL-18 en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). Comparación de la razón de IL-18 en el 2º trimestre / IL-18 en el 1er trimestre en embarazo fisiológico y embarazo preecláptico. No significativo: ns.

Para observar si existen diferencias durante las manifestaciones clínicas de la enfermedad, se comparó los niveles en el parto de embarazo fisiológico y preecláptico, catalogando los partos preeclápticos en preeclampsia moderada y severa (Figura 5).

En la Figura 5, observamos que los niveles séricos de IL-18 no muestran diferencias estadísticamente significativas entre el parto de embarazo fisiológico y parto de preeclampsia moderada, a diferencia de las pacientes con preeclampsia severa, donde IL-18 se encuentra disminuida en comparación tanto al grupo de preeclampsia moderada como al de embarazo fisiológico. Por lo tanto, al contrario de lo que esperábamos, IL-18 a pesar de ser una citoquina clásicamente pro-inflamatoria, se ve disminuida en mujeres con preeclampsia severa, en la cual los síntomas de la enfermedad son más evidentes y graves.



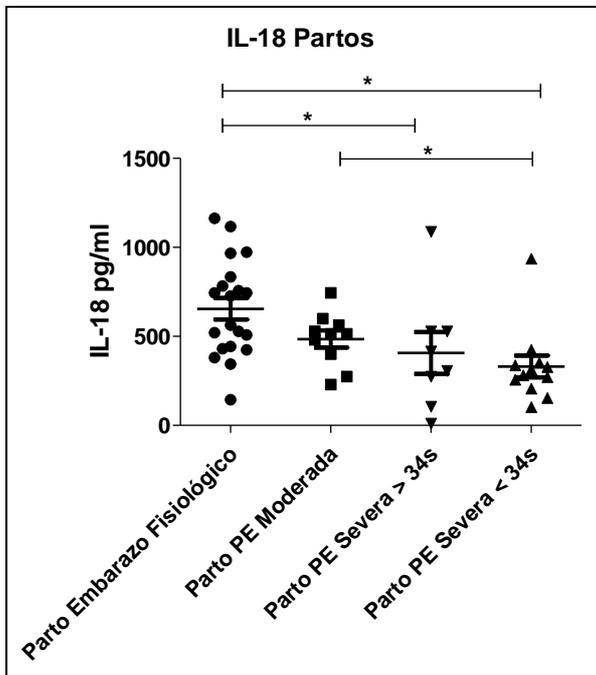
**Figura 5. Niveles de IL-18 en el momento del parto dividido por preeclampsia moderada y severa.**

*La concentración de IL-18 es menor en el parto de preeclampsia severa.*

Identificación de IL-18 en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). IL-18 fue medida en plasma de mujeres con parto de embarazo fisiológico, parto con preeclampsia moderada y severa.

PE: Preeclampsia. \*P<0,05

Para tratar de dilucidar este hallazgo y comprender a que se deben estos resultados, realizamos además una subdivisión en el grupo de preeclampsia severa, entre parto con menos y más de 34 semanas (Figura 6). Esta subdivisión se basa en criterios clínicos de prematuridad, y en algunas teorías no claramente comprobadas de que la preeclampsia con manifestaciones previas a las 34 semanas, podría ser generada por mecanismos etiológicos diferentes a la preeclampsia con manifestaciones más tardías (Akolekar et al., 2013).



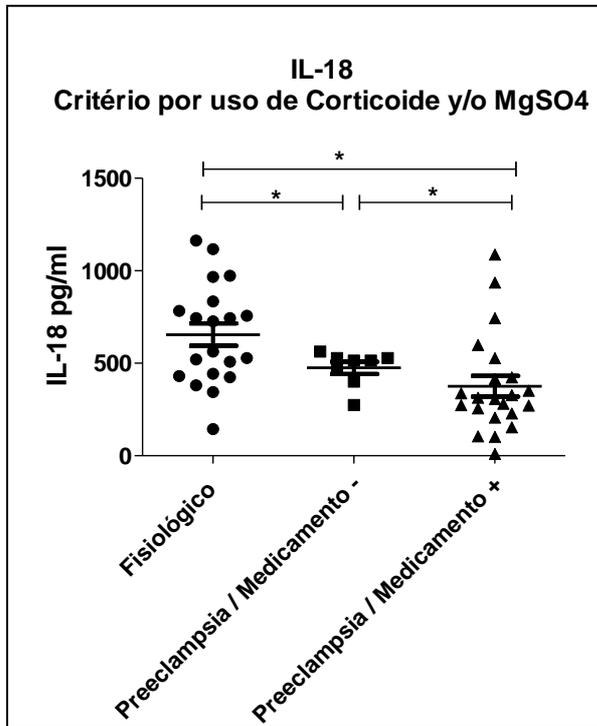
**Figura 6. Niveles de IL-18 en el momento del parto dividido por preeclampsia moderada, severa con más de 34 semanas y menos de 34 semanas de embarazo.**

*La concentración de IL-18 es menor en parto de PE severa anterior a 34 semanas al comparar con PE moderada.*

Identificación de IL-18 en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). IL-18 fue medida en plasma de mujeres con parto de embarazo fisiológico, parto de preeclampsia moderada, parto de preeclampsia severa con presentación posterior o anterior a 34 semanas. PE: Preeclampsia. \* P<0,05.

En la figura 6 podemos observar que, independiente de la edad gestacional, los niveles de IL-18 en mujeres con preeclampsia severa son significativamente menores al comparar con el parto de embarazo fisiológico, sin diferencia entre los dos subgrupos de modalidad severa de enfermedad. Sin embargo, solamente el grupo de preeclampsia menor a 34 semanas es significativamente diferente a la preeclampsia moderada. Este resultado es interesante desde el punto de vista clínico, ya que las pacientes con necesidad de interrupción de parto y con embarazo con menos de 34 semanas son sometidas a uso de corticoides, un potente agente con efectos anti-inflamatorios.

Posteriormente, evaluamos si el uso de corticoides y otras drogas con efectos anti-hipertensivos como el sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) previo a la toma de las muestras pudiera estar siendo responsable por las menores concentraciones de IL-18 en la preeclampsia. Observamos que las pacientes que utilizaron estos medicamentos presentan niveles disminuidos de esta citoquina cuando comparadas a preeclampsia sin uso de corticoide y/o sulfato de magnesio (Figura 7).



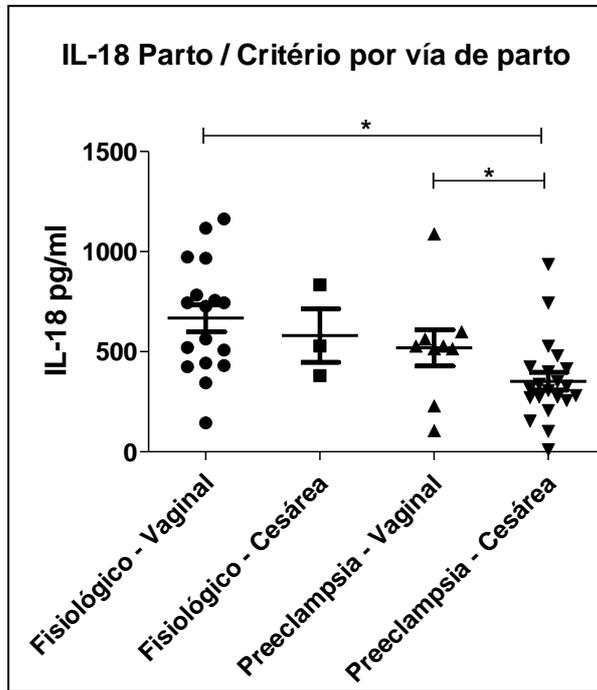
**Figura 7. Niveles de IL-18 en el momento del parto dividido por uso de corticoides y/o MgSO<sub>4</sub>.**

*El uso de medicamentos está relacionado a una menor concentración de IL-18.*

Identificación de IL-18 en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). Los grupos son divididos en parto de embarazo fisiológico y parto de embarazo preecláptico. Grupo que no utilizó ninguno de los dos medicamentos (Medicamento -). Grupo que utilizó por lo menos uno de los dos medicamentos (Medicamento +). MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de Magnesio. \*P<0,05.

Otro parámetro que nos parece muy importante de abordar en el análisis de estas pacientes y que pudiera estar siendo responsable por la baja concentración de IL-18 en las pacientes preeclápticas es la presencia o ausencia de trabajo de parto, ya que éste pudiera ser determinante para los análisis, debido a reportes previos que relacionan el aumento de IL-18 en el momento del trabajo de parto (Ida et al., 2000).

En la figura 8 podemos observar las concentraciones de IL-18 dividido por la vía de parto en los grupos de partos de embarazo fisiológico y parto de embarazo preecláptico. En este gráfico podemos observar que las pacientes con preeclampsia que presentaron su embarazo interrumpido por cesárea presentan concentraciones de IL-18 significativamente menores que las pacientes que presentaron parto por vía vaginal, tanto de embarazo fisiológico como preecláptico.



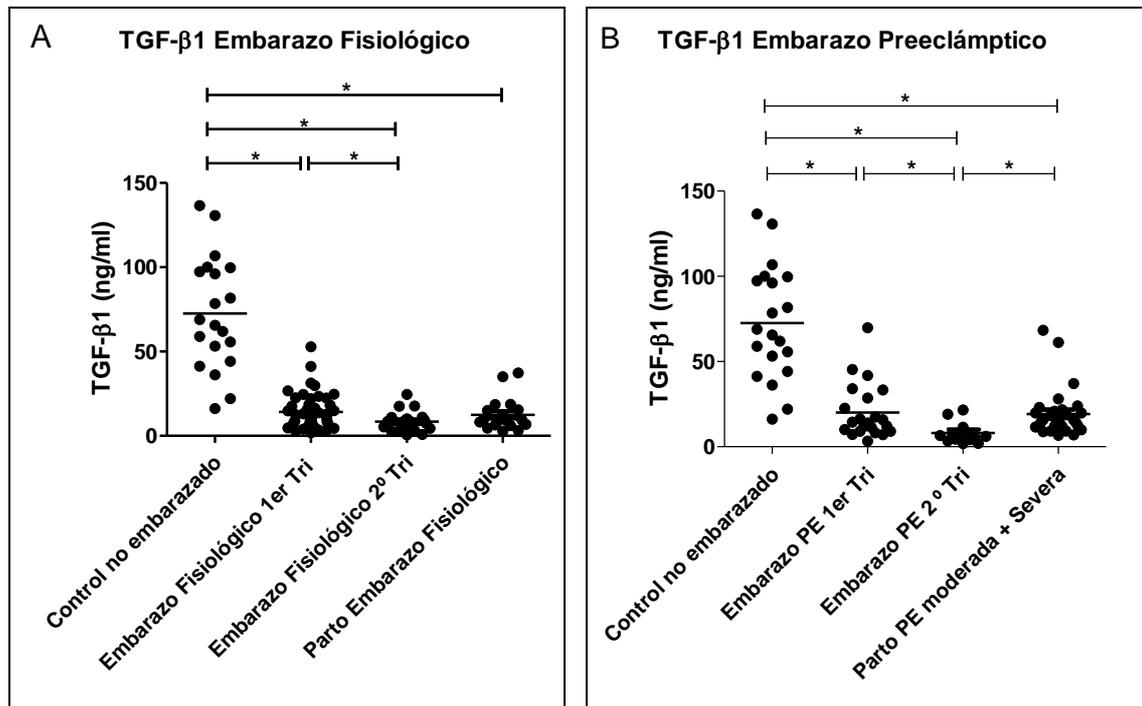
**Figura 8. Niveles de IL-18 en el momento del parto dividido por vía de parto.**

*El parto por vía cesárea en las pacientes con preeclampsia está relacionado a una menor concentración de IL-18.*

Identificación de IL-18 en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). Los grupos son divididos en parto de embarazo fisiológico y parto de embarazo preecláptico, por vía vaginal o cesárea. \* P<0,05

La figura 9 evidencia las concentraciones TGF- $\beta$ 1 en el plasma de mujeres con embarazo fisiológico y embarazo preecláptico. La figura 9A se muestra el análisis de los embarazos fisiológicos, donde se observa que TGF- $\beta$ 1 presenta niveles mayores en el primer trimestre del embarazo comparados con el segundo trimestre y al momento del parto. Sin embargo, los niveles en el primer trimestre están disminuidos cuando comparados a mujeres no embarazadas (Figura 9A).

En el caso del embarazo preecláptico, TGF- $\beta$ 1 se encuentra aumentada en el primer trimestre al compararla con el segundo trimestre del embarazo, adicionalmente se observó que los niveles en el momento del parto son mayores que el segundo trimestre y similares al primer trimestre (Figura 9B). Por último, los tres trimestres del embarazo tanto fisiológico como preecláptico presentan niveles disminuidos al comparar con mujeres no embarazadas (Figura 9).

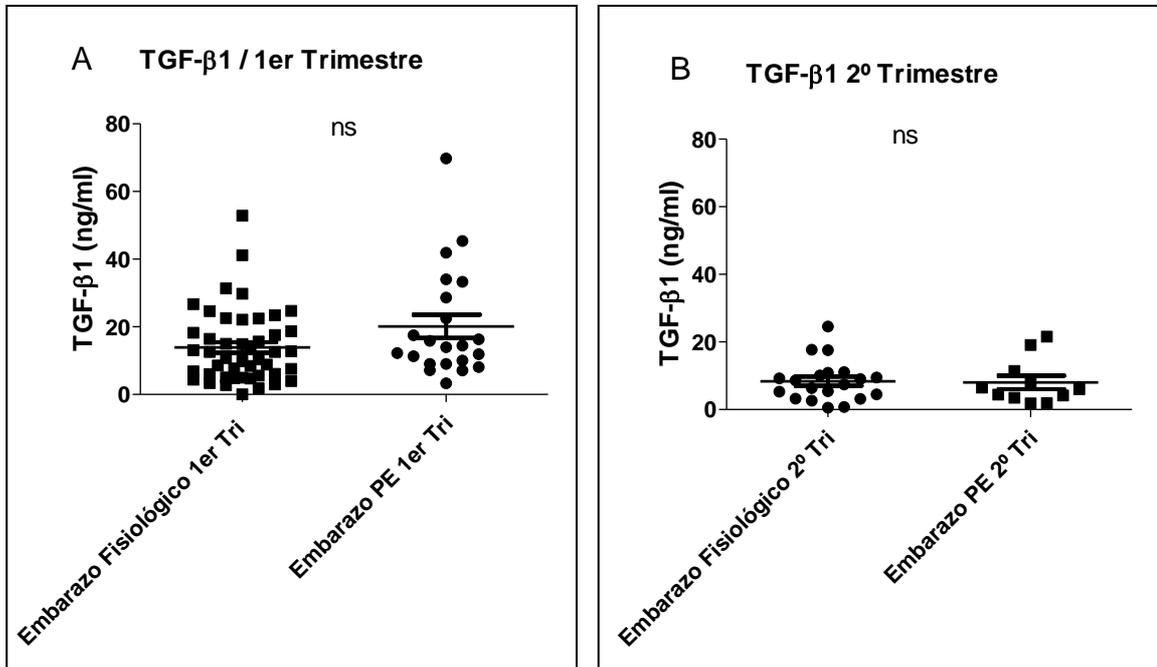


**Figura 9: Niveles de TGF-β1 durante el embarazo, en mujeres con embarazo fisiológico y preeclámptico.**

*La concentración de TGF-β1 es menor en todas las etapas del embarazo fisiológico y preeclámptico, al comparar con el control no embarazado. Sin embargo, durante las etapas del embarazo fisiológico ésta es mayor en el primer trimestre y durante el embarazo preeclámptico ésta es menor en el segundo trimestre.*

La concentración de TGF-β1 en plasma fue determinada mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). TGF-β1 fue medida en plasma de mujeres no embarazadas, con embarazo en el primer, segundo trimestre y parto. El análisis fue realizado observando la dinámica de TGF-β1 en mujeres que desarrollaron embarazos fisiológicos y las que posteriormente presentaron preeclampsia. En A): se observa la concentración de TGF-β1 en plasma de mujeres con embarazo fisiológico. En B): se observa la concentración de TGF-β1 en plasma de mujeres con embarazo preeclámptico. PE: Preeclampsia. Tri: Trimestre. \* P < 0,05

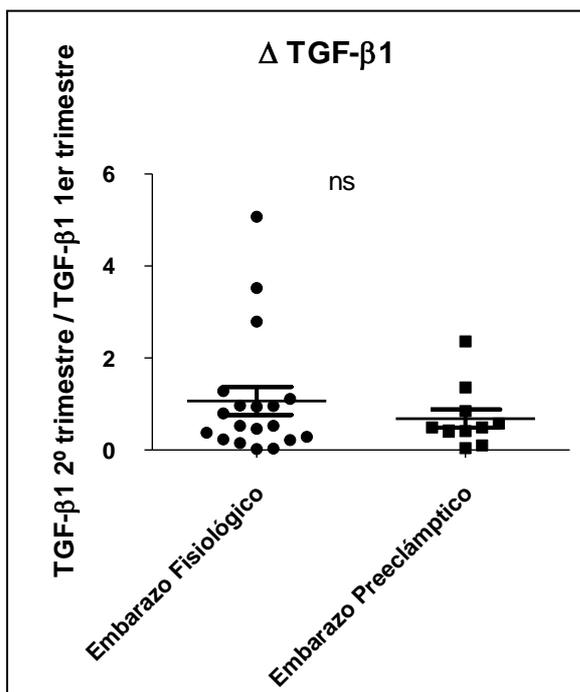
Con el fin de evaluar si los niveles séricos de TGF-β1 pudiesen comportarse como un factor predictivo de la enfermedad, comparamos los niveles de TGF-β1 en plasma de mujeres que posteriormente desarrollaron preeclampsia, y las que mantuvieron un embarazo fisiológico, en el primer y segundo trimestre del embarazo (Figura 10), además de la razón de cambio de ésta citoquina entre el segundo y el primer trimestre del embarazo en grupos pareados de pacientes (Figura 11). En estos estudios, ninguna diferencia fue encontrada entre los grupos de embarazo fisiológico y preeclámptico.



**Figura 10. Niveles de TGF-β1 en el primer y segundo trimestre en mujeres con embarazo fisiológico y preecláptico.**

*La concentración de TGF-β1 no presentó diferencias entre embarazo fisiológico y preecláptico previo a los síntomas clínicos de la enfermedad.*

La concentración de TGF-β1 en plasma fue determinada mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). En A) se observa la concentración de TGF-β1 en el primer trimestre del embarazo fisiológico y preecláptico. En B) se observa la concentración de TGF-β1 en el segundo trimestre del embarazo fisiológico y preecláptico. PE: Preeclampsia. No significativo: ns. Tri: Trimestre.

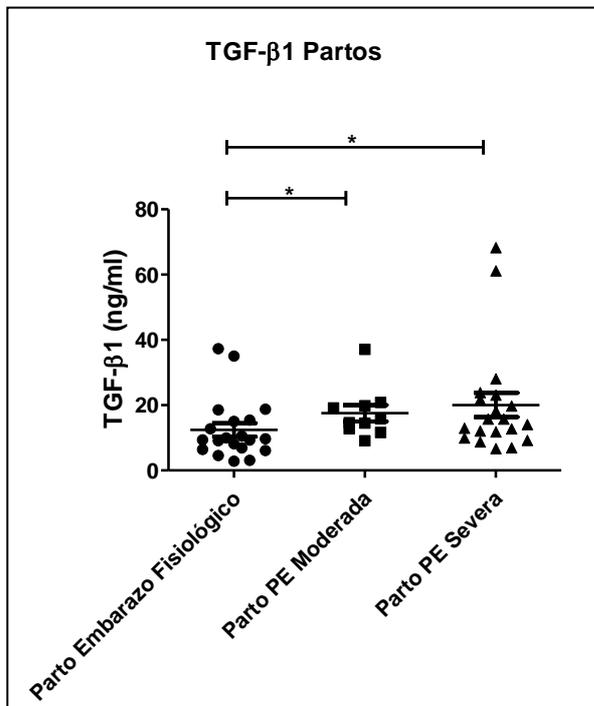


**Figura 11. Razón de cambio de TGF-β1 entre 1º y 2º trimestre del embarazo fisiológico y preecláptico.**

*El Δ TGF-β1 no presentó diferencias entre embarazo fisiológico y preecláptico previo a los síntomas clínicos de la enfermedad.*

Identificación de TGF-β1 en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). Comparación de la razón de TGF-β1 en el 2º trimestre / TGF-β1 en el 1º trimestre en embarazo fisiológico y embarazo preecláptico. No significativo: ns.

A fin de dilucidar si existían diferencias entre grupos del parto de preeclampsia y embarazo fisiológico, separamos las pacientes con manifestaciones de preeclampsia moderada o severa durante el parto y los comparamos con mujeres con partos fisiológicos. Se observó aumento de los niveles séricos de TGF- $\beta$ 1 en las pacientes con preeclampsia, cuando se comparan a los partos de embarazo fisiológico, entretanto entre los dos grupos de preeclampsia no se observan diferencias (Figura 12).



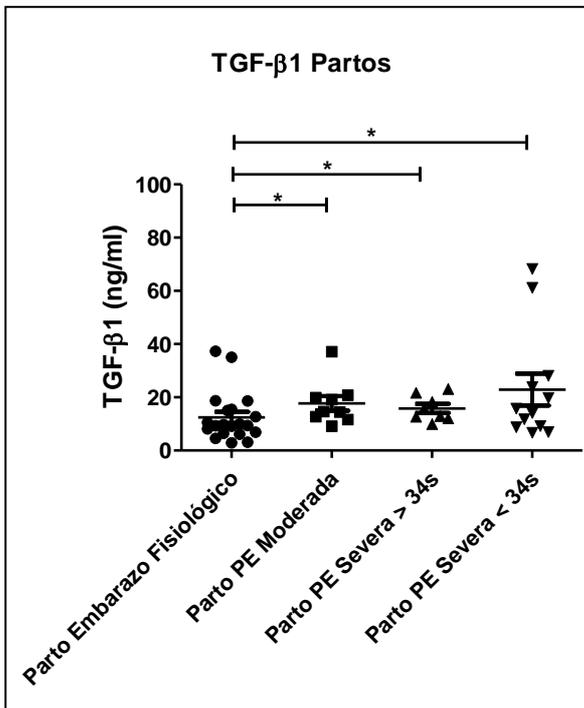
**Figura 12. Niveles de TGF- $\beta$ 1 en el momento del parto separado por los diferentes grupos clínicos.**

*La concentración sérica de TGF- $\beta$ 1 está aumentada en pacientes con preeclampsia.*

La concentración de TGF- $\beta$ 1 fue evaluada en plasma de mujeres en parto con embarazo fisiológico, parto con preeclampsia moderada o severa y determinada mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). PE: Preeclampsia.

\* P<0,05.

Siguiendo el mismo raciocinio que utilizamos para IL-18, analizamos las concentraciones de TGF- $\beta$ 1 en subgrupos de preeclampsia severa por criterios de prematuridad (Figura 13), uso de medicamentos (Figura 14) y vía de parto (Figura 15).



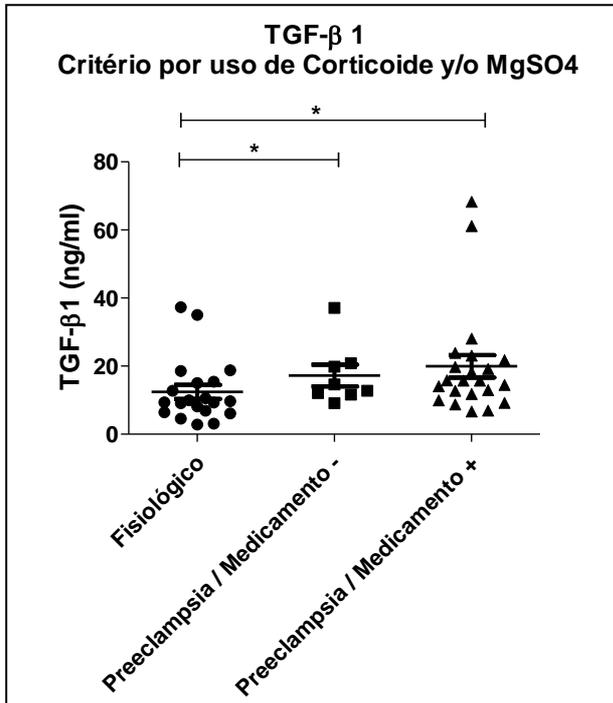
**Figura 13. Niveles de TGF-β1 en el momento del parto dividido por preeclampsia moderada, severa posterior a 34 semanas y anterior a 34 semanas de embarazo.**

*La concentración sérica de TGF-β1 está aumentada en preeclampsia independiente de la edad gestacional.*

Identificación de TGF-β1 en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). TGF-β1 fue medida en plasma de mujeres con parto de embarazo fisiológico, parto con preeclampsia moderada, parto con preeclampsia severa con presentación posterior a 34 semanas y parto con preeclampsia severa con presentación anterior a 34 semanas. PE: Preeclampsia. \* P<0,05.

En la figura 13, podemos observar que la concentración de TGF-β1 se presenta aumentada en los grupos de preeclampsia, cuando se compara con el parto de embarazo fisiológico, sin presentar diferencia entre los diferentes subgrupos de preeclampsia.

Cuando realizamos la división por criterio de uso de corticoide y/o MgSO<sub>4</sub>, observamos que independiente del uso de los medicamentos las pacientes con preeclampsia poseen concentración de TGF-β1 significativamente mayor que las pacientes con parto de embarazo fisiológico (Figura 14).

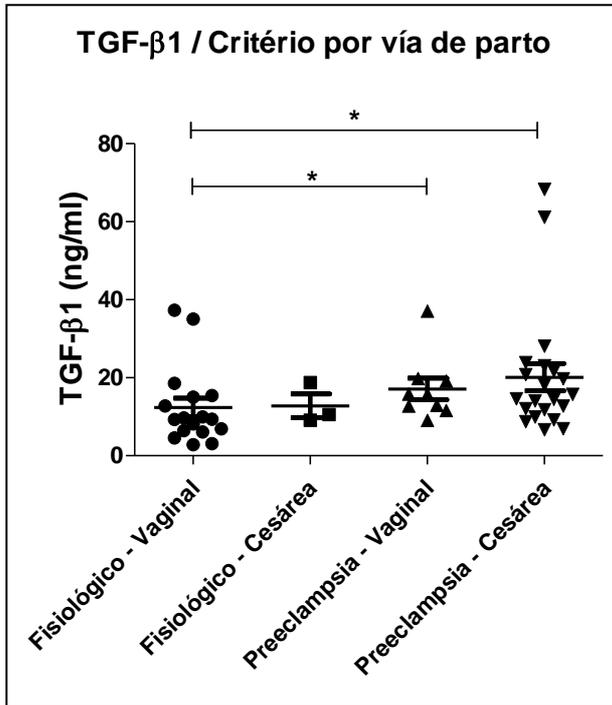


**Figura 14. Niveles de TGF-β1 en el momento del parto dividido por uso de corticoides y/o MgSO<sub>4</sub>.**

*La concentración sérica de TGF-β1 está aumentada en preeclampsia independiente del uso de medicamentos.*

Identificación de TGF-β1 en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). Los grupos son divididos en parto de embarazo fisiológico y parto de embarazo preecláptico. Grupo que no utilizó ninguno se los dos medicamentos (Medicamento -). Grupo que utilizó por lo menos uno de los dos medicamento (Medicamento +). MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de Magnesio. \*P<0,05.

Adicionalmente, se evaluó como criterio de subdivisión la presencia o no de trabajo de parto, como vaginal (presencia de trabajo de parto) o cesárea (ausencia de trabajo de parto). Se observó que TGF-β1 se presenta aumentada en las pacientes con preeclampsia, independiente de la presencia o ausencia de trabajo de parto, ya que tanto la preeclampsia con parto vaginal, como la preeclampsia con interrupción del embarazo por cesárea presentan niveles de TGF-β1 significativamente mayores al comparar con las pacientes con parto fisiológico por vía vaginal (Figura 15).



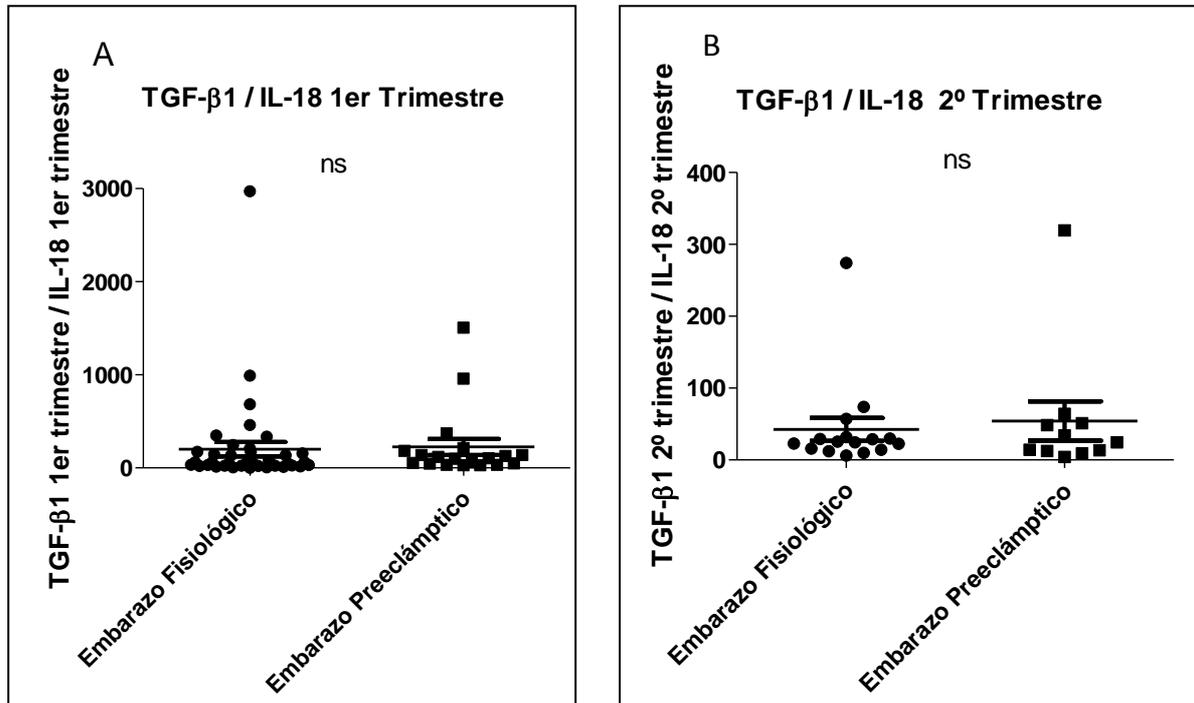
**Figura 15. Niveles de TGF-β1 en el momento del parto dividido por vía de parto.**

*La concentración sérica de TGF-β1 está aumentada en preeclampsia independiente de la vía de parto*

Identificación de TGF-β1 en plasma mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). Los grupos son divididos en parto de embarazo fisiológico y parto de embarazo preecláptico, por vía vaginal o cesárea.

\* P<0,05

Adicionalmente tratando de buscar una relación entre los resultados de estas dos citoquinas, estudiamos la relación TGF-β /IL-18 en el primer y segundo trimestre del embarazo, a fin de observar implicancias predictivas. Tampoco se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa (Figura 16)

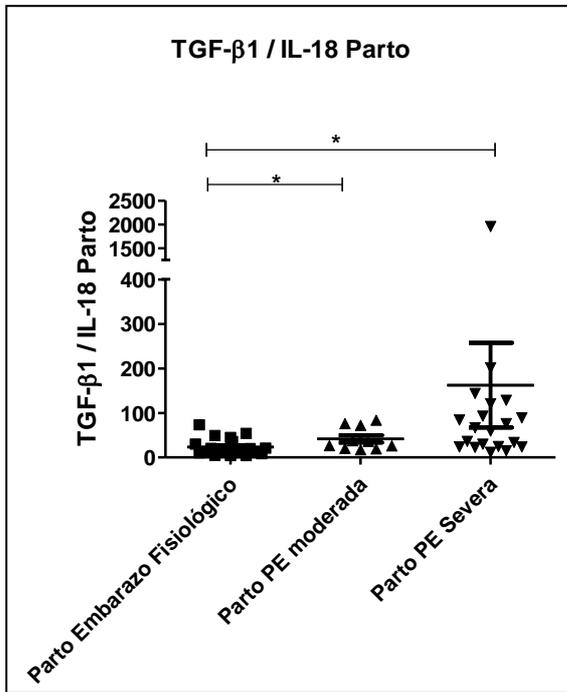


**Figura 16: Relación TGF-β1 / IL-18 en el primer y segundo trimestre en mujeres con embarazo fisiológico y preecláptico.**

*La Relación TGF-β1 / IL-18 no se presenta alterada previo a los síntomas clínicos de la enfermedad.*

La concentración de TGF-β1 y IL-18 en plasma fue determinada mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). La relación se aplica en las concentraciones en pg/mL. En (A) se observa la relación TGF-β1/IL-18 en el primer trimestre del embarazo fisiológico y preecláptico. En (B) se observa la relación TGF-β1 / IL-18 en el segundo trimestre del embarazo fisiológico y preecláptico. (No significativo: ns).

Cuando se observa esta misma relación TGF-β1/IL-18 para el momento del parto, observamos que esta relación está aumentada en la preeclampsia moderada y severa, cuando comparada a parto fisiológico, sin diferencia entre los dos grupos (Figura 17).



**Figura 17. Relación TGF-β1/IL-18 en el momento del parto separado por los diferentes grupos clínicos.**

*La relación TGF-β1/IL-18 está aumentada en pacientes con preeclampsia.*

La concentración de TGF-β1 e IL-18 fue evaluada en plasma de mujeres en parto con embarazo fisiológico, parto con preeclampsia moderada o severa y determinada mediante FlowCytomix® (BenderMedSystem, Austria). La relación se aplica en las concentraciones en pg/mL. PE: Preeclampsia. \*P<0,05

## Conclusiones

De la experimentación realizada en la presente tesis podemos concluir lo siguiente:

1. Las citoquinas estudiadas no fueron relacionadas a predicción clínica de la preeclampsia.
2. IL-18 es regulada durante el 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> trimestre del embarazo fisiológico, llegando a concentraciones similares a las de mujeres no embarazadas en el momento del parto.
3. TGF- $\beta$ 1 se encuentra disminuida en el embarazo fisiológico cuando se compara a mujeres no embarazadas.
4. IL-18 se presentó disminuida en parto de preeclampsia severa, estando este resultado directamente relacionado al uso de medicamentos y a la ausencia de trabajo de parto.
5. TGF- $\beta$ 1 está aumentada en el parto de preeclampsia moderada y severa, independiente del uso de medicamentos o de trabajo de parto.
6. Los hallazgos descritos para IL-18 sugieren que esta citoquina no estaría relacionada a las manifestaciones clínicas de la preeclampsia, las diferencias encontradas podrían deberse al uso de medicamentos y de la ausencia de trabajo de parto.
7. Los hallazgos descritos para TGF- $\beta$ 1 sugieren que esta citoquina podría estar implicada en las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

## Discusión

La preeclampsia es una enfermedad multifactorial que hasta la fecha posee una etiología no totalmente dilucidada. A pesar de que el mal desarrollo placentario en el primer trimestre es aceptado como etiología principal de la preeclampsia, esta enfermedad es conocida como “la enfermedad de teorías” (Salas, et al. 1999), ya que no está claro qué factores podría causar esta disfunción en el temprano desarrollo placentario. Los factores angiogénicos, el estrés oxidativo y el desequilibrio inmunológico son sugeridos como posibles factores etiológicos de la preeclampsia (Laresgoiti-Servitje et al., 2010).

En el presente estudio planteamos como objetivo cuantificar mediante FlowCytomix® citoquinas en el plasma de mujeres con embarazo fisiológico y preeclámpico en el primer trimestre (12-14 semanas) y segundo trimestre (22-24 semanas) del embarazo y en el momento del parto, como forma de evaluar si existe un perfil de citoquinas, que pueda predecir el desarrollo de las manifestaciones clínicas en la preeclampsia.

Con este método las citoquinas TGF- $\beta$ 1 e IL-18 fueron detectables en todas las muestras analizadas. En contrapartida, siete citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-10) presentaron concentraciones plasmáticas por debajo de la sensibilidad del método en un porcentaje importante de las muestras. A pesar de esto, utilizamos el porcentaje de detección (% de muestras en el que se detectaba la citoquina) como variable para realizar análisis estadísticos y verificar una tendencia para estudios posteriores. En este análisis, las citoquinas IL-10, IL-17A, IL-8 e IL-6 presentaron diferencias entre el embarazo fisiológico y preeclámpico en el 1<sup>er</sup> trimestre del embarazo, lo que las hace muy interesantes a futuro, ya que estudios con métodos más sensibles son necesarios para clarificar el papel que juegan

estas citoquinas en el embarazo fisiológico y preecláptico.

En el caso de IL-18, ésta es conocida como una citoquina pro-inflamatoria por su rol al estimular células Natural Killer y en el desarrollo del perfil de linfocitos T<sub>H</sub>1 (Li et al., 2009; Huang H.Y., 2006). Adicionalmente, ésta citoquina induce la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias, como IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 y TNF- $\alpha$  (Polettini et al., 2012). En este estudio hemos podido demostrar que en embarazos fisiológicos los niveles de IL-18, aumentan a medida que el embarazo progresa llegando a su máximo cuando se acerca al momento del parto (Figura 2A). Estos hallazgos no se encuentran publicados hasta la fecha y apuntan a la existencia de una regulación inmune para esta citoquina durante el primer y segundo trimestre del embarazo, llegando a niveles similares a los de las mujeres no embarazadas solamente en el momento del parto. Estos datos son coherentes a reportes previos que apoyan un rol inflamatorio del sistema inmune en el desencadenamiento del trabajo de parto, con aumento de la actividad pro-inflamatoria en el cérvix uterino, en el miometrio y en las membranas fetales, a través del aumento de prostaglandinas, invasión de leucocitos, principalmente neutrófilos, macrófagos y células T, además del aumento de la expresión de quimioquinas, moléculas de adhesión y de la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Golightly et al., 2010).

Por otro lado, hemos observado que contrario a lo esperado, existe una disminución de IL-18 durante el parto de mujeres que desarrollaron preeclampsia severa, no así en mujeres con preeclampsia moderada (Figura 5). Tratando de esclarecer estos resultados separamos las pacientes con preeclampsia sometidas a cesárea de aquellas con parto vaginal y pudimos observar que las concentraciones de IL-18, en pacientes con parto vaginal, tanto fisiológico como preecláptico, eran superiores a los de preeclampsia con cesárea (Figura 8). Lamentablemente no pudimos evaluar diferencias similares para las pacientes con embarazo

fisiológico sometidas a cesárea electiva, debido al bajo número de muestras (n=3). Estos hallazgos son concordantes con un estudio realizado por Ida y colaboradores en 2000, que observaron aumento de IL-18 durante el trabajo de parto en un grupo pareado de mujeres con embarazo fisiológico.

Por otra parte, el uso corticoides se ha previamente relacionado a baja en la concentración séricas de algunas citoquinas en la preeclampsia, entre ellas IL-18 (Adams et al., 2003). Adicionalmente se ha relacionado el sulfato de magnesio, otro medicamento utilizado comúnmente en preeclampsia, con disminución de citoquinas pro-inflamatorias *in vivo* e *in vitro* (TamTam et al., 2011; Sugimoto et al., 2012; Makhoul et al., 2005). Concordantemente, nuestros resultados muestran diferencias significativas entre las pacientes preeclámpticas sometidas a tratamiento medicamentoso *versus* las preeclámpticas sin tratamiento medicamentoso (Figura 7). Estos hallazgos se muestran particularmente interesantes, ya que los glucocorticoides y el MgSO<sub>4</sub> inhiben la transcripción de NF- $\kappa$ B (Gross and Cidlowski, 2008; Rochelson et al., 2007) y este factor por su vez, promueve la transcripción de IL-18 (Wang et al., 2007; Chandrasekar et al., 2003).

En conclusión creemos que en pacientes con preeclampsia la disminución de IL-18 estaría relacionada a uso de medicamentos y ausencia de trabajo de parto, sin relación directa a los síntomas de la enfermedad.

En el caso de TGF- $\beta$ 1, ésta es descrita clásicamente como una citoquina regulatoria, producida por diversos tipos celulares, incluso linfocitos reguladores T<sub>H</sub>3 (Raghupathy R, 2001). Sin embargo, en el inicio del embarazo ha sido descrita por múltiples reportes como responsable de la inhibición de la invasión trofoblástica a las arterias espiraladas (Mano et al., 2011; Lash et al., 2005), estando TGF- $\beta$ 1 involucrada en la disminución de la producción de

las metaloproteinasas (Zhao et al., 2006) y en la inhibición deIDO, importante enzima implicada en la supresión linfocitaria (Kudo et al., 2003). En nuestros resultados observamos que TGF- $\beta$ 1 esta aumentada en mujeres no embarazadas cuando se compara con cualquier trimestre del embarazo (Figura 9), lo que es acorde con hallazgos previamente descritos. Adicionalmente, se observó que TGF- $\beta$ 1 está aumentada en el primer trimestre al compararlo con el segundo trimestre y momento del parto fisiológico (Figura 9A), resultados que fueron concordantes con el trabajo realizado por Xuan y sus colaboradores en 2007, que observaron que TGF- $\beta$ 1 está aumentada en tejidos placentarios en el primer trimestre del embarazo al compararlo con el segundo y el tercer trimestres. Creemos que este comportamiento del TGF- $\beta$ 1 indica que durante este periodo la concentración debe ser óptima, ya que por un lado el aumento de su concentración puede afectar el proceso de invasión y posterior desarrollo placentario y por otro lado, la ausencia de respuesta a TGF- $\beta$  genera enfermedades gestacionales relacionadas a la exagerada invasión trofoblástica. (Graham et al., 1994).

A pesar de las importantes funciones mencionadas en la regulación de la respuesta inmune, existe alguna evidencia que TGF- $\beta$  también posee funciones pro-inflamatorias (Letterio et al., 1998). En trabajos más recientes, fue descrita como una citoquina con “funciones dobles”, ya que diversos reportes demostraron que ésta es capaz de generar tanto linfocitos reguladores como linfocitos  $T_H17$ , dependiendo de la concentración de citoquinas pro-inflamatorias en el microambiente, principalmente IL-6 (Cua et al., 2006). Esto se muestra particularmente interesante, ya que determinamos que tanto la preeclampsia moderada, como la severa poseen niveles aumentados de TGF- $\beta$ 1 al comparar con el parto de embarazo fisiológico, y esto ocurre independiente del uso de medicamentos, edad gestacional o vía de parto. Indicando un posible rol de esta citoquina durante la manifestación de la enfermedad.

Por otra parte y concordante con nuestros hallazgos, diversos reportes relacionan TGF- $\beta$  a

la fisiopatología de fibrosis renal, proteinuria e hipertensión (Feizollahzadeh et al., 2012), manifestaciones clínicas presentes en la preeclampsia. Adicionalmente a este efecto de TGF- $\beta$  en los síntomas de la enfermedad, Peraçoli y colaboradores observaron que el aumento de TGF- $\beta$  en la preeclampsia estaba relacionada con activación plaquetaria, determinando que el aumento en la concentración de esta citoquina está relacionada a las disfunciones plaquetarias también presentes en la preeclampsia.

A pesar de estos importantes hallazgos durante el desarrollo de la enfermedad, nuestro trabajo no fue capaz de determinar cambios para IL-18 y TGF- $\beta$ 1 en el primer y segundo trimestre del embarazo y los hallazgos descritos para las otras citoquinas (IL-8, IL-6, IL-10 e IL-17A) apuntan que éstas podrían ser de interés para futuros estudios a través de métodos más sensibles.

En el caso de IL-17A, ésta es una citoquina ícono del perfil T<sub>H</sub>17, siendo relacionada previamente con el desarrollo de diversas patologías en el embarazo (Lee et al., 2011; Saito et al., 2011; Santner-Nanan et al. 2009; Toldi et al., 2011). Nuestros resultados demostraron que en el embarazo fisiológico existe un aumento progresivo del porcentaje de detección de esta citoquina en plasma, con un máximo en el momento del parto (Figura 1F) hallazgos concordantes con el trabajo de Martinez-Garcia en 2010. Interesantemente, Pongcharoen y sus colaboradores en 2007, demostraron que los trofoblastos y los macrófagos de placenta humana normales de término, expresan mRNA de IL-17 e IL-17, lo que puede significar que la presencia IL-17 en el plasma de las mujeres analizadas, puede ser producida fundamentalmente por células placentarias.

Adicionalmente, pudimos observar que este patrón de aumento de detección de IL-17A en el momento del parto también ocurre en embarazos preeclámpicos, presentando la misma cinética observada para embarazos fisiológicos (Figura 1F). Sin embargo, al comparar el

embarazo fisiológico y preeclámptico, observamos que el porcentaje de detección de esta citoquina en las mujeres que desarrollan preeclampsia, es menor en el primer trimestre. A pesar de ser relacionada a la inflamación, esta citoquina también está relacionada a la vasculogénesis y a la promoción de factores angiogénicos (Pongcharoen et al., 2007).

En cuanto a la IL-6, determinamos que existe un aumento del porcentaje de detección de esta citoquina a lo largo del embarazo fisiológico y preeclámptico, con mayores porcentajes en el momento del parto al compararlos con el primer trimestre (Figura 1B). Sin embargo, a pesar de que la dinámica de esta citoquina fue similar entre embarazos fisiológicos y preeclámpticos, se observó que el porcentaje de detección de IL-6 del primer trimestre preeclámptico fue mayor que en el embarazo fisiológico (Figura 1B). Estudios previos determinaron que la decidua de primer trimestre de mujeres que desarrollaron preeclampsia, presentaba un aumento de la expresión de IL-6 y de mRNA de IL-6, determinando un posible factor causal para esta citoquina (Prins y cols 2012), además de los diversos reportes que determinan un aumento de IL-6 en el suero de mujeres preeclámpticas (Molvarec et al., 2011; Szarka et al., 2010).

En el caso de IL-8, ésta es conocida como una citoquina pro-inflamatoria que actúa como quimioattractor de células inmunes (Mukaida et al., 1998). Nuestros resultados demostraron que esta citoquina presenta porcentajes de detección que cambian con la edad gestacional a lo largo del embarazo preeclámptico y fisiológico, sugiriendo que ésta pudiera estar siendo regulada durante la gestación (Figura 1C). A pesar de esta función inflamatoria, pudimos observar que IL-8 es más detectable en el primer trimestre del embarazo fisiológico, cuando se compara con el primer trimestre del embarazo preeclámptico (Figura 1C). Esto es coherente, sin embargo, con otra función de la IL-8 que es facilitar la vasculogénesis en el principio del embarazo (Jovanović et al., 2010). Por lo tanto, la baja concentración de IL-8 en el primer

trimestre podría generar una invasión insuficiente a las arterias espiraladas, fisiopatología principal en la preeclampsia.

IL-10 es una citoquina previamente estudiada en la preeclampsia, que se relaciona principalmente a funciones anti-inflamatorias. Nuestros resultados demostraron el menor porcentaje de detección en el primer trimestre en las mujeres con embarazo fisiológico, cuando comparado al segundo trimestre y al momento del parto de este mismo grupo de pacientes (Figura 1E). Estos hallazgos fueron concordantes al de Freeman y sus colaboradores que en 2004 determinaron que en el embarazo fisiológico existía un aumento de IL-10 del primer al tercer trimestre del embarazo. En el caso del embarazo preecláptico el mayor porcentaje de detección se presenta en el segundo trimestre del embarazo, al compararse al momento del parto (Figura 1E). Sin embargo, al buscar diferencias entre el embarazo fisiológico y patológico observamos que IL-10 es más detectada en el primer trimestre de embarazo preecláptico, cuando se compara con el embarazo fisiológico (Figura 1E). Pensamos que este hallazgo podría ser consecuencia de un equilibrio inmune más complejo de estas pacientes o bien, a la necesidad de técnicas más sensibles para determinar la concentración de esta citoquina en el embarazo.

A partir de la discusión expuesta podemos inferir que el estudio de las citoquinas en el embarazo fisiológico y preecláptico es un trabajo muy arduo y difícil de realizar, en vista de que todas las citoquinas evaluadas, cumplen funciones fisiológicas que son cruciales para el embarazo y sus acciones muchas veces no dependen directamente de sus concentraciones séricas, pero sí se relaciona más bien a un microambiente, en que el resultado final de su acción depende del balance de todas las citoquinas, quimioquinas, receptores, ligandos solubles entre otros factores.

Adicionalmente debemos considerar que en el estudio de la inmunología del embarazo y de la preeclampsia, los resultados obtenidos pueden ser afectados por la intervención de factores ambientales, genéticos y poblacionales, además de su etiología multifactorial, los cuales claramente pueden ser los responsables por las divergencias de hallazgos en la literatura.

A pesar de este desafío, nuestros resultados indican que existe una regulación inmunológica durante el embarazo fisiológico. Esta regulación se evidencia a partir de la dinámica de la concentración de IL-18 en el embarazo normal, en la cual se observa que esta citoquina es regulada hacia abajo durante el primer y segundo trimestre del embarazo, alcanzando niveles similares a los encontrados en mujeres no embarazadas en el momento del parto. En el caso de la preeclampsia, determinamos que durante las manifestaciones clínicas de la enfermedad, TGF- $\beta$ 1 se encuentra aumentada al ser comparada con el embarazo fisiológico. Adicionalmente determinamos que el tratamiento medicamentoso y la ausencia de trabajo de parto serían responsables por la baja concentración de IL-18 en el grupo de mujeres con preeclampsia severa.

En relación a la predicción clínica de la enfermedad, lamentablemente no fuimos capaces de determinar alteraciones inflamatorias previas a las manifestaciones clínicas de la preeclampsia. Sin embargo, con esta afirmación no tenemos la pretensión de excluir el sistema inmune como factor etiológico de la preeclampsia, si bien tenemos la intención de exponer que futuras investigaciones son necesarias para poder comprobar su participación en la etiología de la preeclampsia.

En conclusión, este estudio no determinó alteraciones de citoquinas plasmáticas previo a los síntomas de la preeclampsia, sin embargo apunta a una posible participación de TGF- $\beta$ 1 en la fisiopatología sus manifestaciones clínicas. Estudios futuros son necesarios para una mejor

comprensión del rol que cumple el sistema inmune en la etiología y fisiopatología de la preeclampsia.

## Referencias

1. Abraham; V.M.; Kim; Y.M.; Straszewski; S.L.; Romero; R. and Mor; G. “Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy”. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2004; 51: 275–282.
2. Adams; K.M.; Lynn; S.M.; Guthrie; K.A. and Atkinson; M.W. “Interleukin-18 in the plasma of women with preeclampsia”. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188 (5):1234-1237.
3. Akolekar, R.; Syngelaki, A.; Poon, L.; Wright, D. and Nicolaides K.H. “Competing Risks Model in Early Screening for Preeclampsia by Biophysical and Biochemical Markers”. *Fetal Diagn. Ther.* 2013; 33: 8–15.
4. Amash; A.; Holcberg; G.; Sapir; O. and Huleihel; M. “Placental secretion of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in preeclampsia: effect of magnesium sulfate”. *J. Interferon Cytokine Res.* 2012; 32 (9):432-41.
5. Amash; A.; Holcberg; G.; Sheiner; E. and Huleihel; M. “Magnesium sulfate normalizes placental interleukin-6 secretion in preeclampsia”. *Interferon Cytokine Res.* 2010; 30(9):683-690.
6. Amash, A.; Huleihel, M.; Eyal, S.; Maor, E.; Myatt, L. and Holcberg, G. “ The expression of Interleukin-15 and Interleukin-18 by Human term placenta is not affected by lipopolysaccharide” *Eur Cytokine Netw.* 2007; 18(4):188-194.
7. Arriaga-Pizano, L.; Jimenez-Zamudio, L.; Vadillo-Ortega, F.; Martinez-Flores, A.; Herrerias-Canedo, T.; Hernandez-Guerrero, C. “The predominant TH1 cytokine

- profile in maternal plasma of preeclamptic women is not reflected in the chorionic and fetal compartments”. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 2005; 12: 335–342.
8. Ashkar; A.; Di Santo; J. and Croy; B. “Interferon- $\gamma$  contributes to initiation of uterine vascular modification; decidual integrity in uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy”. *J. Exp Med.* 2000; 17: 259-269.
  9. Ashkar; A. and Croy; B. “Function of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy”. *Immunology.* 2001; 13: 235-241.
  10. Banerjee, S.; Smallwood, A.; Moorhead, J.; Chambers, A.E.; Papageorghiou, A.; Campbell, S. and Nicolaides, K. “Placental expression of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and its receptor IFN- $\gamma$  R2 fail to switch from early hypoxic to late normotensive development in preeclampsia”. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90: 944–952.
  11. Barra, S.; Cachulo, M.; Providência, R. and Marques, A.L. “Hypertension in pregnancy: The current state of the art”. *Rev Port Cardiol.* 2012; 31(6):425-432.
  12. Bazer, F.W.; Spencer, T.E. and Johnson, G.A. “Interferons and uterine receptivity.” *Semin Reprod Med.* 2009 ; 27 (1): 90-102.
  13. Benian, A.; Madazli, R.; Aksu, F.; Uzun, H. and Aydin, S. “Plasma and placental levels of interleukin-10, transforming growth factor-beta1 and epithelial-cadherin in preeclampsia”. *Obstet. Gynecol.* 2002; 100 (2): 327-331.
  14. Bergqvist; A.; Nejaty; H.; Froysa; B.; Bruse; C.; Carlberg; M.; Sjöblom; P. and Sörder; O. “Production of interleukins 1beta; 6 and 8 and tumor necrosis factor alpha in separated and cultured endometrial and endometriotic stromal and epithelial cells”. *Gynecol Obstet Invest.* 2000; 50:1–6.

15. Boyle; J.J.; Weissberg; P.L. and Bennett; M.R. “Tumor necrosis factor-alpha promotes macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis by direct and autocrine mechanisms”. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1553–1558.
16. Brogin Moreli, J.; Cirino Ruocco, A.M.; Vernini J.M.; Rudge, M.V. and Calderon I.M. “Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Pregnancy: Aspects of Interest in Clinical Obstetrics”. *International Scholarly Research Network ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2011; Volume 2012; Article ID 230742; 5 pages.  
Review article.
17. Cackovic; M.; Buhimschi; C.; Zhao; B.; Funai; E.; Norwitz; E.; Kuczynsk; E.; Lockwood; C. and Buhimschi; I. “Fractional Excretion of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Women With Severe Preeclampsia”. *Obstet Gynecol.* 2008; 112 (1): 93–100.
18. Cai B, Zhang J, Zhang M, Li L, Feng W, An Z, Wang L.”Micro-inflammation Characterized by Disturbed Treg/Teff Balance with Increasing sIL-2R in Patients with Type 2Diabetes”. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2013;121(4): 214-219
19. Carr, D.B.; Epplein, M.; Johnson C.O.; Easterling, T.R. and Critchlow, C.W. “A sister’s risk: Family history as a prediction of preeclampsia”. *Am. F. Obstet. Gynecol.* 2005; 193: 965-972.
20. Chandrasekar B.; Colston, J.T.; de la Rosa, S.D.; Rao P.P. and Freeman, G.L.. “TNF- $\alpha$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce IL-18 and IL-18R $\beta$  expression in cardiomyocytes via NF- $\kappa$ B activation”. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2003; 303 (4):1152–1158.

21. Chen, H.L.; Yang, Y.P.; Hu, X.L.; Yelavarthi, K.K.; Fishback, J.L. and Hunt, J.S. “Tumor necrosis factor alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation”. *Am J Pathol.* 1991; 139:327–335.
22. Clavero J.; Botella J. *Tratado de Ginecología*, 14<sup>o</sup> edición, Editorial Díaz de Santos, 1993.
23. Conrad, K.P.; Miles, T.M. and Benyo, D.F. “Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia”. *Am J Reprod Immunol.* 1998; 40:102–111.
24. Cua, D.J. and Kastelein, R.A. “TGF- $\beta$ , a ‘double agent’ in the immune pathology war”. *Nature Immunology.* 2006; 7(6): 557-559.
25. Curry, A.E.; Vogel, I.; Skogstrand, K.; Drews, C.; Schendel, D.E.; Flanders, W.D.; Hougaard, D.M. and Thorsen, P. “Maternal plasma cytokines in early and mid gestation of normal human pregnancy and their association with maternal factors”. *J. Reproductive Immunol.* 2008; 77: 152-160.
26. Darmochwal-Kolarz, D.; Kludka-Sternik, M.; Tabarkiewicz, J.; Kolarz, B.; Rolinski, J.; Leszczynska-Gorzela, B. and Oleszczuk, J. “The predominance of TH17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia”. *J. Reprod. Immunol.* 2012; 93(2):75-81.
27. Dekker, G. “The partner’s role in the etiology of preeclampsia”. *J. Reprod. Immunol.* 2002; 57: 203–215.
28. Dekker, G.A. and Sibai, B.M.; “The immunology of preeclampsia. *Semin. Perinatol.* 1999; 23: 24–33.
29. Dhillon, P.; Wallace, K.; Herse, F.; Scott, J.; Wallukat, G.; Heath, J.; Mosely J.; Martin, J.N.; Dechend, R. and LaMarca, B. IL-17-mediated oxidative stress is an important stimulator of AT1-AA and hypertension during pregnancy. *Am J Physiol*

- Regul Integr Comp Physiol. 2012; 303 (4): 353-358.
30. Djurovic, S.; Schjetlein, R.; Wisløff, F.; Haugen, G.; Husby, H. and Berg, K.  
“Plasma concentrations of Lp(a) lipoprotein and TGF-beta1 are altered  
in preeclampsia”. Clin. Genet. 1997; 52(5): 371-376.
31. Djurovic, S.; Clausen, T.; Wergeland, R.; Brosstad, F.; Berg, K. and Henriksen, T.  
“Absence of enhanced systemic inflammatory response at 18 weeks of gestation in  
women with subsequent pre-eclampsia”. BJOG. 2002;109(7): 759-764.
32. Enquobahrie, D.A.; Williams, M.A.; Qiu, C.; Woelk, G.B. and Mahomed, K.  
“Maternal plasma transforming growth factor-beta1 concentrations in preeclamptic  
and normotensive pregnant Zimbabwean women”. J. Matern. Fetal Neonatal  
Med. 2005; 17(5): 343-348.
33. Erlebacher, A. “Immunology of the maternal-fetal interface.”Annu Rev Immunol.  
2013; 31: 387-411. (a)
34. Erlebacher, A. “Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus”.  
Nature Reviews. 2013; 13: 23-33. (b)
35. Fallon, P.G.; Jolin, H.E.; Smith, P.; Emson, C.L.; Townsend, M.J.; Fallon, R.;  
Smith, P. and McKenzie, A.N. “IL-4 induces characteristic T<sub>H</sub>2 responses even in  
the combined absence of IL-5, IL-9 and IL-13”. Immunity. 2002; 17: 7– 17.
36. Feizollahzadeh, S.; Taheripannah, R.; Khani, M. and Farokhi, B. “Promoter region  
polymorphisms in the transforming growth factor beta -1 (TGF-β1) gene and serum  
TGF-β1 concentration in preeclámptico and control Iranian women”. J. Reproductive  
Immunology. 2012; 94: 216-221.
37. Freeman, D.J.; McManus, F.; Brown E.A.; Cherry L.; Norrie J.; Ramsay J.E.;  
Clark, P.; Walker, I.D.; Sattar, N.; Greer, I.A. “Short- and Long-Term Changes in

- Plasma Inflammatory Markers Associated With Preeclampsia”. *Hypertension*. 2004; 44: 708-714.
38. Fukushima, K.; Miyamoto, S.; Komatsu, H.; Tsukimori, K.; Kobayashi, H.; Seki, H.; Takeda, S. and Nakano H. “TNFalpha-induced apoptosis and integrin switching in human extravillous trophoblast cell line”. *Biol Reprod*. 2003; 68:1771–1778.
39. Golightly, E.; Jabbour, H.N. and Norman, J.E. “Endocrine immune interactions in human parturition”. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011; 335 (1): 52–59.
40. Graham, C.H.; Connelly, I.; MacDougall, J.R.; Kerbel, R.S.; Stetler-Stevenson, W.G.; Lala, P.K.” Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta”. *Exp. Cell Res*. 1994; 214(1): 93-99.
41. Gross, K.L. and Cidlowski, J.A. “Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair”. *Trends Endocrinol Metab*. 2008; 19(9): 331–339.
42. Hahn, S.; Gupta, A.K.; Troeger, C.; Rusterholz, C. and Holzgreve, W. “Disturbances in placental immunology: ready for therapeutic interventions?” *Springer Semin. Immunopathol*. 2006; 27: 477–493.
43. Haider S. and Knöfler, M. “Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium”. *Placenta*. 2009;30(2):111-23.
44. Hammer A. “Immunological regulation of trophoblast invasion.” *J. Reproductive Immunol*. 2011; 90: 21-28.
45. Hanna, J.; Goldman-Wohl, D.; Hamani, Y.; Avraham, I.; Greenfield, C.; Natanson-Yaron, S.; Prus, D.; Cohen-Daniel, L.; Arnon, T.I.; Manaster, I.; Gazit, R.; Yutkin, V.; Benharroch, D.; Porgador, A.; Keshet, E.; Yagel, S. and Mandelboim, O.

- “Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface”. *Nat Med.* 2006; 12:1065–1074.
46. Hanna, N.; Hanna, I.; Hleb, M.; Wagner, E.; Dougherty, J.; Balkundi, D.; Padbury, J. and Sharma, S. “Gestational Age-Dependent Expression of IL-10 and Its Receptor in Human Placental Tissues and Isolated Cytotrophoblasts”. *The Journal of Immunology.* 2000; 164 (11): 5721-5728.
47. Hennessy, A.; Orange, S.; Willis, N.; Painter, D.M.; Child, A.; Horvath, J.S. “Transforming growth factor-beta 1 does not relate to hypertension in pre-eclampsia”. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2002, 29(11): 968-971.
48. Houser, B.L. “Decidual Macrophages and their roles at the maternal-fetal interface”. *Yale Journal of Biology and Medicine.* 2012; 85: 105-118.
49. Hunt, J.S.; Chen, H.L.; Hu, X.L. and Tabibzadeh, S. “Tumor necrosis factor-alpha messenger ribonucleic acid and protein in human endometrium”. *Biol Reprod.* 1992; 47: 141–147.
50. Huang, H.Y. “The Cytokine Network during Embryo Implantation”. *Chang Gung Med J.* 2006; 29:25-36.
51. Huang, X.; Huang, H.; Dong, M.; Yao, Q. and Wang, H. “Serum and placental interleukin-18 are elevated in preeclampsia”. *J. Reproductive Immunol.* 2005; 65: 77-87.
52. Huppertz, B.; Kingdom, J.; Caniggia, I.; Desoye, G.; Black, S.; Korr, H. and Kaufmann, P. “Hypoxia favours necrotic *versus* apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation”. *Placenta.* 2003; 24: 181–190.
53. Ida, A.; Tsuji, Y.; Muranaka, J.; Kanazawa, R.; Nakata, Y.; Adachi, S.; Okamura, H. and Koyama, K. “IL-18 in pregnancy; the elevation of IL-18 in maternal

- peripheral blood during labour and complicated pregnancies”. *Journal of Reproductive Immunology*. 2000; 47: 65-74.
54. Ilhan, N.; Ilhan, N.; Simsek, M. “The changes of trace elements, malondialdehyde levels and superoxide dismutase activities in pregnancy with or without preeclampsia”. *Clinical Biochemistry* Volume 35, Issue 5, July 2002, Pages 393–397.
55. Juch, H.; Blaschitz, A.; Dohr, G. and Hutter, H.. “HLA class I expression in the human placenta”. *Wien Med Wochenschr*. 2012; 162(9–10): 196–200.
56. Jokh, P.P.; King, A.; Sharkey, A.M.; Smith, S.K. and Loke, Y.W. “Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction”. *J. Immunol*. 1994; 153: 4427–4435.
57. Jonsson, Y.; Rubèr, M. Matthiesen, L.; Berg, G.; Nieminen, K.; Sharma, S.; Ernerudh, J. and Ekerfelt, C. “Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies”. *Journal of Reproductive Immunology*. 2006; 70: 83–91.
58. Jovanović, M.; Stefanoska, I.; Radojčić, L. and Vićovac, L. “Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1”. *Reproduction*. 2010; 139: 789–798.
59. Kalkunte, S.; Nevers, T.; Norris, W.E. and Sharma, S. “Vascular IL-10: a protective role in preeclampsia.” *J Reprod Immunol*. 2011; 88(2): 165-169.
60. Kang, L.; Chen, C.H.; Yu, C.H.; Chang, C.H.; Chang, F.M. “Interleukin-1 $\beta$  gene is not associated with preeclampsia in Taiwanese”. *Taiwan J. Obstet. Gynecol*. 2012;

51(2): 240-244.

61. Klonoff-Cohen, H.S.; Savitz, D.A.; Cefalo, R.C. and McCann, M.F. “An epidemiologic study of contraception and preeclampsia”. *JAMA*. 1989; 262: 3143–3147.
62. Kronborg, C.S.; Gjedsted, J.; Vittinghus, E.; Hansen, T.K.; Allen, J. and Knudsen, U.B. “Longitudinal measurement of cytokines in pre-eclamptic and normotensive pregnancies” *Acta Obstet. Gynecol. Scand*. 2011; 90 (7): 791-796.
63. Kudo, Y.; Boyd, C.A.; Sargent, I.L. and Redman, C.W. “Decreased tryptophan catabolism by placental indoleamine 2;3-dioxygenase in preeclampsia”. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2003; 188:719–726.
64. Lafontaine, L.; Chaudhry, P.; Lafleur, M.; Van Themsche, C.; Soares, M. and Asselin, E. “Transforming Growth Factor Beta regulates proliferation and invasion of rat placental cells lines”. *Biology of reproduction*. 2011; 84: 553-559.
65. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. “Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases”. *Biol Reprod*. 2005; 73(2):374-81.
66. Laresgoiti-Servitje, E.; Gómez-López N. and Olson, D.M. “An immunological insight into the origins of pre-eclampsia”. *Human Reproduction Update*. 2010; 16 (5): 510–524.
67. Lédée, N.; Petitbarat, M.; Rahmati, M.; Dubanchet, S.; Chaouat, G.; Sandra, O.; Perrier-d’Hauterive, S.; Munaut, C. and Foidart, J.M. “New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side”. *Journal of Reproductive Immunology*. 2011; 88(2): 118-123.

68. Leisser, C.; Saleh, L.; Haider, S.; Husslein, H.; Sonderegger, S. and Knofler, M. “Tumour necrosis factor-alpha impairs chorionic gonadotrophin beta-subunit expression and cell fusion of human villous cytotrophoblast”. *Mol. Hum. Reprod.* 2006; 12:601–609.
69. Lee, S.K.; Kim, J.Y.; Hur, S.E.; Kim, C.J.; Na, B.J.; Lee, M.; Gilman-Sachs, A. and Kwak-Kim, J. “An imbalance in interleukin-17 producing T and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in women with idiopathic recurrent pregnancy loss”. *Hum. Reprod.* 2011; 226 (11): 2964-2671.
70. Letterio, J.J. and Roberts, A.B. “Regulation of immune responses by TGF- $\beta$ ” *Annu. Rev. Immunol.* 1998. 16:137–161.
71. Li, W.; Yamamoto, H.; Kubo, S. and Okamura, H. “ Modulation of innate immunity by IL-18”. *Journal of Reproductive Immunol.* 2009; 83: 101-105.
72. Lin, Y.; Ren, L.; Wang, W.; Di, J.; Zeng, S. and Saito, S. “Effect of TLR3 and TLR7 activation in uterine NK cells from non-obese diabetic (NOD) mice”. *Reprod. Immunol.* 2009; 82:12–23.
73. Luo, S.; Yu, H.; Wu, D. and Peng, C. “Transforming growth factor-beta1 inhibits steroidogenesis in human trophoblast cells”. *Molecular Human Reproduction.* 2002; 8: 318–325.
74. Lygnos M.C.; Pappa K.I. ; Papadaki, H.A. ; Relakis, C.; Koumantakis, E.; Anagnostou N.P. and Eliopoulos, G.D. “Changes in Maternal Plasma Levels of VEGF; bFGF; TGF-,ET-1 and sKL During Uncomplicated Pregnancy”. *Hypertensive Pregnancy and Gestational Diabetes*”. *In vivo.* 2006; 20: 157-164.
75. Madazli, R.; Aydin, S.; Uludag, S.; Vildan, O. and Tolun, N. “Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and

- their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels”. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2003; 82(9): 797-802.
76. Michel A. Makhoul, Hyagriv N. Simhan. “Effect of tocolytics on interleukin-8 production by human amniotic and decidual cells”. *Journal of Reproductive Immunology.* 2006; 69: 1–7.
77. Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MM. Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2003; 49:308–318.
78. Mano, Y.; Kotani, T.; Shibata, K.; Matsumura, H.; Tsuda, H.; Sumigama, S.; Yamamoto, E.; Iwase, A.; Senga, T. and Kikkawa F.. “The loss of endoglin promotes the invasion of extravillous trophoblasts”. *Endocrinology.* 2011; 152 (11): 4386-4394.
79. Matsumoto, S.; Tsuji-Takayama, K.; Aizawa, Y.; Koide, K.; Takeuchi, M.; Ohta, T. and Kurimoto, M. “Interleukin-18 activates NF-kappa B in murine T helper type 1 cells”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 234(2): 454-457.
80. Martínez-García, E.A.; Chavez-Robles, B.; Sanchez-Hernandez, P.E.; Nuñez-Atahualpa, L.; Martín-Maquez, B.T.; Muñoz-Gomez. A.; Gonzalez-Lopez, L.; Gamez-Nava, J.I.; Salazar-Paramo, M.; Davalos-Rodriguez, I.; Petri, M.H.; Zuñiga-Tamayo, D.; Vargas-Ramirez, R.; Vazquez-Del Mercado, M. “IL-17 Increased in the Third Trimester in Healthy Women with Term Labor”. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2010. Short citation.
81. Marzi, M.; Vigano, A.; Trabattoni. D.; Villa, M.L.; Salvaggio, A.; Clereci, E. and Clereci M. “Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in

- physiologic and pathologic human pregnancy”. *Clin Exp Immunol.* 1996; 106: 127–33.
82. Minyue Dong; Jing He; Zhengping Wang; Xing Xie and Hanzhi Wang. “Placental imbalance of TH1- and TH2-type cytokines in preeclampsia”. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2005; 84: 788-793.
83. Miyazaki, S.; Tsuda, H.; Sakai, M.; Hori, S.; Sasaki, Y.; Futatani, T.; Miyawaki, T. and Saito, S. “Predominance of TH2-promoting dendritic cells in early human pregnancy deciduas”. *J. Leukoc. Biol.* 2003; 74:514–522.
84. Molvarec, A.; Szarka, A.; Walentin, S.; Beko, G.; Karádi, I.; Prohászka, Z. and Rigó, J. Jr. “Serum leptin levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in normal pregnancy and preeclampsia”. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011; 9:124.
85. Monte, S. “Biochemical markers for prediction of preeclampsia: review of the literature”. *Journal of prenatal Medicine.* 2011; 5(3) 69-77.
86. Morrish, D.W.; Bhardwaj, D. and Paras, M.T. “Transforming growth factor beta 1 inhibits placental differentiation and human chorionic gonadotropin and human placental lactogen secretion”. *Endocrinology.* 1991; 129: 22–26.
87. Mukaida N.; Harada, A.; Matsushima, K. “Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1); chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions”. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998; 9: 9–23.
88. Muñoz-Durango, N.; Barake, M.F.; Letelier, N.A.; Campino, C., Fardella, C.E. and Kalergis, A.M. ”Immune System Alterations by Aldosterone During Hypertension: From Clinical Observations to Genomic and Non-Genomic

- Mechanisms Leading to Vascular Damage”. *Curr Mol Med.* 2013 Apr 12. [Epub ahead of print]
89. Murphy, S.P.; Tayade, C.; Ashkar, A.A.; Hatta, K.; Zhang J. and Croy B.A. Interferon Gamma in Successful Pregnancies. *Biol. Reprod.* 2009; 80: 848–859.
90. Nakashima, A; Ito, M.; Yoneda, S.; Shiozaki, A.; Hidaka, T. and Saito, S. “Circulating and decidual T<sub>H</sub>17 cell levels in healthy pregnancy”. *Am J. Reprod. Immunol.* 2010; 63(2):104-9.
91. Naruse, K.; Innes, B.A.; Bulmer, J.N.; Robson S.C.; Searle R.F. and Lash G.E. “Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first trimester of human pregnancy”. *Journal of Reproductive Immunology.* 2010; 86: 148–150.
92. Oliveira, L.G.; Lash, G.E.; Murray-Dunning, C. ; Bulmer, J.N. ; Innes, B.A. ; Searle, R.F.; Sass, N. and Robson, S.C. “Role of Interleukin 8 in Uterine Natural Killer Cell Regulation of Extravillous Trophoblast Cell Invasion”. *Placenta.* 2010; 31: 595–601
93. Oliveira, L.G.; Lash, G.E.; Otun, H.A.; Innes, B.A.; Naruse, K.; Searle, R.F.; Robson, S.C. and Bulmer, J.N. “IL-8 promotes trophoblast cell invasion *in vitro*”. *Reprod. Sci.* 2007; 14: 221A.
94. Parra, M.C.; Rodrigo R.; Barja P.; Bosco C.; Rencoret G., Sepulveda-Martinez A. and Quezada S. “Prediction of early and late pre-eclampsia from maternal characteristics, uterine artery Doppler and markers of vasculogenesis during first trimester of pregnancy”. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41: 538–544.
95. Peraçoli, M.T.; Menegon, F.T.; Borges, V.T.; Costa R.A.dA.; Thomazini-Santos, I.A.; Peraçoli, J.C. “Platelet aggregation and TGF-beta (1) plasma levels in pregnant

- women with preeclampsia”. *J. Reprod. Immunol.* 2008; 79 (1): 79-84.
96. Plevyak M, Hanna N, Mayer S, Murphy S, Pinar H, Fast L, Ekerfelt C, Ernerudh J, Berg G, Matthiesen L, Sharma S. Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: a lack of correlation with the decidual immune cell profile. *Am J Reprod Immunol.* 2002; 47:242–250.
97. Polettini, J.; Vieira, E.P.; Santos, M.P.; Peraçoli, J.C.; Witkin, S.S. and Silva M.G. “Interleukin 18 messenger RNA and Pro-IL-18 protein expression in Chorioamniotic membranes from pregnant women with preterm prelabour rupture of membranes”. *European J Obste Gynecol and Reprod Biology.* 2012; 161:134-139.
98. Pongcharoen, S.; Somran, J.; Sritippayawan, S.; Niumsup, P.; Chanchan, P.; Butkhamchot, P.; Tatiwat, P.; Kunngurn, S. and Searle, R.F. “Interleukin-17 expression in the human placenta”. *Placenta.* 2007; 28: 59–63.
99. Prins, J.R.; Faas, M.M. ; Melgert, B.N.; Huitema, S.; Timmer, A.; Hylkema, M.N. and Erwich, J.J. “Altered expression of immune-associated genes in first-trimester human decidua of pregnancies later complicated with hypertension or fetal growth restriction”. *Placenta.* 2012; 33: 453–455.
100. Prins, J.R.; Gomez-Lopez, N. and Robertson, S.A. “Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders”. *Journal of Reproductive Immunology.* 2012; 95 (1–2): 1–14.
101. Raghupathy, R.; Makhseed, M.; Azizieh, F.; Hassan, N.; Al-Azemi, M.; Al-Shamali, E. “Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions”. *Cell Immunol.* 1999; 196: 122–130.
102. Raghupathy R. “Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm”. *Semin Immunol.* 2001;13(4): 219-227.

103. Robillard, P.Y.; Hulsey, T.C.; Alexander, G.R.; Keenan, A.; de Caunes, F. and Papiernik, E. "Paternity patterns and risk of preeclampsia in the last pregnancy in multipara". *J. Reprod. Immunol.* 1993; 24: 1–12.
104. Robillard, P.Y.; Hulsey, T.C.; Perianin, J.; Janky, E.; Miri, E.H. and Papiernik, E. "Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception". *Lancet.* 1994; 344: 973–975.
105. Roland, L.; Gagné, A.; Bélanger, M.; Boutet, M.; Julien, P. and Bilodeau, J. "Plasma interleukin-18 (IL-18) levels are correlated with antioxidant vitamin coenzyme Q10 in preeclampsia" *Acta Obstetricia et Gynecologica.* 2010; 89: 360–366.
106. Rochelson, B.; Dowling, O.; Schwartz, N. and Metz C.N. "Magnesium sulfate suppresses inflammatory responses by human umbilical vein endothelial cells (HuVECs) through the NF $\kappa$ B pathway". *Journal of Reproductive Immunology* 2007; 73: 101–107
107. Rowe, J.H.; Ertelt, J.M.; Xin, L. and Way, S.S. "Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen". *Nature.* 2012; 490: 102-107.
108. Saito S; Nakashima A; Ito M; Shima T. "Clinical implication of recent advances in our understanding of IL-17 and reproductive immunology". *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2011; 7 (5): 649-657
109. Saito, S.; Nakashima, A.; Shima, T. and Ito, M. "Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy". *American Journal of Reproductive Immunology.* 2010; 63: 601–610.
110. Saito, S. and Sakai, M. "Th1/Th2 balance in preeclampsia". *J. Reprod. Immunol.* 2003; 59: 161–173.

- 111.Saito, S.; Umekage, H.; Sakamoto, Y. Sakai, M.; Tanebe, K.; Sasaki, Y. and Morkawa, H. “Increased T-helper-1- type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia”. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1999; 41: 297–306.
- 112.Saito, S.; Kasahara, T.; Sakakura, S.; Umekage, H.; Harada, N. and Ichijo, M. “Detection and localization of interleukin-8 mRNA and protein in human placenta and decidual tissues”. *J. Reprod. Immunol.* 1994; 27(3): 161-172.
- 113.Sakai, M.; Shiozaki, A.; Sasaki, Y.; Yoneda, S. and Saito, S. “ The ratio of IL-18 to IL-12 secreted by peripheral blood mononuclear cells is increased in normal pregnant subjects and decreased in pre-eclamptic patients”. *J. Reproductive Immunol.* 2004; 61: 133- 143.
- 114.Salas, S.P. “What causes pre-eclampsia?. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 1999; 13(1): 41-57.
- 115.Santner-Nanan, B.; Peek, M.J.; Khanam, R.; Richarts, L.; Zhu, E. St Groth, B.F. and Nanan, R. “Systemic Increase in the Ratio between Foxp3 and IL-17-Producing CD4\_ T Cells in Healthy Pregnancy but Not in Preeclampsia” *J. Immunol.* 2009; 183: 7023-7030.
- 116.Sasaki, Y.; Darmochwal-Kolarz, D.; Suzuki, D.; Sakai, M.; Ito, M.; Shima, T.; Shiozaki, A.; Rolinski, J. and Saito, S. “Proportion of peripheral blood and decidual CD4+ CD25bright regulatory T cells in pre-eclampsia”. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology.* 2007; 149: 139–145.
- 117.Schiessl, B. “Inflammatory response in Preeclampsia”. *Molecular Aspects of Medicine.* 2007; 28: 210-219.

- 118.Sharma, A.; Satyam, A.; Sharma J.B. “IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha; IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic; normotensive pregnant and healthy non-pregnant women”. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007; 58: 21–30
- 119.Skjaerven, R.; Wilcox, A.J. and Lie, R.T. “The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia”. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 33–38.
- 120.Song, Y.; Keelan, J. and France, J.T. “Activin-A stimulates; while transforming growth factor beta 1 inhibits; chorionic gonadotrophin production and aromatase activity in cultured human placental trophoblasts”. *Placenta.* 1996; 17: 603–610.
- 121.Steinman, R.M.; Hawiger, D. and Nussenzweig, M.C. “Tolerogenic dendritic cells”. *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 21: 685–711.
- 122.Sugimoto, J.; Romani, A.M.; Valentin-Torres, A.M.; Luciano, A.A.; Ramirez-Kitchen, C.M.; Funderburg, N.; Mesiano,S. and Bernstein, H.B. “Magnesium Decreases Inflammatory Cytokine Production: A Novel Innate Immunomodulatory Mechanism”. *The Journal of Immunology*, 2012, 188: 6338–6346
- 123.Szarka, A.; Rigo, J.J.; Lazar, L.; Beko, G. and Molvarec, A. “Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunology.* 2010; 11:59.
- 124.Tam Tam, H.B.; Dowling, O.; Xue, X.; Lewis, D.; Rochelson, B. and Metz C.N. “Magnesium sulfate ameliorates maternal and fetal inflammation in a rat model of maternal infection”. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011; 204: 364.e1-8.
- 125.Tang, M.; Taylor, H.S. and Tabibzadeh, S. “*In vivo* gene transfer of lefty leads to implantation failure in mice”. *Human Reproduction.* 2005; 20: 1772–1778.
- 126.Tarnowska-Madra, U.; Leibschang, J.; Kowalska, B.; Filipp, E.; Kozar, A.; Nimer, A. and Maciejewski, T. “Levels of immunoreactive cytokines in serum of women

- with preeclampsia or severe pregnancy hypertension”. *Ginekol Pol.* 2010; 81(3): 192-196.
127. Toldi, G.; Rigó, J.Jr; Stenczer, B.; Vásárhelyi, B.; Molvarec, A. “Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in pre-eclampsia”. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2011; 66(3): 223-229.
128. Trupin, L.S.; Simon, L.P.; Eskenazi, B. “Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas”. *Epidemiology.* 1996; 7: 240–244.
129. Voll, R.E.; Herrmann, M.; Roth, E.A.; Stach, C.; Kalden, J.R. and Girkontaite, I. “Immunosuppressive effects of apoptotic cells”. *Nature.* 1997; 390; 350–351.
130. Xuan, Y.H.; Choi, Y.L.; Shin Y.K.; Ahn G.H.; Kim, K.H.; Kim, W.J.; Lee, H.C. and Kim, S.H. “Expression of TGF- $\beta$  signaling proteins in normal placenta and gestational trophoblastic disease”. *Histol. Histopathol.* 2007; 22: 227-234.
131. Wang, J.; Wang, X.; Hussain, S.; Zheng, Y.; Sanjabi, S.; Ouaz, F. and Beg, A.A. “Distinct Roles of Different NF- $\kappa$ B Subunits in Regulating Inflammatory and T Cell Stimulatory Gene Expression in Dendritic Cells”. *The Journal of Immunology.* 2007; 178 (11): 6777-6788.
132. Yap, D.Y. and Lai, K.N. “The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus - from bench to bedside”. *Nephrology (Carlton).* 2013; 18(4): 243-255.
133. Yui, J.; Hemmings, D.; Garcia-Lloret, M. and Guilbert, L.J. “Expression of the human p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in primary villous trophoblasts and their role in cytotoxic signal transduction”. *Biol Reprod.* 1996; 55: 400–409.
134. Yoshino, O.; Osuga, Y.; Koga, K.; Tsutsumi, O.; Yano, T.; Fujii, T.; Kugu, K.; Mamoeda, M.; Fujiwara, T.; Tomita, K. and Taketani, Y. “ Evidence for the

- expression of interleukin-18, IL-18 receptor and IL-18 binding protein in the human endometrium” *Mol Hum Reprod.* 2001; 7: 649 – 654.
135. Young; B.C.; Levine; R.J. and Karumanchi; S.A. “Pathogenesis of Preeclampsia”. *Annual Review Pathol. Mech. Dis.* 2010; 5: 173-192.
136. Zhanga, S.; Lina, H.; Konga, S.; Wanga, S.; Wanga, H.; Wanga, H. and Armant, D.R. “Physiological and molecular determinants of embryo implantation”. *Molecular Aspects of Medicine* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.011>.
137. Zhao, M.R.; Qiu, W.; Li, Y.X; Zhang, Z.B.; Li, D. and Wang, Y. “Dual effect of transforming growth factor b1 on cell adhesion and invasion in human placenta trophoblast cells”. *Reproduction.* 2006; 132: 333–341.