

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



**“RELACIÓN ENTRE PERFILES LINFOCITARIOS TH1 Y TH17 EN SANGRE
PERIFÉRICA DE EMBARAZADAS ENTRE LAS 11 Y 14 SEMANAS DE GESTACIÓN Y
EL ÍNDICE DE PULSATILIDAD (IP) MEDIDO POR DOPPLER UTERINO”**

Cristina Andrea Rivera Arcos

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN INMUNOLOGIA

Director de Tesis: Prof. Dr.(a) Mercedes López Nitche, MD, PhD.

Director de Tesis: Prof. Dr.(a) Mauro Parra Cordero, MD, Director Departamento Obstetricia
y Ginecología, HCUCH

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

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

Cristina Andrea Rivera Arcos

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Inmunología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 6 de Noviembre del 2017.

PROF. DRA. MERCEDES LÓPEZ NITSCHKE, 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 CORDERO, 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. DRA. CARMEN ROMERO

PROF. DRA. CAROLINA VALCK

PROF. DRA. LILIAN SOTO

PRESIDENTE DE LA COMISION

DEDICATORIA

A María José, Carolina, Cristian, Roció, Manuel, Frida, Noam, Papá y Mamá

Por su incondicional apoyo y amor.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia que siempre me brindó su apoyo y me alentó en todo el proceso. Fabián Tempio por su tiempo y dedicación, estando presente desde mis primeros pasos por el laboratorio hasta la realización experimental de esta misma. Iván Flores y Felipe Falcón quienes me ayudaron en los problemas que se me presentaron tanto en lo profesional como en lo personal. A mi tutora Mercedes López que a pesar con su amplio conocimiento científico que me traspaso; su sencillez y calidad humana por la cual se caracteriza, hizo que tuviera un crecimiento personal de forma exponencial que siempre recordaré. A mi tutor Mauro Parra que me ha enseñado mucho más allá de lo académico durante este proceso. Y Finalmente a todo el personal técnico del laboratorio tanto de la Dra. López como del Dr. Salazar, que tendré que dejar en anonimato, sin embargo reconociendo la importancia de todos.

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	4
Abstract	6
Introducción	8
Anatomía del útero	8
Placentación Normal	9
Placenta como órgano inmune	10
Sistema inmune y remodelación vascular	15
Interferón gamma (IFN- γ)	16
Interleuquina-17 (IL-17A)	17
Interleuquina-10 (IL-10)	18
Factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β 1)	18
Factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α)	18
Placentación Anómala y Patología Hipóxica	19
Doppler Arterias uterinas como predictor de correcta remodelación vascular.	20
Hipótesis	23
Objetivo General	23
Objetivos específicos	23
Materiales y Métodos	24
Selección de pacientes	24
Número de pacientes	25
Doppler de circulación uterina.	25
Preparación y análisis de muestras de sangre para ensayos inmunológicos	26
Citometría de Flujo	26
Ensayo de ELISA	27
Análisis Estadístico	27
Resultados	29

Tabla 1.- Características de pacientes	30
Figura 1.- Estrategia de selección de las poblaciones linfocitarias para su análisis.	32
Figura 2.- Panel de expresión de citoquinas en linfocitos durante el embarazo de mujeres sanas	34
Figura 3.- Mujeres embarazadas con IP alterado presentan un aumento en el porcentaje de linfocitos productores de IFN- γ .	36
Figura 4.-Mujeres de 11 a 14 semanas de embarazo con IP alterado muestran un incremento plasmático de IL-18 y TGF- β 1.	38
Tabla 2.- Mujeres embarazadas con IP alterado que desarrollaron PE ó RCF	41
Tabla 3.- Mujeres embarazadas con IP normal que desarrollaron PE ó RCF	41
Discusión	42
Bibliografía	48
Anexo 1	57

Abreviaturas

β-HCG: Subunidad Beta de la Gonadotropina Coriónica Humana (Human Chorionic Gonadotropin Beta)

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

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

CD14: Cúmulo de Diferenciación 14. Correceptor de LPS.

CD16: Cúmulo de Diferenciación 16. Receptor de porción Fc de Inmunoglobulinas.

CD56: Cúmulo de Diferenciación 56. Glicoproteína de membrana involucrada en la función de adhesión celular.

CD163: Cúmulo de Diferenciación 163. Receptor de tipo scavenger

CD209: Cúmulo de Diferenciación 209. Receptor de reconocimiento de glicoproteínas con alto contenido de manose. También conocido como DC-SIGN (Dendritic Cell Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin)

CSF-1: Factor estimulador de colonias 1 (Colony stimulating factor 1)

DC: Célula Dendrítica (Dendritic Cells)

dNK: Células Asesinas Naturales deciduales (decidual Natural Killer cells)

eNK: Células Asesinas Naturales endometriales (endometrial Natural Killer cells)

EVT: Trofoblasto extravellositario.

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

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)

HLA: Complejo Mayor de Histocompatibilidad en Humanos (Human Leukocyte Antigen)

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

IFN- α : Interferon-alpha

IFN- γ : Interferon-gamma

IL: Interleuquina

IMC: Índice de Masa Corporal

IP: Índice de pulsatilidad

LPS: Lipopolisacárido

LT: Linfocitos T

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)

NK: Células Asesinas naturales (Natural Killer cells)

NKT: Células T Asesinas Naturales (Natural Killer T Cells)

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear cell)

PE: Preeclampsia

PGF: Factor de Crecimiento Placentario (Placental Growth Factor)

pNK: Células Asesinas Naturales Periféricas (peripheral Natural Killer cells)

RCF: Restricción de crecimiento fetal (Intrauterine Growth Restriction-IGR).

s-HLA: Pseudogen del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Humanos (Human Leukocyte Antigen Pseudogene)

TGF- β 1: Factor de transformación y crecimiento beta 1 (Transforming Growth Factor Beta 1)

T_H: Linfocitos T Helper (T Helper lymphocytes)

T_H1: Linfocitos T Helper tipo 1 (T Helper lymphocytes type 1)

T_H2: Linfocitos T Helper tipo 2 (T Helper lymphocytes type 2)

T_H17: Linfocitos T Helper tipo 17 (T Helper lymphocytes 17)

Treg: Linfocitos T reguladores (T regulatory lymphocytes)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral – α (Tumor Necrosis Factor- α)

VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)

VSMC: Células musculares lisas de las arterias espiraladas (Vascular smooth muscle cells)

MAdCAM-1: Molécula de adhesión celular en la dirección mucosa humana 1 (Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1)

MMP-2: Metaloproteinasa-2 (Matrix Metalloproteinase-2)

MMP-9: Metaloproteinasa-9 (Matrix Metalloproteinase-9)

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1

Resumen

El feto semi alogénico necesita coexistir con el sistema inmune materno durante todo el embarazo. Hasta la fecha no se conocen completamente los mecanismos de tolerancia materno-fetal; sin embargo, es consenso que alteraciones a este equilibrio, pueden desembocar en patologías placentarias como la preeclampsia y la restricción del crecimiento fetal. La remodelación vascular es el hito clave para que el feto pueda desarrollarse dentro del útero, y es regulado por citoquinas inflamatorias como IFN- γ y por células como las uNK. Se desconoce el papel de los linfocitos T en este proceso y se ha planteado que el desbalance de la respuesta inflamatoria en las primeras fases del embarazo podría relacionarse a una falla en la remodelación vascular. Basados en estos antecedentes, en este proyecto nos propusimos analizar si la alteración precoz de la resistencia vascular uterina durante el embarazo se relaciona con un desbalance en la relación de los perfiles linfocitarios T_H1 y T_H17, favoreciendo los perfiles proinflamatorios.

Para dilucidar esta propuesta, analizamos una población de 98 mujeres embarazadas sin evidencia de patologías maternas o fetales, inscritas para el cuidado prenatal en las Unidades de Medicina Materno-Fetal (Hospital Clínico Universidad de Chile y Hospital Clínico San Borja Arriarán), mediante la metodología de casos y controles. Se recolectó sangre periférica de las embarazadas en cada trimestre del embarazo y en el momento del parto. De las 98 embarazadas, 47 fueron controles con IP normal a las 11-14 semanas de embarazo y 51 fueron casos con IP alterado (>p95) a las 11-14 semanas. Se analizaron la frecuencia de las subpoblaciones T_H1/T_H17/CD4⁽⁻⁾IFN- γ ⁽⁺⁾ por citometría de flujo y las citoquinas IFN- γ , IL-4, IL-17A, IL-18 y TGF- β ₁ por ELISA. Ambos grupos fueron clínicamente monitorizados durante el embarazo y el parto.

Para obtener una línea base que nos permitiera evaluar el cambio de perfiles linfocitarios entre las mujeres embarazadas que presentan un IP normal y un IP alterado, evaluamos cómo se comportan estas subpoblaciones en embarazos fisiológicos. En el primer trimestre del embarazo normal observamos un aumento de la frecuencia de los perfiles linfocitarios T_H1 (P<0,05) y de linfocitos CD4⁽⁻⁾IFN- γ ⁽⁺⁾, (P<0,05) que disminuyen durante el 2° trimestre y se elevan nuevamente en el 3° trimestre y al momento del parto (P<0,01). Posteriormente, comparamos los perfiles linfocitarios y citoquinas plasmáticas entre embarazadas con IP normal y alterado entre las 11-14 semanas. Observamos, un aumento del perfil linfocitario T_H1 (P<0,05), de la población CD4⁽⁻⁾IFN- γ ⁽⁺⁾ (P<0,01) y de la concentración plasmática de IL-18 (P<0,05) y TGF- β ₁ (P<0,01) en embarazos con IP alterado en comparación con embarazos con IP normal. Como esperábamos, aquellas pacientes con IP alterado que desarrollan preeclampsia, tienen un aumento en la frecuencia del perfil T_H1 (P<0,05) y de la concentración plasmática de IL-18 (P<0,01). Además, estas pacientes y aquellas que desarrollan restricción del crecimiento fetal muestran también un incremento significativo de la concentración plasmática de TGF- β ₁, P<0,01 para aquellas que desarrollaron preeclampsia y P<0,05 para las restricciones de crecimiento fetal, cabe destacar que el número de casos de patologías hipóxicas son pocos, por lo tanto no se pueden sacar conclusiones significativas.

Nuestros datos muestran que embarazadas con IP alterado presentan un aumento de perfiles linfocitarios $\text{IFN}\gamma^{(+)}$ y en las concentraciones de IL-18 y TGF- β 1 en el suero, cuando se comparan con embarazos con IP normal. Esto podría sugerir que la alteración precoz de la remodelación vascular, es debida al menos en parte, a un desbalance del sistema inmune hacia perfiles linfocitarios proinflamatorios. Adicionalmente, proponemos que existen dos grupos de pacientes que desarrollan preeclampsia. Uno de ellos, con IP precoz alterado y que se caracteriza por aumento en la frecuencia de las subpoblaciones T_{H1} , una alta concentración plasmática de IL-18 y elevaciones leves de TGF- β 1. Por el contrario, mujeres preeclampticas con IP precoz normal tienen un perfil T_{H1} normal, una leve alza en la concentración de IL-18 y elevaciones leves de TGF- β 1. Nuestros datos abren nuevas líneas de investigación que deberán ser corroboradas en estudios con mayor número de pacientes.

Abstract

The semi-allogenic fetus needs to coexist with the maternal immune system throughout pregnancy. To date, the mechanisms of maternal-fetal tolerance are not completely known; however, it is a consensus that alterations to this balance can lead to placental pathologies such as preeclampsia and fetal growth restriction. Vascular remodeling is the key milestone for the fetus to develop within the uterus, and is regulated by inflammatory cytokines such as IFN- γ and by cells such as uNK. The role of T lymphocytes in this process is unknown and it has been suggested that the imbalance of the inflammatory response in the early stages of pregnancy could be related to a failure in vascular remodeling. Based on these antecedents, in this project we aimed to analyze whether the early alteration of uterine vascular resistance during pregnancy is related to an imbalance in the relationship of the T_H1 and T_H17 lymphocyte profiles, favoring proinflammatory profiles.

To elucidate this proposal, we analyzed a population of 98 pregnant women without evidence of maternal or fetal pathologies, registered for prenatal care in the Maternal-Fetal Medicine Units (Hospital Clínico Universidad de Chile and Hospital Clínico San Borja Arriarán), using the methodology of cases and controls. Peripheral blood was collected from pregnant women in each trimester of pregnancy and at the time of delivery. Of the 98 pregnant women, 47 were controls with normal IP at 11-14 weeks of pregnancy and 51 were cases with altered IP (> p95) at 11-14 weeks. The frequency of subpopulations T_H1/T_H2/T_H17/CD4⁽⁻⁾IFN- γ ⁽⁺⁾ were analyzed by flow cytometry and the cytokines IFN- γ , IL-4, IL-17A IL-18 and TGF- β 1 by ELISA . Both groups were clinically monitored during pregnancy and delivery.

To obtain a baseline that would allow us to evaluate the change in lymphocyte profiles among pregnant women who have a normal IP and an altered IP, we evaluate how these subpopulations behave in physiological pregnancies. In the first trimester of normal pregnancy we observed an increase in the frequency of lymphocyte profiles T_H1 (P <0.05) and lymphocytes CD4⁽⁻⁾IFN- γ ⁽⁺⁾, (P <0.05) that decrease during the 2nd quarter and rise again in the 3rd quarter and at the time of delivery (P <0.01). Subsequently, we compared the lymphocyte profiles and plasma cytokines between pregnant women with normal IP and altered between 11-14 weeks. We observed an increase in the T_H1 lymphocyte profile (P <0.05), in the CD4⁽⁻⁾IFN- γ ⁽⁺⁾ population (P <0.01) and in the plasma concentration of IL-18 (P <0, 05) and TGF- β 1 (P <0.01) in pregnancies with impaired IP compared to pregnancies with normal IP. As expected, those patients with altered IP who develop preeclampsia have an increase in the frequency of the T_H1 profile (P <0.05) and the plasma concentration of IL-18 (P <0.01). In addition, these patients and those who develop fetal growth restriction also show a significant increase in the plasma concentration of TGF- β 1, P <0.01 for those who developed preeclampsia and P <0.05 for fetal growth restrictions. It should be noted that the number of cases of hypoxic pathologies are few, therefore no significant conclusions can be draw.

Our data show that pregnant women with altered IP have an increase in lymphocyte profiles IFN γ ⁽⁺⁾ and in the concentrations of IL-18 and TGF- β 1 in serum, when compared with pregnancies with normal IP. This could suggest that the early alteration of vascular remodeling is due, at least in part,

to an imbalance of the immune system towards pro inflammatory lymphocyte profiles. Additionally, we propose that there are two groups of patients that develop preeclampsia. One of them, with precocious IP altered and characterized by increased frequency of T_H1 subpopulations, a high plasma concentration of IL-18 and mild elevations of TGF-β1. By contrast, preeclamptic women with normal early IP have a normal T_H1 profile, a slight increase in the concentration of IL-18 and mild elevations of TGF-B1. Our data open new lines of research that should be corroborated in studies with greater number of patients.

Introducción

Durante el embarazo se requiere de la acción coordinada y regulada del sistema inmune tanto innato como adaptativo para que el producto de la concepción semi-alogénica no sea rechazado por los tejidos maternos [1-2]. Para que la gestación tenga éxito, se necesita la interacción de múltiples factores, como son: hormonas, citoquinas y factores reguladores de la actividad de los linfocitos T y de las células *Natural Killer*, que actúan fundamentalmente en el ámbito local [1]. La correcta interacción de estos elementos, determinará que la madre desarrolle tolerancia hacia el feto y una adecuada placentación, por el contrario, una desregulación de estos mecanismos puede generar patologías, como son: aborto recurrente, parto prematuro, preeclampsia (PE) o restricción del crecimiento fetal (RCF) [1].

Anatomía del útero

El útero, el cual es el órgano de la nidación o gestación, consta de tres capas: mucosa o endometrio; muscular o miometrio y serosa o perimetrio. La capa interna que cubre el cuello uterino se denomina endocervix y posee glándulas cervicales que producen un moco cervical viscoso. Durante la menstruación se desprenden los 2/3 más internos del endometrio, quedando sólo la capa basal que va a regenerar una nueva capa de endometrio para volver a descamar en el próximo ciclo o transformarse en decidua y anidar el producto de la concepción. El miometrio es un músculo liso que se organiza en capas externa e interna longitudinal, que cubre completamente al útero hasta el cuello uterino y una capa media plexiforme. Esta capa al contraerse es capaz de cerrar flujo de los vasos uterinos y actuar como verdaderas pinzas hemostáticas en el momento de la menstruación y en el parto, después de la expulsión de la placenta. Y finalmente el perimetrio corresponde al peritoneo que cubre al útero en todas sus caras. [3-4].

El útero es irrigado principalmente por la arteria uterina (izquierda y derecha), rama de la Iliaca interna y por la arteria ovárica, rama de la Aorta. Ambas arterias se anastomosan en el fondo uterino dando origen a las arterias arcuatas, que a su vez generan las arterias radiales que penetran en el tercio externo del miometrio y finalizan en las arterias espiraladas que toman contacto con el espacio intervelloso [5].

Placentación Normal

El desarrollo placentario se inicia con la invasión del blastocito al endometrio uterino, entre el 5° a 7° día después de la fecundación. Las células de la superficie del blastocito se denominan trofoblasto y darán origen a la placenta, mientras que las células internas originaran al feto [6,7]. Las células trofoblásticas se diferencian en una capa interna, conocida como citotrofoblasto y una capa externa llamada sincitiotrofoblasto, masa protoplasmática multinucleada sin límites celulares, que posee microvellosidades en su superficie y gran capacidad histolítica, lo que implica un alto poder invasor. Algunas células del sincitiotrofoblasto, conocidas como trofoblasto extravelositario (EVT), tienen la capacidad de migrar y de producir una gran cantidad de enzimas proteolíticas capaces de destruir el epitelio endometrial y eliminar las células musculares lisas de las arterias espiraladas (VSMC), fenómeno conocido como remodelación vascular [8]. De esta forma se produce la pérdida de la capacidad de contracción de estas arterias; obteniendo un vaso en permanente dilatación, es decir, de alta capacitancia. De esta forma se establece una adecuada perfusión sanguínea de la placenta, facilitando el intercambio gaseoso y metabólico entre la circulación fetal y la materna. [8,9]

Para que ocurra la placentación se requiere que la mucosa uterina, es decir la capa interna del útero, sea transformada en un tejido altamente especializado, el cual se conoce como Decidua [9]. La Decidua recubre la cara interna del útero durante el embarazo y tiene como función tanto la protección de los tejidos maternos como la nutrición del embrión, además es el principal sitio de contacto entre el feto y madre. [10]. En el primer trimestre del embarazo entre un 30-40% de las células de la decidua corresponden a células inmunes,

distribuidas en la siguiente proporción: las células natural killer (NK) corresponden a un 70%, los macrófagos a un 20%, los linfocitos T (LT) a un 10% y un 2%, corresponde a células dendríticas (DC) [11,12,13], lo que indica el importante rol que el sistema inmune cumple en la placentación.

Placenta como órgano inmune

Para que el embarazo sea exitoso, la comunicación entre las células maternas y las células del trofoblasto fetal requieren de una regulación temporal estricta de la función inmune [14]. Se sabe que la implantación en etapas temprana se ve facilitada por procesos inflamatorios que son secundarios a la remodelación vascular, asegurando una adecuada invasión placentaria [15]. Sin embargo, para prevenir el rechazo del feto esta inflamación debe ser regulada. Como se mencionó anteriormente, en la decidua encontramos diversas células del sistema inmune, células claves para que el embarazo se lleve a término.

Una de estas poblaciones celulares son las *Natural Killer* deciduales (dNK), las cuales, poseen una morfología de linfocitos grandes granulares y se caracterizan por que expresan CD56^{bright} y no poseen CD16. Corresponden solamente al 10% del perfil de NK periféricas (pNK) [8]. El origen de las dNK es un debate hoy en día. Existe evidencia, tanto en modelos murinos como humanos, que las dNK podrían provenir de sangre periférica [8]. Estos estudios proponen que las NK CD56^{bright} CD16⁽⁻⁾ periféricas tienen la capacidad de infiltrarse en la capa basal de la decidua por medio de la expresión de L-selectina, la cual se une a MAdCAM-1 y VCAM-1 de la capa endotelial de las arterias espiraladas, produciendo la extravasación de estas células [8]. En contraste, otros estudios indican que las dNK se generan durante el proceso de decidualización, a partir de NK endometriales (eNK) [16]. La decidualización induciría la diferenciación terminal de las células eNK, a través de la secreción de Interleuquina-15 (IL-15) producida principalmente por células estromales de la mucosa decidual y en menor medida por macrófagos deciduales. Esta citoquina, produce la sobreexpresión de NKp30 y NKp44 en las eNK, dos receptores altamente expresados por las dNK [12]. Adicionalmente, se ha demostrado que la progesterona y la prostaglandina E2

aumentan la producción de IL-15 a partir de células estromales de la mucosa decidual [8]. Asimismo, en mujeres no embarazadas, las células eNK varían según su ciclo menstrual, durante la fase pre-ovulatoria las eNK son escasas, pequeñas y sin granulaciones, mientras que en el periodo post-ovulatorio proliferan, aumentan de tamaño y adquieren una granulación importante. Este cambio fenotípico coincide con la decidualización uterina durante el embarazo, por lo que eventualmente las eNK sufren un cambio de fenotipo final a dNK durante la decidualización [8].

Las dNK secretan una variedad de factores angiogénicos y citoquinas tales como angiopoyetina-1 y angiopoyetina-2, factor de crecimiento endotelial vascular-C, metaloproteinasa-2 (MMP-2), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias (CSF-1) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) [12].

Las funciones principales de las dNK, se relacionan principalmente con la remodelación vascular. También se ha visto que estas células expresan receptores inhibitorios de la citotoxicidad los cuales se activan cuando se unen a las moléculas de histocompatibilidad HLA-G del trofoblasto [13] favoreciendo así, la tolerancia materno-fetal.

En la decidua tenemos aproximadamente entre un 10-20% de LT CD3⁽⁺⁾ TCR $\alpha\beta$, de éstos un 30-40% son LT CD4⁽⁺⁾, un 45-75% corresponden a LT CD8⁽⁺⁾ y aproximadamente el 5% son LT reguladores CD25^{bright} FOXP3⁽⁺⁾ (Treg) [12]. Para que exista un embarazo exitoso debe existir un balance entre T_H1/T_H2, el cual estará fuertemente inclinado hacia la actividad T_H2 durante la segunda mitad del embarazo [13]. Las citoquinas de tipo *Helper* 1 (T_H1) impiden la invasión adecuada del trofoblasto en la decidua materna, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) estimula la apoptosis en las células del trofoblasto, el interferón gamma (IFN- γ) incrementa la muerte celular mediada por el TNF- α y la interleuquina 2 (IL-2) inhibe la decidualización. Por otra parte, las citoquinas de los LT helper 2 (T_H2), interleuquina 4 (IL-4) e interleuquina 10 (IL-10) estimulan el desarrollo e invasión del trofoblasto [12]. Paradójicamente, diversos estudios muestran un predominio de T_H1 durante el primer trimestre del embarazo [17], encontrándose entre un 5 a 30% de células T_H1, mientras que

los T_H2 representan sólo el 5% y los LT Helper 17 (T_H17) solo un 2%, expresado por su citoquina icono interleuquina 17 (IL-17) [17]. Durante el segundo trimestre del embarazo los linfocitos T_H2 son los que predominan hasta el final del embarazo, siendo las responsables de mantener el equilibrio inmunológico entre la madre y el feto [12]. Esta dicotomía de predominio del perfil T_H1 durante el primer trimestre, tiene relación con la remodelación vascular e implantación del embrión en la cavidad uterina, ya que para este fenómeno se requiere de la acción INF- γ secretado mayoritariamente por la dNK, pero de una forma altamente regulada [12].

Adicionalmente, diversos estudios avalan que la prevalencia de un perfil T_H1 sobre un perfil T_H2, durante el primer periodo del embarazo, se asocia a mayores tasas de reabsorciones fetales como también fallas en la implantación [21]. Adicionalmente, el aumento de citoquinas inflamatorias como TNF- α , IFN- γ y TGF- β 1 provoca la inhibición del crecimiento del trofoblasto *in vitro* [22]. Este fenómeno se asocia a patologías como Preeclampsia (hipertensión gestacional asociado a proteinuria) y Restricción del crecimiento [12].

Por el contrario, se ha comprobado que las citoquinas asociadas a una respuesta linfocitaria T_H2 contribuyen a la implantación del embrión, desarrollo de la placenta y supervivencia del feto hasta el término de la gestación [13]. Este predominio de los linfocitos T_H2 durante la segunda a parte de la gestación, crea un estado de tolerancia entre la madre y feto [13].

En la actualidad, la función de los linfocitos T deciduales es en gran parte desconocida. En modelos murinos deficientes en linfocitos T, se observa que no presentan alteraciones reproductivas [12]. Sin embargo, existen datos que apoyan el desarrollo de PE en modelos murinos que presentan menor frecuencia de Tregs deciduales [18,19]. Por otro lado, se ha observado en cortes histológicos de placentas del tercer trimestre, que la inadecuada infiltración de células T CD4⁽⁺⁾ y CD8⁽⁺⁾ produce tres patologías histológicas interrelacionadas: deciduitis crónica (que afecta a la decidua basal), corioamnionitis crónica (que afecta a la membrana corioamniótica) y villitis de etiología desconocida (afecta a los

vasos placentarios con la participación frecuente de tejido decidual cercano) [23]. Estas patologías se observan en aproximadamente entre el 10-20% de los embarazos clínicamente normales, pero son más frecuentes en los casos de parto prematuro y RCF [13].

Recientemente, se ha descrito un nuevo perfil de células T *helper*, capaz de secretar en forma preponderante interleuquina-17 (IL-17). Las células T *helper* 17 (T_H17) están implicadas en diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, incluyendo el síndrome coronario agudo, la esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias del intestino y psoriasis. Sin embargo, las células T_H17 también pueden tener papeles reguladores y protectores en el intestino e hígado [24, 25]. Aún no está claro su rol durante el embarazo, sin embargo, es importante tener en consideración la gran plasticidad de las células T_H17 [24]. Sabemos que en patologías como la PE se secretan constitutivamente altos niveles de IL-1 β e IL-6, favoreciendo el desarrollo de T_H17 [24]. Estudios han observado un aumento en la concentración de IL-17 en sangre periférica en patologías obstétricas como aborto espontáneo [20] y PE [24]. Por lo contrario, embarazos fisiológicos se asocian a una disminución del perfil T_H17 [24]. En cuanto a los Treg, estas células son una población especializada de linfocitos T conocidos por sus potentes propiedades supresoras de las respuestas inmunes inflamatorias y su capacidad para mediar la homeostasis inmunológica [24]. Los embarazos fisiológicos se caracterizan por aumento en la frecuencia de Treg en sangre periferia y en la interfase materno fetal [24]. Estudios recientes demuestran la importancia de esta población celular para el desarrollo de la tolerancia materno fetal, en el primer trimestre del embarazo [24]. Modelos murinos depletados de estas células presentan abortos a repetición, pero al transferirles Treg de embarazos murinos fisiológicos se logra restablecer la tolerancia materno fetal evitando el rechazo del feto [24]. En pacientes con PE se ha observado una disminución de Treg en la periferia y en la interfase materno fetal [24]. Además se ha visto en mujeres embarazadas que los Treg interactúan con células dendríticas, a través de CTLA-4 (Citotoxic-Lymphocyte Antigen 4), induciendo la secreción deIDO (Indolamida-2,3-dioxigenasa) por parte de las células dendríticas deciduales [26]. La enzima IDO provoca la depleción del triptófano en la interface materno-fetal y por consiguiente no se producirá la activación de los LT y NK maternos [26].

Por su parte los macrófagos deciduales tienen una capacidad limitada de presentar antígenos y bajos niveles de CD86. También pueden secretarIDO e IL-10 favoreciendo así, la inhibición de la respuesta inmune [13]. Además, están implicados en la remodelación tisular durante la implantación, a través de la eliminación de células y restos de tejidos, por otro lado, también se ha sugerido que estos macrófagos producen citoquinas como TNF- α [13].

En cuanto las células dendríticas (DC) del endometrio decidualizado, existen 2 tipos de DC: células dendríticas que expresan CD83, que comprenden al 1% de la población decidual y las células dendríticas inmaduras conocidas como CD83⁽⁻⁾ DC-SIGN⁽⁺⁾ [27,28]. Durante el embarazo estas últimas, interactúan con las dNK a través de la secreción de las citoquinas como, IL-15, IL-12, IL-18, IFN- γ , promoviendo la diferenciación y proliferación de las dNK [29]. Además, las dNK activadas inducen diferenciación y maduración de las DC [30]. Por otro lado, las DC inmaduras son sensibles a la citotoxicidad medida por las células dNK, a través, de su receptor NKp30; mientras las DC maduras están protegidas por la alta expresión de MHC de clase I [29].

Las células que definen el límite entre la madre y el feto son las células trofoblásticas [9]. El trofoblasto humano expresa moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), que como es sabido tiene como función presentar antígenos a las células T [16]. En forma general, existen 2 tipos de MHC, los cuales son llamados clásicos y no clásicos. En el trofoblasto encontramos MHC no clásicos, entre ellos HLA-E, F y G. La molécula HLA-G se expresa selectivamente en la interface materno-fetal y se unen a receptores inhibitorios de las células NK deciduales, contribuyendo de este modo a la tolerancia materno-fetal [10,11,12]. Existen formas solubles de la molécula, llamadas sHLA-G (shed HLA-G) que se generan por la proteólisis de HLA-G de membrana y es secretada por el trofoblasto extravellocitario. Diversos reportes señalan que esta molécula potencia la secreción de interleuquina-10 (IL-10) y además, favorece la generación de un perfil linfocitario T_{H2}, contribuyendo a la tolerancia materno-fetal [13].

Existe una fuerte evidencia que los HLA-G juegan un importante papel en la inmunosupresión materno-fetal, ya que por diferentes mecanismos son capaces de regular la actividad de células NK, linfocitos T y células presentadoras de antígenos [10,11,12].

Sistema inmune y remodelación vascular

El mecanismo exacto de la remodelación vascular no está del todo aclarado [8]. Se sabe que ocurre en 2 fases distintas, la primera fase se produce en ausencia de trofoblasto y conlleva la degradación de las células lisas musculares y apoptosis de células endoteliales [8]. La segunda fase implica la migración de trofoblastos extravelositarios hacia el lumen del vaso para formar un pseudoendotelio gracias a la pérdida casi completa de la capa muscular de las arterias espiraladas y células endoteliales, transformando un vaso de baja capacitancia a uno de alta capacitancia, este cambio fisiológico permite el intercambio adecuado de nutrientes y gases entre madre y feto [8,12]. En estudios de murinos deficientes de células dNK, se observó que la administración de IFN- γ fue capaz de reducir el edema uterino e iniciar los eventos de la remodelación vascular [8]. Como el 90% del IFN- γ presente en decidua es producido por células dNK, podemos suponer que la producción de IFN- γ por dNK presenta un papel regulador clave en la remodelación vascular, pero la función exacta aún no está del todo estudiada [8].

Existen 2 vías migratorias del trofoblasto extravelositario (EVT). La primera es la invasión endovascular a través de una trayectoria luminal intra-arterial en dirección opuesta al flujo sanguíneo y la segunda es la invasión intersticial en la que el EVT migra dentro de los tejidos de la pared decidual, miometrial y vascular [8-9].

La contribución del EVT en la finalización del remodelado arterial es altamente dependiente de esta capacidad de migrar/invasión en el estroma decidual [8,13]. La población celular decidual o los componentes extracelulares dentro de la decidua parecen regular esta invasión de trofoblasto. En ausencia de la decidua, debido al tejido cicatricial uterino o en sitios de embarazo ectópico donde no se observan células dNK, se ha observado una invasión EVT profunda no controlada [28]. Estudios *in vitro* han demostrado que las citoquinas

producidas por dNK como TNF- α , IFN- γ y TGF- β 1 inhiben la invasión EVT [8]. Este fenómeno se ha visto en las pacientes que presentan PE, con aumento en la concentración de IFN- γ y una pobre invasión trofoblástica [8].

Sin embargo, el EVT no sólo reemplazan transitoriamente las células endoteliales que recubren la pared de las arterias espiraladas, sino que también tienen la capacidad de degradar la matriz extracelular (MEC) que rodea a estos vasos. Las células endoteliales y las células musculares lisas de las arterias espiraladas son capaces de producir componentes de la MEC tales como colágeno IV, laminina, proteoglicanos y fibras de elastina. Los estudios *in vitro* han demostrado que el EVT es capaz de degradar y fagocitar la lámina de elastina creando “huecos” que permiten el acceso intersticial de EVT a la superficie arterial. Las proteasas esenciales responsables de la degradación de la MEC son las metaloproteinasas de matriz (MMPs) [8], más específicamente, los EVT del primer trimestre expresan MMP-12 capaces de degradar los componentes MEC tales como colágeno IV, laminina, fibronectina, vitronectina y proteoglicanos de sulfato de heparina [8]. Por otro lado, recientemente en cocultivos de arteria espiralada con EVT en medios acondicionados, el EVT produce up-regulation de la C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10), que es capaz de inducir motilidad y diferenciación de las células musculares lisas de las arterias espiraladas [31].

Como ya se mencionó anteriormente, existe una gran cantidad de citoquinas involucradas en el proceso de remodelamiento de las arterias espiraladas, las cuales se destacan a continuación:

Interferón gamma (IFN- γ)

Interferón gamma, es producida por células T_H1, NK y NKT durante el primer trimestre [32]. Estudios en humanos la relacionan con la implantación del embrión [33] y en modelos murinos, se ha descrito alteraciones en las arterias espiraladas y disfunciones placentarias cuando las dNK son *knockout* para IFN- γ . Dichas alteraciones son revertidas por la reconstitución con dNK provenientes de un ratón *wild type* [34]. Adicionalmente, estudios realizados en ratones TbH26 (deficientes en NK y LT) y Rag2^(-/-)J^(-/-) (deficientes de NK, LT y LB)

mostraron que presentaban problemas en la decidualización [13]. Por otra parte, las dNK son la principal fuente secretora de IFN- γ en el sitio de la implantación [35]. Se han observado ratones IFN- γ ^(-/-) presentan elevadas tasas de aborto [12, 13]. La forma como el IFN- γ actúa sobre la decidua no está del todo comprendida [8]. Se postula que está involucrada en la degradación y remodelación de las células del músculo liso de las arterias espiraladas y las células endoteliales, permitiendo una mayor dilatación de las arterias espiraladas y un mejor suministro de sangre materna hacia el embrión [8]. Desde el punto de vista funcional las dNK son cruciales para la correcta invasión trofoblástica, permitiendo el remodelamiento vascular a través de la secreción de estas citoquinas, en especialmente IFN- γ [6,7,9]. Desde el punto de vista patológico, numerosos estudios observan que pacientes con PE presentan una concentración de IFN- γ plasmático aumentada en comparación con embarazadas normales [33], sin embargo, otros autores no observan estas diferencias [36], por lo que aún se requieren más estudios para dilucidar completamente el papel de esta citoquina en embarazo normal y patológico.

Interleuquina-17 (IL-17A)

IL-17A es la citoquina ícono del perfil T_H17, el perfil pro-inflamatorio más recientemente estudiado en la PE. Esta citoquina del punto de vista fisiológico está relacionada a la vasculogénesis y a la promoción de factores angiogénicos [37]. Se ha descrito que durante el primer trimestre del embarazo de mujeres que desarrollaran PE, un aumento sostenido de esta citoquina en el plasma [24]. En embarazos fisiológicos se observan bajos niveles de esta citoquina hasta el momento del parto [38].

Desde el punto de vista patológico, existen variados reportes que relacionan los perfiles T_H17 y la citoquina IL-17 a patologías del embarazo como el aborto a repetición, RCF y PE, pero aún no está del todo aclarado [39, 40].

Interleuquina-10 (IL-10)

IL-10 es una citoquina muy estudiada durante el embarazo. Sus funciones anti-inflamatorias, se relacionan a la inhibición de células T_H1 y macrófagos, a través de la disminución de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, con la interferencia en la presentación antigénica, y por último, con la inhibición directa e indirecta de células NK y linfocitos $TCD8^{(+)}$, promoviendo la regulación de la respuesta inmune [41]. Además, presenta un papel regulador de la vasculogénesis, inhibe autocrinamente la secreción de la metaloproteinasa 9 producida en el trofoblasto humano [12]. Se ha descrito además que bloquea el parto de pretérmino inducido por lipopolisacárido en modelos murinos y activa la producción de sHLA-G [42].

Factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β 1)

TGF- β 1 es descrita clásicamente como una citoquina regulatoria, producida por diversos tipos celulares, incluso linfocitos reguladores. Sin embargo, en el embarazo ha sido descrita como la responsable de la inhibición de la invasión trofoblástica a las arterias espiraladas, base fisiopatológica del PE y RCF [43]. Son pocos los reportes de esta citoquina en el embarazo. Estudios recientes, describen que TGF- β 1 aumenta en el suero de mujeres con preeclampsia [44,45,46], sin embargo, otros reportes no relacionan TGF- β 1 con esta enfermedad [47,48]. En estudios recientes de nuestro laboratorio, se compararon los perfiles de citoquinas en plasma de pacientes con embarazos preeclámpicos y fisiológico, observándose que la concentración de TGF- β 1 no está alterada previo a los síntomas de la enfermedad, pero en el momento que se establece la preeclampsia, existe un aumento en la concentración plasmática de esta citoquina, (manuscrito en preparación).

Factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α)

El TNF- α , otra citoquina clásicamente inflamatoria, está implicada en la apoptosis de las células musculares lisas de las arterias espiraladas (VSMC), favoreciendo la invasión por

parte de las células trofoblásticas [48]. Además, parece cumplir otros roles como la diferenciación de las células trofoblásticas extravelositarios [49]. Diversos reportes muestran un aumento del TNF- α plasmático en embarazos que desarrollan PE en comparación con embarazos fisiológicos [50,51,52]. Por otra parte, estudios *in vitro* han observado, que el aumento de concentración de esta citoquina se ha relacionado con la disminución de la actividad invasiva de los trofoblastos en el primer trimestre del embarazo, sugiriendo que elevadas concentraciones de TNF- α afectaría el desarrollo placentario y la mantención del embarazo [48]. Adicionalmente, se ha determinado que TNF- α participa en la regulación de la expresión de la subunidad β de la gonadotropina humana coriónica (β -HCG), disminuyendo la producción y liberación de ésta por las células trofoblásticas [53].

Placentación Anómala y Patología Hipóxica

La regulación temporal de las funciones de las células dNK y la invasión de trofoblasto son determinantes importantes para que la remodelación vascular sea adecuada y por consiguiente el embarazo sea exitoso. En algunos embarazos patológicos, esta asociación parece estar alterada. La alteración de la interacción entre la célula dNK y EVT tiene un impacto significativo tanto en el estado de activación de las células dNK, la invasión de trofoblasto y, en última instancia, la remodelación de las arterias espiraladas. En mujeres con preeclampsia, por ejemplo, se ha demostrado que existe una alteración de la invasión del trofoblasto asociado a una reducción de la remodelación arterial, por otra parte, en los casos de restricción del crecimiento fetal, se ha observado una proporción menor de células dNK en relación con el número de leucocitos totales en comparación con embarazos fisiológicos, presentado también una escasa remodelación vascular y pobre crecimiento de la placenta [8].

Durante el embarazo fisiológico, normalmente ocurre liberación de antígenos tanto maternos como fetales a la circulación materna. Estos detritus, son fagocitados por células presentadoras de antígenos que producirían citoquinas inmunosupresoras como IL-10 disminuyendo la generación y respuesta de linfocitos T_H1 ubicados en la decidua [47]. Sin

embargo, en condiciones de hipoxia *in vitro*, se ha observado que, hay un aumento de interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8) y una disminución de IL-10 [48]. Produciéndose inflamación y por consiguiente expresión de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-12 y estrés oxidativo, con mayor liberación de detritus fetales hacia el espacio intervelloso, induciendo un aumento del perfil inflamatorio T_H1 [8].

Otro ejemplo de remodelación vascular defectuosa, es el aborto espontáneo recurrente tardío (mayor a 13 semanas). Las arterias espiraladas del miometrio procedentes de biopsias de lecho placentario se asociaron a una disminución del trofoblasto intramural y endovascular en comparación con las arterias espirales del miometrio de embarazos fisiológicos [54]. En otro estudio en abortos espontáneos recurrente de causa no precisada, se observa un aumento de las células dNK en sangre periférica en comparación con el embarazo normal [55]. Queda por determinar si estas variaciones en el porcentaje de células dNK en sangre periférica, se reflejan en el tejido uterino. Si es así, el aumento potencial en las células dNK podría alterar el equilibrio entre dNK y el trofoblasto extravellositario [56].

Doppler Arterias uterinas como predictor de correcta remodelación vascular.

Existen varios factores en la historia materna que podrían predisponer a una placentación anormal, entre ellos encontramos: raza negra, nuliparidad, índice de masa corporal (IMC) alto, historia de hipertensión arterial crónica, antecedentes de preeclampsia. Pero su sensibilidad es baja, se ha visto que puede estar asociado a PE sólo en un 50% de los casos, con una tasa de falsos positivos de un 10% [57].

Hoy en día existe otro método de evaluación flujo útero-placentario más certero y esta es la ecografía Doppler de arterias uterinas ya sea por vía transabdominal o transvaginal [56]. El Doppler de arterias uterinas se utiliza mucho en la práctica clínica para predecir el riesgo de hipoperfusión placentaria, se realiza entre la semana 11-14, logrando una sensibilidad de hasta un 85% para predecir el riesgo patologías hipóxicas placentarias con un 10% de tasas de falso positivo [57].

El Doppler tiene como principio básico el efecto Doppler, es el cambio en la frecuencia recibida desde un receptor fijo, en relación a una fuente emisora en movimiento. Este principio aplicado al ultrasonido nos permite conocer ondas de velocidad de flujo de un vaso determinado. [58]. El ultrasonido emitido con una frecuencia determinada, desde un transductor hacia una columna de partículas sanguíneas en movimiento, será dispersado y reflejado con una frecuencia diferente. La diferencia entre la frecuencia emitida y reflejada se llama frecuencia, siendo proporcional a la velocidad de flujo sanguíneo [58].

Se han desarrollado índices cualitativos descriptivos de esta onda de velocidad de flujo pulsátil, siendo el más utilizado hoy en día, el índice de pulsatilidad ($IP = (A-B)/\text{promedio}$), estimar el pico sistólico máximo (peak systolic velocity = PSV). El flujo anormal o Doppler alterado está definido por el valor que esta sobre el percentil 95 ó por sobre 2 desviaciones estándar (DS) del promedio. Este límite de anormalidad varía según edad gestacional [57].

El estudio del rol inmunológico en la placentación es bastante amplio y sin embargo, aún no ha podido esclarecer el papel que tiene el sistema inmune sobre el desarrollo de patologías que implican alteraciones en la remodelación vascular placentaria. Sin embargo, se sabe que algunos de los principales actores de este proceso son las células dNK y la citoquina IFN- γ . Sin embargo, hay estudios que demuestran que existen otras células inflamatorias que pueden estar presentes y contribuir a las patologías hipóxicas. Hay pocos estudios que asocien las diferencias de perfiles linfocitarios T_H1 , T_H2 y T_H17 con sus citoquinas en relación a la placentación anormal. Por otra parte, tenemos una herramienta clínica, como el Doppler de las Arterias Uterinas, que orienta si la placentación se llevara a cabo de forma correcta o no. Hay que considerar que no existe evidencia concluyente que correlacione aumentos en impedancia de territorio uterino durante el primer trimestre y un mal resultado perinatal, pero si sabemos que presentar Doppler de arterias uterinas alterado, presenta un mayor riesgo de desarrollar algunas patologías hipóxicas como la preeclampsia, restricción del crecimiento ó parto prematuro. Lo que conllevaría un eventual mal *resultado* perinatal.

En base a la importancia que posee el sistema inmune en el embarazo fisiológico y lo que implica una placentación anormal, junto a esto y con todos los antecedentes presentados es que proponemos la siguiente hipótesis de trabajo.

Hipótesis

“El aumento en el Índice de Pulsatilidad (IP) medido por Doppler uterino en embarazadas entre las 11 y 14 semanas de gestación, se relaciona con un aumento de la frecuencia de linfocitos T_H1 y T_H17 y sus respectivas citoquinas en sangre periférica”.

Objetivo General

Estudiar la relación entre el aumento de los perfiles linfocitarios T_H1 y T_H17 en sangre periférica con la alteración precoz de la resistencia vascular uterina durante el embarazo.

Objetivos específicos

- 1.- Evaluar el perfil de linfocitos T_H1, T_H2 y T_H17 y de la población celular CD4⁽⁻⁾IFN- γ ⁽⁺⁾ en sangre durante el primer trimestre, segundo trimestre y parto de embarazos fisiológicos.
- 2.- Comparar el porcentaje de linfocitos T_H1, T_H2 y T_H17 y de la población celular CD4⁽⁻⁾IFN- γ ⁽⁺⁾ en sangre de mujeres con IP normal e IP alterado en Doppler de Arterias Uterinas, realizado entre las 11 y 14 semanas de embarazo.
- 3.- Determinar y comparar la concentración de TGF- β 1, IL-18, IFN- γ , IL-17A e IL-4 en plasma de mujeres con IP normal e IP alterado en Doppler de Arterias Uterinas, realizado entre las 11 y 14 semanas de embarazo.

Materiales y Métodos

Selección de pacientes

Este estudio de casos y controles, se realizó en una población de mujeres embarazadas inscritas para el cuidado prenatal en las Unidades de Medicina Materno-Fetal del Hospital Clínico Universidad de Chile y del Hospital Clínico San Borja Arriarán. Los criterios de inclusión para este estudio incluyen pacientes con embarazos fisiológicos entre 11-14 semanas que se sometieron a estudio de Doppler de arterias uterinas. Los criterios de exclusión para este estudio incluyen enfermedades crónicas, como la diabetes mellitus, la hipertensión crónica conocida, neoplasia maligna, dislipidemia u otros conocidos para causar alteraciones en los parámetros bioquímicos.

Para las pacientes que cumplen criterios de inclusión, se tomó una muestra de sangre de 10 ml a mujeres embarazadas que realizaron su control de 11-14 semanas (1º Trimestre), en tubos de Heparina-Litio, (BD Biosciences). Las muestras de se obtuvieron a partir de mujeres sin evidencia de patologías maternas o fetales y/ó Doppler de arterias uterinas normal para las 11-14 semanas de embarazo (controles) y los casos fueron obtenidos de mujeres embarazadas que presenten aumento del Índice de Pulsatilidad Promedio del Doppler de las arterias uterinas mayor al percentil 95 para las 11 y 14 semanas, denominado como Índice de Pulsatilidad (IP) alterado. Adicionalmente, a cada paciente del estudio, tanto casos como controles, se les tomaron muestras de sangre durante el segundo y tercer trimestre del embarazo, y en el momento del parto, en tubos de Heparina-Litio, (BD Biosciences).

Las mujeres reclutadas firmaron el consentimiento informado correspondiente (Acta de aprobación N° 57) aprobado por el Comité de Ética Científico para Investigación Biomédica (CECel) en seres humanos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y el Comité Ético-Científico (CEC) del Servicio de Salud Metropolitano Central, constituido por la resolución exenta N°0187, para el Hospital Clínico San Borja Arriaran.

Número de pacientes

Para este estudio se analizaron 98 pacientes, dividiéndose 47 pacientes controles, es decir Índice de Pulsatilidad (IP) de Doppler de arterias uterinas normal y 51 paciente como caso, es decir, Índice de Pulsatilidad (IP) de Doppler de arterias uterinas alterado (IP sobre el percentil 95). Siendo el enfoque principal de este estudio el análisis de los perfiles linfocitarios, se revisaron dichos perfiles con STATA 12 con un error alpha de 5% y una potencia de 80%, dando los siguientes resultados. Para el análisis de T_H1 se requiere un tamaño muestral de 43 por grupo, para T_H2 el N muestral tendría que ser de 65 por grupo, para T_H17 el tamaño muestral sería de 254 por grupo, para $CD4^{(-)}IFN-\gamma^{(+)}$ se necesitan 42 por grupo. Para los resultados del estudio estadísticamente significativos, el tamaño muestral es adecuado.

Doppler de circulación uterina.

El estudio de Doppler de circulación uterina se realizó vía transvaginal, con un sistema de Doppler pulsado color en embarazadas entre 11 y 14 semanas, por médicos ginecólogos pertenecientes a las unidades de Medicina Materno Fetal del Hospital Clínico José Joaquín Aguirre y del Hospital Clínico San Borja Arriarán.

Se utilizó una técnica estandarizada por la International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG): Para ello la paciente debe estar en decúbito dorsal y con el transductor del ultrasonido Doppler color en la pared uterina lateral baja a nivel de la unión cervico-ístmica de forma para-sagital a 2-3 cm medial a la espina ilíaca antero superior, se busca la ubicación de ambas arterias uterinas a nivel de su nacimiento desde la división anterior de las respectivas arterias ilíacas internas y se realiza la medición del IP en ambas arterias uterinas.

Preparación y análisis de muestras de sangre para ensayos inmunológicos

Para llevar a cabo el proyecto se obtuvieron muestras de sangre periférica de mujeres embarazadas, en tubos de plástico de 10 ml que contienen heparina como anticoagulante como se describió en las secciones precedentes. Brevemente, para aislar PBMC, la sangre periférica se diluyó 1:1 con solución equilibrada de Hank y las células mononucleares se separaron por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque. La viabilidad del PBMC aisladas fue evaluada por *kit Live-Dead Aqua (Life technologies)* siguiendo las instrucciones del fabricante, sólo fueron analizadas aquellas muestras que presentaron mayor o igual a 75% de viabilidad. Aislado el PBMC y aquellas que tenían una viabilidad mayor o igual al 75% se procedió a lavar en buffer isotónico (PBS 1X) para eliminar los remanentes de Ficoll, a continuación se procedió a eliminar los eritrocitos con buffer de lisis para una mayor purificación del producto. Realizado esto, se contaron las células en un contador automático (logos biosystems) y se congelaron en criotubos de 1.5ml en Suero fetal Bovino (Corning) + 10% DMSO (Calbiochem), para ser almacenadas en nitrógeno líquido -80°C hasta la medición de la concentración de citoquinas. Las citoquinas se analizaron utilizando kits de ELISA específicos. La caracterización de las células mononucleares se analizó por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para determinar la frecuencia de subpoblaciones de linfocitos T.

Citometría de Flujo

Se caracterizó la frecuencia de subpoblaciones de linfocitos T helper con el *Kit BD Pharmingen™ Human T_H1/T_H2/T_H17 Phenotyping Kit*, el cual recomienda la estimulación de PBMC a una concentración de $1-10^6$ células por ml de medio durante 5 horas con PMA (25ng/ml) / ionomicina (1 mg/ml) en presencia del inhibidor del transporte de proteína *BD GolgiStop (0,66mg/ml)™*. Posteriormente se recolectaron y se procedió a su marcación con el *Kit Live-Dead Aqua (Life technologies)* y el *Kit T_H1/T_H2/T_H17 (BD Biosciences)* para poblaciones linfocitarias, las células fueron permeabilizadas e incubadas con *buffer BD Perm/Wash™* en una solución 1x en 1 ml e incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se agregó 20 μl del tubo de cóctel (CD4 humano PerCP-CY5.5, IL-17A PE, IFN- γ

con FITC e IL-4 APC). Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Como control de isotipo se utilizó IgG1 de ratón conjugado a PE, APC y FITC (eBioscience, USA).

Finalmente las células fueron analizadas por citometría de flujo FACSVerse (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) del laboratorio de regulación e Inmunología del Cáncer.

Ensayo de ELISA

Se realizó *Elisa sandwich Quantikine (R&D System)* para IL-4, IL-10, IL-17A, IL-18, IFN- γ y TGF- β 1, según la metodología del fabricante. Para ello se utilizaron muestras de plasma de pacientes con IP alterado del primer trimestre del embarazo (11-14 semanas).

Análisis Estadístico

Para el análisis de las características poblacionales se utilizó una distribución Chi-cuadrado. Para el resto de los resultado obtenido de manera experimental, cada una caso fue sometido a las pruebas de normalidad del Lilliefors's test y Shapiro-wilk's test antes de la aplicación del método estadístico. Tras determinar que en ambos testes las muestras se comportaban como normales, para las muestras pareadas se aplicó el Test t Student pareado. En caso contrario, cuando las muestras no fueron pareadas se aplicó el Test t Student no pareado. Y en caso de que en ambos testes las muestras se comportaban como no normales, se aplicó el Mann Whitney test. Para la determinación de la significancia entre más de dos grupos, se utilizó la prueba de ANOVA de una vía. En todos los casos se fijó el nivel de significancia del p inferior a 0,05. El software utilizado para el análisis fue GraphPad Prism 7.03.

Este proyecto fue financiado por fondos provenientes de Conicyt a través del proyecto Fondecyt *“Role of immune and inflammatory markers as screening test for preeclampsia during the first trimester of pregnancy”* (N° 1130668) y por el Instituto de Inmunología e Inmunoterapia.

Resultados

En este trabajo se analizaron 98 mujeres embarazadas entre las 11 y 14 semanas de gestación. Estas pacientes se dividieron en dos grupos de acuerdo al Índice de Pulsatilidad (IP) uterinas: el primer grupo de embarazadas presentaba un IP alterado (47 casos, ver Material y Método) y el grupo restante mujeres embarazadas con IP normales (51 controles). Los datos clínicos generales de las pacientes estudiadas son detallados en la Tabla 1. En ella podemos observar que no existen diferencias significativas entre la edad de las embarazadas y un índice IP alterado. Tampoco observamos diferencias entre número de embarazos, la edad y primiparidad y el desarrollo de un IP alterado. Adicionalmente, no observamos diferencias entre el desarrollo de embarazos con patologías hipóxicas previas e IP alterado, a pesar de los antecedentes de la literatura [60]. Interesantemente, en el grupo control predominan las pacientes eutróficas a diferencia de la población con IP alterado donde predomina la obesidad. Evidenciamos una tendencia lineal, a mayor peso una mayor probabilidad de desarrollar IP alterado y viceversa.

En ambos grupos se desarrollaron patologías hipóxicas tanto PE como RCF. Sin embargo, observamos que las pacientes con IP alterado desarrollan el doble de casos de RCF si se compara con las embarazadas control. Creemos que el bajo número de casos no permite que las diferencias observadas sean estadísticamente significativas.

Antecedentes Clínicos	Indice de pulsatilidad normal (N=47)	Indice de pulsatilidad alterado (N=51)
Edad Materna		
Media (\pm SD)	31.13 (\pm 1.23)	32.75 (\pm 1.20)
Paridad		
Primigestas; n (%)	22 (47%)	21 (41%)
Multiparas; n (%)	25 (53%)	30 (58%)
Antecedente PE parto anterior; n (%)	0%	1 (1,8%)
Antecedente RCF parto anterior; n (%)	0%	1 (1,8%)
Indice de Masa corporal		
Normalidad (IMC 19-24,9); n (%)	21 (45%)*	13 (26%)*
Sobrepeso (IMC 25-29,9); n (%)	15 (32%)*	18 (35%)*
Obesidad (IMC > 30); n (%)	11 (23%)*	20 (39%)*
Desarrolla Patología Hipoxica en embarazo actual		
RCF; n (%)	3(6,3%)	6(11,7%)
PE; n (%)	3(6,3%)	3(5,8%)

* P< 0.05; Chi-Cuadrado Test

Los valores son media \pm SD, n (%)

Tabla 1. Tabla Características de pacientes.

A las mujeres embarazadas de ambos grupos se les tomo una muestra de sangre en el primer, segundo, tercer trimestre del embarazo y al momento del parto. Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PMBC) y el plasma, para evaluar los diversos perfiles linfocitarios y las citoquinas plasmáticas tal como se mencionó en materiales y métodos. Todas las pacientes de este estudio cuentan con consentimiento informado firmado de acuerdo a las instrucciones de los comités de ética humana de la Facultad de Medicina, Hospital Clínico de la Universidad de Chile y Servicio de Salud Metropolitano Central correspondiente al Hospital Clínico San Borja Arriarán.

La Figura 1 ilustra la estrategia de selección de poblaciones linfocitarias que fueron utilizadas para evaluar el perfil linfocitario en cada uno de los sujetos analizados, mediante citometría de flujo. Como se puede observar en los *density plot* representativos es posible definir claramente la población linfocitaria en A. En B, seleccionamos la población que está viva gracias al marcador Live-Dead. Es importante destacar que para este estudio se consideraron sólo las muestras con un porcentaje de viabilidad mayor o igual al 75%. En C se seleccionan las células que poseen o no el marcador CD4, característico de los perfiles linfocitarios helper. Para el perfil linfocitario T_H1, D, se analiza el porcentaje de expresión de IFN- γ en las células. En el caso del perfil linfocitario T_H17 (F) se evalúa el porcentaje de células que expresan IL-17A. En el caso del perfil linfocitario T_H2, ilustrado en E, se analiza la expresión de IL-4. Por otra parte, analizamos el porcentaje de células CD4⁽⁻⁾ (G) que son capaces de secretar IFN- γ . Esta población sería mayoritariamente una población que expresa CD3⁽⁺⁾ y compuesta fundamentalmente por LT CD8⁽⁺⁾ y NKT.

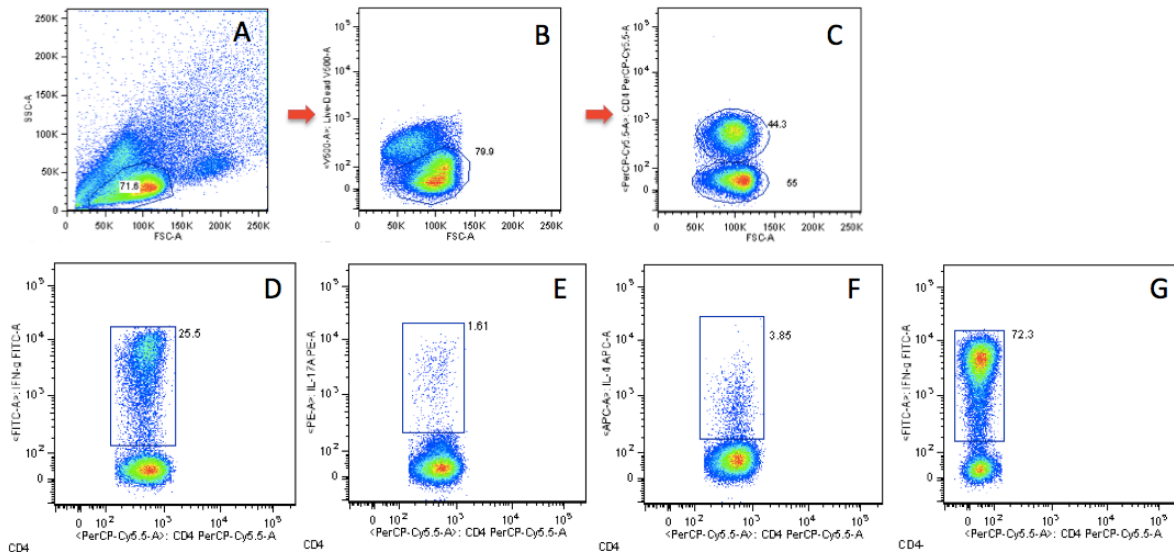


Figura 1.- Estrategia de selección de las poblaciones linfocitarias para su análisis.

Dot Plots representativos de citometría de flujo de una paciente embarazada de entre 11 y 14 semanas. Posterior y al aislamiento de PBMC, se procedió a marcar la muestra con el *phenotyping Kit* T_H1 / T_H2 / T_H17 según lo explicado en materiales y métodos. Para finalmente ser analizado en el citómetro de flujo *FacsVerse*. En A se muestra la selección de linfocitos mediante *SideScatter* y *ForwardScatter*. B señala la discriminación de células muertas del análisis mediante el *Kit Live/Dead Aqua*. El cuadrante C ejemplifica como se tomó la población $CD4^{(+)}$ y $CD4^{(-)}$. Los cuadrantes D, E, F ilustran la detección de las diversas citoquinas IFN- γ , IL17A e IL-4 respectivamente. Finalmente en G se puede observar la producción de IFN- γ por parte de la población $CD4^{(-)}$.

Analizamos los perfiles linfocitarios T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} y $CD4^{(-)}IFN-\gamma^{(+)}$ en sangre periférica de 47 mujeres entre las 11 y 14 semanas de embarazo con IP normal (**Grupo Control**), además, se les realizó una cinética de estos perfiles linfocitarios durante el segundo trimestre, tercer trimestre del embarazo y en el momento del parto. En la Figura 2, observamos una disminución significativa del porcentaje de células T_{H1} entre el primer trimestre y tercer trimestre del embarazo para luego, en el momento del parto elevarse significativamente (Figura 2 A), acorde con lo reportado en la literatura, y que se ha asociado a una correcta decidualización [8,12]. Por otro lado observamos que el porcentaje de la población linfocitaria T_{H2} productora de IL-4 (Figura 2 B), muestra un aumento significativo entre el primer trimestre y el segundo trimestre del embarazo acorde a los hallazgos en literatura [12]. Luego a medida que transcurre el embarazo estos niveles disminuyen, siendo su mínima nivel en el momento del parto. En cuanto a la población T_{H17} , no se encontró diferencias significativas en ninguno de los intervalos evaluados (Figura 2 C).

Finalmente, al analizar la población $CD4^{(-)}$ productora de $IFN-\gamma$ (Figura 2 D) encontramos un incremento significativo a las 12 semanas, disminuyendo a las 22 y 32 semanas, recuperándose finalmente en el momento del parto.

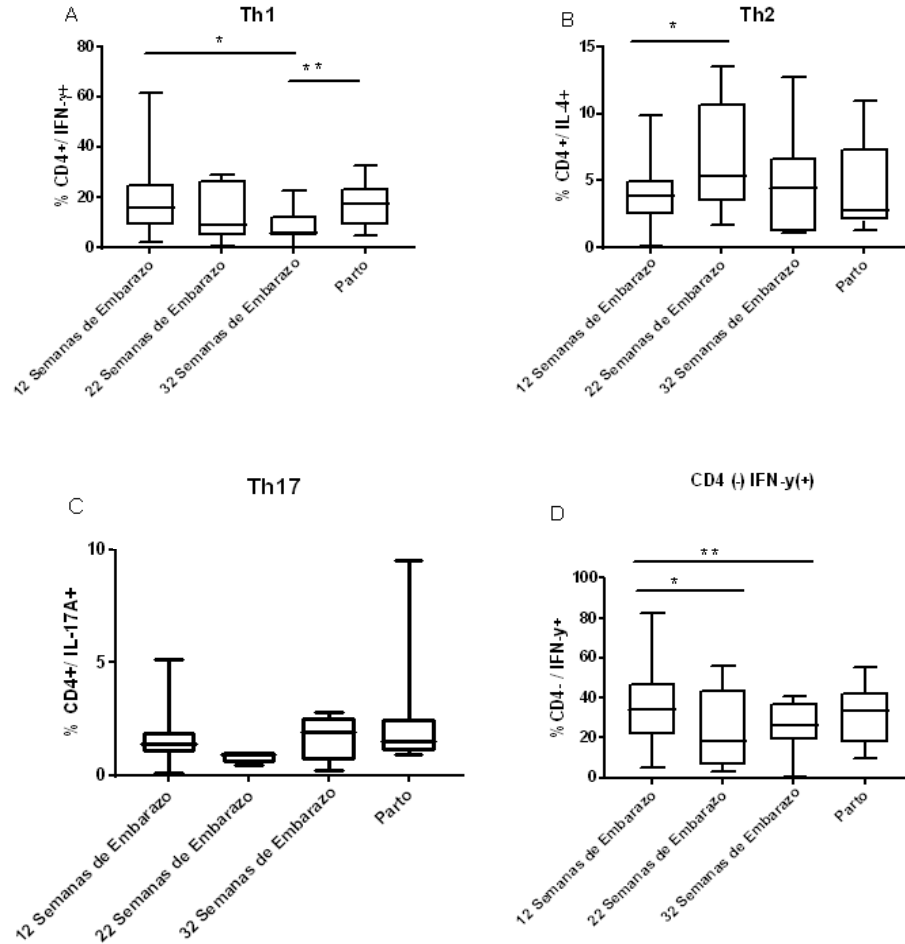


Figura 2.- Panel de expresión de citoquinas en linfocitos durante el embarazo de mujeres sanas. 47

mujeres embarazadas con IP normal fueron elegidas como control, a las cuales se le extrajo una muestra de sangre a las 12, 22, 32 semanas y al momento del parto. Se analizaron las poblaciones T_H1/T_H2/T_H17 y las células CD4⁽⁻⁾ productoras de IFN- γ por citometría de flujo de la manera que se menciona en materiales y métodos. A, B y C muestran el porcentaje de células capaces de expresar las diversas citoquinas icónicas de cada perfil linfocitario: IFN- γ , IL-4 e IL-17A respectivamente. En D se observa el porcentaje de células CD4⁽⁻⁾ que expresan IFN- γ . Los datos fueron expresados como promedio \pm SD. Análisis estadístico realizado T-test no pareado y Test de ANOVA. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Posteriormente, quisimos comparar los perfiles linfocitarios de las 51 pacientes con IP alterado y las 47 pacientes controles durante el primer trimestre del embarazo. En la Figura 3 observamos que las pacientes con IP alterado muestran un incremento significativo del porcentaje de linfocitos productores de IFN- γ , tanto LT CD4⁽⁺⁾ T_H1 (Figura 3 A) como en la población CD4⁽⁻⁾ capaz de producir IFN- γ (Figura 3D). No encontramos diferencia significativa en los perfiles linfocitarios T_H2 y T_H17 entre las pacientes control y con IP alterado, tal como se observa en la Figura 3 B y Figura 3 C.

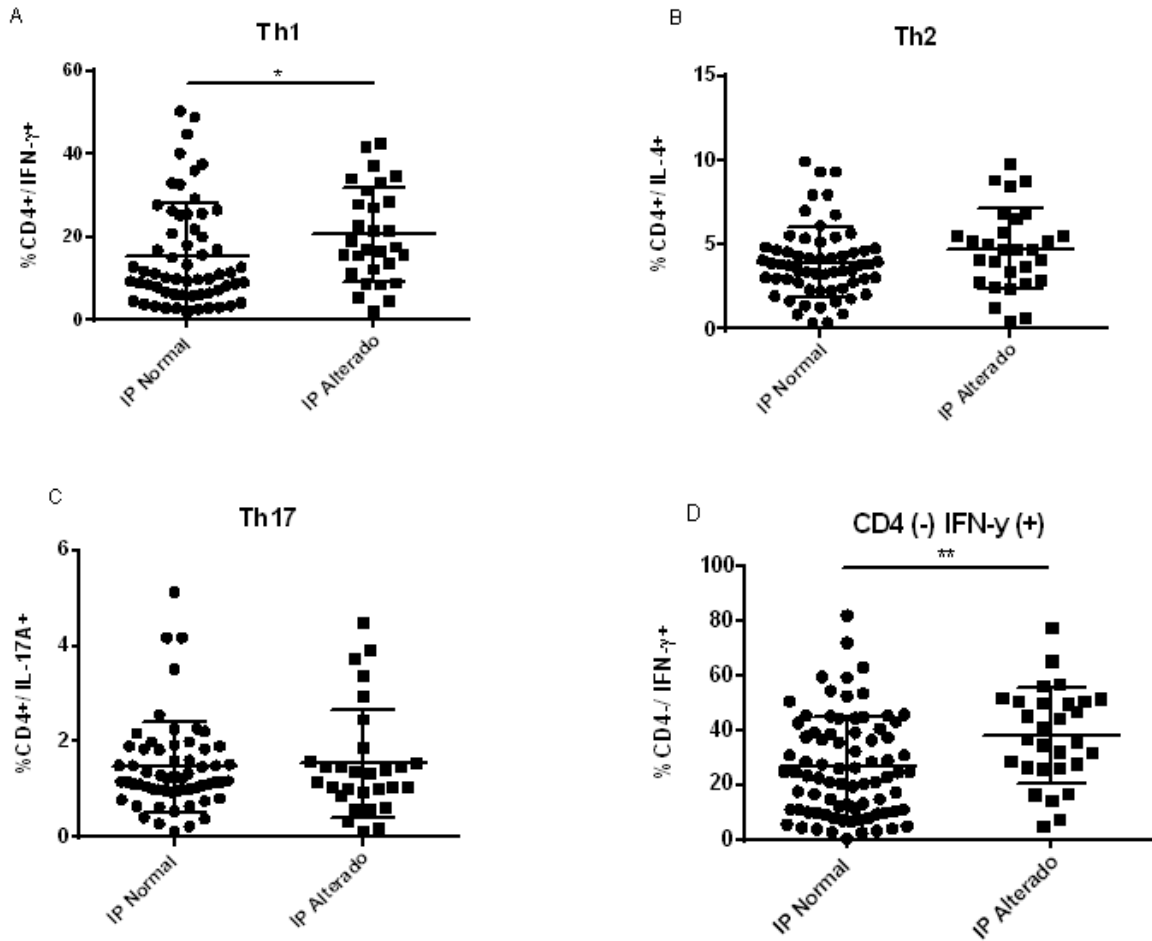


Figura 3.- Mujeres embarazadas con IP alterado presentan un aumento en el porcentaje de linfocitos productores de IFN- γ .

51 mujeres embarazadas de 11 a 14 semanas con IP alterados fueron seleccionadas. Se analizaron las poblaciones $T_H1/T_H2/T_H17$ y las células $CD4^{(-)}$ productoras de IFN- γ por citometría de flujo de la manera que se menciona en materiales y métodos. A, B y C muestran el porcentaje de células capaces de expresar las diversas citoquinas icónicas de cada perfil linfocitario: IFN- γ , IL-4 e IL-17A respectivamente. En D se observa el porcentaje de células $CD4^{(-)}$ que expresan IFN- γ . Los datos fueron expresados como promedio \pm SD. Análisis estadístico realizado T-test no pareado. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Posteriormente, se analizaron los niveles de citoquinas plasmáticas en las pacientes y controles. Para ello, se midió la concentración de IFN- γ , IL-4 e IL-17A a través de ensayos de ELISA. No se detectó la presencia de estas citoquinas en el suero de mujeres embarazadas controles y con IP alterado, entre las 11 y 14 semanas de embarazo. Datos no publicados por nuestro laboratorio muestran que pacientes con preeclampsia aumentan la concentración plasmática de IL-18 y TGF- β 1 en relación a embarazadas control. Debido a este hallazgo, analizamos la presencia de estas citoquinas en pacientes con IP normal (control) como en las pacientes que muestran un IP alterado. Observamos, que los pacientes con IP alterado muestran un incremento significativo en la concentración sérica de IL-18 y TGF- β 1, en comparación con sus controles (Figura 4 A-B).

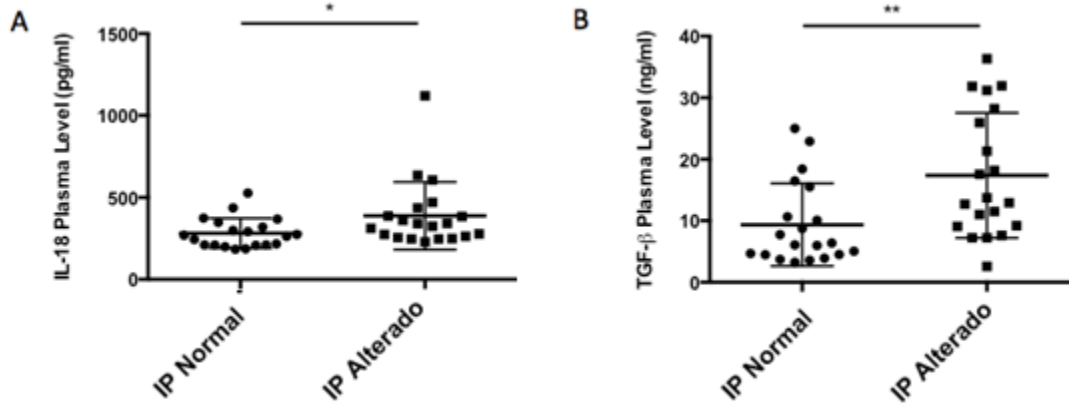


Figura 4.-Mujeres de 11 a 14 semanas de embarazo con IP alterado muestran un incremento plasmático de IL-18 y TGF-β1.

Concentración plasmática de IL-18 y TGF-β1 de pacientes con IP alterado y normales fueron detectados por ELISA, ensayo realizado según indicaciones del fabricante tal como se menciona en materiales y métodos. Los datos fueron expresados como promedio \pm SD. Análisis estadístico realizado T-test no pareado. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Como se mencionó anteriormente, todas las pacientes del estudio fueron seguidas clínicamente durante todo su embarazo y en el momento del parto. En este seguimiento observamos que se desarrollaron patologías hipóxicas (PE ó RCF) tanto en las embarazadas con IP normal como con IP alterado, ninguna de ellas desarrollo ambas patologías. En la población con IP alterado (Tabla 2), hubo 3 casos de PE, que corresponde al 5,8% y 6 casos de RCF que corresponden al 11,7%. En el caso de las pacientes con IP normales (Tabla 3), se registraron 3 casos de PE y 3 casos de RCF, que corresponde cada uno al 6,3% del total de las paciente con IP normal. Estos porcentajes se correlacionan con la prevalencia general de ambas enfermedades.

En todas las pacientes en las que se diagnóstico PE ó RCF, se analizó el porcentaje de las poblaciones T_H1 , T_H2 , T_H17 y de células $CD4^{(-)}IFN-\gamma^{(+)}$, además de la concentración plasmática de IL-18 y TGF- β 1 en las muestras de sangre tomadas a las 11 y 14 semanas. En la Tabla 2, observamos que las pacientes con IP alterado que desarrollaron PE, poseen un aumento significativo en el porcentaje de las poblaciones T_H1 ($p < 0.05$) en comparación con las embarazadas control. En las pacientes que desarrollaron RCF no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las poblaciones analizadas. Sólo se observa un incremento no significativo para el perfil T_H1 ($p = 0.067$). En este caso creemos que si aumentamos el número de pacientes evaluadas que desarrollaron la patología, estos valores podrían alcanzar significancia estadística.

Finalmente, evaluamos la concentración sérica de las citoquinas IL-18 y TGF- β 1 de las pacientes con IP alterado que desarrollaron PE y observamos un aumento significativo para ambas citoquinas. Los reportes de la literatura y nuestros propios resultados son consistentes con el aumento de TGF- β 1 en las pacientes que desarrollan PE [44,45,46]. En cuanto a las pacientes con RCF, se observa solo un aumento significativo de la IL-18.

Por otra parte las pacientes con PE y RCF con IP normal (Tabla 3) no presentaron el mismo patrón que la población anterior. Para ambas patologías no se observó diferencias significativas en ninguna de las poblaciones linfocitarias analizadas. Por el contrario cuando analizamos la concentración plasmática de las citoquinas IL-18 y TGF- β 1, observamos

pacientes que desarrollan PE, muestran un aumento significativo de la concentración de IL-18 y TGF- β 1. Por otro lado, en las pacientes que desarrollaron RCF no se observó variación en la concentración de las citoquinas analizadas en comparación con los controles.

Interesantemente, podemos observar un patrón inmune distinto entre mujeres que desarrollan PE y desarrollan alteración precoz del IP, en estas pacientes podemos observar que presentan un aumento en el perfil T_H1, una alta concentración plasmática de IL-18 y elevaciones leves de TGF- β 1. Por el contrario, mujeres preeclámpticas con IP precoz normal tienen un perfil T_H1 normal, una leve alza en la concentración de IL-18 y elevaciones leves de TGF- β 1. No existen diferencias clínicas en la severidad de la PE entre embarazadas con IP normal y alterado.

IP ALTERADO						
Restricción del crecimiento fetal (N= 6)	Th1	Th2	Th17	CD4- IFN- γ +	IL-18	TGF- β 1
Media (\pm SD)	23 (\pm 4.92) \ddagger	4.58(\pm 0.77)	1.43(\pm 0.11)	33.48(\pm 5.44)	351.6(\pm 99.3)	56.62(\pm 5.04)*
Preeclampsia (N= 3)						
Media (\pm SD)	33.27 (\pm 2.79)*	4.98(\pm 2.41)	2.11 (\pm 0.82)	41.63(\pm 5.75)	650.6(\pm 77.04)**	67.81(\pm 15.34)*
Controles (N = 48)						
Media (\pm SD)	15.4 (\pm 1.60)	4.14 (\pm 0.24)	1.61(\pm 0.11)	26.59(\pm 2.03)	286.3(\pm 19.49)	30.9(\pm 2.60)

Los valores son media \pm SD

*p< 0.05; **p<0.01 ; Mann-Whitney test

\ddagger P=0.0679

Tabla2. Mujeres embarazadas con IP alterado que desarrollaron PE ó RCF. Presentan diferencias significativas en sus perfiles linfocitarios T_H1, T_H2, T_H17, CD4⁽⁻⁾ IFN- γ ⁽⁺⁾ y en la concentración plasmática de las citoquinas IL-18 y TGF- β 1

IP NORMAL						
Restricción del crecimiento fetal (N= 3)	Th1	Th2	Th17	CD4- IFN- γ +	IL-18	TGF- β 1
Media (\pm SD)	7.16(\pm 2.44)	2.71(00.79)	2.54(\pm 1.29)	13.08(\pm 5.91)	103.2(\pm 58.29) \ddagger	29.59(\pm 2.19)
Preeclampsia (N= 3)						
Media (\pm SD)	12.11(\pm 6.71)	2.57(\pm 0.87)	1.02(\pm 0.35)	31.17(\pm 20.62)	59.76(28.78)*	89.01(\pm 7.93)**
Controles (N = 48)						
Media (\pm SD)	15.4 (\pm 1.60)	4.14 (\pm 0.24)	1.61(\pm 0.11)	26.59(\pm 2.03)	286.3(\pm 19.49)	30.9(\pm 2.60)

Los valores son media \pm SD

*p< 0.05; **p<0.01 ; Mann-Whitney test

\ddagger p=0.07

Tabla 3. Mujeres embarazadas con IP normal que desarrollaron PE ó RCF. Sin diferencias significativas en sus perfiles linfocitarios T_H1, T_H2, T_H17, CD4⁽⁻⁾ IFN- γ ⁽⁺⁾, pero por el contrario en la concentración plasmática de las citoquinas IL-18 y TGF- β 1

Discusión

En este trabajo se analizaron 98 mujeres embarazadas a las que se les midió el Índice de Pulsatilidad (IP) uterinas entre las 11 y 14 semanas de gestación. De acuerdo a este resultado, las dividimos en dos grupos embarazadas con IP alterado (47 casos) y embarazadas con IP normales, las que se utilizaron como controles (51 casos). A ambos grupos se les tomo una muestra de sangre en el primer, segundo, tercer trimestre del embarazo y al momento del parto y se evaluaron los perfiles linfocitarios T_H1 , T_H2 , T_H17 y $CD4^{(-)}IFN-\gamma^{(+)}$ y citoquinas IL-18 y TGF- β 1.

En nuestro estudio podemos describir varios hallazgos interesantes, el primero fue que a medida que aumenta el peso corporal, aumenta la probabilidad de desarrollar Doppler de arterias uterinas alterado. Esta relación no se dio en otros factores de riesgos clásicos para el desarrollo de PE, como la edad materna y la paridad, [59]. Como es sabido la obesidad es un estado pro inflamatorio persistente [8, 60], este estado puede potenciar una falla en la remodelación vascular y manifestarse precozmente con una alteración de IP de las arterias uterinas y por consiguiente mayor probabilidad de manifestar patologías hipóxicas. Cada vez es más evidente a partir de los datos epidemiológicos la obesidad, aumenta el riesgo de PE. Aunque no están claros los mecanismos específicos por los cuales la obesidad aumenta la tasa de PE, hay fuertes evidencias que sugieren que la activación periférica secundaria de LT helper que producen TNF- α , IL-6 y IL-17, podría alterar el delicado equilibrio entre factores que favorecen la remodelación de los vasos placentarios y aquellos que alteran esta remodelación, desviando la respuesta inmune hacia perfiles T helper 1, con secreción de IFN- γ e IL-18.

Al analizar la cinética de los perfiles linfocitarios T_H1 , T_H2 , T_H17 y $CD4^{(-)}IFN-\gamma^{(+)}$ en sangre periférica de embarazos normales durante los tres trimestres del embarazo y en el momento del parto, precozmente observamos una elevación de la frecuencia de linfocitos que expresan IFN- γ (Figura 2 A), acorde a lo publicado en la literatura, y concordante con las condiciones que se requieren para una correcta decidualización [8,12]. A medida que avanza

el embarazo disminuye significativamente el porcentaje linfocitos CD4 productores de IFN- γ hasta la semana 32. Paralelamente, la población linfocitaria T_H2 aumenta a las 22 semanas acorde a los hallazgos en la literatura [12], que reportan que el balance T_H1 y T_H2 debe inclinarse hacia T_H2 para así mantener la tolerancia materno fetal. Finalmente en el momento del parto se produce la caída de la población T_H2, y una nueva alza de la población T_H1, lo que sugiere que los niveles de IFN- γ aumentan debido a factores celulares y solubles que estimulan las posibles repuestas inmunológicas al feto permitiendo el inicio del parto. Al igual que en el perfil T_H1 los niveles de IFN- γ a las 12 semanas son altos, apoyando la idea que la secreción de IFN- γ , es importante para mantener los mecanismos que permiten la implantación del embrión y caen el segundo trimestre para elevarse nuevamente al momento del parto.

Al analizar a las mujeres con IP alterado entre las 11-14 semanas de embarazo (Figura 3), evidenciamos un incremento significativo en las poblaciones secretoras de IFN- γ , tanto como en el perfil T_H1 (Figura 3 A) como en la población CD4⁽⁻⁾ capaz de producir IFN- γ (Figura 3D). Los niveles de IFN- γ son claves en este proceso, así podemos ver que la literatura afirma que elevadas concentraciones de esta citoquina, se asocia a una mayor tasa de aborto [12,13], preeclampsia [33] y restricción del crecimiento fetal [12]. En particular la población CD3⁽⁺⁾CD4⁽⁻⁾IFN- γ ⁽⁺⁾, pudiese corresponder a células NKT y LTCD8⁽⁺⁾. Las células NKT son diez veces más frecuentes en la decidua que en sangre periférica de mujeres embarazadas. Diversos reportes indican que las células NKT se reducen significativamente en el embarazo normal en comparación con preeclampsia. Sin embargo, este sería el primer reporte que mostraría una alteración tan precoz de esta población en pacientes que demuestran una alteración clínica en la remodelación de las arterias uterinas. Estos datos son concordantes con el papel de las células NKT en la regulación del equilibrio T_H1/T_H2 *in vivo*. Tanto en decidua como en sangre periférica, las células NKT son capaces de modular la respuesta inmune a través de la producción de citoquinas asociado con células T_H1 (IFN- γ) y T_H2 (IL-4, IL-10).

Podemos proponer que el aumento de la concentración de IFN- γ induce el incremento de otras citoquinas, producidas por ejemplo por las dNK, como TNF- α y TGF- β 1.

Estas citoquinas en concentraciones altas han demostrado inhibir la invasión EVT en estudios *in vitro* [8], impidiendo el correcto reemplazo de las VSMC por el EVT, por lo tanto, se mantiene la capa muscular de las arterias espiraladas, traduciéndose en un territorio de baja capacitancia [12], reflejándose en el Doppler de las arterias uterinas, a través de la alteración del IP [57,58]. Es decir, el aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias induce la falla de la remodelación vascular. Concordante con la observación de que las pacientes obesas en su mayoría presentan IP alterado y su estado pro inflamatorio eventualmente potenciaría la falla en la remodelación vascular.

Los perfiles linfocitarios T_H1 y T_H2 por dogma son antagónicos [43], pero durante el análisis de los datos se observó en un pequeño grupo de pacientes la expresión concomitante de IFN- γ e IL-4 en linfocitos T CD4⁽⁺⁾. Hace algunos años ha surgido la teoría de plasticidad linfocitaria, en la cual dependiendo de los estímulos del medio ambiente, el sistema inmunológico podría estar modulando un perfil T_H1 a T_H2 o viceversa [59]. Podría ser que algunos clones de tipo T_H1 podrían modularse a un perfil linfocitario T_H2 para aumentar la tolerancia materno fetal al embrión de 12 semanas en gestación, cuando los perfiles inflamatorios son mayores de lo esperado.

Además de la plasticidad linfocitaria T_H1/T_H2 , es conocida también la plasticidad de los linfocitos $T_H17/Treg$ [24]. La clave de este balance es la presencia de citoquinas inflamatorias, como es la IL-6 [24]. En el grupo de pacientes con IP alterado, la mayoría obesas y con mayor inflamación, se esperaba encontrar un aumento de los linfocitos T_H17 , pero no se encontraron diferencias significativas en ambos grupos de pacientes. Puede ser que el aumento de los T_H17 se produce cuando se manifiesta la enfermedad [24].

Con respecto a las concentraciones plasmáticas de las citoquinas IFN- γ , IL-4 e IL-17A no se logró detectar mediante ELISA en el suero de mujeres embarazadas entre las 11 y 14 semanas. Datos no publicados por nuestro laboratorio muestran que en pacientes con PE, se observa un aumento de IL-18 y TGF- β 1. Debido a este hallazgo, se analizó la presencia de estas citoquinas en pacientes tanto con IP normal como en las pacientes que muestran un IP alterado. Las pacientes con IP alterado muestran un incremento significativo en la

concentración de IL-18 (Figura 4 A). Esta citoquina secretada por células de la inmunidad innata, como macrófagos, está involucrada en potenciar la síntesis de IFN- γ en otras poblaciones linfocitarias. El aumento en la concentración de IL-18 e IFN- γ , parecen preceder la manifestación clínica de la remodelación defectuosa (patologías hipóxicas), a diferencia de los linfocitos T_H17. Por otra parte, la IL-18, potencia la secreción de IFN- γ y esta a su vez induce mayor secreción de TGF- β 1 por las dNK [8,12] (Figura 4 B). Estos resultados son el reflejo de la alteración inmunológica que podría ser importante en la falla de la remodelación vascular.

Como se mencionó anteriormente, a todas las pacientes del estudio, tanto caso como controles, se les realizó una cinética de los tres trimestres del embarazo y en el momento del parto. En ambos grupos se desarrollaron patologías hipóxicas. En la población con IP normal, se registraron 3 casos de PE y 3 casos de PE. Y en la población con IP alterado, también se registraron 3 casos de PE y el doble de casos para RCF. Cabe destacar que ninguna de las pacientes desarrolló ambas patologías.

En todas las paciente que manifestaron PE ó RCF, se analizaron tanto las poblaciones T_H1 T_H2, T_H 17 y las células CD4⁽⁻⁾ productoras de IFN- γ por citometría de flujo, como la concentración plasmática de IL-18 y TGF- β 1. En la Tabla 2, se muestran los resultados de las pacientes con IP alterado que desarrollaron PE o RCF. Tanto las pacientes con PE como las con RCF presentaron un aumento en la frecuencia de las poblaciones T_H1 Pareciera ser que el aumento de los perfiles secretores de IFN- γ , son un precedente para el desarrollo de estas patologías, debido a que el número de casos es pequeño, estos resultados pueden ser datos pre-eliminarios para estudios a futuros. En cuanto la población T_H17 representada por su citoquina icono IL-17A, sólo las pacientes que desarrollan PE presentaron mayor nivel de detección, respecto a la pacientes control, datos acordes a literatura [24]. El aumento del perfil T_H17, se presenta una vez instaurada la enfermedad.

Por otra parte, al analizar la concentración plasmática de citoquinas IL-18 y TGF- β 1 de las pacientes con IP alterado. Presentaron un aumento significativo para ambas citoquinas en las pacientes con PE. Reportes asocian el aumento de TGF- β 1 con PE [44,45,46] y también

son acordes a los resultados no publicados del laboratorio. Además en las pacientes con RCF, se observó solo un aumento significativo de la IL-18. Por lo tanto, a pesar de ser 2 entidades propias del embarazo, que nacen de la misma patogenia pro inflamatoria, los mecanismos desencadenante aparentemente son distintos. En cuanto a las pacientes con IP normal (Tabla 3) que manifestaron PE ó RCF, no se manifiesta el patrón observado en la población anterior, ya que no se observan cambios significativos en la frecuencia de ninguna de las subpoblaciones analizadas, sugiriendo que podemos estar frente a subgrupo de pacientes diferentes.

Finalmente, en pacientes con IP normal y PE, se observó un aumento significativo en la concentración de IL-18 y TGF- β 1. Sin embargo, IL-18 es mucho más alta las pacientes con IP alterado, sugiriendo que el aumento de TGF- β 1, es característico de las pacientes que desarrollan PE, pero que el aumento de IL-18 podría estar restringido a mujeres que desarrollan alteraciones precoces en la remodelación vascular, pudiendo esta alteración ser compensada o no durante el desarrollo de la implantación.

Con los datos expuestos, se concluye que la falla de la remodelación vascular, no es solo un proceso inflamatorio, como se describe en la literatura [8,12]. Los resultados de este trabajo plantea que existen al menos 2 grandes grupos que producen falla en la remodelación vascular: uno dependiente de la vía clásica inflamatoria medida por IFN- γ , y por consiguiente alteración en el IP del Doppler de las arterias uterinas y otro grupo de pacientes independiente de IFN- γ , no inflamatoria que por una vía distinta, genera patología hipóxica, no asociada al Doppler de las arterias uterinas. El peso corporal materno, es un factor de riesgo importante para orientar que tipo de vía tendrá la paciente si desarrollo PE o RCF. A medida que aumenta el peso corporal, más riesgo de desarrollar una falla en la remodelación vascular vía inflamatoria dependiente de IFN- γ y no así en las pacientes con normopeso que si desarrollan patología hipóxica, será por una vía independiente de IFN- γ . En la práctica clínica, todas las pacientes embarazadas tienen riesgo de desarrollar PE, RCF, parto prematuro, etc. Pero es interesante saber que no necesariamente son los mismos estímulos que producen estas patologías y tampoco las mismas vías.

El estudio de la inmunología del embarazo y la correcta remodelación vascular, se pueden ver afectados por la intervención de factores ambientales, genéticos y poblacionales, además de su etiología multifactorial de diversas patologías que derivan de una hipoxia placentaria secundaria a una remodelación vascular defectuosa, los cuales claramente pueden ser los responsables por las divergencias de hallazgos en la literatura [9,10,12]. A pesar de este desafío, resultados indican que existe una regulación inmunológica durante el embarazo fisiológico. Esta regulación se evidencia en este trabajo ya que a partir de la dinámica de los perfiles linfocitarios T_H1 , T_H2 , T_H17 , la población $CD4^{(-)}$ $IFN-\gamma^{(+)}$ y la concentración de citoquinas solubles en plasma como la IL-18 y TGF- β 1, existen 2 patrones que podrían desarrollar patologías hipóxicas, a pesar que el número de pacientes es bajo, estos datos pueden ser pre-eliminarios para estudios futuros que son necesarios para una mejor comprensión del rol del sistema inmune en la etiología y fisiopatología de la remodelación vascular.

Bibliografía

1. Bouteiller P., Tabiasco J, Parinaud J. Soluble HLA-G and embryo implantation: frequently asked questions. *Gynecol Obstet Invest.* 2007;64(3):134-7.
2. Sarah A. Robertson, Leigh R. Guerin, Lachlan M. Moldenhauer, John D. Hayball. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy — the contribution of seminal fluid. *Journal of Reproductive Immunology* 83 (2009) 109–116.
3. Moore Keith L., Dailey Arthur F., Agur Anne M.R . (2013). *Anatomía con orientación clínica.* Barcelona: Lippincott Williams e Wilkins.
4. Netter Frank H. (2003). *Atlas de Anatomía Humana.* Barcelona: Masson.
5. Parra Mauro. Utilidad de la flujometría doppler en obstetricia. *Hosp Clínico Universidad de Chile.* 2015;1–65.
6. Zhang S, Lina H, Konga S, Wanga S, Wanga H. and Armant, D.R. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular Aspects of Medicine* 2013; 34(5):939-80.
7. Washintong Muñoz Agüero (2005). *Obstetricia Fisiológica.* Departamento de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina. Universidad de Concepción.
8. Tessier DR, Yockell-Lelievre J, Gruslin A. Uterine spiral artery remodeling: the role of uterine natural killer cells and extravillous trophoblasts in normal and high-risk human pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2014. doi:10.1111/aji.12345

9. Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. – A review. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(8):584-94. doi: 10.1038/nri1897.
10. Erlebacher, A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nature Reviews Immunology* 2013; 13: 23-33.
11. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006; 12(9):1065-1074.
12. Erlebacher, A. "Immunology of the maternal-fetal interface." *Annu Rev Immunol*. 2013; 31: 387-411.
13. Bulmer JN, Lash GE. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Mol Immunol* 2005; 42:511–521
14. Schminkey DL, Groer M. Imitating a stress response: A new hypothesis about the innate immune system's role in pregnancy. *Medical Hypotheses*. 2014;82(6):721-9.
15. Ishitani A, Sageshima N, Hatake K. The involvement of HLA-E and -F in pregnancy. *J Reprod Immunol* 2006; 69(2):101-113.
16. Chiossone L, Vacca P, Orecchia P, et al. In vivo generation of decidual natural killer cells from resident hematopoietic progenitors. *Haematologica*. 2014;99(3):448-457. doi:10.3324/haematol.2013.091421.
17. Mjosberg J, Berg G, Jenmalm MC, Ernerudh J.. FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biol. Reprod*. 2010; 82:698–705

18. Sasaki Y, Darmochwal Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, et al. Proportion of peripheral blood and decidual CD4+ CD25bright regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin. Exp. Immunol.* 2007; 149:139–45
19. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.* 2004; 10:347–53
20. Nakashima A, Ito M, Shima T, Bac ND, Hidaka T, Saito S. Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 64:4–11
21. Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med* 2005; 201(7):1025-1029.
22. Moffet AC. Metastatic thymoma and acquired generalized myasthenia gravis in a beagle. *Can Vet J* 2007; 48(1):91-93.
23. Redline RW. Villitis of unknown etiology: noninfectious chronic villitis in the placenta. *Hum. Pathol.* 2007; 38:1439–46
24. Warning JC, McCracken S A and Morris JM. A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. *Reproduction* (2011) 141 715–724
25. Hanna J, Mandelboim O. When killers become helpers. *Trends Immunol* 2007; 28(5):201-206.

26. Saito S, Shima T, Nakashima A, Shiozaki A, Ito M, Sasaki Y. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2007;24(9):379-386. doi:10.1007/s10815-007-9140-y.
27. Kämmerer U, Schoppet M, McLellan AD, Kapp M, Huppertz HI, Kämpgen E, Dietl J. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83 (+) dendritic cells. *Am J Pathol*. 2000;157(1):159-69. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64527-0
28. Kämmerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, Dietl J, van Kooyk Y, Kämpgen E. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol*. 2003;162(3):887-96. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63884-9.
29. Laskarin, G., Kämmerer, U., Rukavina, D., Thomson, A. W., Fernandez, N., & Blois, S. M. (2007). Antigen-Presenting Cells and Materno-Fetal Tolerance: An Emerging Role for Dendritic Cells. *American journal of reproductive immunology*, 58(3), 255-267.
30. Tantbirojn P, Crum CP, Parast MM: Pathophysiology of placenta creta: the role of decidua and extravillous trophoblast. *Placenta* 2008; 29:639–645
31. Wallace AE, Cartwright JE, Begum R, Laing K, Thilaganathan B, Whitley GS: Trophoblast-induced changes in C-x-C motif chemokine 10 expression contribute to vascular smooth muscle cell dedifferentiation during spiral artery remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33:e93–e101.

32. Toldi, G., Rigo Jr., J., Stenczer, B., Vasarhelyi, B., Molvarec, A. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* (2011) 66, 223–229.
33. Banerjee, S.; Smallwood, A.; Moorhead, J.; Chambers, A.E.; Papageorghiou, A.; Campbell, S. and Nicolaides, K. “Placental expression of interferon- γ (IFN- γ) and its receptor IFN- γ R2 fail to switch from early hypoxic to late normotensive development in preeclampsia”. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90: 944–952.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.

38. Martínez-García EA, Chávez-Robles B, Sánchez-Hernández PE, Nuñez-Atahualpa L, Martín-Márquez BT, Muñoz-Gómez A, González-López L, Gámez-Nava JI, Salazar-Páramo M, Dávalos-Rodríguez I, Petri MH, Zúñiga-Tamayo D, Vargas-Ramírez R, Vázquez-Del Mercado M. IL-17 Increased in the third trimester in healthy women with term labor. *Am J Reprod Immunol* 2011; 65: 99–103. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00893.x
39. 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.
40. 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⁺ regulatory T cells in women with idiopathic recurrent pregnancy loss”. *Hum. Reprod.* 2011; 26(11): 2964-2671.
41. 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.
42. Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury J, Sharma S. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol*. 2000 Jun 1;164(11):5721-8
43. Raghupathy R. “Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm”. *Semin Immunol*. 2001;13(4): 219-227.
44. 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.
45. Feizollahzadeh, S.; Taheripannah, R.; Khani, M. and Farokhi, B. "Promoter region polymorphisms in the transforming growth factor beta -1 (TGF- β 1) gene and serum TGF- β 1 concentration in preeclámptico and control Iranian women". *J. Reproductive Immunology*. 2012; 94: 216-221.
 46. 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.
 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. 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.
 49. Haider S. and Knöfler, M. "Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium". *Placenta*. 2009;30(2):111-23.
 50. 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

51. 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.
52. Cackovic; M.; Buhimschi; C.; Zhao; B.; Funai; E.; Norwitz; E.; Kuczynsk; E.; Lockwood; C. and Buhimschi; I. "Fractional Excretion of Tumor Necrosis Factor- α in Women With Severe Preeclampsia". *Obstet Gynecol.* 2008; 112 (1): 93–100.
53. 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.
54. Ball E, Bulmer JN, Ayis S, Lyall F, Robson SC: Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *J Pathol* 2006; 208:535–542.
55. Gao L, Zhang JP, Chen H, Zhang SN, Chen LB, Tan JP, Liu ML, Meng LL, Wang YH, Zhang R, Liu YL, Cai WB: Characteristics of immune cell changes before and after immunotherapy and their clinical significance in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Genet Mol Res* 2014; 13:1169–1178.
56. Clinical evaluation of a first trimester algorithm predicting the risk of hypertensive disease of pregnancy. Felicity j. park, Constance H.y. Leung, Leona C.Y. Poon Paul F. williams, Samantha J. Rothwell and Jon A. Hyett. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2013.
57. 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.

58. ISUOG Practice Guidelines: use of Doppler ultrasonography in obstetrics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41: 233–239 Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/uog.12371

59. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ: British Medical Journal*. 2005;330(7491):565. doi:10.1136/bmj.38380.674340.E0.

60. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E, Roka R, Scherthaner G. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jun 1;23(6):1042-7. doi: 10.1161/01.ATV.0000073313.16135.21

61. DuPage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease- A review. *Nature Reviews Immunology*. 2016;16(3):149-63. doi: 10.1038/nri.2015.18

Anexo 1

ACTA DE APROBACION N° 57

SANTIAGO, Diciembre del 2012.

El Comité Ético Científico para Investigación Biomédica (CECeI) en Seres Humanos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Prof. Verónica Anguita Mackay, Académico, Facultad de Medicina. (no asiste)
Dra. Gloria López Stewarts, Médico Endocrinólogo.
Dra. Ana María Madrid S. Médico Gastroenterólogo, Secretaria.
Dra. Teresa Massardo Vega, Médico, Medicina Nuclear. (no asiste)
Dr. Antonio Morales Barria, Médico Gastroenterólogo.
Dr. Juan Carlos Prieto D. Farmacología Clínica.
Srta. Rina Sepúlveda A. Abogado.
Dr. Juan Jorge Silva Solis, Médico Cirujano, Presidente.
Dr. Sergio Valenzuela P. Médico Ginecoobstetra. (no asiste)
Dr. Guillermo Watkins S. Médico Cirujano.

Ha analizado el proyecto denominado: "Papel de marcadores inmunológicos y de inflamación como prueba de cribado de preeclampsia en el primer trimestre del embarazo", cuyo investigador principal es el **Dr. Mauro Parra C.** Departamento Obstetricia y Ginecología, Hospital Clínico Universidad de Chile.

Para este efecto tuvo a la vista los siguientes documentos:

- Solicitud de evaluación del proyecto de investigación por Comité de Ética.
- Currículo del investigador.
- Consentimientos informados (2).
- Resumen ejecutivo.
- Formulario Fondecyt 2013.

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buenas Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité Ético Científico para Investigación Biomédica en Seres Humanos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

a) Carácter de la población estudiada:

Pacientes ambulatorias que acudan a control ecográfico a las 11 a 14 semanas de gestación.

b) Utilidad del Proyecto:

Entender de mejor forma la fisiopatología de la enfermedad.

c) Riesgos:

Mínimos, leve molestia en la toma de muestra sanguínea.

d) Beneficios:

Podría desarrollar un modelo de pesquisa precoz de preeclampsia en mujeres chilenas.

e) Confidencialidad del estudio:

El investigador principal asegura la confidencialidad de los datos.

f) Notificación oportuna de reacciones adversas:

El investigador principal se compromete a informar todos los eventos adversos, y aquellos que se catalogan como serios dentro de las 72 horas de ocurridos.

g) El investigador responsable se compromete a comunicar el resultado del estudio.

h) El investigador responsable se compromete a enviar semestral y/o anual el informe del estudio.

Por lo tanto el Comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

El investigador ha dado respuestas satisfactorias a la solicitud del Comité.

Los consentimientos informados cribado y transversal son adecuados en forma y fondo por lo tanto se timbran, firman y fechan.

- Se adjunta nómina de los integrantes del Comité.

- Se adjunta Declaración de Cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas.

En virtud de las consideraciones anteriores, el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, el **05 de Diciembre del 2012**.



DR. JUAN JORGE SILVA SOLIS
PRESIDENTE
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
HOSPITAL CLINICO U. DE CHILE

22 MAYO 2013

Unidad de Medicina Fetal
Hospital Clínico Universidad de Chile
Consentimiento informado para participar en un estudio de investigación
Fondecyt 11.30668



PAPEL DE MARCADORES INMUNOLOGICOS Y DE INFLAMACION COMO PRUEBA DE CRIBADO DE PREECLAMPSIA EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO

La invitamos a participar en un estudio de investigación. Es importante que lea y comprenda este consentimiento y que tenga en cuenta que su participación es absolutamente voluntaria. Si acepta formar parte de este estudio, también puede retirarse en cualquier momento.

En este consentimiento se explica el objetivo del estudio y los potenciales beneficios y riesgos. Lea cuidadosamente esta información, si desea puede conversarlo con su familia y/o médico tratante. Si requiere cualquier información extra, por favor contáctese con el coordinador del estudio, Dr. Mauro Parra C. a los teléfono 978 8881 o 978 8880.

¿Por qué estamos haciendo este estudio?

Durante el embarazo se pueden producir algunas enfermedades originadas por un mal funcionamiento de la placenta. La placenta es el órgano encargado de entregar nutrientes y oxígeno al feto. Dentro de estas enfermedades está la preclampsia y la restricción del crecimiento fetal. Las mujeres con preclampsia tienen una presión sanguínea alta y muchas veces deben ser hospitalizadas. En los casos más graves se debe interrumpir el embarazo, para evitar complicaciones en la madre y la guagua.

Hasta hoy no existen tratamientos o formas de prevenir estas enfermedades, sin embargo existe una herramienta que es útil para evaluar el riesgo que tiene cada mujer de desarrollar preclampsia. Este examen se llama Doppler de arterias uterinas, y lo que hace es evaluar el flujo de sangre que va hacia la placenta.

El objetivo de este estudio es encontrar exámenes, que junto al Doppler, ayuden a predecir qué mujeres durante su embarazo desarrollarán preclampsia. Esto, para buscar métodos de prevención y/o tratamiento de esta enfermedad

¿Qué procedimientos se realizarán si acepto participar?

Ud. ha acudido a nuestra Unidad a realizarse una ecografía, la que normalmente se complementa con la realización del Doppler de arterias uterinas. Este examen se realiza a través de la vagina, con un aparato especializado que usa ondas de sonido para visualizar los vasos sanguíneos, el cuello del útero y el bebe. La ecografía se realizará entre 11-14 semanas.

Si acepta participar de este estudio, solo utilizaremos la información clínica obtenida desde una breve entrevista que realizamos a todas nuestras pacientes al ingreso a la Unidad, y que almacenaremos en una base de datos computacional, y la obtenida de la ecografía y el Doppler.

Además, luego de la realización de cada ecografía, le solicitaremos una muestra de sangre (25 cc que equivalen a 5 cucharaditas de té).

Si Ud. tiene a su guagua en nuestro Hospital, es posible que al momento del parto le solicitemos una nueva muestra de sangre. Además, una vez que la guagua nazca y se haya cortado el cordón umbilical, tomaremos muestras de sangre del cordón que queda colgando de la placenta (20 cc o 2 cucharadas soperas). También guardaremos la placenta para analizarla y tomarle muestras. Tanto el

22 MAYO 2013



Unidad de Medicina Fetal
Hospital Clínico Universidad de Chile
Consentimiento informado para participar en un estudio de investigación
Fondecyt : 1130668

cordón umbilical como la placenta, luego del parto son eliminados, por lo que estos procedimientos no traerán ningún riesgo para Ud. o para el bebe.

¿Qué riesgos corre mi guagua o yo?

Doppler. La ecografía y el Doppler no constituyen ningún riesgo para Ud. o para la guagua.

Muestra de sangre. Tal como ocurre cada vez que se toma una muestra de sangre, Ud. puede sentir un pequeño dolor y/o que le aparezca un moretón en el sitio de la punción. Este examen no trae ningún riesgo para la guagua.

Muestras de placenta y cordón umbilical. Estas muestras serán obtenidas una vez que su bebe haya nacido, por lo tanto no implica ningún tipo de riesgo para Ud. o su guagua. La placenta y el cordón umbilical que queda unido a ella, normalmente se eliminan.

¿Estoy obligada a tomar parte de este estudio?

Es absolutamente decisión suya el participar o no en este estudio. Si Ud. decide participar se le entregará esta información escrita y luego se le solicitará firmar el consentimiento informado. Incluso habiendo decidido participar en el estudio, Ud. es libre de abandonarlo en cualquier momento. Esto no afectará en lo más mínimo atención que Ud. recibirá y las muestras que se le hayan tomado serán eliminadas (no serán utilizadas en el estudio).

¿Qué beneficios trae participar en este estudio?

Ud. y su guagua pueden beneficiarse con las ecografías que se le realizarán, sabiendo si la anatomía de su guagua es normal. Puede preguntar por el sexo de su bebe. Si se encontrara que algo no está bien, esta información será utilizada para que reciba el tratamiento que corresponde. Ud. no recibirá dinero por participar de este estudio, pero tampoco incurrirá en gastos adicionales.

¿Será mantenida en forma confidencial la información obtenida en este estudio?

Toda la información obtenida será mantenida en estricta confidencialidad. Además las muestras de sangre y/o placenta son manejadas por un sistema de codificación (se les asigna un número), por lo que su nombre no aparecerá. Estas muestras son almacenadas en lugares especiales y bajo normas de seguridad. Sólo las personas que trabajan en este estudio tienen acceso a ellas y se encuentran bajo la responsabilidad del coordinador del proyecto Dr. Mauro Parra Cordero.

¿Qué sucederá con los resultados obtenidos en este estudio?

Una vez que se complete el estudio, los resultados serán publicados en una revista médica. Nunca se identificará su nombre en relación a los datos obtenidos.

¿Qué pasará en el futuro con la información y las muestras obtenidas?

Ud. ya conoce cuales son los objetivos de este estudio. Lo más probable es que la mayoría de los exámenes se realicen de forma inmediata. Sin embargo, existe la posibilidad que parte de las muestras de sangre y/o placenta sean almacenadas para realizar nuevos estudios en el futuro relacionados con el síndrome de parto prematuro, entre ellos la preeclampsia y restricción de crecimiento fetal.

Es probable que un tiempo después del nacimiento de su guagua, la contactemos telefónicamente para solicitar información relacionada con el embarazo y parto.

Unidad de Medicina Fetal
Hospital Clínico Universidad de Chile
Consentimiento informado para participar en un estudio de investigación
Fondecyt :...1130668

En todo caso, antes de la utilización de sus muestras para un nuevo estudio, debemos necesariamente contar con la autorización del Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, entidad que resguarda sus derechos como participante del estudio.

Si usted optase por retirarse voluntariamente del estudio, le consultaremos si desea mantener o retirar las muestras que hasta la fecha hayan sido obtenidas y almacenadas.

¿Cuáles son mis derechos?

Ud. tiene derecho a solicitar más información al coordinador del proyecto Dr. Mauro Parra Cordero, para esto puede llamar a los teléfonos 978 8880 o 978 8881. De existir alguna complicación derivada de este estudio Ud. no recibirá compensaciones económicas, pero si recibirá una apropiada atención de salud. Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética Científico y de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Cualquier consulta llamar a su Presidente Dr. Juan Jorge Silva Solís al teléfono 9789008.

¿Quién está organizando y financiando esta investigación?

Este estudio está organizado por la Unidad de Medicina Materno Fetal de nuestro Hospital, en colaboración con otro centro asistencial en Santiago, Hospital San Borja Arriarán, y será financiado con fondos provenientes de la Comisión Nacional de Investigación y Tecnología, a través del proyecto de investigación Fondecyt (Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología).

22 MAYO 2013





22 MAYO 201

PAPEL DE MARCADORES INMUNOLOGICOS Y DE INFLAMACION COMO PRUEBA DE CRIBADO DE PREECLAMPSIA EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO

Consentimiento informado del estudio de cribado

Confirme en la caja

1. Confirmando que he leído y entendido la información entregada por este estudio y he tenido la oportunidad de hacer preguntas en relación a éste.
2. Entiendo que mi participación es voluntaria y que soy libre de retirarme en cualquier momento, sin dar razones, sin que mis cuidados antenatales y derechos legales se vean afectados.
3. Estoy de acuerdo de donar sangre con el propósito de la investigación.
4. Estoy de acuerdo que se utilice la placenta después del parto como parte de este proyecto de investigación
5. Estoy de acuerdo en recibir llamadas telefónicas para realizar seguimiento clínico de mi embarazo
6. Estoy de acuerdo en que mi Ficha Clínica sea revisada por los investigadores de este proyecto con el fin de realizar seguimiento clínico

Nombre de la paciente.....Firma.....Fecha.....
RUT.....

Investigador..... Firma.....Fecha.....
RUT.....

Nombre del Delegado del Director o Ministro de Fe:.....
RUT:Firma:.....Fecha.....

Unidad de Medicina Fetal
Hospital Clínico Universidad de Chile
Consentimiento informado para participar en un estudio de investigación
Fondecyt ...1130668

Si la paciente es menor de 18 años, se requiere la firma de los padres

Nombre.....Firma.....

Relación con paciente..... Fecha.....

22 MAYO 2013





MINISTERIO DE SALUD
SERVICIO DE SALUD M.
CENTRAL
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
Teléfono: 5746943
CSS/coa N° 789/12

A

CERTIFICADO

DR. EMILIANO SOTO ROMO, en su calidad de Presidente del Comité Ético-Científico (CEC) del Servicio de Salud Metropolitano Central, constituido por resolución exenta N° 0187 de fecha 12 de mayo de 2006 de la Dirección de dicho Servicio, certifica que en sesión Plenaria del 14 de Noviembre del 2012 presenta su Protocolo el **Dr. Mauro Parra de la Unidad de Medicina Fetal del HCUCH. Investigador Principal del Protocolo. "Papel de marcadores inmunológicos y de inflamación como prueba de cribado de preeclampsia en el primer trimestre del embarazo"**

Se acusa recibo de los siguientes documentos:

Protocolo de estudio clínico sin foliar, sin fecha y sin versión.
Consentimiento informado general (2)

Analizados los documentos y la presentación del Dr. Parra este CEC-SSMC acuerda lo siguiente:

Aprueba:

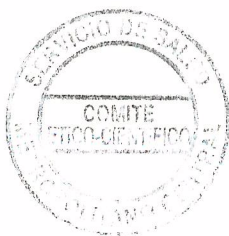
Protocolo de estudio clínico.

Se solicita al Investigador: foliar el documento y agregar al pie de página fecha y versión.

Se informa al investigador que los consentimientos informados se dejan pendientes de revisión hasta obtener respuesta del Fondecyt.

Se adjunta carta enviada por el investigador, firmada, fechada y timbrada.

La sesión plenaria de fecha 14 de Noviembre, contó con la asistencia de la Sra. Blanca Campos, Sra. Margarita Valdés, Sra. Victoria Soto, Sra. Carmen Salazar, Srta. Paulina Martínez. Dr. Víctor Hanna, Dr. Oscar Valderrama, Dr. Jaime Bitrán y el Dr. Emiliano Soto quien presidió la sesión



A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

**DR. EMILIANO SOTO RÓMO
PRESIDENTE CEC**

SERVICIO DE SALUD METROPOLITANO CENTRAL

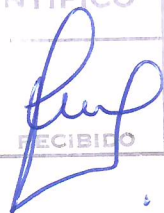
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carmen Salazar Salgado'.

**E.U. CARMEN SALAZAR SALGADO
SECRETARÍA EJECUTIVA CEC**

SANTIAGO, Noviembre 14 de 2012.
Dirección Servicio de Salud Metropolitano Central
Victoria Subercaseaux # 381, Santiago, Chile.

② Decree 14/11/12 F2 F

UNIDAD DE MEDICINA FETAL
DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA
HOSPITAL CLINICO UNIVERSIDAD DE CHILE

COMITE ETICO CIENTIFICO	
Nº 1265	
FECHA 03/09/2011	
RECIBIDO	

Santiago, 28 Agosto 2012

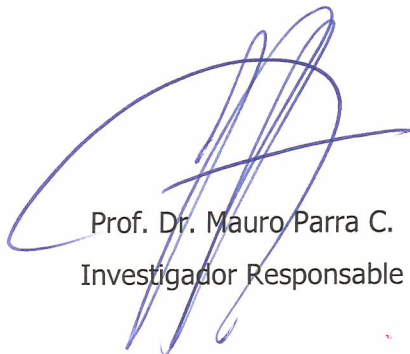
Profesores - OK
CIF (2) Aced.

Dr. Emiliano Soto Romo
Presidente de Comité de Etica-Científico (CEC)
Servicio de Salud Metropolitano Central
PRESENTE

Estimado Dr. Soto

Por intermedio de la presente carta adjunto para vuestro análisis el proyecto de investigación presentado al concurso Fondecyt Regular 2013 titulado: "PAPEL DE MARCADORES INMUNOLOGICOS Y DE INFLAMACION COMO PRUEBA DE CRIBADO DE PREECLAMPSIA EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO", para vuestro análisis.

Esperando una grata acogida se despide atentamente de usted,


Prof. Dr. Mauro Parra C.
Investigador Responsable


14/11/12
