



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL HIF- α Y DE
POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS AL
DESARROLLO DE PREECLAMPSIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOMÉDICAS)

P R E S E N T A :
M. EN C. SONIA NAVA SALAZAR

TUTOR: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES



MÉXICO, D. F.

JUNIO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología de la Reproducción, del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes en colaboración con el Dr. Juan Fernández Romero Arauz y el Dr. Carlos Moran Villota del Servicio de Complicaciones Hipertensivas del Embarazo del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala" del Instituto Mexicano del Seguro.

*Gracias a todas las mujeres con Preeclampsia y con Embarazos
Normales por donar una muestra, sin ellas este
trabajo no se hubiera llevado a cabo*

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL HIF- α Y DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS AL DESARROLLO DE PREECLAMPSIA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes en el laboratorio de Biología de la Reproducción, del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Martha Patricia Ostrosky Wegman	Instituto Nacional de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Alfonso León del Río	Instituto Nacional de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dr. Juan Fernando Romero Arauz, Dr. Carlos Moran Villota, al grupo de médicos, enfermeras y residentes del 5to. Sur del Hospital de Ginecología y Obstetricia No.4 “Luis Castelazo Ayala” del IMSS por su apoyo en la obtención de las muestras de la pacientes.

Se reconoce a la Dra. C. Adriana Mendoza Rodríguez por la asesoría en la realización de los experimentos y revisión de los artículos.

Se reconoce a la Dra. Elly N. Sánchez Rodríguez por el apoyo en la obtención de muestras para la realización de este proyecto.

Se reconoce al Dr. Ignacio Camacho Arroyo por la revisión del artículo derivado de esta tesis.

Se reconoce al personal administrativo del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas: Eva, Zenaida y Angélica por su apoyo y paciencia en la realización de los trámites.

El proyecto fue apoyado por CONACyT (80338) y DGAPA-PAPIIT (IN219710).

Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT (49796) para la realización de la presente tesis.

Reconozco y agradezco ampliamente las críticas y comentarios de los miembros del Jurado de Examen Doctoral que estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Emilio Rojas del Castillo	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Felipe Vadillo Ortega	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dra. María Cristina Fernández	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dra. Elizabeth Langley McCarron	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

***E studio de la regulación del $HLF-\alpha$ y de
polimorfismos genéticos asociados al desarrollo de
preeclampsia***

Índice

	Página
Índice de Figuras	I
Índice de tablas	II
Abreviaturas	III
Resumen	VI
Abstract	VIII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1. Preeclampsia	
2.1.1. Definición	4
2.1.2. Epidemiología y factores de riesgo	4
2.1.3. Diagnóstico clínico	5
2.1.4. Etiología	7
2.1.5. Hipótesis de la isquemia placentaria	7
2.2. Placentación	
2.2.1. Factores angiogénicos y el Factor inducido por hipoxia	10
2.2.2. Desbalance de factores angiogénicos y anti-angiogénicos en la preeclampsia	11
2.3. Factor inducido por hipoxia	
2.3.1. Estructura de las isoformas de HIF- α	12
2.3.2. Regulación de HIF- α dependiente de oxígeno	14

2.3.3. Polimorfismos del gen <i>HIF1A</i>	15
3. Planteamiento del problema	17
4. Objetivos	18
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos particulares	18
5. Metodología	19
5.1. Población de estudio	19
5.2. Determinación de los polimorfismos C1772 y G1790A del gen <i>HIF1A</i>	19
5.2.1. Extracción del DNA y cuantificación	20
5.2.2. Amplificación específica del exón 12 del gen <i>HIF1A</i> por medio de PCR	21
5.2.3. Secuenciación	21
5.3. Estudio de las proteínas que participan en la degradación de HIF- α dependiente de oxígeno	22
5.3.1. Extracción de proteína de placenta y cuantificación	22
5.3.2. Western Blot	23
5.3.3. Co-inmunoprecipitación del complejo VEC con actividad de ligasa de ubiquitina	24
5.4. Análisis estadístico	25
6. Resultados	26
6.1. Estudio de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen <i>HIF1A</i>	26

6.2.	Estudio de la expresión de las proteínas que participan en la degradación de HIF- α dependiente de oxígeno	27
7.	Discusión	36
7.1.	Factores de riesgo asociados al desarrollo de PE en población Mexicana	36
7.2.	Frecuencias de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen <i>HIF1A</i> en población Mexicana y su posible relación con PE	38
7.3.	Cambios en la expresión de las proteínas que participan en la degradación de HIF- α dependiente de oxígeno en pacientes con PE	40
8.	Conclusiones	45
9.	Perspectivas	46
10.	Referencias	47
11.	Anexos	54
A	Publicación: Polymorphisms in the Hypoxia-Inducible factor 1 alpha gene in Mexican patients with preeclampsia: A case-control study	54
B	Publicación: Persistence of decidual NK cells and KIR genotypes in healthy pregnant and preeclamptic women: a case-control study in the third trimester of gestation	55
C	Publicación: Estado actual de la preeclampsia en México: de lo epidemiológico a sus mecanismos moleculares	56
D	Publicación: Immune-endocrine alterations during preeclampsia	57

Índice de figuras

Figura		Página
1	Remodelación de las arterias en espiral en un embarazo normal y en PE	9
2	Dominios y estructura de las isoformas del factor de transcripción HIF- α	13
3	Regulación de HIF- α dependiente de oxígeno y localización de los polimorfismos en el gen <i>HIF1A</i>	16
4	Expresión diferencial de las proteínas HIF-1 α y HIF-2 α .	32
5	Expresión diferencial de PHD1, PHD2 y PHD3.	33
6	La expresión de la enzima FIH esta incrementada en la placenta de mujeres con PES.	34
7	pVHL disminuye su expresión en placentas de mujeres con PEL y PES.	34
8	Interacción del complejo E3 con actividad de ligasa de ubiquitina con HIF- α en la placenta de mujeres con EN, PEL y PES.	35

Índice de tablas

Tabla		Página
1	Criterios de diagnóstico de PE	6
2	Características clínicas y demográficas de la población seleccionada para el estudio de los polimorfismos del gen <i>HIF1A</i>	29
3	Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen <i>HIF1A</i> en pacientes con PE y el grupo control	30
4	Características clínicas y demográficas de los grupos para el estudio de la expresión de proteínas de la vía de degradación dependiente de oxígeno	31

Abreviaturas

μg	Microgramos
μL	Microlitro
μM	Micromolar
A	Alanina
Ala	Alanina
ANG	Angiopoyetinas
C	Celsius
D.O.	Densidad óptica
DHL	Deshidrogenasa láctica
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Eng	Endogлина
EPO	Hormona eritropoyetina
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FIH	Del inglés asparagyl-hydroxylase-factor-inhibiting HIF-1
Flt-1	Tirosina 1 tipo fms
Hg	Mercurio
HIF	Factor inducido por hipoxia
Hrs	Horas
IC	Intervalo de confianza
IMC	Índice de Masa Corporal
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
KDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramo
L	Litro
m	Metro

mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
N.D.	No determinada
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NO	Oxido nítrico
ODDD	Dominio de degradación dependiente de oxígeno
P	Prolina
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PAS	Per/Arnt/Sim
pb	Pares de base
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Preeclampsia
PEL	Preeclampsia leve
PES	Preeclampsia severa
PHD	Hidroxilasas de un residuo de prolina
PIGF	Factor de crecimiento placentario
Pro	Prolina
PVDF	Polivinildifluoruro
pVHL	Proteína von Hippel-Lindau
Rbx1	RING box protein 1
RCIU	Restricción en el crecimiento intrauterino
r.p.m.	Revoluciones por minuto
S	Serina
SDG	Semanas de gestación

SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
Ser	Serina
SSA	Secretaria de Salud
T	Treonina
TAD	Dominio de transactivación
TBE	Tris - boratos – EDTA
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TGO	Transaminasa glutámico-oxalacética
TGP	Transaminasa glutámico-pirúvica
Thr	Treonina
U	Unidad
U.V.	Luz ultravioleta
VCB	Complejo pVHL-elongina C-elongina B
VEC	Complejo VCB unido con la proteína Cul2
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor del Factor de crecimiento del endotelio vascular
Y	Tirosina

Resumen

Abstract

Resumen

La preeclampsia (PE) es una de las complicaciones más severas del embarazo, se caracteriza clínicamente por hipertensión arterial, compromiso multisistémico y/o proteinuria después de la semana 20 de gestación. Su etiología es aún desconocida, sin embargo, trabajos recientes sugieren que existen cambios en el balance de factores angiogénicos y anti-angiogénicos, tanto en la placenta como en circulación periférica de mujeres con PE, y que tienen un papel clave en su patogénesis. En el trofoblasto de mujeres con PE se ha observado que el Factor inducido por hipoxia alfa (HIF- α) está sobreexpresado, así como algunos de sus genes blanco que se han asociado al desarrollo de PE, principalmente factores anti-angiogénicos e inhibidores de la diferenciación del trofoblasto; por lo que el estudio de su regulación ha tomado un gran interés en esta patología.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar tanto factores genéticos como moleculares que modifican la expresión de HIF- α y su asociación al desarrollo de la PE; primero analizamos la presencia de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen *HIF1A*, los cuales se han asociado a un incremento en su expresión, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional, en comparación con la isoforma normal. Por otro lado estudiamos la expresión de proteínas que participan en una de las principales vías que regulan negativamente a este factor de transcripción. Esta vía dependiente de oxígeno involucra procesos de poliubiquitinación que determinan su degradación.

El análisis de los polimorfismos genéticos se realizó mediante un estudio de casos y controles. Los resultados indican que existe una frecuencia muy baja de estos polimorfismos en población mexicana y por otra parte los datos sugieren que no existe una correlación entre estos polimorfismos y el desarrollo de la PE.

Interesantemente, cuando estudiamos la expresión de las proteínas que participan en la degradación de HIF- α dependiente de oxígeno, encontramos una expresión diferencial de las proteínas HIF-1 α , HIF-2 α , PHD3, PHD2, PHD1 y FIH en la placenta de mujeres con PE severa (PES), PE leve (PEL) y con embarazo normal (EN). La expresión de HIF-1 α se

encontró aumentada en la placenta de mujeres con PEL y PES. Para las proteínas HIF-2 α , PHD3 y FIH, su expresión esta incrementada significativamente, solo en la placenta de mujeres con PES, en comparación con el grupo de mujeres con PEL y con EN. La expresión de pVHL mostró una disminución significativa en la placenta de mujeres con PEL y PES. El análisis de la interacción de HIF-2 α con el complejo E3 con actividad de ligasa de ubiquitina mostró una asociación similar en la placenta de los grupos estudiados, indicando que el complejo se esta formando y uniendo a HIF-2 α , siendo este último, susceptible a poliubiquitinación y degradación.

En su conjunto nuestros resultados sugieren que la expresión de HIF-2 α podría estar regulada negativamente por este mecanismo de degradación, sin embargo debido a las condiciones de oxígeno de las placentas de mujeres con PE, podría no ser eficiente y no compensa la sobreexpresión de este factor de transcripción. La diferencia en los patrones de expresión de las proteínas involucradas en esta vía, principalmente entre la placenta de mujeres con PES y PEL, podrían estar relacionadas con el progreso y severidad de la enfermedad.

Abstract

Preeclampsia (PE), one of the most severe complications of pregnancy after 20 weeks of gestation, is clinically characterized by hypertension, multisystemic dysfunction and/or proteinuria. Although its etiology is still unknown, recent works suggest that in women with PE the different balance between angiogenic and anti-angiogenic factors compared to that found in women with normal pregnancies, both in the placenta and in peripheral circulation, have a key role in this pathogenesis. In the trophoblast of women with PE, an overexpression has been observed in the hypoxia-inducible factor alpha (HIF- α), as well as in some of its target genes associated with the development of PE. Among the latter, particularly important are anti-angiogenic factors and inhibitors trophoblast differentiation. Hence, the study of the regulation of such genes and their corresponding molecules has taken a keen interest in the study of this disease.

The aim of this study was to examine both genetic and molecular factors that modify the expression of HIF- α , and to evaluate the association of this factor with the development of PE. Firstly, we analyzed the presence of the C1772T and G1790A polymorphisms of the *HIF1A* gene, as they have been associated with an increased expression, compared with the wild type isoform, at both the transcriptional and post-transcriptional level. Secondly, we studied the expression of proteins involved in a major pathway that negatively regulates this transcription factor. This oxygen-dependent pathway involves polyubiquitination processes that determine the degradation of these proteins.

The genetic analysis of the polymorphisms was performed by using a case-control. The results indicate a very low frequency of these polymorphisms in the Mexican population. On the other hand, the data suggest that there is no correlation between these polymorphisms and the development of PE.

Interestingly, when we studied the expression of proteins involved in the oxygen-dependent degradation of HIF- α , we found a differential expression of HIF-1 α protein, HIF-2 α , PHD3, PHD2, PHD1 and FIH in the placenta women with severe PE (PES), mild PE (PEM) and

normal pregnancy (NP). Whereas the expression of HIF-1 α was higher in the placenta of women with PEM and PES, the expression of HIF-2 α , PHD3 and FIH proteins was only significantly higher in the placenta of women with PES, compared with the group of women with PEM and EN. pVHL expression was significantly lower in the placenta of women with women with PEM and PES compared to those with normal pregnancies. A similar pattern was found in relation to the interaction of HIF-2 α with the E3 ubiquitin-protein ligase complex in the placenta of the different groups of women. That is, this complex is formed and joining to HIF-2 α , thus leading to a polyubiquitination and degradation of this factor.

Overall, our results suggest that the expression of HIF-2 α could be negatively regulated by this mechanism of degradation. However, due to hypoxic conditions in the placentas of women with PE, this degradation may not be efficient, and thus does not compensate for the over-expression of this transcription factor. The difference in the expression patterns of proteins involved in this pathway, principally between the placenta of women with PES and PEM, may be associated with the progression and severity of the disease.

1. / ntroducción

1. Introducción

Los trastornos hipertensivos del embarazo afectan a un 5-10% de las mujeres y constituyen una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad materna, fetal y neonatal, tanto en países desarrollados como en los subdesarrollados. La preeclampsia (PE) se considera uno de los trastornos más graves y a pesar del continuo esfuerzo en el entendimiento de su etiología, constituye siendo un enigma y un reto en cuanto a su diagnóstico y tratamiento para el área clínica.

La PE se define como un síndrome que se presenta después de la semana 20 de gestación, se caracteriza clínicamente por la presencia de hipertensión acompañada de proteinuria; diversos estudios señalan que alteraciones en la desarrollo de la placenta, se relacionan directamente con la fisiopatología de la PE.

La placenta es un órgano transitorio que se encarga del intercambio de nutrientes, gases y desechos entre el sistema materno y fetal; para que estos procesos se realicen de forma adecuada, es necesario el establecimiento de una compleja red vascular entre ambos sistemas. Una etapa crucial en la formación del sistema vascular, es la invasión del trofoblasto, tipo celular de la placenta, hacia el tejido uterino; lo cual tiene como objetivo anclar la placenta al útero, regular la secreción de hormonas, modular la angiogénesis de la decidua y remodelar las arterias en espiral. Este último proceso es necesario para incrementar el flujo sanguíneo de la madre hacia el feto, satisfaciendo de esta manera, las demandas metabólicas para su desarrollo a lo largo del embarazo.

En la formación de esta compleja red vascular participan una gran variedad de moléculas, tal es como factores de crecimiento, proteasas, citocinas y factores angiogénicos, los cuales juegan un papel crucial en este proceso. Los factores angiogénicos participan principalmente durante las primeras 8 semanas del embarazo, etapa que se desarrolla en condiciones de hipoxia, en estas condiciones, se activa el factor inducido por hipoxia alfa (HIF- α), el cual es un factor de transcripción que regula directamente la transcripción de los factores

angiogénicos; conforme aumenta la edad gestacional y la concentración de oxígeno, HIF- α y sus genes blanco, disminuyen su expresión, favoreciendo la maduración del trofoblasto.

En la placenta de mujeres con PE, se ha encontrado una sobreexpresión de HIF- α y algunos de sus genes blanco, principalmente factores anti-angiogénicos e inhibidores de la diferenciación del trofoblasto. En mujeres con PE se ha observado, no solo en tejido placentario, sino también en sangre periférica, una disminución de los factores angiogénicos y aumento de factores anti-angiogénicos, lo cual se ha relacionado con el fenotipo observado en las placentas de estas pacientes, que se caracterizan por una remodelación de las arterias en espiral inadecuada, debido a un trofoblasto inmaduro.

Se ha propuesto que el desbalance de factores angiogénicos y anti-angiogénicos es una de las principales causas del desarrollo de PE y al ser HIF- α el principal regulador de dichos factores, el estudio de su regulación y su relación con la PE, ha cobrado un enorme interés.

El gen *HIF1A* es altamente polimórfico y la presencia de las variantes C1772T y G1790A se han asociado con un aumento en su transcripción y en la síntesis de su proteína. En diversos estudios, donde se evalúan la frecuencia de estos polimorfismos en enfermedades donde HIF- α se encuentra involucrado, han encontrado una correlación positiva entre la presencia de estas variantes y la patología estudiada. Por lo que en este trabajo exploramos si la presencia de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen *HIF1A* pueden ser un factor de riesgo para el desarrollo de este trastorno hipertensivo en población Mexicana.

Posteriormente, estudiamos una de las principales vías que se encarga de regular negativamente la expresión de HIF- α , la cual es a través de su poliubiquitinación y posterior degradación, dependiente de oxígeno; y debido a que en el desarrollo placentario, la concentración de este elemento juega un papel clave, es importante evaluar esta vía y su implicación en el desarrollo de la PE.

La PE en México y en el mundo, se sigue considerando un problema de salud pública, por lo que es importante la continua búsqueda de marcadores de riesgo y pronóstico de la enfermedad para un diagnóstico y manejo oportuno; así mismo, es importante el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de este trastorno hipertensivo.

2. Antecedentes

2. Antecedentes

2.1. Preeclampsia

2.1.1. Definición

La Preeclampsia (PE) es un trastorno multisistémico de severidad variable, específico del embarazo, que se puede presentar a partir de la semana 20 de gestación, durante el parto o en las primeras 48 horas después de éste. Ésta enfermedad se diagnostica clínicamente por la presencia de hipertensión arterial $\geq 140/90$ mm Hg, acompañada de proteinuria. Es frecuente que también se presente cefalea, acúfenos, fosfenos, edema, dolor abdominal y/o alteraciones de laboratorio (Sibai *et al.*, 2005; SSA, 2007).

2.1.2. Epidemiología y factores de riesgo

En México, la preeclampsia se presenta del 5 al 10% de los embarazos y es una causa importante de muerte materna, perinatal, neonatal, restricción en el crecimiento intrauterino y prematuridad (RCIU) (SSA, 2007). El Sistema Nacional de Salud de México, durante el 2005, reportó 1242 defunciones maternas, de las cuales, una tercera parte se debe a trastornos hipertensivos durante el embarazo, lo que representa casi el 34% del total de muertes maternas (INEGI, 2005). En un estudio reportado por Velasco, en el periodo de tiempo comprendido entre 1991 y 2005, encontró 3553 defunciones maternas en las unidades médicas del IMSS; en los 15 años analizados la mortalidad materna hospitalaria en esta institución se redujo un 40.4%, al pasar de 45.3 a 27 por 100,000 nacidos vivos. A pesar de la disminución observada en la mortalidad materna, la PE junto con la hemorragia obstétrica y la tromboembolia pulmonar, se mantuvieron como las principales causas de muerte materna (Velasco *et al.*, 2005).

En América Latina y en el Caribe, los desordenes hipertensivos, son responsables de casi el 26% de las muertes maternas, mientras que en África y Asia, estos desordenes contribuyen al 9% de las muertes. En países desarrollados, la PE es la primera causa de muerte materna (15-

20%) afectando del 6 al 8% de todos los embarazos; y a nivel mundial, mueren aproximadamente 500 000 mujeres por complicaciones en el embarazo, y la PE junto con su mas grave complicación, la eclampsia es responsable del 10-15% de éstas muertes (Maynard *et al.*, 2008; Hutcheon *et al.*, 2011).

Diversos estudios epidemiológicos han establecido como factores de riesgo para desarrollar PE, ser primigesta, multigesta, primipaternidad, obesidad (Índice de Masa Corporal, IMC >30 Kg/m²), embarazo a edades tempranas (<20 años) o tardías (>40 años), embarazo anterior con PE y/o historia familiar, periodo intergenésico largo (>10 años), el padecer alguna enfermedad como hipertensión crónica, diabetes, enfermedades renales, inmunológicas y/o trombofilias, previamente al embarazo (Sibai *et al.*, 2005; Steegers *et al.*, 2010).

2.1.3. Diagnóstico clínico

Clínicamente la PE puede manifestarse como síndrome materno (hipertensión con o sin proteinuria) o síndrome fetal (RCIU, oligohidramnios y oxigenación anormal). El síndrome materno se caracteriza por la aparición de hipertensión arterial después de la semana 20 de gestación, en una mujer previamente normotensa, asociada a proteinuria. De acuerdo a los lineamientos técnicos de la Secretaria de Salud, la PE se clasifica en PE leve (PEL) y severa (PES) (Tabla 1) (SSA, 2007; Romero *et al.*, 2009).

También puede distinguirse una PE atípica, cuando se presenta el cuadro de hipertensión asociado a síntomas sistémicos, pruebas hematológicas anormales y/o aumento de enzimas hepáticas sin proteinuria. Pacientes con hipertensión crónica antes de la gestación y que se agregan datos de PE después de la semana 20 del embarazo, se le conoce como PE sobreagregada (SSA, 2007; Sibai y Stella, 2009).

El síndrome de HELLP, el cual se caracteriza por hemólisis microangiopática, aumento de las enzimas hepáticas y trombocitopenia, complica del 10-20% de los casos de PES y los criterios bioquímicos para su diagnóstico son: cuenta plaquetaria < 100 000/mm³, enzimas hepáticas TGO/ TGP ≥ 70 U/L, DHL ≥ 600 U/L y bilirrubina total > 1.2 mg/dL. Esta complicación

materna es responsable del 50% de los embarazos pretérmino y aproximadamente del 10-20% de los casos de PES, pueden presentar este síndrome sin hipertensión y/o proteinuria. Entre las principales complicaciones relacionadas al síndrome de HELLP son desprendimiento prematuro de placenta normoinsera (9-20%), coagulación intravascular diseminada (5-56%) e insuficiencia renal aguda (7-36%) (Haram *et al.*, 2009).

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de PE

PE	Tensión Arterial* [mm Hg] Sistólica y/o Diastólica		Proteinuria	Otros
Leve	≥ 140	≥ 90	≥ 300mg ** ó ≥ 30 mg/dL***	No evidencia de compromiso multisistémico o de vasoespasma persistente
Severa [♦]	≥ 160	≥ 110	≥ 2 g**	Oliguria: diuresis < de 500 ml en 24 horas Creatinina sérica ≥ 1.2 mg/dl Trastornos cerebrales severos persistentes o alteraciones visuales Edema agudo pulmonar Dolor epigástrico o en cuadrante superior derecho del abdomen Disfunción hepática (TGO, TGP ≥ 70/UI) Trombocitopenia (< 100,000 mm ³) Coagulación intravascular diseminada Cianosis RCIU

* Se requieren por lo menos 2 tomas con diferencia de 6 horas entre cada una con la paciente en reposo en un lapso no mayor de 7 días

** Recolección de orina de 24 hrs

*** En 2 muestras de orina tomadas al azar con diferencia de 6 horas entre cada una, pero en un lapso no mayor de 7 días.

♦ Se requiere uno o más de los criterios enlistados

Una de las complicaciones mas graves de la PE es la eclampsia (1-2%) y el diagnóstico se establece cuando pacientes con PE, presentan convulsiones o estado de coma en ausencia de otras causas de convulsiones. Otras complicaciones menos frecuentes, que se pueden presentar son edema agudo pulmonar cardiogénico (2-5%), insuficiencia hepática o hemorragia (<1%),

enfermedad vascular cerebral, edema cerebral e insuficiencia cardiaca (Sibai *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2010).

Con respecto al síndrome fetal, la deficiencia en la perfusión placentaria, es la principal causante del RCIU (5-18%), parto pretérmino (15-67%), mortalidad perinatal (1-9%) y daño neurológico por hipoxia (<1%). La muerte neonatal, es dos veces mas alta en infantes de madres con PE, y este riesgo permanece constante durante la primera década (Basso *et al.*, 2006).

El único tratamiento efectivo para la PE, es la interrupción oportuna del embarazo, del 15 al 23% de los nacimientos pretérmino están indicados médicamente por PE, que deja consecuencias a corto y largo plazo, dependiendo del grado de severidad (Ananth y Vintzileos, 2008).

2.1.4. Etiología

A pesar de los continuos avances en el entendimiento de la fisiopatología de la PE, su etiología aun es desconocida. La evidencia indica que la placenta, tiene un papel fundamental en el desarrollo de esta patología; ya que solo en presencia de ésta, se desarrolla la PE, e incluso en ausencia del feto, como es el caso de la mola hidatiforme (Young *et al.*, 2010).

Estudios patológicos de la placenta de mujeres con PE, han encontrado deposición de fibrina, regiones con infartos y aterosclerosis aguda en las arterias espirales; estas características se han asociado a una inadecuada remodelación en las arterias en espiral, que dan como resultado una hipoperfusión e isquemia placentaria; por lo que ésta se ha establecido como una de las principales hipótesis para explicar el desarrollo de la PE (Zhou *et al.*, 1997; Levine *et al.*, 2004).

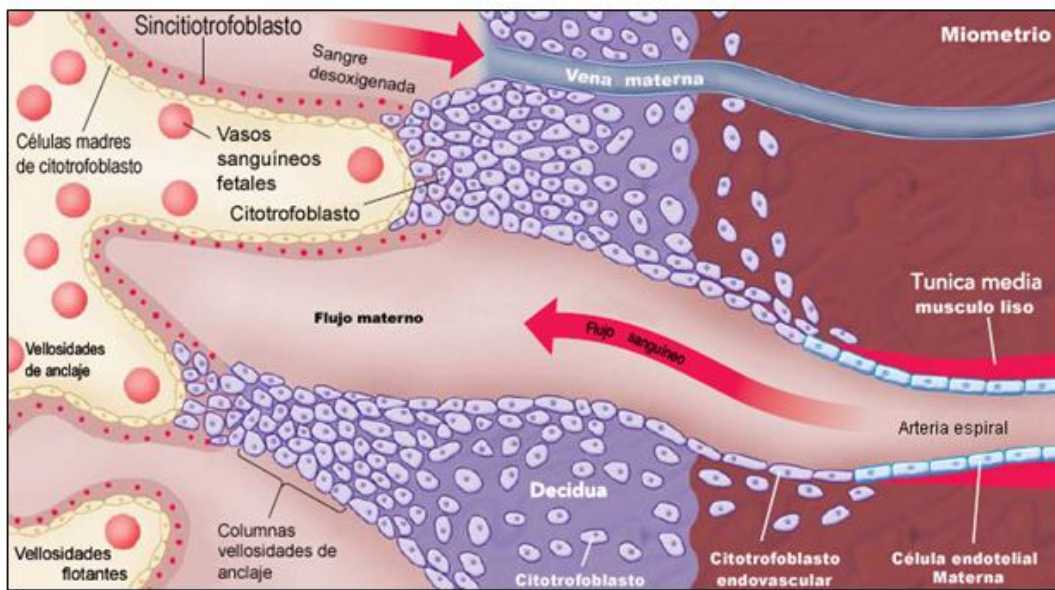
2.1.5. Hipótesis de la isquemia placentaria

La formación de la placenta o placentación, es el proceso más importante para un embarazo exitoso. La placenta es el órgano a través del cual se establece un intercambio de

nutrientes, gases y desechos entre el sistema materno y fetal; para que estos procesos se realicen de forma adecuada es necesario la formación de una red vascular entre los dos sistemas (Caniggia y Winter, 2002; Geva *et al.*, 2002).

Durante el desarrollo temprano de la placenta, el citotrofoblasto extravascular, invade las arterias espirales uterinas de la decidua y del miometrio. Estas células fetales invasivas, reemplazan la capa endotelial de las arterias maternas, transformándolas de vasos de alta resistencia y diámetro pequeño, a vasos de mayor calibre y de baja resistencia. Esta transformación vascular permite incrementar el flujo sanguíneo uterino para mantener al feto a lo largo del embarazo. En PE, esta transformación es incompleta; la invasión del citotrofoblasto a las arterias espirales es limitada a la superficie de la decidua y al segmento miometrial. En el desarrollo normal de la placenta, el citotrofoblasto adopta un fenotipo endotelial, proceso al cual se le conoce como pseudovasculogénesis, regulando negativamente la expresión de moléculas de adhesión de la superficie celular, características las células epiteliales de origen y en su lugar, adopta un fenotipo de células endoteliales de adhesión. En PE, el citotrofoblasto no sufre este cambio y es incapaz de invadir adecuadamente las arterias espirales (Figura 1), dando como resultado una reducción en la perfusión útero-placenta y conforme progresa la gestación, la placenta se torna isquémica. El concepto de hipoxia o isquemia placentaria, es soportado por las características patológicas de las placentas provenientes de mujeres con PE, mencionadas anteriormente (Zhou *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2002).

Normal



Preeclampsia

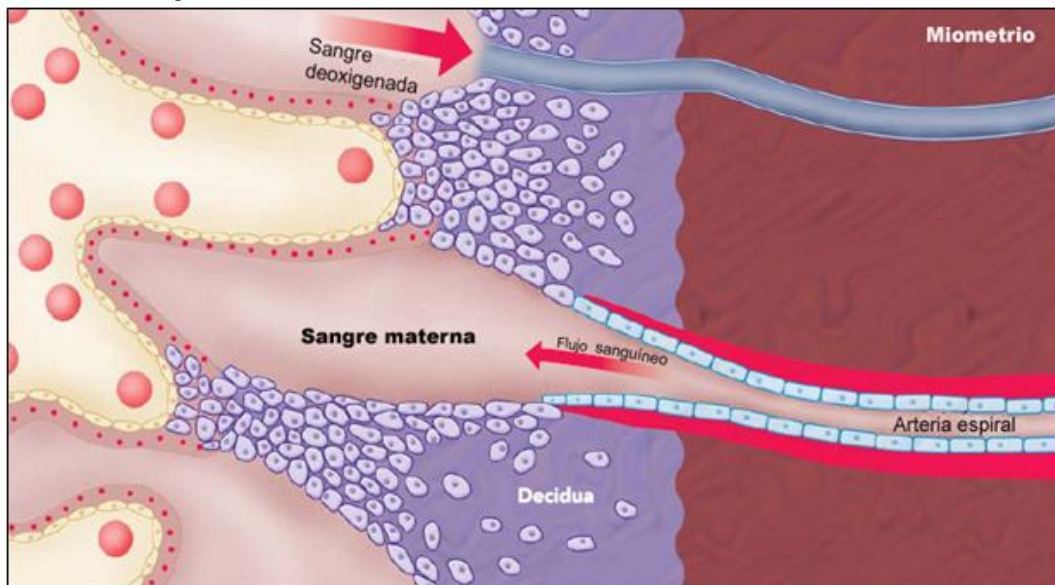


Figura 1. Remodelación de las arterias en espiral en un embarazo normal y en PE. En el desarrollo normal de la placenta, el citotrofoblasto invasivo de origen fetal, invaden las arterias espirales uterinas, transformándolas de vasos de pequeño calibre a vasos de alto calibre, capaces de proporcionar una adecuada perfusión a la placenta, para mantener el crecimiento del feto. Durante el proceso de invasión vascular, el citotrofoblasto se diferencia de un fenotipo epitelial a uno endotelial, proceso conocido como pseudovasculogénesis (panel superior). En la preeclampsia, el citotrofoblasto falla en adoptar un fenotipo endotelial invasivo, dando como resultado una remodelación inadecuada de las arterias en espiral (panel inferior) (Tomada y modificada de Lam *et al.*; 2005).

2.2. Placentación

2.2.1. Factores angiogénicos y el Factor inducido por hipoxia

El desarrollo y maduración de la placenta es un proceso complejo, que requiere de una coordinada regulación de la invasión, diferenciación y proliferación del trofoblasto hacia la decidua materna. En el primer trimestre, las células del trofoblasto extraveloso invaden la decidua, obstruyendo las arterias espirales uterinas. Esta restricción del flujo sanguíneo hacia el espacio intervelloso, da como resultado una baja concentración de oxígeno o estado de hipoxia, el cual es esencial para el desarrollo e invasión de la placenta. En condiciones de hipoxia (< 8 semanas de gestación), se activa el factor inducido por hipoxia alfa (HIF- α), el cual es un factor de transcripción que promueve la transcripción de factores angiogénicos y anti-angiogénicos (Semenza y Wang, 1992; Caniggia y Winter, 2002; Pijnenborg *et al.*, 2006; Cross, 2006;).

Los factores angiogénicos son indispensables para el desarrollo normal de la placenta, principalmente en procesos de proliferación, vascularización y migración de las células del trofoblasto hacia la región materna; entre los mas importantes tenemos a FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), la familia de ANG (angiopoyetinas), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), PlGF (factor de crecimiento placentario), VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) y sus receptores VEGFR-1 (Flt1) y VEGFR-2, siendo estos últimos, los mas importantes para el desarrollo de la placenta (Ahmed *et al.*, 2000; Reynolds y Redmer, 2001; Geva *et al.*, 2002).

VEGF es un agente mitógeno de las células endoteliales de las arterias, venas y vasos linfáticos, incrementa la permeabilidad vascular, promueve la vasculogénesis y la angiogénesis; proliferación y migración del trofoblasto; PlGF actúa de manera similar, pero es un inductor mas débil. FGF estimula también la proliferación de las células endoteliales de las arterias espirales uterinas y de las arterias fetales e induce diferenciación de las capas germinales embrionarias, principalmente la del mesodermo. VEGF y FGF también se han asociado con la regulación del flujo sanguíneo placentario y la producción del oxido nítrico

(NO). ANG-1 tiene una actividad mitógena débil, participa en la maduración de las células endoteliales y estabilización celular, mientras que ANG-2 lo antagoniza (Fong *et al.*, 1995; Clauss *et al.*, 1996; Plaisier *et al.*, 2007; Osol *et al.*, 2008).

También se sabe que HIF- α activa a el Factor de Crecimiento Transformante β 3 (TGF β 3) el cual es un inhibidor de la diferenciación del trofoblasto; de tal forma que durante las primeras 8 semanas del embarazo, el trofoblasto se mantiene en un estado proliferativo y de diferenciación, con un fenotipo intermediario de no invasivo (Caniggia *et al.*, 2000; Genbacev *et al.*, 2001; Cross, 2006). De las semanas 10 a 12 de gestación el rápido incremento en la concentración de oxígeno, regulan negativamente a HIF- α y sus genes blanco, completando el proceso de diferenciación del trofoblasto (Cross J., 2006; Caniggia y Winter, 2002).

2.2.2. *Desbalance de factores angiogénicos y anti-angiogénicos en la preeclampsia*

En la placenta isquémica de mujeres con PE, se ha encontrado sobreexpresión de HIF- α y sus proteínas blanco, principalmente factores anti-angiogénicos (tirosina 1 tipo fms soluble -sFlt-1- y endoglina soluble -sEng-) e inhibidores de la diferenciación del trofoblasto (TGF β 3) (Rajakumar *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002; Venkatesha *et al.*; 2006). sFlt-1 es una variante trunca del receptor membranal VEGFR-1, el cual antagoniza a VEGF y PlGF, por medio de su unión a ellos y evitando la interacción con su receptor membranal, bloqueando así, sus vías de señalización. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que el incremento de sFlt-1 disminuye la invasividad del citotrofoblasto, *in vivo* los efectos que se han observado en ratas embarazadas, es el desarrollo de un síndrome parecido a la PE; y en mujeres con esta patología, el incremento de este factor en circulación periférica, precede a la manifestación del cuadro clínico característico (Maynard *et al.*, 2003; Levine *et al.*, 2004).

De manera similar, sEng es la forma trunca de la endoglina, la cual se une y antagoniza a TGF- β 1, factor involucrado en la migración del citotrofoblasto. Se ha observado que sEng amplifica el daño vascular mediado por sFlt-1, induciendo en ratas embarazadas una PE mas severa, con características parecidas al síndrome de HELLP (Levine *et al.*, 2006; Venkatesha *et al.*, 2006).

En mujeres con PE se ha observado una disminución de los factores angiogénicos y aumento de factores anti-angiogénicos e inhibidores de la diferenciación del trofoblasto, lo cual coincide con los fenotipos observados en las placentas de estas pacientes, un trofoblasto inmaduro, ocasionando una remodelación inadecuada de las arterias en espiral, teniendo como consecuencia un aumento en la resistencia vascular útero-placenta y una disminución en la concentración de oxígeno y de nutrientes hacia el feto (Zhou *et al.*, 2002; Venkatesha *et al.*; 2006).

El desbalance entre factores angiogénicos y anti-angiogénicos, debido a la hipoxia placentaria, se ha propuesto como una de las principales causas del desarrollo de PE, en donde HIF- α es el principal regulador de dichos factores; por lo que diversos grupos de estudios han aumentado el interés en el estudio de las diferentes vías, que se encargan de su regulación, como probable causa de su sobreexpresión en la placenta de mujeres con PE.

2.3. *Factor inducido por hipoxia*

2.3.1. *Estructura de las isoformas de HIF- α*

El factor inducido por hipoxia (HIF) es fundamental para la adaptación de la célula a concentraciones limitadas de oxígeno y se encarga de regular más de 100 genes involucrados en procesos celulares que actúan para compensar este déficit, estos procesos incluyen vasculogénesis, angiogénesis, metabolismo, vasodilatación y migración celular (Semenza y Wang, 1992).

HIF es un factor de transcripción en forma de heterodímero, el cual está compuesto de la subunidad alfa y beta, ambos son miembros de la familia Per/Arnt/Sim (PAS). Hay tres miembros de la familia HIF- α en humanos: *hHIF-1 α* , *hHIF-2 α* (también conocida como EPAS1 o MOP2) y *hHIF-3 α* , localizados en el cromosoma 14q21-24, 2p21-16 y 19q13.32 respectivamente. La proteína HIF-1 α es de 826 aminoácidos y pesa aproximadamente 120 KDa, HIF-2 α tiene 874 aminoácidos y pesa 115 KDa y HIF-3 α , la isoforma más grande es de 668 aminoácidos y pesa 73 KDa. Las tres isoformas poseen un dominio Hélice-asa-Hélice

(helix-loop-helix: bHLH), dos dominios PAS A y PAS B (Figura 2) (Wiener *et al.*, 1996; Hogenesch *et al.*, 1997; Ema *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2002).

La actividad transcripcional del HIF-1 α y HIF-2 α es regulado a través de dos dominios de transactivación localizados hacia el COOH-terminal, llamados N-TAD y C-TAD, son las isoformas mejor caracterizadas y estudiadas en diferentes procesos fisiológicos normales y patológicos. La regulación de HIF-3 α y la función de sus diferentes isoformas son menos claras.

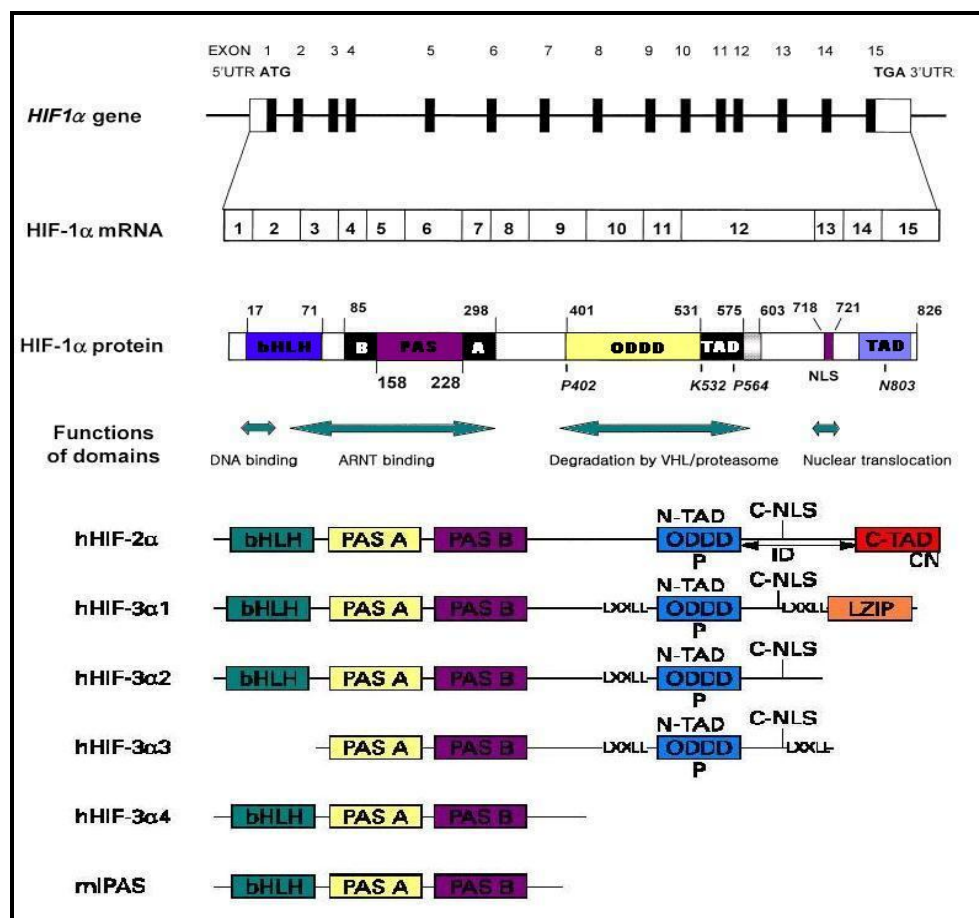


Figura 2. Dominios y estructura de las isoformas del factor de transcripción HIF- α . Los dominios funcionales se ilustran en cajas. bHLH, hélice, asa, hélice básico; PAS, Per/Arnt/Sim; ODDD, dominio de degradación dependiente de oxígeno; C-NLS, señal de localización nuclear del carboxilo terminal; N-TAD y C-TAD, dominios de transactivación del amino y carboxilo terminal (Tomada y modificada de Maynard y Ohn, 2004).

2.3.2. Regulación de HIF- α dependiente de oxígeno

HIF-1 α y HIF-2 α en presencia de oxígeno se degrada vía poliubiquitinación por el complejo VEC y proteosoma 26S; bajo condiciones de hipoxia, HIF α se estabiliza, transloca al núcleo y se dimeriza con HIF- β formando un complejo activo que se une a elementos de respuesta en el promotor de sus genes blanco permitiendo su transcripción, tal es TGF β 3, VEGF, EPO, entre otros (Huang *et al.*, 1998; Salceda y Caro, 1997).

El complejo VEC esta compuesto por el complejo VCB y la Cul2. El complejo VCB, a su vez esta formado por la proteína VHL (pVHL), elongina C y elongina B (Stebbins *et al.*, 1999). La proteína Cul2 no se une a la pVHL en ausencia de las elonginas B y C (Lonergan *et al.*, 1998; Pause *et al.*, 1999). El complejo VEC cuando se une con la enzima E2 conjugada con ubiquitina y Rbx1 tiene la actividad de ligasa E3 de ubiquitina, el cual se encarga de poliubiquitinar sus proteínas blanco para su posterior degradación vía proteosoma 26S (Lisztwan *et al.*, 1999; Iwai *et al.*, 1999). La proteína encargada de anclar HIF- α al complejo VEC es pVHL.

La unión de pVHL con HIF- α está regulada por la hidroxilación en un residuo de prolina. En presencia de oxígeno, HIF- α es hidroxilada enzimáticamente por miembros de la familia PHDs en uno de dos posibles residuos de prolina dentro del dominio N-TAD (Yu *et al.*, 2000; Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 2001). La hidroxilación de cualquiera de los residuos de HIF- α corresponde a la prolina (Pro) 402 y Pro564, generando un sitio de unión para la pVHL. Por lo tanto, en ausencia de oxígeno (hipoxia) las prolin hidroxilasas no son activas, como consecuencia los residuos de prolina de HIF- α al no encontrarse hidroxilados no interaccionan con la pVHL, por esta razón este dominio de HIF- α también se le conoce como dominio de degradación único dependiente de oxígeno (ODDD) (Huang *et al.*, 1998; Salceda y Caro, 1997).

La familia de hidroxilasas PHDs en humano tiene tres miembros: PHD1, PHD2 y PHD3. PHD2 es la enzima que hidroxila principalmente a HIF- α en condiciones normales; PHD1 y

PHD3 también son capaces de hidroxilar HIF- α pero en condiciones específicas, tal es como condiciones prolongadas de hipoxia (Ivan *et al.*, 2002; Berra *et al.*, 2003).

El dominio C-TAD abarca los residuos 786-826 e interacciona con los coactivadores transcripcionales CREB, CBP, p300, SRC-1 y TIF-2. Este dominio también es regulado por la concentración de oxígeno a través de la hidroxilación de un residuo de asparagina por FIH-1 (del inglés asparagyl-hydroxylase-factor-inhibiting HIF-1), en condiciones de normoxia la hidroxilación de la asparagina 803 inhibe la unión con sus coactivadores por impedimento estérico (Lando *et al.*, 2002) (Figura 3).

Por lo tanto, la regulación de HIF- α requiere de la participación de diferentes proteínas, dependientes de oxígeno, para su correcta poliubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma 26S.

2.3.3. Polimorfismos del gen *HIF1A*

Clifford *et al.* (Clifford *et al.*, 2001) describieron dos variantes del gen *HIF1A* en un estudio de pacientes con carcinoma de células renales, estos dos polimorfismos se localizan en el exón 12, el cual codifica para el ODDD y como se menciono anteriormente, este dominio es de vital importancia para la unión de HIF- α con pVHL. Las variantes encontradas fueron el cambio de una C \rightarrow T en el nucleótido 1772, lo cual da como resultado el cambio de una prolina por una serina en la posición 582 (P582S); el segundo fue el cambio de G \rightarrow A, en el nucleótido 1790, cambiando una alanina por una treonina en la posición 588 (A588T) (Figura 3). En éste estudio, no se encontraron diferencias en la presencia de estos polimorfismos entre los grupos de casos y controles; sin embargo Tanimoto *et al.* (Tanimoto *et al.*, 2003) describieron que la presencia de estos dos polimorfismos en el gen *HIF1A* pueden aumentar su actividad transcripcional bajo condiciones de hipoxia y normoxia, en comparación con la isoforma normal. Aunado a esto, en carcinomas de células escamosos de cabeza y cuello, asociaron la presencia de éstos polimorfismo a un aumento en la vascularización de dichos tumores.

Percy *et al.* (Percy *et al.*, 2003) demostraron que el polimorfismo P582S no interviene en la hidroxilación del residuo de prolina 564, importante para el reconocimiento de la pVHL, pero si le confiere mayor estabilidad a la isoforma con este polimorfismo. Por lo anterior, se ha analizado la presencia de estos polimorfismos como factor de riesgo para diferentes enfermedades en donde HIF-1 α se encuentra involucrado, tal es enfermedades coronarias, diabetes tipo 2, cáncer de mama, colon, estomago, páncreas, próstata, esófago; encontrando en algunos estudios una correlación entre el avance de la enfermedad y el grado del tumor y en otros estudios no se ha encontrado un significado clínico (Kuwai *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2005; Ling *et al.*, 2005; Hebert *et al.*, 2006; Apaydin *et al.*, 2008; Heino *et al.*, 2008).

En el gen *HIF1A* se han descrito 35 polimorfismos, tres de los cuales se encuentran en una región codificante: S28Y (exón 2), P582S y A588T (exón 12); y el resto se localizan en regiones no codificantes, por lo que la implicación de sus polimorfismo en su proteína y función, aun faltan ser elucidados (Yamada *et al.*, 2005).

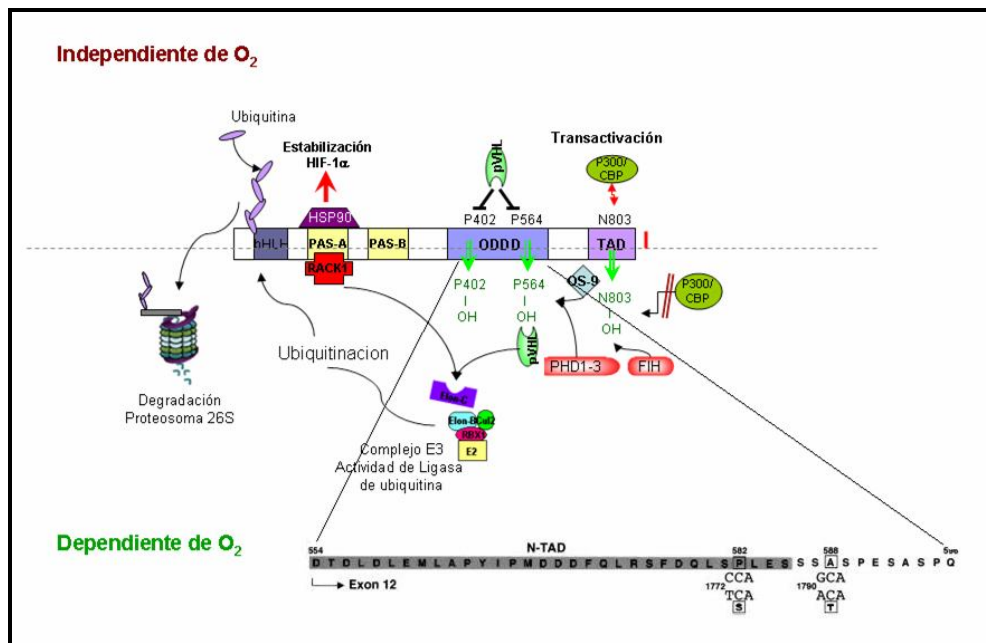


Figura 3. Regulación de HIF- α dependiente de oxígeno y localización de los polimorfismos en el gen *HIF1A*.

3. Planteamiento del problema

3. Planteamiento del problema

La PE es una de las principales causas de morbi-mortalidad materna y perinatal en nuestro país. Es un desorden específico del embarazo, con características clínicas y datos de laboratorio muy heterogéneas entre las pacientes, por lo que se considera una de las patologías más complejas del ser humano. A pesar de los avances en investigación por elucidar su etiología, en la actualidad aun es desconocida, por lo que se sigue en la búsqueda de nuevas moléculas involucradas en su patología y/o marcadores de diagnóstico y pronóstico, para mejorar el manejo y tratamiento de la PE.

Se ha propuesto como una de las principales causas del desarrollo de PE, una inadecuada remodelación de las arterias en espiral, dando como resultado un desbalance en la expresión de factores angiogénicos y anti-angiogénicos en la placenta de mujeres con PE; el principal regulador de dichos factores y que también se encuentra sobreexpresado en esta patología, es el factor inducido por hipoxia alfa (HIF- α).

HIF- α es regulado por varios mecanismos, uno de los más notables es el encargado de su degradación dependiente de oxígeno, por lo que uno de los objetivos de éste trabajo es estudiar la expresión de las proteínas que participan en esta vía, como probable causa de su desregulación.

Otro mecanismo que se ha relacionado con el aumento de la expresión de HIF-1 α , son los polimorfismos C1772T y G1790A del gen *HIF1A*. Estas variantes se han estudiado en diferentes enfermedades donde HIF-1 α se encuentra involucrado y se ha correlacionado con el progreso y severidad de la enfermedad; por lo que es importante caracterizarlos en nuestra población y en pacientes con PE, como factor de predisposición y/o riesgo a desarrollar la enfermedad.

4. Objetivos

4. Objetivos

4.1. *Objetivo general*

Estudiar la frecuencia de los polimorfismos de *HIF- α* y la expresión de las proteínas que participan en su degradación dependiente de oxígeno, en la placenta de mujeres mexicanas con embarazos normales y con preeclampsia.

4.2. *Objetivos particulares*

- Estudiar los polimorfismos C1772T y G1790A del gen *HIF1A* y su asociación a la predisposición del desarrollo de preeclampsia.
- Estudiar la expresión de las proteínas que participan en la vía de degradación de HIF- α dependiente de oxígeno: HIF1- α , HIF2- α , PHD1, PHD2, PHD3, FIH y pVHL en la placenta de mujeres con preeclampsia y con embarazo normal.
- Estudiar la interacción de HIF- α con el Complejo E3 con actividad de ligasa de ubiquitina en la placenta de mujeres con preeclampsia y con embarazo normales.

5. Metodología

5. Metodología

5.1. *Población de estudio*

Se realizó un estudio prospectivo de casos y controles, conformados por pacientes mexicanas adscritas al Hospital de Ginecología y Obstetricia “Luis Castelazo Ayala” No. 4 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Se capturaron pacientes en el periodo de Septiembre del 2008 a Julio del 2010. El diagnóstico y clasificación de PE fue realizado por un médico Gineco-obstetra de acuerdo al Lineamiento técnico del 2007 de la Secretaría de Salud y la Norma Técnico-Médica para la prevención y manejo de la preeclampsia-eclampsia del IMSS.

El grupo control estuvo conformado por mujeres con embarazos a términos y sin complicaciones. No se incluyeron mujeres con enfermedades sistémicas crónicas, tales Lupus Eritematoso Sistémico, Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, glomerulonefritis, epilepsia, diabetes, hipertensión arterial sistémica crónica; así como padecimientos hematológicos como: púrpura trombocitopenia idiopática, púrpura trombocitopenia trombótica. Se excluyeron aquellos pacientes que no desearon participar en el estudio o que no cumplieron con los criterios clínicos de diagnóstico.

La recolección de los datos demográficos e historia familiar se realizó por entrevista personal y los pacientes participantes firmaron la hoja de consentimiento, aprobada por el Comité de Ética del Hospital de Ginecología y Obstetricia “Luis Castelazo Ayala” No. 4.

5.2. *Determinación de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen HIF1A*

Se analizaron 105 muestras de mujeres con embarazos normales (grupo control) y 150 muestras de pacientes con PE. El grupo de mujeres con PE estuvo constituido por 29 pacientes con PE leve (PEL) y 121 con PE severa (PES), de las cuales 36 presentaron adicionalmente, síndrome de HELLP y 11 RCIU.

5.2.1. Extracción del DNA y cuantificación

Se obtuvieron aproximadamente 7 ml de sangre periférica de los pacientes seleccionados por punción venosa, en tubos vacutainer con el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

La extracción del DNA se realizó con tritón y sales. Primero, se adicionó a la muestra de sangre, un amortiguador de sales y tritón (2.5% Tritón X-100%, 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂.7H₂O y 2 mM EDTA), para lisar los eritrocitos y dejar sólo los leucocitos, en donde se encuentra el DNA. Posteriormente al botón de leucocitos formado, se lisaron con los reactivos: SDS al 20%, 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂.7H₂O, 2 mM EDTA y 0.4 M de NaCl y se incubó a 55°C por 15 minutos.

El DNA obtenido se precipita con etanol al 100% y se lava con etanol al 70% (Sambrook *et al.*, 1989). El DNA se secó por medio de calor y vacío, se resuspendió en agua estéril y se disolvió a 50°C.

El análisis cuantitativo del DNA se hizo por espectrofotometría, la lectura se realizó a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm permite el cálculo de la concentración de DNA y la lectura a 280 nm indica si existen restos proteicos en la muestra. Una D.O. (Densidad Óptica) de 1 corresponde a aproximadamente 50 µg/ml de DNA de doble cadena. El cociente entre las lecturas de 260 y 280 nm da una estimación de la pureza de la muestra. Una muestra de DNA con buena pureza da una razón entre 1.8 y 2.0 (Sambrook *et al.*, 1989).

El análisis cualitativo se realizó por medio de electroforesis, el DNA se resolvió en geles de agarosa al 1%, el cual se saturó con el amortiguador TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM Ácido bórico, 2mM EDTA) y se corrió a 100 volts. Posteriormente el gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.

5.2.2. Amplificación específica del exón 12 del gen *HIF1A* por medio de PCR

Por medio de PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) se amplificaron 178 pb del exón 12 del gen *HIF1A*. Se utilizó el oligonucleótido sentido 5'-CAT GTA TTT GCT GTT TTA AAG-3' y el anti-sentido 5'-GAG TCT GCT GGA ATA CTG TAA CTG-3', reportados previamente por Tanimoto *et al.* (Tanimoto *et al.*, 2003). La reacción de PCR se realizó en 30 μ L, conteniendo 200 ng de DNA, 0.2 mM de dNTP, 0.5 μ M de cada oligonucleótido, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 U de Taq polimerasa y 3 μ L del buffer 10X para PCR. Se utilizó un termociclador BioRad (MyCycler Thermal Cycler) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 61°C por 30 seg, extensión a 70°C por 1 min; extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 2.5% en TBE 1X a 100 volts, los productos amplificados se flanquearon por un marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder de Invitrogen) para verificar su tamaño. Posteriormente los geles de agarosa fueron teñidos con bromuro de etidio y observados en un transiluminador de luz U.V.

5.2.3. Secuenciación

Se llevó a cabo un paso de purificación previa a la secuenciación. En este trabajo se realizó por columna con un Kit comercial de la marca Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit), según las especificaciones del proveedor. Posteriormente, para confirmar que los productos de PCR estuvieran libres de productos inespecíficos y de impurezas, se resolvieron nuevamente por electroforesis, en geles de agarosa.

Para la reacción de secuenciación se utilizó el Kit BigDye Terminator V3.3 de Applied Biosystems. La reacción de secuenciación se realizó en 20 μ L, que contenía: 0.05 μ M del oligonucleótido sentido, 3.0 μ L de Buffer 5X, 2 μ L de Big Dye y la cantidad del producto de PCR purificado varió entre 2-4 μ L, dependiendo del rendimiento obtenido. Se utilizó un termociclador BioRad (MyCycler Thermal Cycler) con las siguientes condiciones:

desnaturalización inicial a 96°C por 1 min; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento a 52°C por 10 seg, extensión a 60°C por 4 min; y extensión final a 60°C por 3 min.

Posteriormente los productos de la reacción de secuenciación se purificaron con columnas de gel (Centri Sep Princeton Separations), de acuerdo a las especificaciones del proveedor y se secaron en un concentrador de vacío. Se resuspendió el producto de la reacción de secuenciación con formamida y se traspasó a una gradilla para el termociclador, en la cual, la muestra se desnaturalizó y se cargó en el secuenciador automático (ABI prism 3100) para ser procesada.

Una vez procesadas las muestras, se obtuvieron los electroferogramas del secuenciador para ser analizados. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia del gen *HIF1A* de la base de datos del NCBI con número de acceso AF050124.

5.3. Estudio de las proteínas que participan en la degradación de HIF- α dependiente de oxígeno

En esta parte del estudio se estudiaron 44 muestras de placenta pertenecientes a 16 mujeres con embarazo normal, 8 con PEL y 20 con PES; de las cuales 3 pacientes presentaron adicionalmente IUGR y 5 síndrome de HELLP.

5.3.1. Extracción de proteína de placenta y cuantificación

Se obtuvieron muestra de placenta de aquellas mujeres que fueron programadas para cesárea, ya sea por elección de la paciente o por indicación medica, tales como compromiso del binomio madre-feto, cesárea previa, ruptura prematura de membranas, desproporción cefalopélvica y/o falta de trabajo de parto.

Las placentas fueron recolectadas inmediatamente después de la cesárea y colocadas en una solución amortiguador de PBS frío (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄.2H₂O,

1.76 KH₂PO₄, pH 7.4). De cada placenta se obtuvieron 10 biopsias de 10 sitios diferentes de la cara materna de la placenta.

El tejido placentario se lavó con PBS 1X frío y se colocó en una solución amortiguadora de lisis con inhibidores de proteasas (1 mM DTT, 10 mM Tris HCl pH 6.8, 30% Glicerol, 1 mM EDTA, 1% Tritón X-100%, 5 µg/mL Leupeptina, 5 µg/mL Aprotinina, 2 µg/mL Pesptatina, 1 mM PMSF, 1 mM ortovanadato de sodio, 15 mM azida de sodio, disuelto en PBS). El tejido se homogenizo con un sonicador (VibraCell, Sonic & Materials INC.) a una amplitud de 100%, con 4 ciclos de pulsos durante 20 segundos y con intervalos de un minuto. Los homogenados se mantuvieron en hielo por 30 minutos y se centrifugaron a 12,500 rpm por 15 min a 14°C. Se recupero el sobrenadante y se guardo a -70°C. La proteína total fue cuantificada por medio de espectrofotómetro por el método de Bradford (Bradford, 1976), en la cual se mide la cantidad de proteína a una absorbancia de 595 nm y se utiliza como referencia, una curva de albúmina.

5.3.2. *Western Blot*

Se utilizaron 50 µg de proteína total, a la cual se les adicionó la solución amortiguadora de carga Laemmli 1X (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercapto etanol y 0.0025% azul de bromofenol) y se calentaron a 95°C por 6 minutos. Los extractos proteicos se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE al 8 y al 12% a 90 volts durante 3 horas. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Immobilon, Millipore, Bedford, MA) a 295 mA durante 1 hora. Las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche descremada al 10% en TBS-Tween (TBS: 50 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, pH 7.4 y Tween 20 al 0.1%) por una hora a TA. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios contra HIF-1α (1 µg/mL, Cat. No. 610958, BD Transduction Laboratorios, Inc., Santa Cruz, CA), HIF-2α (0.8 µg/mL, Cat. No. sc-46691, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), pVHL (0.5 µg/mL, Cat. No. sc-5575, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), FIH (0.5 µg/mL, Cat. No. ab36814, Abcam, Cambridge, MA), PHD1 (0.67 µg/mL, Cat. No. NB100-310, Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO), PHD2 (0.5 µg/mL, Cat. No. NB100-138, Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO), PHD3 (0.5 µg/mL, No. Cat. NB100-303,

Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO) y β -actina (0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cat. No. sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) en TBS-Tween a 4°C O/N. Las membranas se lavaron 3 veces por 10 min con TBS-Tween, posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón (0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cat. No. sc-2004, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) por 30 min a TA y se volvieron a lavar 3 veces por 10 min con TBS-Tween. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (ECL detection system, Amersham Biosciences).

Las placas radiográficas obtenidas se digitalizaron en un archivo TIFF, por medio de un scanner (EPSON Perfection 4490 Photo). Se utilizó el programa Kodak 1D v.3.6.1 para el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados de la expresión de las proteínas de interés se normalizaron con la expresión de la proteína de control de carga β -actina.

5.3.3. Co-Immunoprecipitación del complejo VEC con actividad de ligasa de ubiquitina

Para determinar si el complejo VEC con actividad de ligasa de ubiquitina se está formando, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación, como se ha descrito previamente (MacPhee *et al.*, 2001).

A una alícuota de 500 μg de proteína total, se le agregó 1.0 μg del IgG adecuado, dependiendo del anticuerpo utilizado para co-inmunoprecipitación y 25 μL de Proteína-A agarosa (Cat. No. sc-2003, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Se incubó con agitación constante por 30 min a 4°C y después se removió la proteína-A agarosa por centrifugación a 3000 r.p.m. por 2 min a 4°C. Los extractos proteicos fueron incubados a 4°C, O/N con 1.0 μg de anticuerpo anti-pVHL (Cat. No. sc-5575, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) ó 1.0 μg de anti-HIF-2 α (Cat. No. sc-46691, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

Posteriormente se le agregó 25 μL de proteína-A agarosa y se incubó por 30 min. Los inmunoprecipitados fueron colectados por centrifugación, lavados 4 veces con PBS 1X y resuspendidos en el amortiguador Laemmli 1X. Finalmente las proteínas se separaron

mediante electroforesis SDS-PAGE y el western blot se realizó con los anticuerpos primarios contra HIF-2 α (0.8 μ g/mL, Cat. No. sc-46691, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), pVHL (0.5 μ g/mL, Cat. No. sc-5575, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), Ubicuitina (0.1 μ g/mL, Cat. No. sc-58449, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) y Cullin-2 (1.0 μ g/mL, Cat. No. RB-1480, Neomarkers, Fremont, CA). Se utilizaron los anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón (0.04 μ g/mL, Cat. No. sc-2004, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

5.4. Análisis estadístico

Las características clínicas y los datos densitométricos obtenidos del western blot, entre los grupos de mujeres con PEL, PES y control; fueron analizados mediante un Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), seguida por una prueba de Tukey ó de t-student.

Las diferencias entre las frecuencias genotípicas, fueron evaluadas con tablas de contingencias de 2 x 2 y una prueba exacta de Fisher. Los OR (odds ratios) se calcularon con un intervalo de confianza (IC) del 95%. Estas pruebas estadísticas se realizaron en el programa Graph Pad Prism V.5.1.

Para determinar si nuestra población esta en equilibrio de Hardy-Weinberg, se utilizo una prueba de χ^2 en <http://www.oege.org>.

El cálculo del poder estadístico se realizó en el programa Quanto V.1.2. y se utilizaron las frecuencias de los polimorfismos genéticos obtenidos en este trabajo y la prevalencia de la PE en nuestra población (7%).

Las diferencias obtenidas con un valor de $p < 0.05$, fueron consideradas como significativas y todas las pruebas fueron de dos colas.

6. Resultados

6. Resultados

Realizamos un estudio de casos y controles para analizar las causas genéticas y moleculares de la desregulación de HIF- α . Primero, determinamos si la presencia de alguno de los polimorfismos del gen *HIF1A*, se asociaba con el desarrollo de PE; y segundo, si hay alteraciones en la expresión de las proteínas que participan en la ruta de degradación de HIF- α dependiente de oxígeno, en población Mexicana.

6.1. *Estudio de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen HIF1A*

Se analizaron los polimorfismos C1772T y G1790 del gen *HIF1A* en 150 muestras de mujeres con PE y 105 mujeres con embarazos normales. En la tabla 2, se muestran características clínicas y demográficas de nuestra población de estudio, que han sido asociadas como factor de riesgo para el desarrollo de PE. El grupo de mujeres con PE presentaron recién nacidos con bajo peso, un menor número de semanas de gestación, y un índice de masa corporal (IMC) mayor en comparación con el grupo control; también se encontró un alto porcentaje de mujeres que fumaban antes del embarazo. Las diferencias entre éstas características fueron estadísticamente significativas. No se observaron diferencias en la edad y en ser primigesta entre los grupos estudiados.

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen *HIF1A* se muestran en la tabla 3. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de ambos polimorfismos entre los grupos estudiados; en ningún individuo se encontraron los dos polimorfismos y en aquellos casos, en los que presentaron alguno de los dos polimorfismos, se observó en forma de heterocigoto.

La frecuencia para el alelo 1772T es de 4.3 y 4.8% en el grupo de PE y controles, respectivamente. Del grupo de los casos, los pacientes que fueron heterocigotos para este alelo corresponden a 3 con PEL y 10 con PES, de los cuales, 2 tenían adicionalmente IUGR y 1 síndrome de HELLP. El alelo 1790A, solo se encontró en un individuo del grupo control.

6.2. Estudio de la expresión de las proteínas que participan en la degradación de HIF- α dependiente de oxígeno

Estudiamos la expresión de las proteínas HIF-1 α , HIF-2 α , PHD1, PHD2, PHD3, FIH y pVHL en 44 muestras de placenta; 16 muestras corresponden a mujeres con embarazos normales (EN), 8 con PEL y 20 con PES.

En la tabla 3 se muestran las características clínicas y demográficas de la población seleccionada y analizada para esta parte del estudio. El grupo de mujeres con preeclampsia presento recién nacidos con bajo peso, un menor número de semanas de gestación y la mayor parte de las mujeres eran primigestas, en comparación con el grupo control; estas diferencias fueron estadísticamente significativas. A diferencia de la población para el estudio de los polimorfismos genéticos, en estos grupos, el IMC y el porcentaje de mujeres que fumaban antes del embarazo, fue similar. Con respecto a la edad de la madre, al igual que la población estudiada anteriormente, no se encontró diferencias.

Rajakumar et al. (Rajakumar *et al.*, 2001) reportaron previamente que en la placenta de mujeres con PE hay una sobreexpresión de las proteínas HIF-1 α y HIF-2 α , por lo que se corroboró éstos datos en nuestras pacientes. Comparando nuestros grupos de estudio, EN, PEL y PES, encontramos que hay un aumento en la expresión de HIF-1 α en la placenta de mujeres con PEL y PES. HIF-2 α solamente se encuentra incrementada en mujeres con PES (Figura 1).

De las enzimas que se encargan de hidroxilar a HIF- α en un residuo de prolina en el ODDD, la expresión de PHD1 y PHD2 fue similar en los grupos estudiados; en la enzima PHD3, si se observó un aumento en su expresión en la placenta de mujeres con PES (Figura 2).

FIH, enzima que hidroxila un residuo de arginina hacia el extremo del carboxilo terminal de HIF- α , se encontró incrementada su expresión solo en el grupo de mujeres con PES (Figura 3). En los grupos de PEL y PES, se observó un decremento en la expresión de pVHL, con respecto al grupo control (Figura 4).

Por medio de ensayos de co-inmunoprecipitación, estudiamos la interacción de HIF- α con el complejo E3 con actividad de ligasa de ubiquitina. Como se mencionó anteriormente este complejo está compuesto por las proteínas Cul2, pVHL, Elongina B y C, Rbx1 y E2 conjugado con ubiquitina; por lo que nosotros determinamos la expresión de proteínas claves en la formación de este complejo (Figura 5). Realizamos el ensayo de co-inmunoprecipitación con HIF-2 α y pVHL, e identificamos su interacción con Cul2, ubiquitina, HIF-2 α y pVHL. En los ensayos realizados, observamos que HIF-2 α sí está interaccionando con pVHL y Cul2 en los grupos estudiados; y también observamos que se sigue poliubiquitinando (dato no mostrado).

Tabla 2. Características clínicas y demográficas de la población seleccionada para el estudio de los polimorfismos del gen *HIF1A*

Parámetro	Control	PE	P-valor	
N	105	150		
Edad Materna (años)	27.7 ± 0.6	28.4 ± 0.6	NS	
Fumaban antes del embarazo (%)	16.2	27.7	0.034	
Primigestas (%)	37.9	36.9	NS	
IMC (Kg/m ²)	28.9 ± 0.5	31.3 ± 0.8	0.011	
Peso del recién nacido (g)	2991.0 ± 63.1	2177.0 ± 74.6	< 0.001	
SDG (semanas)	38.2 ± 0.2	34.8 ± 0.3	< 0.001	
		PEL	PES	
PAS (mmHg)	114.1 ± 0.7	137.7 ± 1.9	155.0 ± 1.4	< 0.001 [♦]
PAD (mmHg)	73.3 ± 0.6	89.7 ± 1.3	100.9 ± 1.0	< 0.001 [♦]
Proteinuria (mg/ 24 hr)	ND	443.6 ± 63.5	2482.0 ± 377.4	< 0.001 ^{♦♦}

Los valores representan la media ± ESM. PE, preeclampsia; IMC, índice de masa corporal; SDG, semanas de gestación al momento de la cesárea; PEL, preeclampsia leve; PES, preeclampsia severa; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; ND, no determinado, pero negativo utilizando una tira reactiva; NS, no significativo.

Valores de P se calcularon entre el grupo control y con PE

[♦] Control vs. PEL y PES; PEL vs. PES

^{♦♦} PEL vs. PES

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen *HIF1A* en pacientes con PE y el grupo control

Nucleótido	Aminoácido	Genotipo	PE (%)	Control (%)	P-valor	OR (95% IC)
C1772T	Pro582	CC	137 (91.3)	95 (90.5)		
		CT	13 (8.7)	10 (9.5)		
		TT	0 (0.0)	0 (0.0)		
	Ser582	CT + TT	13 (8.7)	10 (9.5)	0.203 *	0.485 (0.178-1.067)
		Alelo				
		C	287 (95.7)	200 (95.2)	0.831	0.906 (0.389-2.107)
		T	13 (4.3)	10 (4.8)		
Genotipo						
G1790A	Ala588	GG	150 (100.0)	104 (99.3)		
		GA	0 (0.0)	1 (0.7)		
		AA	0 (0.0)	0 (0.0)		
	Thr588	GA + AA	0 (0.0)	1 (0.7)	0.412 **	0.232 (0.009-5.737)
		Alelo				
		G	300 (100.0)	209 (99.5)	0.411	0.232 (0.009-5.737)
		A	0 (0.0)	1 (0.5)		

PE, preeclampsia; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza

* El cálculo se realizó CC vs. CT + TT

** El cálculo se realizó GG vs. GA + AA

Tabla 4. Características clínicas y demográficas de los grupos para el estudio de la expresión de proteínas de la vía de degradación dependiente de oxígeno

Parámetro	Control	PE	P-valor	
N	16	28		
Edad materna (años)	28.5 ± 1.3	29.6 ± 1.4	NS	
Fumaban antes del embarazo (%)	18.8	27.3	NS	
Primigestas (%)	0.0	50.0	0.001	
IMC (Kg/m ²)	29.4 ± 0.9	32.7 ± 1.5	NS	
Peso del recién nacido (g)	3165 ± 110.0	2102 ± 165.7	< 0.001	
SDG (semanas)	38.6 ± 0.3	34.9 ± 0.7	< 0.001	
		MPE	SPE	
PAS (mmHg)	108.8 ± 2.4	140.0 ± 2.6	154.4 ± 3.8	< 0.001 [♦]
PAD (mmHg)	70.9 ± 1.6	90.0 ± 0.1	99.5 ± 2.5	< 0.001 [♦]
Proteinuria (mg/ 24 h)	ND	458.3 ± 103.0	2971.0 ± 788.4	0.029 ^{♦♦}

Los valores representan la media ± ESM. PE, preeclampsia; IMC, índice de masa corporal; SDG, semanas de gestación al momento de la cesárea; PEL preeclampsia leve; PES, preeclampsia severa; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; ND, no determinado, pero negativo utilizando una tira reactiva; NS, no significativo.

Valores de P se calcularon entre el grupo control y con PE

[♦] Control vs. PEL y PES; PEL vs. PES

^{♦♦} PEL vs. PES

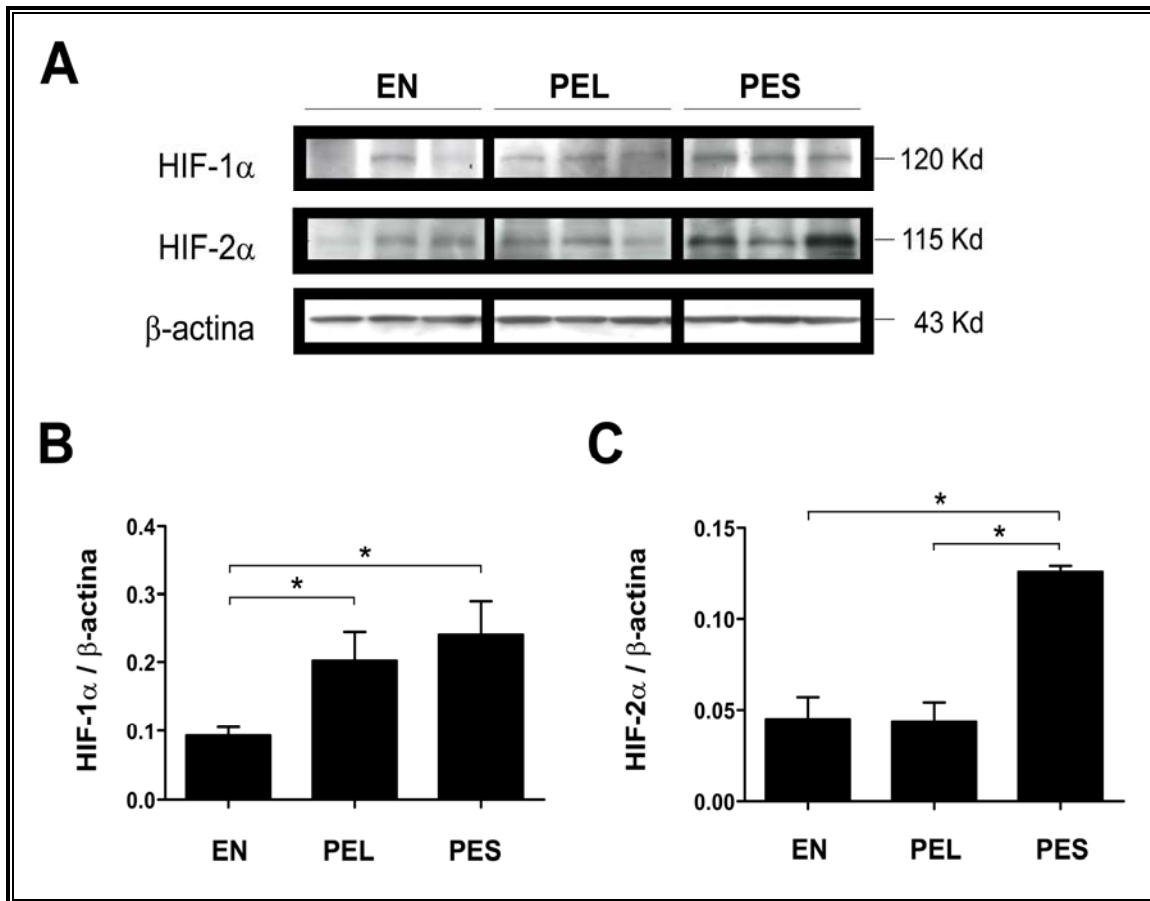


Figura 4. Expresión diferencial de las proteínas HIF-1 α y HIF-2 α . (A) Western blot representativo de la expresión de HIF-1 α y HIF-2 α de diez biopsias de diferentes sitios de placenta de mujeres con embarazo normal (EN, n=16), con PE leve (PEL, n=8) y PE severa (PES, n=20). β -actina se utilizó como un control de carga de proteína total en todos los geles. (B, C) Análisis densitométrico de HIF-1 α y HIF-2 α en placenta; los datos son normalizados con respecto a la β -actina. Los resultados se muestran como la media \pm ESM, * p < 0.05 comparado con el grupo de mujeres con EN.

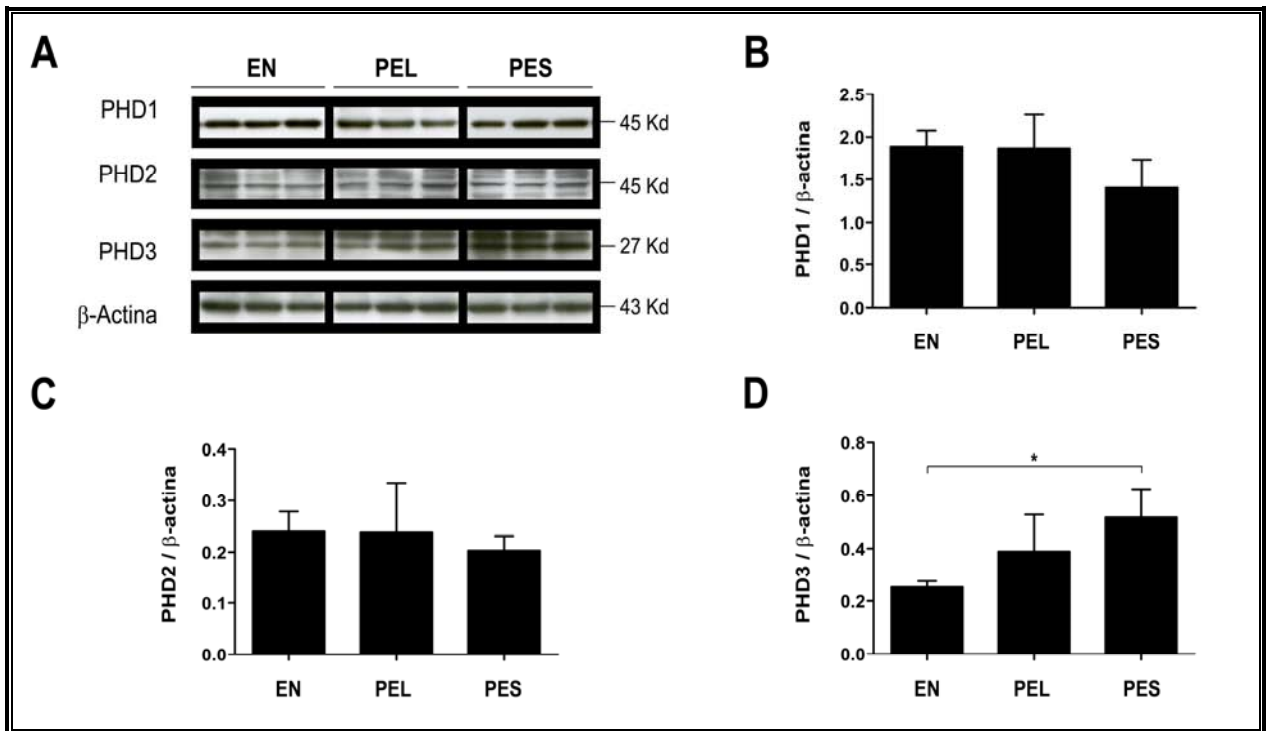


Figura 5. Expresión diferencial de PHD1, PHD2 y PHD3. (A) Western blot representativo de la expresión de PHD1, PHD2 y PHD3 de placenta de mujeres con EN, PEL y PES. Los extractos proteicos de los grupos estudiados, son los mismos que se emplearon en los experimentos de la Figura 1. β -actina se utilizó como un control de carga de proteína total en todos los geles. (B, C, D) Análisis densitométrico de PHD1, PHD2 y PHD3 en placenta; los datos son normalizados con respecto a la β -actina. Los resultados se muestran como la media \pm ESM, * p <0.05 comparado con el grupo de mujeres con EN.

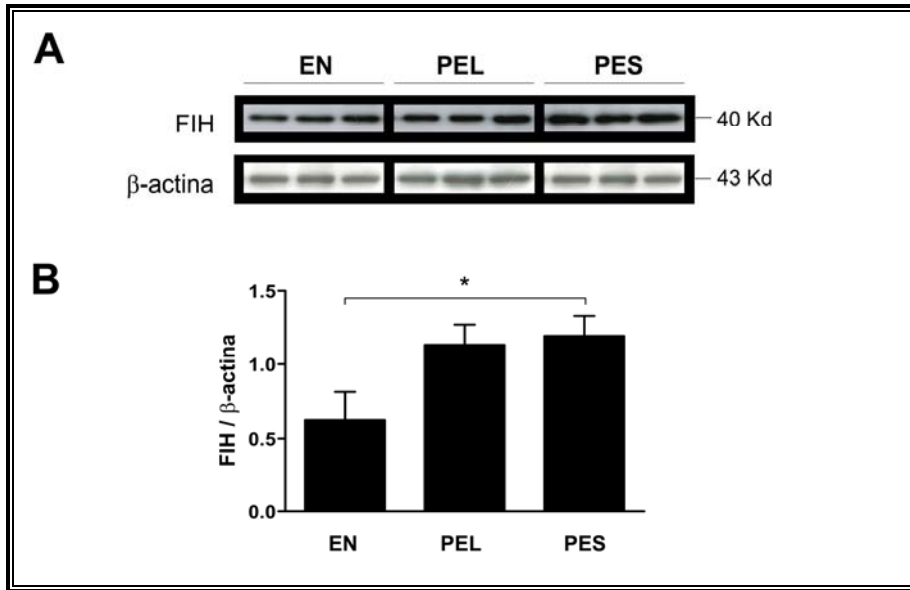


Figure 6. La expresión de la enzima FIH está incrementada en la placenta de mujeres con PES. (A) La expresión de FIH fue medida por Western blot; se muestra un blot representativo del análisis de los extractos de proteína total; dichos extractos son los mismos que se emplearon en los experimentos anteriores. β -actina se utilizó como un control de carga de proteína total en todos los geles. (B) Análisis densitométrico de FIH en placenta; los datos son normalizados con respecto a la β -actina. Los resultados se muestran como la media \pm ESM, * $p < 0.05$ comparado con el grupo de mujeres con EN.

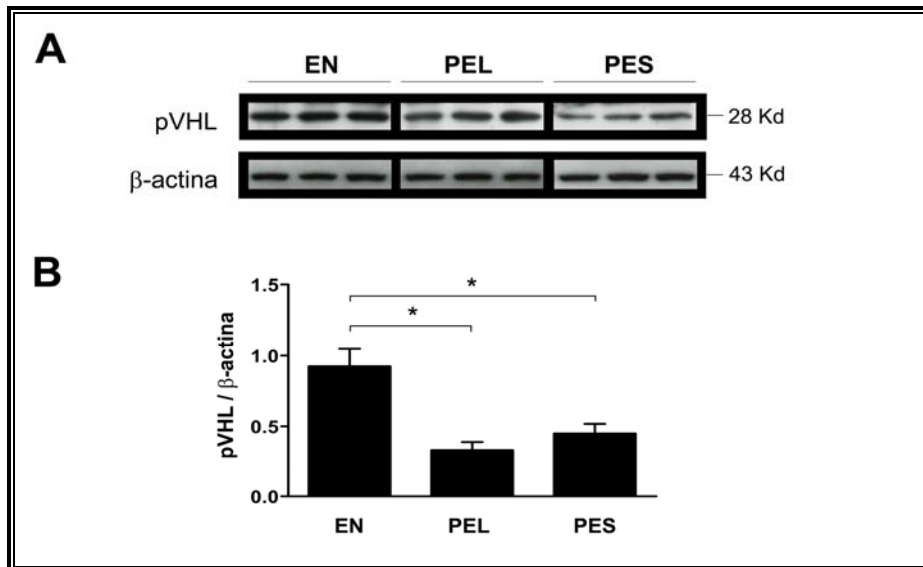


Figura 7. pVHL disminuye su expresión en placentas de mujeres con PEL y PES. (A) Western blot representativo de la expresión de pVHL de placenta. Los extractos de proteína total, son los mismos que se emplearon en los experimentos de la Figura 1. β -actina se utilizó como un control de carga de proteína total en todos los geles. (B) Análisis densitométrico de pVHL en placenta; los datos son normalizados con respecto a la β -actina. Los resultados se muestran como la media \pm ESM, * $p < 0.05$ comparado con el grupo de mujeres con EN.

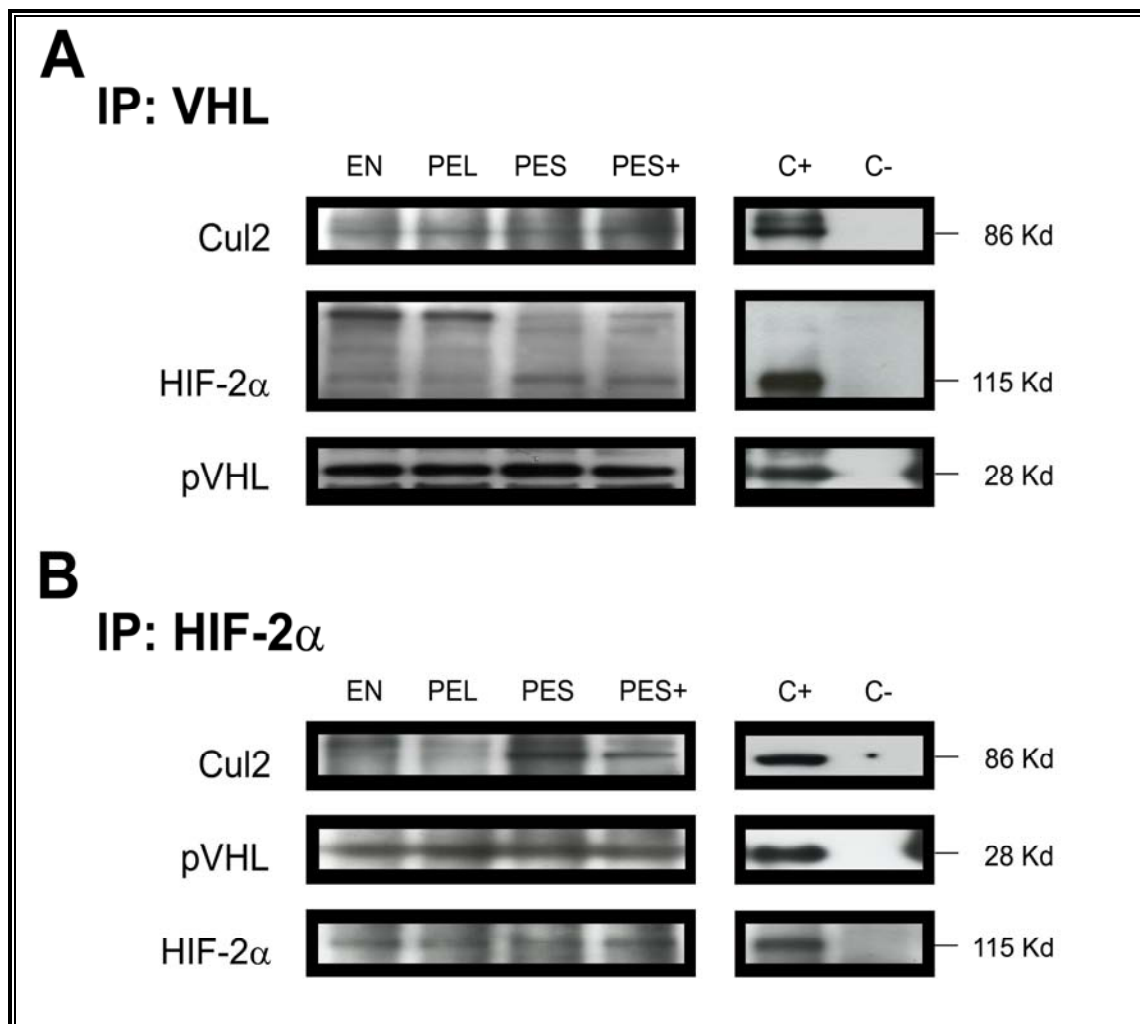


Figure 8. Interacción del complejo E3 con actividad de ligasa de ubiquitina con HIF- α en la placenta de mujeres con EN, PEL y PES. Los extractos proteicos de los grupos estudiados, son los mismos que se analizaron en los experimentos anteriores. (A) Inmunoprecipitación con un anticuerpo contra pVHL seguido de un western blot para estudiar la interacción con las proteínas Cul2, HIF-2 α y pVHL. (B) Inmunoprecipitación con un anticuerpo contra HIF-2 α seguido de un western blot para las proteínas Cul2, HIF-2 α y pVHL. Control positivo (C+) y negativo (C-) para cada anticuerpo se muestra en el lado derecho.

7. Discusión

7. Discusión

Durante el embarazo, el oxígeno es uno de los elementos que juega un papel clave en la proliferación y diferenciación del trofoblasto. Se ha descrito que en la placenta, la transición de un ambiente de baja concentración de oxígeno a una de mayor concentración entre las 8 y 12 semana de gestación, son esenciales para la remodelación de la pared de las arterias en espiral. En las mujeres con PE, el trofoblasto falla en remodelar adecuadamente las arterias uterinas, teniendo como consecuencia una disminución en el suministro de oxígeno y nutrientes de la madre hacia el feto. Los factores implicados en esta alteración aun no se han elucidado, sin embargo una de las principales consecuencias de la hipoxia placentaria en las mujeres con PE es la sobreexpresión del factor de transcripción HIF- α y sus genes blanco, principalmente factores anti-angiogénicos e inhibidores de la diferenciación del trofoblasto (sFlt1, sEng y TGF β 3) (Levine *et al.*, 2004; Foidart *et al.*, 2009). Alteraciones en la expresión de estos factores se ha asociado fuertemente al desarrollo de PE, por lo que diversos grupos de estudio han intensificado el estudio de su regulación, principalmente de HIF- α , para determinar la causa de su sobreexpresión en esta patología.

Se ha descrito que la presencia de los polimorfismos C1772T (P582S) y G1790A (A588T) del gen *HIF1A* y alteraciones en la expresión de las proteínas que participan en la ruta de degradación dependiente de oxígeno de HIF- α , pueden modificar su expresión; por lo que en el presente trabajo estudiamos estos dos factores como probable causa de su desregulación en la PE.

7.1. Factores de riesgo asociados al desarrollo de PE en población Mexicana

En la población seleccionada para el estudio de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen *HIF1A* (Tabla 1), no mostró diferencias significativas entre las mujeres con embarazo normal y el grupo con PE, cuando se analizó la edad y el ser primigravida en la población de estudio. Sin embargo, se ha descrito que mujeres ≥ 40 años, tienen el doble de riesgo de desarrollar PE, independientemente si son primigestas o multigestas, y el riesgo se incrementa en un 30% cada año, después de los 35 años. Las mujeres primigestas tienen el triple de riesgo

de PE, principalmente mujeres jóvenes (≤ 20 años) (Duckitt *et al.*, 2005; Steegers *et al.*, 2010); probablemente no encontramos diferencias debido al rango de edad de las mujeres incluidas en esta parte del estudio, el cual fue de 27-29 años.

La exposición al cigarro durante el embarazo se ha asociado a diversos efectos adversos, tal es como parto pretérmino, ruptura prematura de membranas, desprendimiento de placenta y RCIU. Paradójicamente, fumar se ha asociado con una disminución en el riesgo de PE; varios estudios han encontrado un efecto protector si las mujeres continúan fumando durante el embarazo, si las mujeres dejan de fumar, este efecto se pierde (Conde-Agudelo *et al.*, 1999; Newman *et al.*, 2001). En nuestro trabajo, el porcentaje de mujeres que fumaban en el grupo de PE fue alto, comparado con el grupo control, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.034$, OR= 1.984). De acuerdo a las entrevistas realizadas para la obtención de los datos demográficos, todas las mujeres dejaron de fumar antes del embarazo o en las primeras semanas; por lo que dichas mujeres perdieron el efecto protector, de acuerdo a lo reportado previamente.

Con respecto al Índice de Masa Corporal (IMC), varios estudios indican que las mujeres con obesidad (IMC > 30) tienen el doble de riesgo de PE, comparado con las mujeres con IMC normal (IMC: 20-25) y mujeres con IMC > 35 tienen 4 veces más riesgo de PE (Mbah *et al.*, 2010). El grupo de mujeres con PE tiene una media del IMC de 31, clasificado como obesidad tipo I; lo cual fue estadísticamente diferente con respecto al IMC del grupo control.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados en el peso de los recién nacidos y las semanas de gestación (SDG) al momento de la cesárea. 59% de los recién nacidos de las mujeres del grupo de PE nacieron antes de las 34 SDG, siendo mayor esta proporción en mujeres con PES (63%) en comparación con el grupo de PEL (41%). Esta tendencia es debido a que la PE se caracteriza por un deterioro progresivo en la madre y el feto; y entre más temprano se presente este trastorno hipertensivo, mayor será la severidad. Diversos estudios clínicos indican que después de la 34 SDG, el riesgo de continuar con el embarazo es mayor que el beneficio, por lo que se decide interrumpir el embarazo a esta edad gestacional, teniendo como consecuencia recién nacidos de bajo peso. Adicionalmente, la

PE puede complicarse con RCIU (10-25%); esta condición patológica del feto puede determinar si el embarazo se continúa o si se interrumpe. (Sibai *et al.*, 2005). La PE es una enfermedad heterogénea, y la diferencia entre los factores de riesgo dependen de la condición de cada una de las pacientes.

La población seleccionada para el estudio de la expresión de las proteínas que participan en la vía de degradación dependiente de oxígeno (Tabla 4), encontramos resultados similares en el peso del recién nacido, SDG al momento de la cesárea y la edad de las pacientes. Contrariamente a la población analizada para los polimorfismos, si encontramos diferencias significativas en ser primigestas; en el fumar antes del embarazo y en el IMC la diferencia no fue estadísticamente significativa; estas variaciones pueden deberse a que los factores de riesgo son una probabilidad de que se desarrolle una determinada enfermedad y no un factor determinante.

Al analizar las características clínicas y demográficas, se corroboró que la obesidad y el ser primigesta son factores de riesgo y podrían estar asociados al desarrollo de PE y que los recién nacidos de este grupo de mujeres tienen un bajo peso al nacer y menor número de SDG, lo cual se podría asociar con los efectos adversos en la salud del neonato, descritos previamente.

Con estos datos podemos concluir que aunque la población estudiada no presento todos los datos de riesgo asociados a PE descritos en la literatura para un amplio rango de edades, si encontramos algunos de los previamente descritos.

7.2. Frecuencias de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen HIF1A en población mexicana y su posible relación con PE

Estudios *in vitro* han demostrado que en condiciones de hipoxia y normoxia, los polimorfismos C1772T (P582S) y G1790A (A588T) del gen *HIF1A*, le confieren a este gen una mayor actividad transcripcional, lo cual se ha correlacionado con el aumento de expresión de su proteína, comparada con la secuencia normal (Clifford *et al.*, 2001; Tanimoto *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2005). Varios grupos de investigación, en diferentes poblaciones, han

encontrado una asociación entre la presencia de estos polimorfismos y el desarrollo de una enfermedad en la que HIF- α este implicado, tal es el caso del cáncer, la diabetes y las enfermedades coronarias (Tanimoto *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2005; Hlatky *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008). En este estudio, nosotros determinamos la frecuencia de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen *HIF1A* como factor de riesgo para el desarrollo de PE en población Mexicana.

El análisis genético de los polimorfismos de *HIF1A* entre las mujeres con PE y el grupo control; indican que no hay diferencia significativa en la distribución genotípica y alélica de los polimorfismos C1772T y G1790A (Tabla 2). Para el alelo 1772T, encontramos una frecuencia similar a la reportada para poblaciones como Japón, Finlandia, Corea y China (Tanimoto *et al.*, 2003; Kuwai *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2005; Hlatky *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Heino *et al.*, 2008;). La frecuencia del homocigoto para el alelo T es muy baja (0.010-0.031); en algunas poblaciones, como la nuestra, no ha sido encontrado; esto puede ser debido a la baja frecuencia *per se* en nuestra población y/o al tamaño de muestra analizado.

En nuestra población la frecuencia del alelo 1790A fue de 0.005, este valor es bajo comparado con otras poblaciones (0.015-0.047). El homocigoto para este alelo es muy raro, en las poblaciones estudiadas hasta el momento, solo se ha reportado en población japonesa y coreana (Yamada *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008).

Existe una variación en la distribución de los polimorfismos C1772T y G1790A debido a la variabilidad genética de cada población, esto se refleja en los estudios de asociación de una determinada enfermedad en diferentes poblaciones, en los que encuentran resultados contradictorios, de ahí la importancia de analizar los cambios genéticos en nuestro país (Kim *et al.*, 2008; Apaydin *et al.*, 2008).

En población finlandesa se estudiaron estos dos polimorfismos del gen *HIF1A* y su asociación al desarrollo de PE (Heino *et al.*, 2008), la frecuencia para el polimorfismo C1772T fue similar al encontrado en población mexicana. Contrariamente, la frecuencia de la variante G1790A en nuestra población fue mas baja en comparación con la de población finlandesa.

Sin embargo, en su estudio y en el nuestro, no encontramos asociación entre la presencia de estos polimorfismos y el desarrollo de PE. El estudio de los polimorfismos del gen *HIF1A* y su relación con la PE, solo se han realizado en población finlandesa y en la nuestra, por lo que nuestro estudio es la primera contribución en América en latina.

La incapacidad de desarrollar métodos satisfactorios de prevención y predicción en el área clínica para la PE, varios grupos de investigación se han enfocado a tratar de establecer una correlación entre diversos polimorfismos de genes relacionados en su fisiopatología y el desarrollo de la misma. Como se mencionó anteriormente, el desbalance de factores angiogénicos y anti-angiogénicos esta fuertemente relacionado a la patogénesis de la PE, por lo que se han estudiado algunos polimorfismos de genes que participan en la angiogénesis. Entre los más estudiados han sido los polimorfismos de los genes como VEGF, FLT y ENG, sin embargo se han obtenido datos inconsistente (Papazoglou *et al.*, 2004; Rogers y D'Amato, 2006; Kim *et al.*, 2008; Srinivas *et al.*, 2010). De lo anterior, es importante no solo determinar la presencia de los polimorfismos, sino también la expresión de sus proteínas y su papel que juegan en el desarrollo de la PE.

7.3. Cambios en la expresión de las proteínas que participan en la degradación de HIF- α dependiente de oxígeno en pacientes con PE

Rajakumar *et al.* (Rajakumar *et al.*, 2001) describió que en la placenta de mujeres con PE hay una sobreexpresión de los factores de transcripción HIF-1 α y HIF-2 α ; esta desregulación se ha relacionado directamente con el desbalance entre factores angiogénicos y anti-angiogénicos, los cuales juegan un papel clave en el desarrollo de la PE.

En nuestro estudio observamos que ambas isoformas se encuentran sobreexpresadas en la placenta de mujeres con PE, en comparación el grupo control; sin embargo el patrón de expresión fue significativamente diferente de acuerdo al grado de severidad de la PE. En la placenta de mujeres con PEL y PES se observa un incremento significativo de HIF-1 α , con respecto al grupo control, y HIF-2 α solo se observo un aumento en su expresión en el grupo de mujeres con PES.

Se ha descrito que las diferentes isoformas de HIF no son redundantes y poseen diferentes funciones biológicas, inducen la transcripción de diferentes genes, tienen patrones de expresión propios, distintos requerimientos de co-activadores y principalmente, poseen un modo de regulación diferente, dependiendo del estado de hipoxia de la célula. HIF-1 α media la adaptación de la célula en estados agudos de hipoxia, mientras que HIF-2 α , se ha asociado su activación en estados crónicos de hipoxia (Holmquist-Mengelbier *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007). Nuestros resultados sugieren que existen diferencias importantes en la fisiopatología entre las mujeres con PEL y PES, lo cual podría asociarse a las diferentes manifestaciones clínicas que presentan.

La regulación de la expresión de HIF- α es compleja y pueden participar varios mecanismos, sin embargo el más notable y mejor estudiado, es la vía que se encarga de su degradación dependiente de oxígeno. En el presente trabajo, comparamos la expresión de las proteínas involucradas en esta vía en la placenta de mujeres con embarazos normales, PEL y PES.

Los niveles de oxígeno son críticos para la hidroxilación de HIF- α , la cual es necesaria para que este factor de transcripción pueda unirse al complejo E3 con actividad de ligasa de ubiquitina. Esta hidroxilación dependiente de oxígeno es mediada por la familia de hidroxilasas PHD1, PHD2 y PHD3 (Ivan *et al.*, 2006).

En las muestras analizadas encontramos un incremento en la expresión de PHD3, solo en la placenta de mujeres con PES; y en la expresión de PHD1 y PHD2 no hubo diferencias significativas entre los grupos estudiados. En condiciones normales de oxígeno y en estados agudos de hipoxia, PHD2 es la principal enzima que hidroxila a HIF-1 α ; mientras que PHD3 y PHD1 lo hidroxilan en condiciones prolongadas de hipoxia. PHD2 y PHD3 son sujetos a inducción transcripcional por hipoxia, mediada por HIF- α y la expresión de PHD1 es regulada negativamente bajo estas condiciones (Berra *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2006). Nuestros resultados sugieren que el incremento en la expresión de PHD3 en la placenta de mujeres con PES, es inducido por hipoxia y que este estado, es mayor en la placenta de estas pacientes, comparado incluso con el grupo de mujeres con PEL. A pesar de que PHD2 también puede ser inducido por hipoxia, se sabe que la hidroxilasa que se expresa principalmente en la placenta,

es PHD3, por lo que esta enzima pudiera tener un papel clave en la regulación de HIF- α en este tejido (Soilleux *et al.*, 2005).

Los sitios de prolina donde HIF-1 α y HIF-2 α son hidroxilados por la familia de las PHDs, son sitios altamente conservados, sin embargo la eficiencia de estas enzimas no son equivalentes. Se sabe que PHD2 hidroxila mas eficientemente HIF-1 α que HIF-2 α , mientras que PHD1 y PHD3 son mas activas en HIF-2 α (Appelhoff *et al.*, 2004). A pesar de que observamos un incremento en la expresión de PHD3 en la placenta de mujeres con PES, la alteración en la expresión de HIF-1 α en mujeres con PEL y PES, puede ser debido a la baja afinidad de esta enzima por la isoforma 1 α . Con respecto a la sobreexpresión en la proteína de HIF-2 α en mujeres con SPE, a pesar del aumento de la expresión de PHD3, bajo las condiciones de oxígeno que se encuentran en la placenta, probablemente la actividad de esta enzima sea nula o poco eficiente; dando como resultado la desregulación de la isoforma 2 α .

En la placenta de mujeres con SPE, también observamos un incremento significativo en la expresión de FIH, en comparación con el grupo control y PEL. FIH es una enzima que hidroxila un residuo de asparagina localizado en un dominio hacia el extremo del carboxilo Terminal (T-CAD) (McNeill *et al.*, 2002). Estudios previos indican que FIH tiene una mayor afinidad al oxígeno, comparado con la familia de PHDs, y se ha sugerido que en una ventana de hipoxia, esta enzima aun pueda ser activa y seguir hidroxilando a HIF- α (Koivunen *et al.*, 2004). De acuerdo a lo anterior, aunque la placenta de mujeres con PE este en un estado de hipoxia, FIH probablemente continúe activo e inhiba la transactivación de HIF- α ; sin embargo, se ha descrito que los genes que son regulados por HIF- α , pueden ser inducidos con solo inhibir una de las enzimas que lo hidroxilan (PHDs o FIH); incluso cuando una de ellas este completamente activa (Fandrey *et al.*, 2006).

Contrariamente a reportes previos en donde se ha descrito que pVHL no cambia en mujeres con PE (Rajakumar *et al.*, 2006), nosotros observamos una diferencia significativa en la expresión de pVHL, ya que se encontró disminuida en la placenta de mujeres con PEL y PES. Esto podría estar relacionado con el incremento de expresión de HIF- α , ya que como se mencionó anteriormente, pVHL forma parte esencial del complejo E3 con actividad de ligasa

de ubiquitina (Stebbins *et al.*, 1999). Por otro lado, se sabe que FIH se une a pVHL, y que este último actúa como un co-represor transcripcional, que inhibe la transactivación de HIF- α , por medio del reclutamiento de desacetilasas de histonas. Por lo anterior, una disminución en la expresión de pVHL tendría una repercusión importante en la regulación de HIF- α (Mahon *et al.*, 2001).

pVHL también es un importante regulador de PHD3, ya que se ha observado que en células deficientes de pVHL, la expresión del mRNA de PHD3 está incrementado; la expresión de PHD1 y PHD2 no se altera en estas condiciones (del Peso *et al.*, 2003). Estos datos apoyarían nuestros resultados, en los que detectamos que hay un decremento en la expresión de pVHL, PHD3 incrementa su expresión y no se alteró la de PHD1 y PHD2.

Por otro lado, pVHL tiene dos isoformas, pVHL₃₀ y pVHL₁₉; se ha descrito que ambas isoformas tienen la misma función (Iliopoulos *et al.*, 1998). En nuestro trabajo solo determinamos la isoforma larga, por lo que el papel que juegue la isoforma corta en la regulación de HIF- α en la placenta, necesitaría ser estudiado.

Como se mencionó anteriormente, pVHL se une a la elongina B y C, Cul2 y la proteína Rbx1, para formar el complejo E3 con actividad de ligasa de ubiquitina (Stebbins *et al.*, 1999); este complejo se une al complejo E2 conjugado con ubiquitina, para marcar sus proteínas blancas por medio de la poliubiquitinación y posteriormente, su degradación vía porteosoma 26S. En este estudio investigamos si las proteínas Cul2, pVHL y HIF-2 α están interaccionando entre sí; seleccionamos la proteína Cul2 por que es la última proteína en unirse al complejo VEC y es el puente entre el complejo E2 y el complejo E3 (Pause *et al.*, 1997). Determinamos también la expresión de la proteína ubiquitina, para corroborar si HIF-2 α se está poliubiquitinando. En el grupo de mujeres con embarazo normal, PEL y PES, encontramos que las tres proteínas estudiadas, pVHL, Cul2 y HIF-2 α , si están interaccionando entre sí (Figura 5) y la ubiquitinación de HIF-2 α fue similar en los grupos estudiados (dato no mostrado).

Nuestros resultados indican que HIF-1 α y HIF-2 α , pudieran estar hidroxilándose y degradándose por la vía dependiente de oxígeno. Sin embargo, es necesario considerar varios

puntos; primero como se mencionó anteriormente, HIF- α puede inducir la transcripción de sus genes blanco a pesar de que uno de sus dominios este hidroxilado (ODDD o C-TAD). Segundo, en las condiciones de hipoxia en las que se encuentra la placenta de mujeres con PE, la enzima que pudiera aun estar activa es PHD3, quien al tener una baja afinidad por HIF-1 α , no sería suficiente para regularla negativamente. Tercero, la disminución en la expresión de pVHL en la placenta de mujeres preeclámpticas, puede ser un factor limitante para la formación del complejo VEC, el cual tampoco sería suficiente para poliubiquitinar a HIF- α , afectando de esta forma, su degradación.

Un resultado importante que encontramos en nuestro estudio, es la diferencia en la expresión de proteínas relacionadas a distintos estados de hipoxia, HIF-2 α y PHD3 se han asociado a estados crónicos de hipoxia y ambos están sobreexpresados en la placenta de mujeres con PES; por lo que este estado de severa hipoxia, comparado con el grupo de mujeres con PEL, puede influir directamente en el grado de severidad y en las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Entre los principales objetivos de la investigación clínica-básica, es tratar de establecer en etapas tempranas del embarazo, marcadores que nos ayuden a predecir el riesgo y/o grado de severidad de que una mujer desarrolle PE; por lo que la identificación de diferentes patrones de expresión de moléculas entre mujeres con diferentes grados de severidad podría tener una aplicación en un futuro.

Debido a la complejidad del desarrollo de la placenta y las interacciones que participan en este proceso, particularmente en la vasculogénesis y en la angiogénesis, y tomando en cuenta que aun no se han determinado de manera precisa como la concentración de oxígeno regula este proceso es necesario seguir investigando la regulación de HIF para poder entender mejor su papel en la fisiopatología de la PE.

8. Conclusiones

8. Conclusiones

- ✚ La frecuencia alelica de los polimorfismos C1772T y G1790A del gen *HIF1A* en población mexicana es baja (4.8% y 0.5% respectivamente) y son similares a los observados en población japonesa y coreana.
- ✚ En población mexicana, los polimorfismos C1772T y G1790A del gen *HIF1A*, al igual que en población finlandesa, no mostraron una correlación con el desarrollo de PE.
- ✚ Existe una expresión diferencial de las proteínas que participan en la vía de degradación dependiente de oxígeno en la placenta de mujeres con embarazo normal, PEL y PES; encontrando en este último grupo, una sobreexpresión de proteínas relacionadas con un estado crónico de hipoxia (HIF-2 α y PHD3), lo cual podría estar relacionado con el progreso y la severidad de la enfermedad.
- ✚ HIF- α si interacciona con el complejo E3 con actividad de ligasa de ubiquitina en la placenta de mujeres con PEL y PES, por lo tanto se está degradando por la vía dependiente de oxígeno; sin embargo, este mecanismo no es suficiente para compensar la sobreexpresión de este factor de transcripción.

9. Perspectivas

9. Perspectivas

La etiología exacta de la PE aun es desconocida, sin embargo existe fuerte evidencia de que el desbalance de factores angiogénicos y anti-angiogénicos, así como la desregulación de su principal regulador, HIF- α , juegan un papel clave en la fisiopatología de esta enfermedad; por lo que es importante continuar en la búsqueda de las causas de estas alteraciones.

La regulación de HIF- α es muy compleja y cada día, se tienen nuevos avances en los mecanismos que pueden modificar su expresión; incluso en la ruta que se encarga de su degradación vía poliubiquitinación. Se ha descrito que la proteína OS-9 favorece la hidroxilación de HIF- α por la familia de hidroxilasas PHDs (Baek *et al.*, 2005) y RACK1 facilita la unión de pVHL con la Elongina C, favoreciendo la formación del complejo VEC (Liu *et al.*, 2007). También se sabe que la proteína HAF puede reclutar a HIF- α a su degradación vía poliubiquitinación, de forma independiente a su hidroxilación (Koh *et al.*, 2009); por lo que sería importante estudiar la interacción, expresión y participación de estas proteínas en la regulación de HIF- α en la placenta de mujeres con embarazo normal y las que cursan con PE.

Una de las rutas que ha cobrado recientemente un gran interés en el desarrollo de la PE, es la vía de PI3-Akt, ya que se ha descrito que puede inducir la expresión HIF- α y este a su vez, el incremento específico de sFlt-1 (factor anti-angiogénico) en un modelo específico de hipoxia placentaria (Park *et al.*, 2010). Por otro lado, la vía de Akt-mTOR y ERK, también se ha observado que participan en la inducción de VEGF y Eng en el trofoblasto, mediada por HIF- α , durante las primeras semanas de gestación (Alam *et al.*, 2009), por lo que la regulación de estas vías pueden tener un papel importante en la alteración de la expresión de factores angiogénicos y anti-angiogénicos en la PE y requiere ser explorado.

Por lo anterior, podemos decir que aun queda un amplio campo que estudiar en cuanto a la regulación de HIF- α en la placenta, no solo de mujeres con PE, si no también en mujeres normales, para entender su participación en la fisiopatología de la PE.

10. Referencias

10. Referencias

- Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen—a review. *Placenta* 2000; 21(Suppl A):S16-24.
- Alam H, Weck J, Maizels E, Park Y, Lee EJ, Ashcroft M, et al. Role of the phosphatidylinositol-3-kinase and extracellular regulated kinase pathways in the induction of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and the HIF-1 target vascular endothelial growth factor in ovarian granulosa cells in response to follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 2009; 150:915-28.
- Ananth VC, Vintzileos MA. Medically indicated preterm birth: Recognizing the importance of the problem. *Clin Perinatol* 2008; 35:53-67.
- Apaydin I, Konac E, Onen HI, Akbaba M, Tekin E, Ekmekci A. Single nucleotide polymorphisms in the hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) gene in human sporadic breast cancer. *Arch Med Res* 2008; 39:338-45.
- Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 2004; 279:38458-65.
- Baek JH, Mahon PC, Oh J, Kelly B, Krishnamachary B, Pearson M, et al. OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell* 2005; 17:503-12.
- Basso O, Rasmussen S, Weinberg CR, Wilcox AJ, Irgens LM, Skjaerven R. Trends in fetal and infant survival following preeclampsia. *JAMA* 2006; 296:1357-62.
- Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* 2003; 22:4082-90.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
- Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* 2000; 105:577-87.
- Caniggia I, Winter J.L. Hypoxia inducible factor-1: Oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic Pregnancies—A Review. *Placenta* 2002; 16 suppl A:S47-57.
- Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Röckl W, Waltenberger J, et al. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 1996; 271:17629-34.
- Clifford SC, Astuti D, Hooper L, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Maher ER. The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1alpha in renal cell carcinoma. *Oncogene* 2001; 20:5067-74.

Conde-Agudelo A, Althabe F, Belizán JM, Kafury-Goeta AC. Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:1026-35.

Coordinación de Salud Reproductiva y materno Infantil. Norma Técnico-Médica para la prevención y manejo de la preeclampsia-eclampsia. Instituto Mexicano del Seguro Social, México 1995. pp 7-33.

Cross JC. Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18:71-6.

del Peso L, Castellanos MC, Temes E, Martin-Puig S, Cuevas Y, Olmos G, et al. The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *J Biol Chem* 2003; 278:48690-5.

Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005; 330:565-71.

Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogaza K, et al. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: Their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 1999; 18:1905-14.

Fandrey J, Gorr TA, Gassmann M. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res* 2006; 71:642-51.

Foidart JM, Schaaps JP, Chantraine F, Munaut C, Lorquet S. Dysregulation of anti-angiogenic agents (sFlt-1, PLGF, and sEndoglin) in preeclampsia- a step forward but not the definitive answer. *J Reprod Immunol* 2009; 82:106-11.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.

Fu XS, Choi E, Bubley GJ, Balk SP. Identification of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) polymorphism as a mutation in prostate cancer that prevents normoxia-induced degradation. *Prostate* 2005; 63:215-21.

Genbacev O, Krtolica A, Kaelin W, Fisher S.J. Human Cytotrophoblast Expression of the von Hippel-Lindau Protein Is Downregulated during Uterine Invasion in Situ and Upregulated by Hypoxia in Vitro. *Developmental Biology* 2001; 233:526-36.

Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:4213-24.

Hansen WJ, Ohh M, Moslehi J, Kondo Ke, Kaelin EG, Welch WJ. Diverse effects of mutation in Exon II of the von Hippel - Lindau (VHL) Tumor Suppressor Gene on the interaction of pvh1 with the cytosolic chaperonin and pvh1 - dependent ubiquitin ligase activity. *Mol Cell Biol* 2002; 22:1947-1960.

Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy Childbirth* 2009; 9:8.

Hebert C, Norris K, Parashar P, Ord RA, Nikitakis NG, Sauk JJ. Hypoxia-inducible factor-1alpha polymorphisms and TSC1/2 mutations are complementary in head and neck cancers. *Mol Cancer* 2006; 5:3.

Heino S, Kaare M, Andersson S, Laivuori H. Non-synonymous sequence variants within the oxygen-dependent degradation domain of the HIF1A gene are not associated with pre-eclampsia in the Finnish population. *BMC Med Genet* 2008; 9:96-101.

Hlatky MA, Quertermous T, Boothroyd DB, Priest JR, Glassford AJ, Myers RM, et al. Polymorphisms in hypoxia inducible factor 1 and the initial clinical presentation of coronary disease. *Am Heart J* 2007; 154:1035-42.

Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, et al. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signalling pathway. *J Biol Chem* 1997; 272:8581-93.

Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, et al. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 2006; 10:413-23.

Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol Biol Cell* 2007; 18:4528-42.

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia – inducible factor 1 α is mediated by an oxygen-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:7987-92.

Hutcheon JA, Lisonkova S, Joseph KS. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011; X:1-13.

Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin W. pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel–Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:11661–6.

INEGI/SSA Dirección General de Información en Salud, estadísticas de mortalidad 2005.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF-alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001; 292: 464-8.

Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC, Michelson KS, Günzler V, Kondo K, et al. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:13459-64.

Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, Minato N, Conaway RC, Conaway JW, et al. Identification of the von Hippel – Lindau tumor – suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12436-41.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, K, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel- Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292:468–72.

Kim HO, Jo YH, Lee J, Lee SS, Yoon KS. The C1772T genetic polymorphism in human HIF-1alpha gene associates with expression of HIF-1alpha protein in breast cancer. *Oncol Rep* 2008; 20:1181-7.

Kim SY, Lim JH, Yang JH, Kim MY, Han JY, Ahn HK, et al. Dinucleotide repeat polymorphism in Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) gene is not associated with preeclampsia. *BMC Med Genet* 2008; 9:68.

Koh MY, Powis G. HAF : the new player in oxygen-independent HIF-1alpha degradation. *Cell Cycle* 2009; 8:1359-66.

Koivunen P, Hirsilä M, Günzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* 2004; 279:9899-904.

Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Kuroda T, Ochiuni T, Matsumura S, et al. Single nucleotide polymorphism in the hypoxia-inducible factor-1alpha gene in colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2004; 12:1033-7.

Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension* 2005; 46:1077-85.

Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295:858-61.

Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350:672-83.

Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 2006; 355: 992-1005.

Ling TS, Shi RH, Zhang GX, Zhu H, Yu LZ, Ding XF. Common single nucleotide polymorphism of hypoxia-inducible factor-1alpha and its impact on the clinicopathological features of esophageal squamous cell carcinoma. *Chin J Dig Dis* 2005; 6:155-8.

Lisztwan J, Imbert G, Wirbelauer C, Gstaiger M, Krek W. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev* 1999; 13:1822-33.

Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell* 2007; 25:207-17.

Lonergan KM, Illiopoulos O, Ohh M, Kamura T, Conaway R, Conaway JW, et al. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol* 1998; 18:732-41.

MacPhee DJ, Mostachfi H, Han R, Lye SJ, Post M, Caniggia I. Focal adhesion kinase is a key mediator of human trophoblast development. *Lab Invest* 2001; 81:1469-83

Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001; 15:2675-86.

Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 2001; 20:5197–5206.

Maynard MA, Ohh M. von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. *Am J Nephrol* 2004; 24:1-13.

Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med* 2008; 59:61-78.

Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111: 649–58.

Mbah AK, Kornosky JL, Kristensen S, August EM, Alio AP, Marty PJ, et al. Super-obesity and risk for early and late pre-eclampsia. *BJOG* 2010; 117:997-1004.

McNeill LA, Hewitson KS, Claridge TD, Seibel JF, Horsfall LE, Schofield CJ. Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803. *Biochem J* 2002; 367:571-5.

Newman MG, Lindsay MK, Graves W. Cigarette smoking and pre-eclampsia: their association and effects on clinical outcomes. *J Matern Fetal Med* 2001; 10:166-70.

Osol G, Celia G, Gokina N, Barron C, Chien E, Mandala M, et al. Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294:H1381-7.

Papazoglou D, Galazios G, Koukourakis MI, Panagopoulos I, Kontomanolis EN, Papatheodorou K, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:321-4.

Park JK, Jeong JW, Kang MY, Baek JC, Shin JK, Lee SA, et al. Inhibition of the PI3K-Akt pathway suppresses sFlt1 expression in human placental hypoxia models in vitro. *Placenta* 2010; 31:621-9.

Pause A, Lee S, Worrell RA, Chen DY, Burgess WH, Linehan WM, et al. The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:2156-61.

Pause A, Peterson B, Schaffar G, Stearman R, Klausner R. Studying interactions of four proteins in the yeast two-hybrid system: structural resemblance of the pVHL/elongin BC/hCUL-2 complex with the ubiquitin ligase complex SKP1/cullin/F-box protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:9533-8.

Percy M, Mooney S, McMullin MF, Flores A, Lappin T, Lee F. A common polymorphism in the oxygen-dependent degradation (ODD) domain of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) does not impair Pro-564 hydroxylation. *Molecular Cancer* 2003; 2:31.

Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006; 27:939-58.

Plaisier M, Rodrigues S, Willems F, Koolwijk P, van Hinsbergh VW, Helmerhorst FM. Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth

factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first-trimester decidual tissues. *Fertil Steril* 2007; 88:176-87.

Rajakumar A, Whitelock A, Weissfeld L, Daftary A, Markovic N. Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2 α , in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod* 2001; 64: 499–506.

Rajakumar A, Doty K, Daftary A, Markovic N, Conrad KP. Expression of von Hippel Lindau (pVHL) protein in placenta from normal pregnant women and women with preeclampsia. *Placenta* 2006; 27:411-21.

Reynolds L, Redmer A. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 2001; 64:1033-1040.

Rogers MS, D'Amato RJ. The effect of genetic diversity on angiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312:561-74.

Romero Arauz JF, Tena Alavez G. Epidemiología, clasificación y factores de riesgo en preeclampsia. En: Romero Arauz JF, Tena Alavez G, Jiménez Solís GA. Preeclampsia. Enfermedades hipertensivas del embarazo. McGrawHill, México 2009. Capítulo 1. pp.1-15.

Salceda S y Caro J. Hypoxia- inducible factor 1 α (HIF-1 α) is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxia conditions. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642-7.

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 2da. Edición. Volumen 1, 2 y 3.

Secretaría de Salud. Lineamiento Técnico. Prevención, diagnóstico y manejo de la preeclampsia/eclampsia. 4ta edición. México, DF. 2007.

Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 5447-54.

Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Preeclampsia. *Lancet* 2005; 365:785-97.

Sibai BM, Stella CL. Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200:481.e1-7.

Soilleux EJ, Turley H, Tian YM, Pugh CW, Gatter KC, Harris AL. Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues. *Histopathology* 2005; 47:602-10.

Srinivas SK, Morrison AC, Andrela CM, Elovitz MA. Allelic variations in angiogenic pathway genes are associated with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202:445.e1-11.

Stebbins C, Kaelin Jr W, Pavletich N. Structure of the VHL – elongin C – elongin B complex: Implications for VHL Tumor Suppressor function. *Science* 1999; 284:455-61.

Steevers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet* 2010; 376:631-44.

Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis* 2003; 24:1779-83.

Tian YM, Mole DR, Ratcliffe PJ, Gleadle JM. Characterization of different isoforms of the HIF prolyl hydroxylase PHD1 generated by alternative initiation. *Biochem J* 2006; 397:179-86.

Velasco ME, Navarrete HE. Mortalidad materna en el IMSS, 1991-2005. Un periodo de cambios. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2006; 44:S121-S128.

Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai JI, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006; 12: 642-9.

Wiener, C.M.; Booth, G.; Semenza, G.L. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225:485-8.

Yamada N, Horikawa Y, Oda N, Lizuka K, Shihara N, Kishi S, Takeda J. Genetic variation in the HIF-1 α gene is associated with type 2 diabetes in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5841-7.

Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol* 2010; 5:173-92.

Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9630-5.

Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome?. *J Clin Invest* 1997; 99:2152-64.

Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, et al. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?. *J Clin Invest* 1997; 99:2139-51.

Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, et al. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* 2002; 160:1405-23.

11. Anexos

Publicación

Nava-Salazar S, Sánchez-Rodríguez EN, Mendoza-Rodríguez CA, Romero-Arauz F, Morán C, Cerbón MA. Polymorphisms in the Hypoxia-Inducible factor 1 alpha gene in Mexican patients with preeclampsia: A case-control study. *BMC Res Notes* 2011, 4:68.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Polymorphisms in the hypoxia-inducible factor 1 alpha gene in Mexican patients with preeclampsia: A case-control study

Sonia Nava-Salazar¹, Elly N Sánchez-Rodríguez¹, C Adriana Mendoza-Rodríguez¹, Carlos Moran², Juan F Romero-Arauz², Marco A Cerbón^{2*}

Abstract

Background: Although the etiology of preeclampsia is still unclear, recent work suggests that changes in circulating angiogenic factors play a key role in its pathogenesis. In the trophoblast of women with preeclampsia, hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) is over-expressed, and induces the expression of non-angiogenic factors and inhibitors of trophoblast differentiation. This observation prompted the study of HIF-1 α and its relation to preeclampsia. It has been described that the C1772T (P582S) and G1790A (A588T) polymorphisms of the *HIF1A* gene have significantly greater transcriptional activity, correlated with an increased expression of their proteins, than the wild-type sequence. In this work, we studied whether either or both *HIF1A* variants contribute to preeclampsia susceptibility.

Results: Genomic DNA was isolated from 150 preeclamptic and 105 healthy pregnant women. Exon 12 of the *HIF1A* gene was amplified by PCR, and the genotypes of *HIF1A* were determined by DNA sequencing. In preeclamptic women and controls, the frequencies of the T allele for C1772T were 4.3 vs. 4.8%, and the frequencies of the A allele for G1790A were 0.0 vs. 0.5%, respectively. No significant differences were found between groups.

Conclusion: The frequency of the C1772T and G1790A polymorphisms of the *HIF1A* gene is very low, and neither polymorphism is associated with the development of preeclampsia in the Mexican population.

Background

Preeclampsia (PE), a systemic syndrome occurring in pregnant women, is characterized by the new onset of hypertension and proteinuria after 20 weeks of gestation and prior to 48 h postpartum [1-3]. It is the most important cause of morbidity and mortality in the mother-fetus binomial, affecting 5 to 8% of pregnant women worldwide. The actual percentage depends on the population studied and the definition of preeclampsia employed [4-6].

One of the main characteristics of PE is an inadequate trophoblast invasion leading to an incomplete remodeling of the spiral artery, a reduction in utero-placental perfusion, and a state of placental hypoxia. It is

considered that this condition can trigger widespread maternal endothelial dysfunction, and therefore the systemic manifestation of PE [7,8].

HIF-1 α is the major transducer of hypoxia signaling in several tissues, including human placenta [9,10]. Several studies suggest that hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α), and two of the numerous genes that it regulates [11], soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sF1T-1) and soluble endoglin (sEng) [12,13], are over-expressed in preeclamptic women and play a key role in the development of PE [14-17].

It has been reported that a base change of C to T at 1772, or G to A at 1790 in exon 12 of the *HIF1A* gene can increase the transcriptional activity of this gene compared to the wild type isoform [18]. Several studies have reported associations between these polymorphisms and different diseases in which alterations of HIF- α and its target genes are implicated, such as diabetes,

* Correspondence: mcerbon85@yahoo.com.mx

²Hospital de Ginecología y Obstetricia 4, Luis Castelazo Ayala, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F. 01090, México
Full list of author information is available at the end of the article

coronary disease and cancer (renal cell carcinoma; head, neck, colorectal, breast, and lung cancer) [19-22].

The aim of this study was to determine if there is an association between the presence of C1772T and/or G1790A polymorphisms and the development of PE in the Mexican population.

Methods

Population

We conducted a prospective case-control study with patients admitted to the Gynecology Hospital 4, Luis Castelazo Ayala of Mexican Social Security Institute in Mexico City. Patients were recruited from September 2008 to July 2010, including 105 healthy pregnant women and 150 preeclamptic women. Among the latter group, 29 patients had mild PE (MPE) and 121 severe PE (SPE). 36 patients presented HELLP syndrome and 11 intrauterine growth restriction (IUGR).

The diagnosis of PE was made according to international and Mexican Ministry of Health guidelines [1,3]. Criteria for MPE were as follows: blood pressure $\geq 140/90$ mm Hg persisting for at least 6 h, and proteinuria ≥ 300 mg/day after the 20th week of gestation. Criteria for SPE were: blood pressure $\geq 160/110$ mmHg persisting for at least 6 h, and proteinuria ≥ 2 g/day after the 20th week of gestation. Additionally, at least one of the following symptoms was present for SPE: headache, visual disturbance, epigastric pain or pulmonary edema. Criteria for HELLP syndrome were: thrombocytopenia ($\leq 100\ 000/\mu\text{l}$), increase in lactic dehydrogenase (LDH) (>600 U/l), aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels (AST and ALT ≥ 70 U/l). IUGR was determined by a birth weight below the 10th percentile for gestational age. Women with term pregnancy and without complications were recruited as controls. Excluded from the study were women with chronic hypertension, diabetes mellitus, gestational diabetes, renal or autoimmune disease.

The information on maternal demographic characteristics and family history was gathered from all subjects by personal interview. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital and by the Mexican Ministry of Health. Informed consent was obtained from all patients and controls.

Genotyping

Genomic DNA was isolated from the peripheral blood leukocytes by using standard protocols. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the 178-bp fragment of the exon 12 of the *HIF1A* human gene, as previously reported [18], using the 5'-CAT GTA TTT GCT GTT TTA AAG-3' forward primer and 5'-GAG TCT GCT GGA ATA CTG TAA CTG-3' reverse primer. The mixture for PCR was in 30 μL , containing

200 ng template DNA, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μM of each forward and reverse primer, 1.5 mM MgCl_2 , 0.5 U of Taq polymerase and 3 μL of 10X PCR buffer. The conditions for the PCR reaction were: denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 61°C for 30 sec, extension at 70°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were purified and sequenced using Big Dye Terminator kit (version 3.1) on an ABI Prism[®] 3100 Automated DNA sequencer according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical analysis

We compared clinical characteristics between preeclamptic and control groups. Data are presented as the mean \pm SEM. Statistical significance between groups was established with a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Turkey's multiple comparison test or student-*t* test, as appropriate.

Differences in genotypic frequencies between the two groups were tested for significance by using two by two contingency tables and Fisher's exact statistical test, and the odds ratios were calculated using 95% confidence intervals (CI). Data were analyzed using Graph Pad Prism Software V.5.1.

Test for the Hardy-Weinberg equilibrium, which revealed normal distribution of the population, was performed by the χ^2 test in <http://www.oege.org>.

The frequencies of genetic polymorphisms and the prevalence of PE in Mexican population (reported as 7%) were used for statistical power calculation in Quanto V.1.2.

P-values <0.05 were considered as statistically significant. All statistical tests were two-tailed.

Results

We conducted a case-control study to determine whether the presence of either of two single nucleotide polymorphisms (SNP) of the *HIF1A* gene is associated with the development of PE in Mexican population.

Table 1 shows the demographic and clinical characteristics of cases and controls. The group of women with PE showed a lower infant birth-weight, shorter gestation, and higher body mass index (BMI) compared to the control group. There were also a higher percentage of women with PE who smoked before pregnancy. All of these differences were statically significant. There were no differences in age and the frequency of primigravidas between the two groups. The seventeen PE patients (18%) who were multigravidas had a past history of PE.

The genotypic frequencies of C1772T and G1790A polymorphisms of the *HIF1A* gene are presented in Table 2. There were no significant differences in the

Table 1 Demographic and clinical characteristics of PE patients and the control group

Parameters	Control	PE	P-value	
N	105	150		
Maternal Age (years)	27.7 ± 0.6	28.4 ± 0.6	NS	
Smoking before pregnancy (%)	16.2	27.7	0.034	
Primigravid (%)	37.9	36.9	NS	
BMI (Kg/m ²)	28.9 ± 0.5	31.3 ± 0.8	0.011	
Newborn weight (g)	2991.0 ± 63.1	2177.0 ± 74.6	< 0.001	
GAD (weeks)	38.2 ± 0.2	34.8 ± 0.3	< 0.001	
		MPE	SPE	
SBP (mmHg)	114.1 ± 0.7	137.7 ± 1.9	155.0 ± 1.4	< 0.001 ♦
DBP (mmHg)	73.3 ± 0.6	89.7 ± 1.3	100.9 ± 1.0	< 0.001 ♦
Proteinuria (mg/24 h)	ND	443.6 ± 63.5	2482.0 ± 377.4	< 0.001 ♦♦

Values are the mean ± SEM. PE, preeclampsia; BMI, body mass index; GAD, gestational age at delivery; MPE, mild preeclampsia; SPE, severe preeclampsia; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; ND: not determined but negative using dipstick test. P values were calculated between the control and preeclampsia group. NS, non significant. ♦ Control vs. MPE and SPE; MPE vs. SPE. ♦♦ MPE vs. SPE.

distribution of the two polymorphisms between groups. None of the individuals presented the two polymorphisms, and those with either of the polymorphisms were considered heterozygotes. In the group of cases with C1772T polymorphism, 3 patients presented MPE and 10 SPE. Two of the latter also had IUGR and one had HELLP syndrome. The G1790A polymorphism was only observed in one woman of the control group, also considered heterozygote. The genotype frequencies were in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium.

Discussion

There is strong evidence that an imbalance between angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), placental growth factor, and factors inhibiting angiogenesis, such as sFlt1 and sEng, are closely

related to the pathogenesis of PE [16,17]. Since HIF- α is the main regulator of the angiogenic/anti-angiogenic factors that are over-expressed in women with PE, there has been growing interest in the biology of the HIF- α pathway and its role in human placenta development [14].

In vitro studies have demonstrated that under both normoxic and hypoxic conditions, the C1772T (P582S) and G1790A (A588T) polymorphisms of the *HIF1A* gene has a higher transcriptional activity, correlated with an over-expression of the corresponding protein, compared to the transcriptional activity and protein expression of the wild-type sequence [18,23,24]. Furthermore, in various groups among different populations, an association has been found between the presence of these polymorphisms and the development of diseases

Table 2 Genotype and allele frequencies of the C1772T and the G1790A polymorphisms of the *HIF1A* gene in PE patients and the control group

Nucleotide	Amino acids	Genotypes	PE (%)	Control (%)	P-value	OR (95% CI)
C1772T	Pro582	CC	137 (91.3)	95 (90.5)	0.203 *	0.485 (0.178-1.067)
		CT	13 (8.7)	10 (9.5)		
	TT	0 (0.0)	0 (0.0)			
	CT + TT	13 (8.7)	10 (9.5)			
	Allele					
		C	287 (95.7)	200 (95.2)	0.831	0.906 (0.389-2.107)
		T	13 (4.3)	10 (4.8)		
Genotypes						
G1790A	Ala588	GG	150 (100.0)	104 (99.3)	0.412 **	0.232 (0.009-5.737)
		GA	0 (0.0)	1 (0.7)		
	AA	0 (0.0)	0 (0.0)			
	GA + AA	0 (0.0)	1 (0.7)			
	Allele					
		G	300 (100.0)	209 (99.5)	0.411	0.232 (0.009-5.737)
		A	0 (0.0)	1 (0.5)		

PE, preeclampsia; OR, odds ratio; CI, confidence intervals. * Calculations were performed CC vs. CT + TT. ** Calculations were performed GG vs. GA + AA.

in which an altered HIF-1 α is implicated, such as cancer, diabetes and coronary disease [18-22].

In this study we determined the frequency of the C1772T and G1790A polymorphisms of the *HIF1A* gene and its possible correlation with PE risk in Mexican population.

Analyzing the clinical and demographic characteristic of our population (Table 1), we did not find a significant difference in age and parity between PE patients and women with normal pregnancies. However, it has been reported that women ≥ 40 years old have twice the risk of PE, whether they were primiparous or multiparous, and that as of the age of 34 the risk increases by 30% for each additional year. Nulliparous women have triple the risk of developing PE, especially in young women (≤ 20 years old) [25,26]. It is likely that the lack of significant differences between our study groups in relation to risk for PE is due to the age range of women included in the study.

Cigarette smoke exposure is associated with many adverse effects in pregnancy, such as preterm labor, preterm premature rupture of membranes, placental abruption and IUGR. Paradoxically, smoking has been associated with a decreased risk of PE. Several studies argue that it has a protective effect if women continue to smoke during pregnancy, and that contrarily, the protective effect is lost if the mother stops smoking [27,28]. In our study, the percentage of smokers in the PE group was higher compared with the control group, a difference that was statistically significant ($P = 0.034$, $OR = 1.984$). According to the questionnaires applied to patients, in all cases the women stopped smoking before pregnancy. Thus, the lack of protective effect under these circumstances is in agreement with the reported data.

With regard to body mass index, several studies suggest that obese women have twice the risk of developing PE, compared to women with normal BMI (20 -25). Women with BMI >35 before pregnancy had over four times the risk of PE [29]. The PE group had an average BMI of 31, classified as obese type I, which was statistically different with regard to the BMI of the control group.

There were also significant differences between the two groups in terms of gestational age at delivery (GAD) and newborn weight. 59% of women of the preeclamptic group delivered before 34 weeks of gestation, a proportion that was higher among women with SPE (63%) than MPE (41%). The tendency to an early delivery is due to the fact that PE is characterized by progressive deterioration in both maternal and fetal conditions. For this reason, studies and clinical practice indicate that after 34 weeks, the risk of continuing the pregnancy is greater than the benefit, resulting in the decision to terminate the pregnancy and the consequent low weight of newborns. Additionally, PE can be

complicated with IUGR (10-25%). With this condition, the physiological condition of the fetus determines whether the pregnancy is continued or terminated [2]. PE is a heterogeneous disease, and therefore the differences between these factors depend on the individual condition of each patient.

The genetic analysis of HIF polymorphisms between the patients with PE and women with normal pregnancies indicates that there are no significant differences in terms of the distribution of C1772T and G1790A genotypes and alleles (Table 2). For the 1772T allele, we found frequencies similar to those reported for other populations, such as Japan, Finland, Korea and China [18,21,22,30-32]. The frequency of homozygous for the T allele is very low (0.010-0.031). In some populations, like ours, the homozygous has not been found, which may be due to its low frequency per se in the Mexican population and/or the size of the sample analyzed.

In our population the frequency of the 1790A allele was 0.005. This value is low compared to other populations (0.015 - 0.047). Indeed, the homozygote for the A allele is very rare worldwide, and has only been reported in Japanese and Korean populations [19,21].

There is an ethnicity-related variation in the distribution of C1772T and G1790A polymorphisms, as reflected by studies of its association with particular diseases in different populations [21,33].

In a study of both these polymorphisms and their association with the development of PE in a Finnish population [30], the frequency of the C1772T polymorphism was similar to that found in our study. Contrarily, our results show that the frequency of the G1790A variant was lower than in the Finnish population. Nevertheless, in neither the Finnish study nor in our own, any association was found between the presence of these polymorphisms and the development of PE.

To the best of our knowledge, the Finnish study and the current contribution are the only ones to evaluate the frequency of the P582S and A588T polymorphisms of *HIF1A* gene in patients with PE. Therefore, the present study represents the first contribution from a Latin American population. One limitation of this study is the low statistical power; as the sample size provides a power less than the 50% under a dominant model. On the one hand, the sample size should be increased, however, from our point of view, due to the insignificant statistical difference observed between the study groups, mainly for the variant P582S, these results would not change if a larger number of patients were included in each study group.

The inability to develop satisfactory prevention and clinical prediction strategies for PE has led to various focuses of investigation. Since previous reports have

suggested that changes in circulating angiogenic factors are strongly related to the pathogenesis of PE, one of the approaches has been to attempt to establish a predisposition to this disease in relation to genes that are involved in the angiogenesis pathway. The result of association studies between PE and different angiogenic genes, such as *VEGF*, *FLT* and *ENG*, are inconsistent [34-37]. Hence, further studies are necessary to determine whether these polymorphisms and their proteins play a key role in the development of PE.

Conclusion

In the Mexican population, C1772T and G1790A polymorphisms of the *HIF1A* gene are not associated with the development of PE.

Acknowledgements

This research was supported by CONACyT-México, grant number 80338, and by the UNAM, grant DGAPA PAPIIT number IN219710. SNS is a student of the Doctorate in Biomedical Sciences (UNAM) and received a Scholarship, number 49796, from CONACyT-México. This study was conducted in collaboration between the National Autonomous University of Mexico and the Gynecology Hospital 4 of the Mexican Social Security Institute. We thank the volunteers for participating in this study, and the clinicians of the Gynecology Hospital 4 and Ignacio Camacho-Arroyo for critical review of this manuscript.

Author details

¹Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México. ²Hospital de Ginecología y Obstetricia 4, Luis Castelazo Ayala, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F. 01090, México.

Authors' contributions

SNS, the expert in the field and major contributor to the manuscript, performed the experiments, analyzed data and drafted the manuscript. ENSR helped in collecting and processing biological samples. CAMR reviewed and participated in the design of the experiments. CM and JFRA participated in the study by diagnosis, selection of the studied population and medical care of the patients. MAC participated in the overall study design, project oversight and critical review of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 26 October 2010 Accepted: 17 March 2011

Published: 17 March 2011

References

1. ACOG Practice Bulletin: Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2002, **99**:159-67.
2. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M: Preeclampsia. *Lancet* 2005, **365**:785-97.
3. Secretaría de Salud. Lineamiento Técnico: Prevención, diagnóstico y manejo de la preeclampsia/eclampsia. México, DF; 4 2007.
4. Romero Arauz JF, Tena Alavez G: Epidemiología, clasificación y factores de riesgo en preeclampsia. In *Enfermedades hipertensivas del embarazo* Edited by: McGrawHill, México 2009, 1-15.
5. Velasco ME, Navarrete HE: Mortalidad materna en el IMSS, 1991-2005. Un periodo de cambios. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2006, **44**:S121-8.
6. Souza JP, Cecatti JG, Faundes A, Morais SS, Villar J, Carroli G, Gulmezoglu M, Wojdyla D, Zavaleta N, Donner A, Velasco A, Bataglia V, Valladares E, Kubickas M, Acosta A: Maternal near miss and maternal death in the World Health Organization's 2005 global survey on maternal and perinatal health. *Bull World Health Organ* 2010, **88**:113-9.
7. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ: Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997, **99**:2152-64.
8. Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA: Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med* 2008, **59**:61-78.
9. Semenza GL, Wang GL: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992, **12**:5447-54.
10. Rajakumar A, Conrad K: Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta. *Biol Reprod* 2000, **63**:559-69.
11. Caniggia I, Winter J, Lye S, Post M: Oxygen and placental development during the first trimester: Implications for the pathophysiology of preeclampsia. *Placenta* 2000, **21**(Suppl A):S25-30.
12. Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A: Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) and soluble Flt-1 by oxygen-a review. *Placenta* 2000, **21**(Suppl A):S16-24.
13. Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabéu C: Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 2002, **277**:43799-808.
14. Rajakumar A, Whitelock A, Weissfeld L, Daftary A, Markovic N: Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2 α , in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod* 2001, **64**:499-506.
15. Caniggia I, Winter JL: Hypoxia inducible factor-1: Oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic Pregnancies - A Review. *Placenta* 2002, **16**(Suppl A):S47-57.
16. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA: Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004, **350**:672-83.
17. Foidart JM, Schaaps JP, Chantraine F, Munaut C, Lorquet S: Dysregulation of anti-angiogenic agents (sFlt-1, PLGF, and sEndoglin) in preeclampsia—a step forward but not the definitive answer. *J Reprod Immunol* 2009, **82**:106-11.
18. Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, Oue N, Yasui W, Imai K, Nakachi K, Poellinger L, Nishiyama M: Hypoxia-inducible factor-1 α polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis* 2003, **24**:1779-83.
19. Yamada N, Horikawa Y, Oda N, Lizuka K, Shihara N, Kishi S, Takeda J: Genetic variation in the HIF-1 α gene is associated with type 2 diabetes in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, **90**:5841-7.
20. Hebert C, Norris K, Parashar P, Ord R, Nikitakis N, Sauk J: Hypoxia-inducible factor-1 α polymorphisms and TSC1/2 mutations are complementary in head and neck cancers. *Mol Cancer* 2006, **5**:1-11.
21. Kim HO, Jo YH, Lee J, Lee SS, Yoon KS: The C1772T genetic polymorphism in human HIF-1 α gene associates with expression of HIF-1 α protein in breast cancer. *Oncol Rep* 2008, **20**:1181-7.
22. Hlatky MA, Quertermous T, Boothroyd DB, Priest JR, Glassford AJ, Myers RM, Fortmann SP, Iribarren C, Tabor HK, Assimes TL, Tibshirani RJ, Go AS: Polymorphisms in hypoxia inducible factor 1 and the initial clinical presentation of coronary disease. *Am Heart J* 2007, **154**:1035-42.
23. Clifford SC, Astuti D, Hooper L, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Maher ER: The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1 α in renal cell carcinoma. *Oncogene* 2001, **20**:5067-74.
24. Fu XS, Choi E, Bubley GJ, Balk SP: Identification of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) polymorphism as a mutation in prostate cancer that prevents normoxia-induced degradation. *Prostate* 2005, **63**:215-21.
25. Duckitt K, Harrington D: Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005, **330**:565-571.
26. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R: Pre-eclampsia. *Lancet* 2010, **376**:631-44.
27. Conde-Agudelo A, Althabe F, Belizán JM, Kafury-Goeta AC: Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 1999, **181**:1026-35.

28. Newman MG, Lindsay MK, Graves W: **Cigarette smoking and pre-eclampsia: their association and effects on clinical outcomes.** *J Matern Fetal Med* 2001, **10**:166-70.
29. Mbah AK, Kornosky JL, Kristensen S, August EM, Alio AP, Marty PJ, Belogolovkin V, Bruder K, Salihi HM: **Super-obesity and risk for early and late pre-eclampsia.** *BJOG* 2010, **117**:997-1004.
30. Heino S, Kaare M, Andersson S, Laivuori H: **Non-synonymous sequence variants within the oxygen-dependent degradation domain of the HIF1A gene are not associated with pre-eclampsia in the Finnish population.** *BMC Med Genet* 2008, **9**:96-101.
31. Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Kuroda T, Ochiuni T, Matsumura S, Oue N, Yasui W, Kaneyasu M, Tanimoto K, Nishiyama M, Chayama K: **Single nucleotide polymorphism in the hypoxia-inducible factor-1alpha gene in colorectal carcinoma.** *Oncol Rep* 2004, **12**:1033-7.
32. Ling TS, Shi RH, Zhang GX, Zhu H, Yu LZ, Ding XF: **Common single nucleotide polymorphism of hypoxia-inducible factor-1alpha and its impact on the clinicopathological features of esophageal squamous cell carcinoma.** *Chin J Dig Dis* 2005, **6**:155-8.
33. Apaydin I, Konac E, Onen HI, Akbaba M, Tekin E, Ekmekci A: **Single nucleotide polymorphisms in the hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) gene in human sporadic breast cancer.** *Arch Med Res* 2008, **39**:338-45.
34. Srinivas SK, Morrison AC, Andrela CM, Elovitz MA: **Allelic variations in angiogenic pathway genes are associated with preeclampsia.** *Am J Obstet Gynecol* 2010, **202**:445.e1-11.
35. Rogers MS, D'Amato RJ: **The effect of genetic diversity on angiogenesis.** *Exp Cell Res* 2006, **312**:561-74.
36. Papazoglou D, Galazios G, Koukourakis MI, Panagopoulos I, Kontomanolis EN, Papatheodorou K, Maltezos E: **Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pre-eclampsia.** *Mol Hum Reprod* 2004, **10**:321-4.
37. Kim SY, Lim JH, Yang JH, Kim MY, Han JY, Ahn HK, Choi JS, Park SY, Kim MJ, Ryu HM: **Dinucleotide repeat polymorphism in Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) gene is not associated with preeclampsia.** *BMC Med Genet* 2008, **9**:68.

doi:10.1186/1756-0500-4-68

Cite this article as: Nava-Salazar et al.: Polymorphisms in the hypoxia-inducible factor 1 alpha gene in Mexican patients with preeclampsia: A case-control study. *BMC Research Notes* 2011 **4**:68.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Publicación

Sánchez-Rodríguez EN, **Nava-Salazar S**, Mendoza-Rodríguez CA, Morán C, Romero-Arauz F, Ortega E, Granados J, Cervantes A, Cerbón MA. Persistence of decidual NK cells and KIR genotypes in healthy pregnant and preeclamptic women: a case-control study in the third trimester of gestation. *Reprod Biol Endocrinol* 2011, 9:8.

RESEARCH

Open Access

Persistence of decidual NK cells and KIR genotypes in healthy pregnant and preeclamptic women: a case-control study in the third trimester of gestation

Elly N Sánchez-Rodríguez^{1*}, Sonia Nava-Salazar¹, C Adriana Mendoza-Rodríguez¹, Carlos Moran², Juan F Romero-Arauz², Enrique Ortega³, Julio Granados⁴, Alicia Cervantes-Peredo⁵, Marco Cerbón^{1*}

Abstract

Background: Natural Killer (NK) cells are the most abundant lymphocytes in the decidua during early gestation. The interactions of NK cells with the extravillous cytotrophoblast have been associated with a normal spiral artery remodeling process, an essential event for a successful pregnancy. Recent data indicate that alterations in the amount of decidual NK (dNK) cells contribute to the development of preeclampsia (PE). Moreover, genetic studies suggest that Killer Immunoglobulin-like Receptors (KIR) expressed in dNK cells influence the susceptibility to PE. Although dNK cells have been well characterized during early pregnancy, they have been scarcely studied in the third trimester of gestation. The aim of this work was to characterize dNK cells at the last trimester of gestation and to analyze the KIR genotype of healthy and PE women.

Methods: Decidual samples were obtained during Caesarean section from control (n = 10) and PE (n = 9) women. Flow cytometric analysis of CD3, CD56, CD16 and CD9 was used to characterize and quantify dNK cells in both groups. Cell surface markers from decidual leukocytes were compared with PBMC from healthy donors. KIR genotyping was performed in genomic DNA (control, n = 86; PE, n = 90) using *PCR-SSP*.

Results: The results indicate that dNK cells persist throughout pregnancy. They represented 20% of total leukocytes in control and PE groups, and they expressed the same cell surface markers (CD3⁺, CD56⁺, CD16⁻ and CD9⁺) as dNK in the first trimester of gestation. There were no significant differences in the percentage of dNK cells between control and PE groups. The analysis of KIR gene frequencies and genotypes was not statistically different between control and PE groups. The ratio of activating to inhibitory genes indicated that the overall inhibitory balance (0.2-0.5) was more frequent in the PE group (control, 31.3% vs PE, 45.5%), and the activating balance (0.6-1.1) was more frequent in the control group (control, 68.6% vs PE, 54.4%). However this difference was not significant.

Conclusion: We demonstrated the persistence of dNK cells in PE and control women at the third trimester of pregnancy; these dNK cells had a similar phenotype to those found during early pregnancy. The predominance of a KIR inhibitory balance in the PE group could be associated to the physiopathology of PE.

Background

Extravillous trophoblast invasion is a hallmark of normal pregnancy. One of the main mechanisms that contribute to normal spiral artery remodeling is the interaction between decidual leukocytes and the extravillous cytotrophoblast. Dysregulation of these interactions is

associated with shallow endovascular cytotrophoblast invasion of the spiral arteries, which is a key feature in the pathogenesis of preeclampsia (PE) [1].

During normal early pregnancy, Natural Killer (NK) cells are the most abundant population of leukocytes in the decidua. It has been reported that NK cells represent 70% of the total decidual leukocyte population in the first trimester of gestation [2,3]. Some authors propose that this population is practically absent at the end of pregnancy [2,4], but other researchers have identified

* Correspondence: ellysnz@yahoo.com; mcerbon85@yahoo.com.mx

¹Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F., México

Full list of author information is available at the end of the article

and isolated decidual NK cells (dNK) during normal term pregnancies [5-9].

It is well accepted that dNK cells differ from peripheral blood NK cells (pNK) in terms of their gene expression pattern, cell surface markers [10] and functions [11]. Based on their cell surface markers, pNK cells are divided into two subsets: CD56^{dim} CD16⁺ (highly cytotoxic cells) and CD56^{bright} CD16⁻ (high cytokine secretors) [12]. During early pregnancy, dNK cells have been characterized as CD56^{bright} CD16⁻, as well as by the expression of some exclusive proteins, e.g., Killer cell Immunoglobulin like Receptors (KIR), CD9, CD151, CD53 and $\alpha 4\beta 7$ integrin [10,13,14].

Recently, Hanna *et al* found that dNK cells but not pNK cells, mediate angiogenesis and fetal trophoblast invasion through the release of chemokines and proangiogenic factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PLGF) [11]. In samples of decidua basalis in the earliest stages of artery remodeling, Smith *et al* found dNK immunopositive cells for matrix metalloproteinase 7 and 9, suggesting their participation in vascular remodeling in a trophoblast independent stage [15].

Less evidence is available regarding the proportion, cell surface markers and functions of dNK cells from patients with PE, and the data are still controversial. Some authors have found an increase in the number of CD56⁺ cells in the decidua of women with PE compared to normal term pregnant women [16,17], while others have found a decrease [18-20] or no differences in the number of cells [21]. In this study, we analyzed NK cells from the decidua of PE patients and normal term pregnant women.

Several functions of NK cells depend on a finely tuned regulation by inhibitory and activating receptors. The KIR family is one of the most important groups of receptors expressed in NK cells, and HLA (histocompatibility leukocyte antigens) are their foremost ligands. The KIR family contains inhibitory (L) and activating (S) receptors encoded by highly polymorphic loci. The number and type of genes in these loci vary among individuals and haplotypes. Group A haplotype contains only one stimulatory KIR gene (*2DS4*), whereas group B haplotype contains various combinations of stimulatory genes [22-24].

There is evidence about the participation of KIR in the development of PE. The immune response in the decidua greatly depends on the receptor-ligand recognition of maternal KIR genotypes and their fetal ligands during the critical stages of uterine arterial remodeling. In a Caucasian population it has been reported that the KIR inhibitory genotype AA from pregnant women in combination with *HLA-C2* ligands in their babies, specifically the presence of *KIR2DL1*, is associated with an

increased prevalence of PE [25]. In the present study we analyzed the KIR genotype in normal and PE Mexican women.

Methods

Patients and biological samples

For the analysis of decidual leukocytes, decidual tissue samples were obtained by scraping off the mucosal surface of the uterine cavity by curettage during cesarean section, of women that had indicated or elective cesarean sections at the third trimester of gestation (>36 weeks of gestation; control, n = 10; PE group, n = 9). None of the subjects were in labor. Peripheral blood samples were obtained from pregnant women in the first trimester of gestation and from healthy non-pregnant women.

For the KIR genotyping study, maternal peripheral blood samples were obtained by venipuncture of the forearm from eighty-six (n = 86) healthy pregnant women (control group) and ninety (n = 90) preeclamptic women (PE group).

This case-control study was performed with women recruited consecutively from the Hospital of Gynecology "Luis Castelazo" of the Mexican Social Security Institute, in Mexico City. For the PE group, the diagnosis criteria and classification were according to the American and Royal College of Obstetricians and Gynecologists [26,27] and the Mexican Ministry of Health guidelines [28]. Severe PE was defined as new-onset hypertension after the 20th week of pregnancy; systolic pressure ≥ 160 mm Hg and/or diastolic ≥ 110 mm Hg, during a seven day period on two occasions at least 6 hours apart, while the patient is on bed rest; proteinuria ≥ 2 g in a 24 h urine specimen; two or more persistent data of vasospasm (e.g. oliguria of less than 500 mL in 24 h, seric creatinin ≥ 1.2 mg/dL, cerebral or visual disturbances, pulmonary edema, epigastric or right upper-quadrant pain, impaired liver function [AST ≥ 70 /UI], thrombocytopenia [$<100,000$ mm³], cyanosis, intrauterine growth restriction in the babies).

The control group consisted of healthy pregnant women at the end of pregnancy, without any data or history of PE. Exclusion criteria involved patients with diabetes mellitus, gestational diabetes mellitus, renal diseases, chronic hypertension, infectious diseases, autoimmune diseases, and chronic diseases in general.

The Hospital Ethics Committee approved this study and written consent was obtained from all women.

Decidual leukocytes isolation and Flow cytometry

In order to isolate leukocytes from the decidua and to characterize NK cells, tissue samples were processed as described by Rieger *et al* [19], and Arcuri *et al* [29], with minor modifications. Briefly, decidual tissues were

carefully cleaned of visible blood clots, specimens were extensively washed (at least three times) in sterile PBS solution to eliminate any possible blood contamination; and were then trimmed, minced and digested with 0.1% (w/v) collagenase type IV (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) and 0.02% (w/v) hyaluronidase type I-S (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) in PBS for 1 h at 37°C under gentle agitation. The cell suspension was filtered through a 70 µm sieve (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA), washed in PBS and layered on an equal volume of Ficoll Hypaque (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) at room temperature for density gradient centrifugation (25 min at 600 g). Cells were collected from the interface, washed and suspended in RPMI 1640, supplemented with 10% FCS, 100 IU/mL penicillin, 100 IU/mL streptomycin and 0.25 µg/mL amphotericin B (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA).

Cells were labeled by direct staining with monoclonal antibodies using single, double or triple color immunofluorescence staining: CD3 [HIT3a; FITC] and CD16 [DJ130c; FITC] from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA); CD56 [N-CAM clone MEM 188; Phycoerythrin] and CD9 [OKT3; FITC] from e-Bioscience (San Diego, CA, USA). For three-color staining we used a third antibody for CD3 [clone SK7; PerCP] from Becton Dickinson (San Jose, CA, USA). 1×10^6 cells/mL in PBS/0.1% sodium azide (300 µL/sample) were incubated with 10 or 20 µL of the appropriate monoclonal antibody for 30 min at 4°C in the dark. After two washes with PBS/0.1% sodium azide and once with PBS, cells were resuspended and fixed with PBS containing 1% paraformaldehyde for 20 min at 4°C in the dark. After one wash with PBS, cells were resuspended in PBS and analyzed on a Becton Dickinson FACSCalibur Flow cytometer.

In order to characterize more closely the decidual leukocyte population isolated and to establish qualitative differences in the subset markers between decidual and peripheral NK cells, using two-color staining the percentage of CD56⁺CD9⁺ cells was compared with the same region in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). A further characterization was done using triple-color immunofluorescence staining, CD3⁻ cells were gated and the CD56⁺CD9⁺ expression was analyzed in this gate to avoid CD3⁺CD56⁺ contamination in the analysis of the CD9 marker.

PBMC were obtained from healthy pregnant and non-pregnant women, by Ficoll Hypaque (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) gradient and stained using the procedure described above.

Data were analyzed using BD Cell Quest™ Software (San Jose, CA, USA). The percentage of CD3⁺ (mature T lymphocytes), CD56⁺ and CD3⁻/CD56⁺CD16^{-/+} (NK

cells population) was established by delineating regions around the lymphocyte cluster.

KIR genotyping

DNA was extracted from peripheral blood of PE and control groups using a standard salting out procedure. KIR genes were genotyped by the presence or absence of each gene locus, using a low-resolution *PCR-SSP* commercial typing kit, following the manufacturers' instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). We determined the KIR genotypes responsible for the inhibitory functions (*2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*), the activating signals (*2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5*, *3DS1*) and the two pseudogenes (*2DP1* and *3DP1*). The amplification products were electrophoresed on 2% agarose gels containing ethidium bromide, and visualized under ultraviolet light. The presence of each KIR gene was detected as a band of the expected size. Individuals were determined negative for a KIR gene when a band of the expected size was absent and the control band was present. For the assessment of a given genotype, *KIR2DS4* full length (*ins*) and deletion (*del*) variants were assigned positive when either or both variants were detected; whereas when both variants were absent the subject was labeled as *2DS4* negative.

Statistics

The decidual leukocyte population was analyzed by Student's *t*-test. If the samples did not show a normal distribution, a non-parametric test was used (Mann Whitney's *U*-test). The *p* values lower than or equal to 0.05 were taken as significant.

Genotype frequency was determined by direct counting. Genotype frequency comparisons were made by a two-sided Fisher's exact test; when the *p* value was less than 0.05 we adopted a Bonferroni correction (*pc*) for multiple comparisons. The odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were calculated. The sample size required for an alpha of 0.05 and 80% of statistical power was calculated in each group.

All statistical analyses were performed in Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) for *Windows*.

Results

Flow cytometry of decidual leukocytes

The cell surface markers and proportion of isolated leukocytes from third trimester decidual tissue are shown in Figure 1 and Table 1, respectively. Figure 1A, E, H and 1L show the negative control cell staining. The classic markers for NK cells, CD56⁺CD3⁻ (16.1% Figure 1B); and CD56⁺CD16^{+/-} (1.6% Figure 1C) in the decidua were compared with those obtained from the same

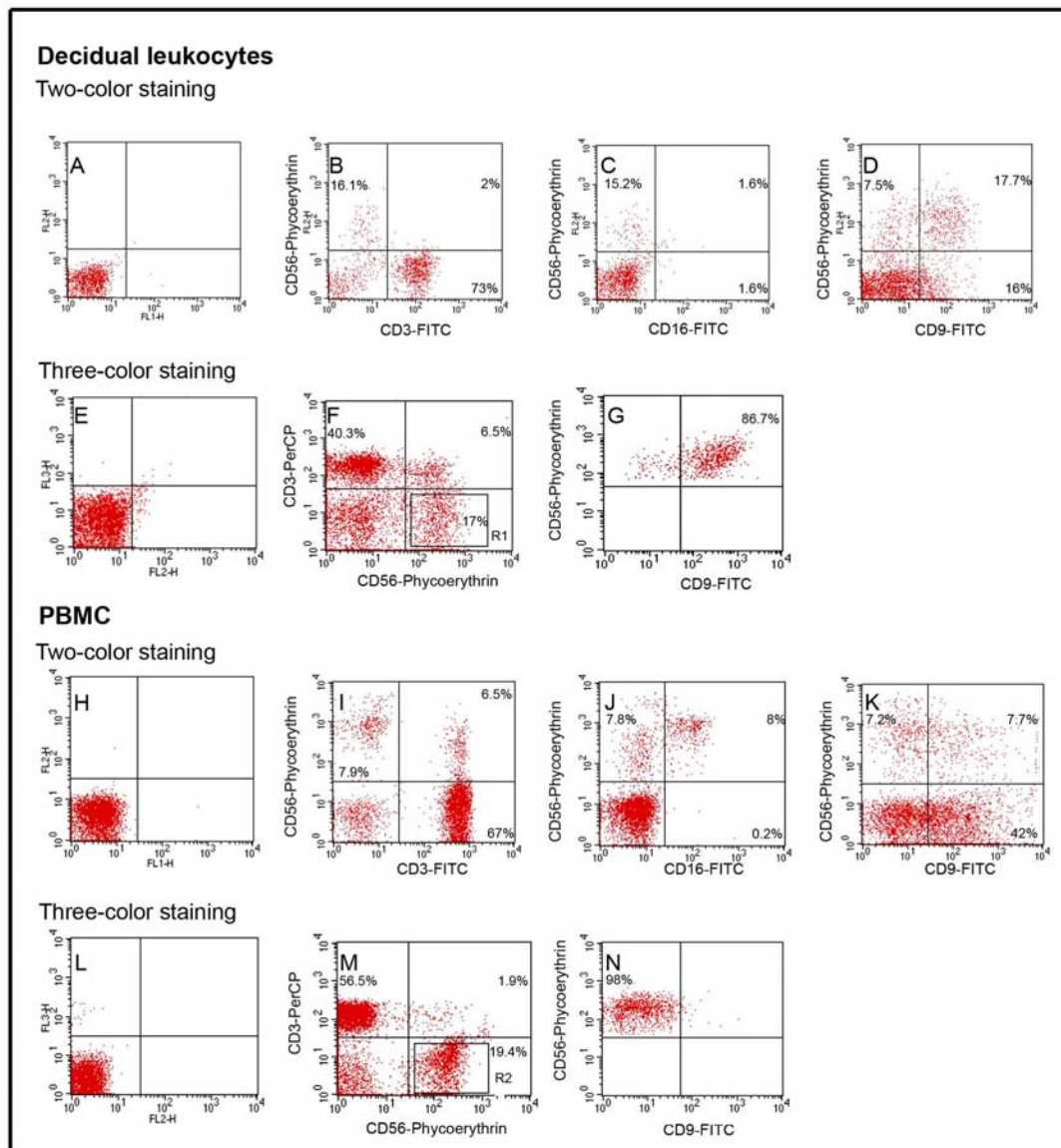


Figure 1 Flow cytometry analysis of decidual leukocytes. Comparison of typical subset-markers of NK cells (CD3⁻, CD56⁺, CD16^{+/+}) and the non-typical dNK cells marker (CD9⁺). A-D) Representative FACS for two-color staining for decidual leukocytes. E-G) Representative FACS for three-color staining for decidual leukocytes. H-K) Representative FACS two-color staining for peripheral blood mononuclear cells (PBMC). L-M) Representative FACS three-color staining for PBMC. A, E, H, L) negative cells; B, I) upper left quadrants (UL): CD56⁺ CD3⁻ cells; C, J) UL: CD56⁺ CD16⁻ cells; upper right quadrants (UR): CD56⁺ CD16⁺ cells; D, K) UR: CD56⁺ CD9⁺ cells. F, M) R1 and R2, gate for CD3⁻ cells; G, N) CD56⁺ CD9^{+/+} expression on CD3⁻ cells.

subset of cells in PBMC (7.9% Figure 1I and 8% Figure 1J). The phenotype found in leukocytes from the decidua was similar to the CD56⁺ CD16⁻ subpopulation in PBMC however, the CD56⁺ CD16⁺ subpopulation was not found in the decidua. Double positive cells were found for CD56 and CD9 markers in decidual leukocytes and PBMC, using two-color staining (Figure 1D, upper right quadrant and Figure 1K, upper right quadrant). However, when we used three-color staining

(Figures 1E-G and 1L-N), 87% of the CD3⁻ CD56⁺ subpopulation in the decidua (Figure 1F, R1) was CD9⁺ (Figure 1G). In contrast, 98% of the same subpopulation in PBMC (Figure 1M, R2) was negative for the CD9 marker (Figure 1N).

The classic markers for NK cells (CD3⁻ CD56⁺) were detected in a similar percentage in the control and PE decidual tissue (20.66 ± 9.49% vs 21.13 ± 12.79% respectively; *p* > 0.05) (Table 1). The subset-markers, CD56

Table 1 Proportion of decidual leukocytes analyzed by Flow cytometry

Decidual lymphocyte subset	Controls (n = 10)	PE (n = 9)	p
CD3 ⁺ (%)	54.15 ± 17.76	30.95 ± 15.01	0.007^a
CD56 ⁺ (%)	21.70 ± 10.35	23.24 ± 12.24	NS
CD3 ⁺ CD56 ⁺ (%)	2.34 ± 1.55	2.40 ± 2.05	NS
CD3 ⁺ CD56 ⁺ (%)	20.66 ± 9.49	21.13 ± 12.79	NS
CD56 ⁺ CD16 ⁻ (%)	19.09 ± 9.49	21.41 ± 12.36	NS
CD56 ⁺ CD16 ⁺ (%)	1.65 ± 1.17	2.81 ± 4.53	NS
CD56 ⁺ CD9 ⁺ (%)	15.68 ± 4.88	18.87 ± 8.7	NS

Comparison of the proportion of decidual leukocytes between healthy pregnant women (controls) and women with preeclampsia (PE) using two-color immunofluorescence.

Values are presented as mean ± standard deviation; NS, No significant difference; (%) percentage of cells bearing a particular set of subset markers.

^a p < 0.05.

+CD16^{-/+} and CD56⁺CD9⁺ remained similar between both groups (p > 0.05) (Table 1).

Interestingly, significant differences in the proportion of CD3⁺ cells between PE patients and the control group were found. A decreased percentage of CD3⁺ cells in the PE group were observed as compared with the control group (30.95 ± 15.01% vs 54.15 ± 17.76%, respectively; p = 0.007) (Table 1).

KIR gene frequencies

To establish KIR gene frequencies, KIR genotyping was performed in women with PE and controls (Table 2). Framework genes (*2DL4* and *3DL3*), and the two pseudogenes (*2DPI*, *3DPI*) were detected in 100% of women from both groups. The *3DL2*, *2DL1*, *3DL1*, and *2DL3* genes were not found in all individuals (90.7-98.9%). The lowest frequency in both groups was for the *2DS3* gene (<21%).

The frequencies of *KIR2DL2* (control, 61.6% vs PE, 43.3%; p = 0.017, OR = 0.47, 95% CI = 0.26 to 0.86; pc > 0.05) and *2DL5 B* (control, 64.0% vs PE, 48.9%; p = 0.049, OR = 0.54, 95% CI = 0.23 to 0.98; pc > 0.05) were lower but not significantly different in the PE group as compared to control group (Table 2). No association for the activating KIR genes (*2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4 del*, *2DS4 ins*, *2DS5* and *3DS1*) between groups was found. No significant differences were observed in any single KIR gene frequency after we adopted the Bonferroni correction.

KIR genotype profiles

Fifty-seven combinations of KIR genes were found (Figure 2). The genotypes (G) with a lower number of KIR genes (G. 48 to G. 57) had at least one activating gene and six or seven inhibitory genes. Genotypes 23, 52 and 56 were detected in high frequencies (10% to 15.6%), whereas the rest of the genotypes were found in low frequencies (0%-8.3%).

Genotypes 42 and 53 were more prevalent but not significantly different in the control group as compared with the PE group (pc > 0.05); both genotypes were characterized by the presence of the *KIR2DL2* gene. Genotype 52 (*KIR2DL2* negative) was two fold more frequent in the PE group than in the control one, but this difference was not significant.

The ratios of activating to inhibitory (Act/Inh) genes ranged from 0.2 to 1.1. No significant differences were observed in the individual ratios between groups. In order to further analyze these data, we grouped the ratios into 2 range categories: 0.2 to 0.5 (more inhibitory range) and 0.6 to 1.1 (more activating range) (Table 3).

With this analysis we observed that the PE women fall more frequently (45.5%) into the inhibitory range category than controls women (31.3%) and the controls women fall more frequently (68.6%) in the activating range as compared to PE group (54.4%), however this difference was not significant (p = 0.05, OR = 0.54, 95% IC = 0.29 to 1.013).

Discussion

Several studies indicate that dNK cells have a major role in implantation and placental development; alterations

Table 2 Frequencies of KIR genes

KIR gene	Controls (n = 86)	PE (n = 90)
Inhibitory		
<i>2DL1</i>	96.5	98.9
^a <i>2DL2</i>	61.6	43.3
<i>2DL3</i>	94.2	95.6
<i>2DL4</i>	100.0	100.0
<i>2DL5 all</i>	61.6	47.8
<i>2DL5 A</i>	59.3	50.0
^b <i>2DL5 B</i>	64.0	48.9
<i>3DL1</i>	90.7	93.3
<i>3DL2</i>	97.7	95.6
<i>3DL3</i>	100.0	100.0
Activating		
<i>2DS1</i>	58.1	47.8
<i>2DS2</i>	48.8	36.7
<i>2DS3</i>	20.9	18.9
<i>2DS4 del</i>	65.4	54.1
<i>2DS4 ins</i>	75.3	76.5
<i>2DS5</i>	53.3	43.3
<i>3DS1</i>	52.3	48.9
Pseudogenes		
<i>2DPI</i>	100.0	100.0
<i>3DPI</i>	100.0	100.0

Values are presented as percentage.

^a p = 0.017, OR = 0.47, 95% CI = 0.26 to 0.86; pc > 0.05.

^b p = 0.049, OR = 0.54, 95% CI = 0.23 to 0.98; pc > 0.05.

The p values were corrected for 19 comparisons using the Bonferroni correction.

Genotype	KIR															Total (19)	% S	% L	Ratio Act/Inh	Frequency (%) Controls	Frequency (%) PE							
	2DL					2DS					3DL			3DS														
	1	2	3	4	5a1	5A	5B	1	2	3	4del	4ins	5	1	2							3	3DS	2DP	3DP			
1																							18	100	100.0	1.0	0.0	1.1

Figure 2 KIR genotype distribution in control and preeclamptic women. KIR genotype distribution and percentage (%) of women displaying each genotype in healthy women (Controls) and women with preeclampsia (PE). Shaded boxes represent the presence of the inhibitory genes (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5all, 2DL5A, 2DL5B, 3DL1, 3DL2, 3DL3), activating (2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4 del, 2DS4 ins, 2DS5, 3DS1) and pseudogenes (2DP1, 3DP1). White boxes indicate the absence of KIR gene. Dark boxes indicate the presence of KIR gene. Dashed boxes indicate that the genotype was assigned when either 2DS4 ins and 2DS4 del variants were detected. The total number of KIR genes in each genotype is indicated, as well as the numbers of activating (S) and inhibitory (L) genes. Ratios of the activating to inhibitory genes are shown in the right column. The *p* values less than 0.05 were corrected for 57 comparisons using the Bonferroni correction. ^a *p* = 0.012, OR = 0.067, 95% IC 0.004 to 1.204; *pc* > 0.05 ^b *p* = 0.03, OR = 0.124, 95% IC 0.015 to 1.028; *pc* > 0.05.

in their proportion and functions have been associated with PE [11,25,30]. There is growing evidence that the clinical features of PE are generated either by defective placentation during early pregnancy and/or by a distinct increase in the systemic inflammatory response in the second part of pregnancy [31,32].

There is agreement on the presence of NK cells in decidual tissue at the earliest stages of pregnancy, but there are conflicting reports about their presence at the third trimester of gestation [5-8,33,34]. In this study we found a high percentage of CD3⁺CD56⁺ cells in the

decidua of women at the third trimester of pregnancy, in agreement with previous investigations in which NK cells have been found and isolated from deciduas at term [5-8]. This is the first demonstration that this population shares the same phenotype as the dNK cells detected in the first trimester of gestation (CD56⁺ CD16⁻ and CD9⁺) [14].

The CD9 marker has been proposed as a specific marker for dNK cells, it has been observed exclusively expressed in NK cells isolated from decidua in early gestation but not in pNK cells [10]. In placenta, it has been detected by immunohistochemistry on extravillous trophoblast cell columns of first trimester, but not in the third trimester [35]. We found in the CD3⁺ gate, double positive cells for CD56 and CD9 markers in leukocytes from decidua and not in PBMC, suggesting that the CD3⁺CD56⁺ CD9⁺ subpopulation found in the third trimester of gestation in the decidua, is similar to that found in early pregnancy. However, we also observed CD9 positive cells in all isolated PBMC when we used two-color staining flow cytometry and since not all CD56⁺ cells in PBMC lack expression of CD3, there will be a possibility that the CD56⁺CD9⁺ cells were CD3⁺

Table 3 Activating to inhibitory balance

Range Act/Inh	Frequency (%) Controls (n = 86)	Frequency (%) PE (n = 90)
Activating range: 0.6-1.1	68.6	54.4
Inhibitory range: 0.2-0.5	31.3	45.5

Ratio numbers of activating to inhibitory (Act/Inh) KIR genes between controls and women with preeclampsia (PE). 0.2 to 0.5 (inhibitory range) and 0.6 to 1.1 (activating range).

p = 0.05, OR = 0.54, 95%CI 0.29 to 1.013.

(NKT). The expression of CD9 in peripheral leukocytes has been reported during infectious conditions [36]. This observation is clarified when we used three-color staining flow cytometric analysis, because all NK cells in PBMC were negative for CD9.

The ligand for murine CD9 is the pregnancy specific glycoprotein (PSG) which concentration increases exponentially in plasma until the term of pregnancy. The CD9 ligand has been involved in the production of cytokines contributing to a successful pregnancy [10,37]. According to Abadía-Molina *et al*, the possible role of term decidual leukocytes is related to placental detachment, cytokine production and normal delivery [6]. Thus, the presence of CD9+ dNK cells at term pregnancy could be of physiological relevance.

The precise composition of decidual leukocytes in PE women has remained unclear due to diverse difficulties such as different sources of decidual tissue (placental bed or attached to the placenta) and the various methods used for their characterization (Flow cytometric analysis and immunohistochemistry) [20]. The Flow cytometric analysis used in this study overcomes this problem providing a better quantification method that can manage a high cell number. However, some discrepancies have been found using this method. In the present study the overall amount of each cell population was quantified, while other studies previously counted CD45 leukocytes. Wilczyński *et al* reported an increase in the cytotoxic CD56⁺CD16⁺ population in the PE group as compared with the control [38], while Rieger *et al* found a decrease in the same population [19]. In contrast, our work did not show any differences between the control and PE groups and we found the cytotoxic population only in a small fraction of the total CD56⁺ cells. The cytokine-producer CD56⁺CD16⁻ cells constituted the predominant subset observed in this study, as it had been reported during early pregnancy [14].

In our study, the observation of a decreased percentage of CD3⁺ cells in the PE group was an unexpected finding. During early pregnancy, T cell lymphocytes have been found in a minor leukocyte proportion in decidua [30] and they predominate in the third trimester of gestation, representing 50% to 60% of total leukocytes in this tissue [2]. Our finding of reduced CD3⁺ cells in patients with PE is in agreement with recent reports of decreased CD8⁺ cell numbers [19] and T regulatory cells [39], which suggests a possible role of T cells in PE but requires further characterization.

Regarding NK cell function, it has been well established that in addition to the total number of cells, NK cell activity results from a balance between activating and inhibitory receptors. Our results of KIR gene

frequencies are in accordance with previous studies of KIR frequencies in Mexican population [40,41]. In the present analysis we found a lower frequency of *KIR2DL2* gene that could suggest a predisposing effect for PE. However, this difference was not statistically significant. Interestingly, similar results have been reported in recurrent miscarriage [42].

When the repertory of KIR genes was analyzed, we found an increased percentage distribution of healthy women with an activating genotype. Hiby *et al*, found a strong association between the inhibitory genotype (AA) and the prevalence of PE and suggested that the activating genotypes protect to PE [25]. Although these genetic data support the notion that dNK cells must be active in order to stimulate the appropriate placental development and differentiation, other researches have found contrasting results in a Japanese population [43].

The widely divergent results obtained from dNK cells at the end of pregnancy raises the necessity to demonstrate their functions and implications in the pathogenesis of PE. Previous work has showed that women with PE have an exaggerated proinflammatory response mediated by pNK cells [44]; therefore it is mandatory to explore the NK1/NK2 response in dNK cells from PE patients. It is known that different factors, such as placental and fetal growth factors, and the local cytokine and hormonal microenvironment modulate the activation of dNK cells throughout gestation. In addition, stromal cells express receptors, ligands, or both, that could interfere with the activity of dNK cells. Importantly, KIRs are also expressed in T cells; e.g., T cytotoxic cells [45]. Moreover KIR expression could change throughout gestation [46].

Conclusion

In conclusion, we demonstrated the persistence of dNK cells in PE and control women at the third trimester of pregnancy; these dNK cells had a similar phenotype (CD56⁺, CD3⁻, CD16⁻, CD9⁺) to those found during early pregnancy. The persistence of this subset until the end of pregnancy suggests that they may be of physiological relevance throughout pregnancy. The predominance of a KIR inhibitory balance in the PE group could be associated to the physiopathology of PE, but suggests that KIR repertory is not the only determinant factor predisposing to PE.

List of abbreviations

CI: confidence interval; dNK: decidual NK cells; G: genotype; HLA: histocompatibility leukocyte antigens; KIR: killer cell immunoglobulin like receptors; NK: Natural Killer cells; OR: odds ratio; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; PE: preeclampsia; PLGF: placental growth factor; pNK: peripheral NK cells.

Acknowledgements

This study was supported by CONACyT-México; grant number 46759-Q and grants PAPIIT IN219710-2 and PAIP 6190-08, from UNAM. EN S-R, is a student of the Doctorate in Biomedical Sciences (UNAM) and received a fellowship (202794) from CONACyT-México. The authors want to thank E. Rivera for her help in the Flow cytometric analysis. The generous donation of biological samples by patients and control volunteers are gratefully acknowledged. We are grateful to the medical staff from the Hospital "Castelazo Ayala", IMSS, for their assistance in the diagnosis of patients and collecting samples. The authors want to thank Dr. I. Camacho-Arroyo and C. Álvarez-Delgado for proofreading the manuscript.

Author details

¹Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F., México. ²Servicio de Complicaciones Hipertensivas, UMAE de Ginecología y Obstetricia "Luis Castelazo Ayala", Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., México. ³Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico, D.F., México. ⁴Departamento de Transplantes, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán", México, D.F., México. ⁵Servicio de Genética, Hospital General de México/Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F., México.

Authors' contributions

ENSR and MC participated in the design of the study. ENSR performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. SNS helped in collecting and processing biological samples. JFRA and CM diagnosed the patients and analyzed the clinical data. The data and the manuscript were analyzed and reviewed by CAMR, EO, JG, AC and MC. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 9 September 2010 Accepted: 19 January 2011

Published: 19 January 2011

References

- Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M: **The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies.** *Placenta* 2006, **27**:939-958.
- Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D: **Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies.** *Human Reprod* 1991, **6**:791-798.
- King A, Loke YW: **On the nature and function of human uterine granular lymphocytes.** *Immunol Today* 1991, **12**:432-435.
- Moffet-King A: **Natural killer cells and pregnancy.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**:656-663.
- Abadía-Molina AC, Ruiz C, Montes MJ, King A, Loke YW, Olivares EG: **Immune phenotype and cytotoxic activity of lymphocytes from human term decidua against trophoblast.** *J Reprod Immunol* 1996, **31**:109-123.
- Abadía-Molina AC, Ruiz C, King A, Loke YW, Olivares EG: **Lymphocytes of human term decidua decrease cell adhesion to a plastic substrate.** *Hum Reprod* 1997, **12**:2393-2398.
- Sindram-Trujillo AP, Scherjon SA, van Hulst-van Miert PP, Kanhai HH, Roelen DL, Claas F: **Comparison of decidual leukocytes following spontaneous vaginal delivery and elective cesarean section in uncomplicated human term pregnancy.** *J Reprod Immunol* 2004, **62**:125-137.
- Poehlmann TG, Schaumann A, Busch S, Fitzgerald JS, Aguerre-Girr M, Le-Bouteiller P, Schleussner E, Markert UR: **Inhibition of term decidual NK cell cytotoxicity by soluble HLA-G1.** *Am J Reprod Immunol* 2006, **56**:275-285.
- Williams PJ, Searle RF, Robson SC, Innes BA, Bulmer JN: **Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy.** *J Reprod Immunol* 2009, **82**:24-31.
- Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL: **Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential.** *J Exp Med* 2003, **198**:1202-1212.
- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yuykin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O: **Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface.** *Nat Med* 2006, **12**:1065-1074.
- Di Santo JP: **Functionally distinct NK-cell subsets: developmental origins and biological implications.** *Eur J Immunol* 2008, **38**:2948-2951.
- Mselle TF, Meadows SK, Eriksson M, Smith JM, Shen L, Wira CR, Sentman CL: **Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract.** *Clin Immunol* 2007, **124**:69-76.
- Manaster I, Mandelboim O: **The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa.** *Placenta* 2008, **29**(Suppl A):60-66.
- Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL: **Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy.** *Am J Pathol* 2009, **174**:1959-1971.
- Stallmach T, Hebisch G, Orban P, Lü X: **Aberant positioning of trophoblast and lymphocytes in the feto-maternal interface with pre-eclampsia.** *Virchows Arch* 1999, **434**:207-211.
- Wilczyński JR, Tchorzewski H, Banasik M, Glowacka E, Wiecek A, Lewkowicz P, Malinowski A, Szpakowski M, Wilczyński J: **Lymphocyte subset distribution and cytokine secretion in third trimester decidua in normal pregnancy and preeclampsia.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003, **109**:8-15.
- Eide IP, Rolfseng T, Isaksen CV, Mecsei R, Roald B, Lydersen S, Salvesen KA, Harsem NK, Austgulen R: **Serious foetal growth restriction is associated with reduced proportions of natural killer cells in decidua basalis.** *Virchows Arch* 2006, **448**:269-276.
- Rieger L, Segerer S, Bernar T, Kapp M, Majic M, Morr AK, Dietl J, Kämmerer U: **Specific subsets of immune cells in human decidua differ between normal pregnancy and preeclampsia - a prospective observational study.** *Reprod Biol Endocrinol* 2009, **23**:132-142.
- Williams PJ, Bulmer JN, Searle RF, Innes BA, Robson SC: **Altered decidual leucocyte populations in the placental bed in pre-eclampsia and foetal growth restriction: a comparison with late normal pregnancy.** *Reproduction* 2009, **138**:177-184.
- Khong TY: **Immunohistologic study of the leukocytic infiltrate in maternal uterine tissues in normal and preeclamptic pregnancies at term.** *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987, **15**:1-8.
- Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart AC, Beck S, Wilson M: **The genomic context of Natural Killer receptor extended gene families.** *Immunol Rev* 2001, **181**:20-38.
- Bashirova A, Martin P, Mc Vicar W, Carrington M: **The killer immunoglobulin like receptor gene cluster: Tuning the genome for defense.** *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006, **7**:277-300.
- Carrington M, Martin MP: **The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2006, **298**:225-257.
- Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffet A: **Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success.** *J Exp Med* 2004, **200**:957-965.
- ACOG Committee on Practice Bulletins-Obstetrics: **ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002.** *Obstet Gynecol* 2002, **99**:159-167.
- Tuffnell DJ, Shennan AH, Waugh JJ, Walker JJ: **The management of severe pre-eclampsia/eclampsia.** *RCOG Guidelines* 2006, **Guideline 10(A)**:1-11.
- Romero-Arauz JF: **Epidemiología, clasificación y factores de riesgo en preeclampsia.** *Preeclampsia. Enfermedades hipertensivas del embarazo* Mexico: McGrawHill; 2009, 1-15.
- Arcuri F, Cintonino M, Carducci A, Papa S, Riparbelli MG, Mangioni S, Di Blasio AM, Tosi P, Viganò P: **Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor.** *Reproduction* 2006, **131**:175-182.
- King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW: **Human uterine lymphocytes.** *Hum Reprod Update* 1998, **4**:480-485.
- Redman CW, Sargent IL: **Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response—a review.** *Placenta* 2003, **24**(Suppl A):21-27.
- Borzichowski AM, Croy BA, Chan WL, Redman CW, Sargent IL: **Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and pre-eclampsia may be mediated by natural killer cells.** *Eur J Immunol* 2005, **35**:3054-3063.
- Haller H, Radillo O, Rukavina D, Tedesco F, Candussi G, Petrović O, Randić L: **An immunohistochemical study of leucocytes in human endometrium, first and third trimester basal decidua.** *J Reprod Immunol* 1993, **23**:41-49.

34. Vargas ML, Santos JL, Ruiz C, Montes MJ, Alemán P, García-Tortosa C, García-Olivares E: **Comparison of the proportions of leukocytes in early and term decidua.** *Am J Reprod Immunol* 1993, **29**:135-140.
35. Hirano T, Higuchi T, Ueda M, Inoue T, Kataoka N, Maeda M, Fujiwara H, Fujii S: **CD9 is expressed in extravillous trophoblast in association with integrin alpha3 and integrin alpha5.** *Mol Hum Reprod* 1999, **5**:162-167.
36. Tohami T, Drucker L, Radnay J, Shapira H, Lishner M: **Expression of tetraspanins in peripheral blood leukocytes: a comparison between normal and infectious conditions.** *Tissue Antigens* 2004, **64**:235-242.
37. Waterhouse R, Ha C, Devksler GS: **Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17.** *J Exp Med* 2002, **195**:277-282.
38. Wilczyński JR, Tchorzewski H, Glowacka E, Banasik M, Lewkowicz P, Szpakowski M, Zeman K, Wilczyński J: **Cytokine secretion by decidual lymphocytes in transient hypertension of pregnancy and pre-eclampsia.** *Mediators Inflamm* 2002, **11**:105-111.
39. Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, Saito S: **Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia.** *Clin Exp Immunol* 2007, **149**:139-145.
40. Gutiérrez-Rodríguez ME, Sandoval-Ramírez L, Díaz-Flores M, Marsh SG, Valladares-Salgado A, Madrigal JA, Mejía-Aranguere JM, García CA, Huerta-Zepeda A, Ibarra-Cortés B, Ortega-Camarillo C, Cruz M: **KIR gene in ethnic and Mestizo populations from Mexico.** *Hum Immunol* 2006, **67**:85-93.
41. Contreras G, Aláez C, Murguía A, García D, Flores H, Gorodezky C: **Distribution of the killer cell immunoglobulin-like receptors in Mexican Mestizos.** *Tissue Antigens* 2007, **69**(Suppl 1):125-129.
42. Flores AC, Marcos CY, Paladino N, Arruivito L, Williams F, Middleton D, Fainboim L: **KIR receptors and HLA-C in the maintenance of pregnancy.** *Tissue Antigens* 2007, **69**(Suppl 1):112-113.
43. Saito S, Takeda Y, Sakai M, Nakabayahi M, Hayakawa S: **The incidence of pre-eclampsia among couples consisting of Japanese women and Caucasian men.** *J Reprod Immunol* 2006, **70**:93-98.
44. Borzychowsky AM, Croy BA, Chan WL, Redman CW, Sargent IL: **Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and pre-eclampsia may be mediated by natural killer cells.** *Eur J Immunol* 2005, **35**:3054-3063.
45. Tilburgs T, van der Mast BJ, Nagtzaam NM, Roelen DL, Scherjon SA, Claas FH: **Expression of NK cell receptor on decidual T cells in human pregnancy.** *J Reprod Immunol* 2009, **80**:22-32.
46. Sharkey AM, Gardner L, Hiby S, Farrell L, Apps R, Masters L, Goodridge J, Lathbury L, Stewart CA, Verma S, Moffett A: **Killer-Ig-like receptor expression in uterine NK cells is biased toward recognition of HLA-C and alters with gestational age.** *J Immunol* 2008, **181**:39-46.

doi:10.1186/1477-7827-9-8

Cite this article as: Sánchez-Rodríguez *et al.*: Persistence of decidual NK cells and KIR genotypes in healthy pregnant and preeclamptic women: a case-control study in the third trimester of gestation. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011 **9**:8.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Publicación

Sánchez-Rodríguez EN, **Nava-Salazar S**, Moran C, Romero-Arauz JF, Cerbón MA. Estado actual de la preeclampsia en México: de lo epidemiológico a sus mecanismos moleculares. *Rev Invest Clin* 2010, 62:252-60.

Estado actual de la preeclampsia en México: de lo epidemiológico a sus mecanismos moleculares

Elly Natty Sánchez-Rodríguez,* Sonia Nava-Salazar,* Carlos Morán,**
Juan Fernando Romero-Arauz,** Marco Antonio Cerbón-Cervantes*

* Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. ** Hospital de Ginecología Número 4. IMSS.

The two leading hypothesis regarding the molecular mechanisms and etiology of preeclampsia, and the Mexican experience in the world context

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is one of the most severe complications of pregnancy. PE is responsible for the highest rates of morbidity and mortality for both pregnant women and the neonate. In this review, we first address general aspects of PE and its diagnosis, along with some epidemiological aspects of this disease in the Mexican population, in particular the experience from the Instituto Mexicano del Seguro Social. Even though over the last 20 years a great deal of evidence has accumulated regarding PE's pathophysiology, an exact mechanism to explain its etiology has not been established. This review aims to cover the status of two of the most important hypotheses in the etiology of PE: the immunological and the placental ischemia hypotheses. Recent data suggest that Natural Killer cells (NK) play a major role in the decidual spiral arteriole remodeling and in normal placental development. In genetic studies, KIR receptors present in NK cells have been involved in the susceptibility for the disease. In this review, we discuss data of our group regarding the presence of NK cells in the decidua, at the end of pregnancy and the genotypes of KIR receptors in normal and preeclamptic Mexican population. PE is characterized by abnormal placentation and hypoxia with an increase of anti-angiogenic factors; the Hypoxia-inducible factor 1-alfa (HIF1-alfa) is over expressed in PE. In this review, we also included some of our results concerning the polymorphisms and regulation of HIF in preeclamptic women.

Key words. Preeclampsia. Natural killer cells. KIR receptors. Angiogenesis. Hypoxia-inducible factor.

INTRODUCCIÓN

La preeclampsia (PE) es una de las principales causas de morbilidad y de las más importantes de mortalidad materna y perinatal a nivel mundial, en

RESUMEN

La preeclampsia (PE) es una de las complicaciones más severas del embarazo, cuya etiología es desconocida. Esta revisión aborda aspectos generales y de diagnóstico de la PE, así como aspectos epidemiológicos en población mexicana, en particular la experiencia del Instituto Mexicano del Seguro Social. Nos enfocamos también al análisis y actualización de dos de las principales hipótesis que tratan de explicarla: la inmunológica y la de isquemia placentaria. Diversos estudios sugieren que las células asesinas naturales (NK) participan en el proceso de remodelación vascular de la placenta y en el desarrollo normal de ésta. Análisis genéticos indican que los receptores KIR presentes en las células NK, podrían participar en la susceptibilidad a la enfermedad. En esta revisión discutimos resultados recientes de nuestro grupo que muestran la persistencia de las células NK en la decidua materna, al final del embarazo, así como los genotipos para los receptores KIR en mujeres mexicanas con embarazos normoevolutivos y con PE. Se sabe que esta enfermedad se caracteriza por una deficiente placentación, hipoxia y un aumento en la concentración de factores anti-angiogénicos relacionados con la sobre-expresión del factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF1-alfa). Discutimos avances de nuestros resultados sobre la regulación de HIF y dos de los polimorfismos de este gen, en mujeres con PE en población mexicana.

Palabras clave. Preeclampsia. Células asesinas naturales. Receptores KIR. Angiogénesis. Factor inducible por hipoxia.

países en vías de desarrollo como los de América Latina y el Caribe constituye la principal causa de muerte materna (> 25%).^{1,2}

Se calcula que mueren anualmente en el mundo 50,000 mujeres por PE,³ la Organización Mundial de

la Salud reporta que cada siete minutos muere una mujer por esta causa.⁴ En México, de acuerdo con la Secretaría de Salud, la PE representa hasta 34% del total de las muertes maternas, por lo que constituye la principal causa de muerte asociada a complicaciones del embarazo.⁵

Dentro de la atención a la salud materna en nuestro país, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) desempeña un papel fundamental, ya que en sus instalaciones médicas se atiende 50% del total de los nacimientos hospitalarios. En el periodo de tiempo comprendido entre 1991 y 2005, Velasco reportó 3,553 defunciones maternas en las unidades médicas del IMSS; en los 15 años analizados la mortalidad materna hospitalaria en esta institución se redujo 40.4%, al pasar de 45.3 a 27 por 100,000 nacidos vivos. A pesar de la disminución observada en la mortalidad materna, las principales causas de muerte materna que se mantuvieron a lo largo del periodo estudiado fueron la PE-eclampsia, hemorragia obstétrica y la tromboembolia pulmonar.⁶ Dentro de estos padecimientos la PE varía de 2 a 10%, dependiendo de la población estudiada y la definición de PE usada.⁷

La PE es un síndrome único en seres humanos de causa desconocida que sigue siendo uno de los enigmas en la medicina moderna. Es probablemente una de las enfermedades más complejas en el ser humano que presenta datos clínicos y de laboratorio heterogéneos en donde la patogénesis puede variar dependiendo de los factores de riesgo preexistentes. Por ejemplo, la PE puede ser diferente en una mujer con enfermedad vascular subyacente, enfermedad renal o autoinmune en comparación con una paciente primigesta, con obesidad⁸ o embarazo múltiple.^{7,9}

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS DE LA PREECLAMPSIA

La PE es un síndrome de origen idiopático, que puede presentar manifestaciones prácticamente en todos los aparatos y sistemas del binomio feto-materno. Se caracteriza por:

- Hipoperfusión tisular generalizada.
- Aumento en las resistencias vasculares periféricas.
- Daño endotelial.
- Cambios metabólicos.
- Consumo plaquetario.
- Aumento en la respuesta inflamatoria.
- Activación del sistema de coagulación y
- Una respuesta vascular anormal placentaria.^{10,11}

Los hallazgos clínicos se pueden manifestar como síndrome materno (hipertensión arterial y proteinuria con o sin manifestaciones multisistémicas) y/o síndrome fetal (oligohidramnios, restricción del crecimiento intrauterino –RCIU– y alteraciones de la oxigenación).^{11,12}

El síndrome materno se caracteriza por la aparición de hipertensión arterial después de la semana 20 de gestación, en una mujer previamente normotensa, asociada a proteinuria. Dependiendo del nivel de estos parámetros, así como de los datos de compromiso multisistémico, puede presentarse en forma severa.^{13,14} En México, de acuerdo con los lineamientos técnicos de la Secretaría de Salud, la clasificación incluye una forma leve y otra severa que para fines convencionales incluimos en esta revisión. Los criterios de clasificación se enlistan en el cuadro 1.^{5,15,16}

Dentro de las complicaciones de esta enfermedad se encuentra la eclampsia (< 1%), definida como el desarrollo de crisis convulsivas en pacientes con signos y síntomas de PE en ausencia de otras causas de convulsiones, el síndrome de HELLP (10-20%), una variante atípica de la PE severa, caracterizada desde el punto de vista bioquímico por hemólisis microangiopática, elevación de las enzimas hepáticas y trombocitopenia.¹¹

Otras complicaciones que se pueden presentar son la coagulación intravascular diseminada (10%), edema agudo pulmonar cardiogénico (2-5%), insuficiencia renal aguda (1-5%), desprendimiento prematuro de placenta normoinserta (1-4%), insuficiencia hepática o hemorragia (< 1%), evento vascular cerebral, edema cerebral e insuficiencia cardíaca.¹¹

Las tres principales causas de muerte materna debidas a PE son:

- Hemorragia cerebral (46%).
- Síndrome de HELLP (12%).
- Coagulación intravascular diseminada (10.7%).¹⁷

Los datos tanto epidemiológicos como los estudios histológicos de la placenta y de ultrasonografía Doppler de arteria umbilical, muestran que las principales repercusiones en el síndrome fetal se deben a la deficiente perfusión placentaria. En la RCIU, la desnutrición y el bajo peso al nacer son dos elementos comunes que se distinguen en el neonato. El 30% de los neonatos de embarazos con PE presentan RCIU.¹⁸

En la actualidad el único tratamiento efectivo para la PE es la interrupción oportuna del embarazo, del 15 al 23% de los nacimientos pretérmino es-

Cuadro 1. Criterios de diagnóstico de PE.^{5,15,16}

PE	Tensión Arterial* [mm Hg] Sistólica y/o Diastólica		Proteinuria	Otros
Leve	≥ 140	≥ 90	≥ 300mg ** o ≥ 30 mg/dL***	No evidencia de compromiso multisistémico o de vasoespasmos persistentes
Severa	≥ 160	≥ 110	≥ 2 g**	Oliguria: diuresis < de 500 ml en 24 horas Creatinina sérica > 1.2 mg/dl Trastornos cerebrales severos persistentes o alteraciones visuales Edema agudo pulmonar Dolor epigástrico o en cuadrante superior derecho del abdomen Disfunción hepática (TGO ≥ 70/UI) Trombocitopenia (< 100,000 mm ³) Coagulación intravascular diseminada Cianosis RCIU

* Se requieren por lo menos dos tomas con diferencia de seis horas entre cada una con la paciente en reposo en un lapso no mayor de siete días. ** Recolección de orina de 24 h. *** En dos muestras de orina tomadas al azar con diferencia de 6 horas entre cada una, pero en un lapso no mayor de siete días. * Se requiere uno o más de los criterios enlistados.

tán indicados médicamente por PE,¹⁹ que deja consecuencias a corto y largo plazos con diferentes grados de severidad, la tasa de mortalidad perinatal en los infantes de madres con PE es cinco veces mayor que en embarazos sin complicaciones.¹⁷

MECANISMOS MOLECULARES EN LA PREECLAMPSIA: DIVERSAS HIPÓTESIS DE SU ETIOLOGÍA

A pesar de la gran cantidad de investigación que se ha realizado para conocer la etiología de la PE, ésta es aún desconocida. Aparentemente la placenta tiene un papel fundamental en su patogénesis, en gran parte debido a que los signos y síntomas clínicos desaparecen una vez que se interrumpe el embarazo,²⁰ pero además porque la PE se caracteriza por un desarrollo deficiente de este órgano, con una invasión endovascular superficial del trofoblasto y una remodelación inadecuada de las arterias espirales de la decidua y el miometrio. Lo anterior genera hipoperfusión placentaria, estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria exacerbada que lleva a las características clínicas de la PE.^{11,21}

Los diferentes estudios clínicos y moleculares recientes, permiten avanzar en algunas hipótesis que explican la patogénesis de la enfermedad, entre las más importantes están: la adaptación inmunológica inadecuada y la isquemia placentaria.²² La figura 1 integra en forma resumida estas dos hipótesis, así como la secuencia de eventos que podrían llevar al

desarrollo de PE, aspectos que serán discutidos en detalle a lo largo de esta revisión.

Adaptación inmunológica inadecuada

Durante la formación de la placenta, las interacciones materno-fetales son críticas para el éxito de este proceso. En las etapas tempranas de la gestación, las células del trofoblasto extraveloso invaden la pared uterina hasta el primer tercio del miometrio y se asocian con las arterias espirales, en donde reemplazan la pared vascular, esto hace que las arterias espirales se distiendan y se incremente el flujo sanguíneo hacia la placenta, permitiendo una perfusión adecuada y la llegada de nutrientes al feto.²³ La interacción de leucocitos deciduales con células del trofoblasto es crítica para este proceso, la población de leucocitos deciduales que constituye la más abundante en la decidua, son células asesinas naturales (NK), las cuales representan más de 40% de las células deciduales al momento de la implantación.²⁴

Las células NK representan hasta 10% de los linfocitos de sangre periférica, y pueden encontrarse en varios tejidos incluyendo la decidua. Estas células se caracterizan por la expresión de marcadores de superficie CD56, CD16 y pueden ser subdivididas en dos poblaciones basadas en la densidad del marcador CD56 (brigth-fuerte o dim-medio), 90 a 95% de las células NK circulantes pertenecen al fenotipo CD56^{dim} CD16⁺ y son altamente citotóxicas; mien-

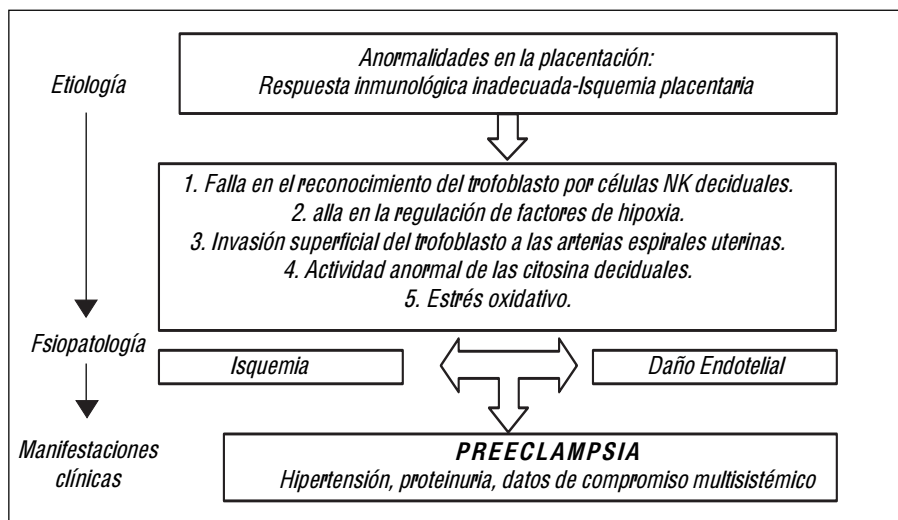


Figura 1. Etiología y fisiopatología de la PE. El reconocimiento inadecuado de las células del trofoblasto por parte de las células NK, así como la falla en la regulación de factores de hipoxia, provocan una invasión superficial del trofoblasto a las arterias espirales uterinas, una falta de remodelación, actividad anormal de citocinas, inflamación y estrés oxidativo que generan isquemia, daño endotelial y finalmente hipertensión, proteinuria así como algunos otros datos de compromiso multisistémico.

tras que el resto son CD56^{bright} CD16⁻ y son muy eficientes en la secreción de citocinas, especialmente IFN- γ .²⁵ En la decidua se han caracterizado células NK principalmente en la gestación temprana, éstas poseen un fenotipo CD56^{bright} CD16⁻ y son muy eficientes en la secreción de citocinas.²⁶ Menos atención se ha puesto para caracterizar células NK al final del embarazo y aunque algunos autores proponen que esta población disminuye considerablemente, los datos que se tienen hasta el momento son controversiales debido a las diferentes técnicas utilizadas para su cuantificación y las regiones de la decidua analizadas.²⁷ En nuestro laboratorio, hemos encontrado células NK con fenotipo CD56^{bright}, CD16⁻ en la decidua tanto de mujeres con embarazos normo-evolutivos como aquellas complicadas con PE (Datos sometidos a publicación).

Recientemente, Jacob, *et al.* (2006) demostraron mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, que las células NK participan en la remodelación de las arterias espirales uterinas, al promover la angiogénesis en los sitios de implantación del embrión. En contacto con células del trofoblasto, estas células son capaces de secretar factores angiogénicos (factor de crecimiento del endotelio vascular –VEGF– y factor de crecimiento placentario –PIGF–) previamente detectados a nivel de RNA mensajero y proteína,^{28,29} así como factores quimiotácticos (IL-8, IP-10, SDF-1 y Eotaxina-1) necesarios para la migración del trofoblasto hacia la decidua. En este estudio se demostró que solo las células NK aisladas de decidua, al ponerlas en contacto con una línea celular de trofoblasto, fueron capaces de promover la migración, invasión y angiogénesis de la línea tumoral de trofoblasto.³⁰ Estudios más recientes proponen que la participa-

ción de las células NK en la remodelación arterial uterina, puede ocurrir incluso antes de su interacción con células del trofoblasto, mediante la inducción de apoptosis del músculo liso vascular y a través de la inducción de la degradación de la matriz extracelular.³¹

La interacción de las células NK del endometrio con el trofoblasto se lleva a cabo gracias a un reconocimiento específico mediado a través de receptores en las células NK y sus ligandos en las células del trofoblasto. Las funciones efectoras de las células NK, dependen de una regulación muy fina entre receptores inhibidores y activadores. Dichos receptores pueden pertenecer a distintas familias estructurales: receptores de tipo Inmunoglobulina (KIR), receptores heterodiméricos de lectina tipo C (CD94/NKG), transcritos del tipo inmunoglobulina (ILT) y receptores citotóxicos de células NK (NCR).²⁹ Los receptores KIR reconocen moléculas de histocompatibilidad del trofoblasto, específicamente HLA-G y HLA-C, este último es el único HLA altamente polimórfico expresado en tejido trofoblástico. La interacción entre moléculas HLA del trofoblasto y los receptores KIR de las células NK del endometrio materno, inhibe la actividad citotóxica y modula la producción de citocinas y factores de crecimiento por las células NK, favoreciendo el crecimiento del trofoblasto, la invasión del endometrio y la remodelación vascular, necesarias todas para el desarrollo normal de la placenta.³²

La familia de receptores KIR consta por lo menos de 14 miembros diferentes, cuando tienen dos dominios extracelulares son llamados 2D y aquellos con tres dominios extracelulares son llamados 3D. Funcionalmente se subdividen en receptores inhibidores

o activadores, dependiendo de su dominio intra-citoplásmico, los que tienen un dominio intra-citoplásmico largo (L) transducen señales inhibitoras a través de sus inmunorreceptores con motivos de inhibición basados en tirosinas (ITIM), en tanto que los que cuentan con un dominio intra-citoplásmico corto (S), transducen señales de activación gracias a que se asocian a la proteína adaptadora DAP-12, la cual contiene inmunorreceptores con motivos activadores basados en tirosinas (ITAM).

La región genómica *KIR* contiene una familia de genes altamente polimórficos y homólogos, localizados en el cromosoma 19q13.4, dentro del complejo de receptores de leucocitos (LCR). Basados en estudios poblacionales, el orden de los genes *KIR* a lo largo del cromosoma ha determinado principalmente dos haplotipos distintos:

- **Haplotipo A.** Contiene un solo gen activador: *2DS4*
- **Haplotipo B.** Contiene varias combinaciones de activadores: *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5*, *3DS1* y *2DS4*.

Los genes *KIR* están arreglados en tandem y cuentan con una característica notable y es que el contenido de genes varía entre haplotipos. La variación en el locus *KIR* es una combinación del polimorfismo alélico con el número y tipos de genes presentes en un haplotipo dado. Los genes *2DL4*, *3DP1*, *3DL2* y *3DL3*, están presentes en ambos haplotipos y se piensa que son indispensables en la generación de diversidad de todos los haplotipos determinados hasta el momento.³³⁻³⁵

Un estudio realizado en población caucásica, que comparó el genotipo de receptores KIR en mujeres con embarazos normales y en mujeres con PE, encontró que la combinación del genotipo AA (inhibidor), específicamente la presencia del gen *KIR2DL1* en las mujeres con PE, en combinación con el HLA-C2 (ligandos con una lisina en la posición 80, HLA-C^{Lys80}) en sus bebés, aumentaba la prevalencia de PE hasta en 50%. Ya que esta interacción es considerada una fuerte señal inhibitora, se considera que es la inhibición y no la activación de las células NK la que predispone a la PE, ya que las células no podrían participar en la remodelación arterial uterina al estar inhibidas y proponen que por el contrario, la presencia de receptores activadores podría ser protectora para la enfermedad.³⁶

Debido a la complejidad inherente de los genes *KIR*, a la diversidad poblacional que presentan y a las características genéticas particulares de la pobla-

ción mexicana, estamos estudiando los genotipos de receptores KIR en mujeres con PE, los resultados encontrados hasta el momento, sugieren que hay diferencias en la frecuencia de genes de tipo activador en las mujeres con PE comparadas con mujeres con embarazos normoevolutivos (Datos en vías de publicación).

Todos estos datos sugieren que la respuesta inmune en la decidua materna en pacientes con PE depende en gran medida de la capacidad de reconocimiento de las células NK, de sus receptores KIR, de sus genotipos y de los ligandos en el feto que puedan reconocerse en el ambiente uterino durante las etapas críticas de la remodelación arterial uterina.

Hipótesis de isquemia placentaria

La preservación de la morfología y función de las vellosidades, así como la regulación de la diferenciación del trofoblasto, son críticas para la formación de la placenta.^{37,38} Las primeras ocho semanas del embarazo se desarrollan en un ambiente de hipoxia, en la que se mantiene al trofoblasto en un estado proliferativo y poco diferenciado, con un fenotipo con características de no invasividad. De las semanas 10 a la 12 de gestación, el rápido incremento en la concentración de oxígeno completa el proceso de diferenciación e invasión por el trofoblasto.^{38,39}

En condiciones de hipoxia, se activa el factor inducible por hipoxia alfa (HIF- α), el cual es un factor de transcripción que promueve la transcripción de factores angiogénicos y no angiogénicos.⁴⁰ Los factores angiogénicos son indispensables para el desarrollo normal de la placenta, principalmente en procesos de proliferación, vascularización y migración de las células del trofoblasto hacia la región materna; entre los más importantes tenemos al VEGF, sus receptores VEGFR-1 (Flt1) y VEGFR-2, factor de crecimiento del fibroblasto (FGF), angioyotina (ANG) y el PIGF.^{41,42}

HIF- α también puede inducir inhibidores de la diferenciación del trofoblasto, como el factor de crecimiento transformante beta3 (TGF β 3) y Hash-2. De esta forma, durante las primeras ocho semanas de gestación, el trofoblasto se mantiene en un estado poco diferenciado y proliferativo; conforme aumenta la edad gestacional y la concentración de oxígeno, HIF- α y TGF β 3 disminuyen su expresión, completando la diferenciación del trofoblasto.^{43,44}

En el trofoblasto de mujeres con PE, se ha encontrado sobreexpresión de HIF- α y sus proteínas blanco, principalmente factores no angiogénicos

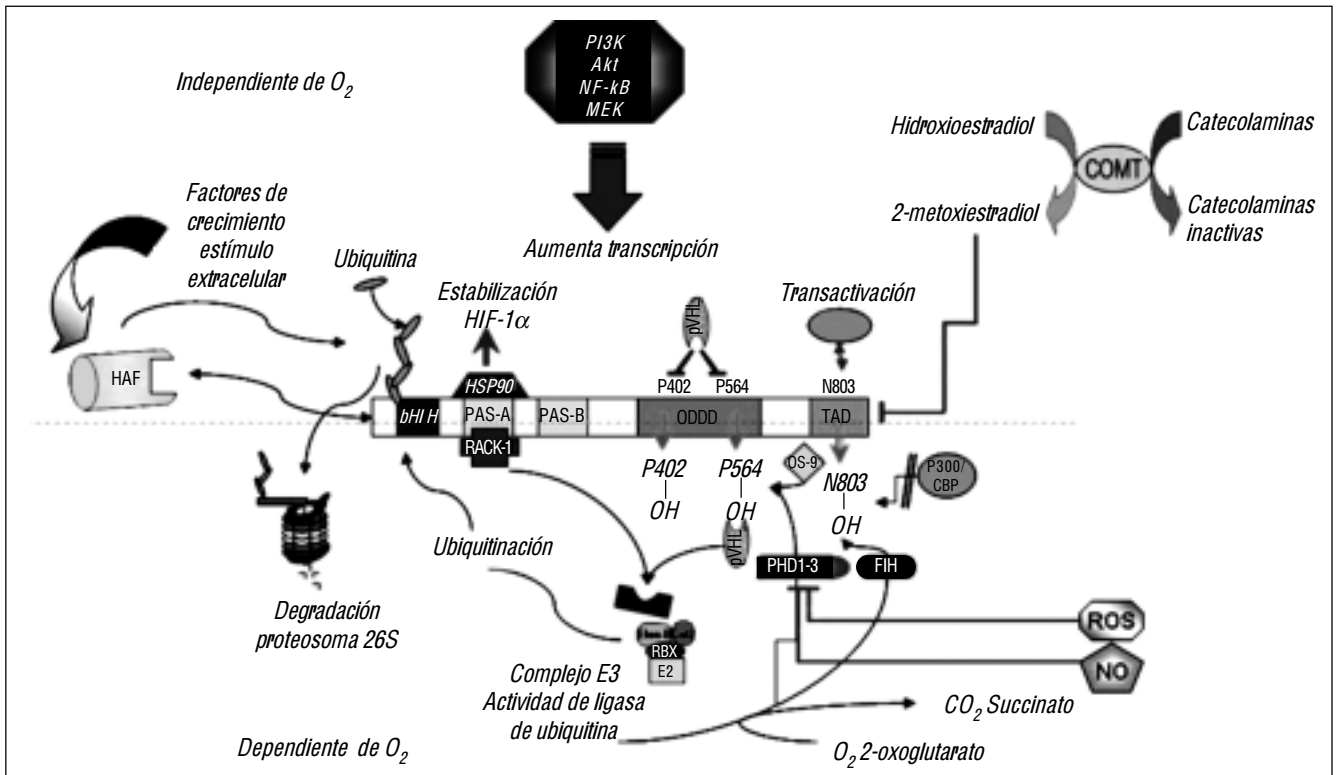


Figura 2. Vía que regulan HIF- α Dependiente de la concentración de O_2 , bajo condiciones de normoxia, la hidroxilación de dos residuos de prolina de HIF- α , mediada por OS-9, favorecen la unión con la pVHL. RACK1 facilita la unión de pVHL con la Elonguina C, lo cual forma parte del complejo E3 con actividad de ligasa de ubiquitina, para su posterior degradación vía proteosoma 26S. HAF recluta a HIF- α a su degradación vía poliubiquitinación y el 2-metoxiestradiol inhibe su expresión, el mecanismo exacto por el cual actúa aún no se conocen. Rutas que inducen la expresión de HIF- α ROS y NO inhiben las hidroxilasas PHD1-3 y FIH, impidiendo la unión con pVHL; la interacción con HSP90 estabiliza a HIF- α y PI3K, AKT, MEK y NF- κ B aumentan su transcripción.

(tirosina 1 tipo fms soluble –sFlt-1– y endoglina soluble –sEng–) e inhibidores de la diferenciación del trofoblasto (TGF β 3). sFlt-1 es una variante trunca del receptor membranal VEGFR1, antagonista de VEGF y PlGF; de manera similar actúa sEng, el receptor soluble para TGF- β 1.⁴⁴⁻⁴⁶

En mujeres con PE se ha observado una disminución de los factores angiogénicos y aumento de factores anti-angiogénicos e inhibidores de la diferenciación del trofoblasto, lo cual coincide con los fenotipos observados en las placentas de estas pacientes, que se caracterizan por una invasión inadecuada debido a un trofoblasto inmaduro.^{47,48}

El desbalance entre factores angiogénicos y anti-angiogénicos se ha propuesto como una de las causas del desarrollo de PE, en donde HIF- α es el principal regulador de dichos factores. Varios grupos de trabajo están estudiando las diferentes vías que regulan a este factor, como probable causa de su sobre-expresión en la placenta de mujeres con PE.^{49,50}

La regulación de HIF- α es muy compleja (Figura 2), siendo la degradación vía poliubiquitinación dependiente de la concentración de oxígeno, una de las más importantes y la mejor caracterizada.⁵¹⁻⁵³

Regulación de HIF- α dependiente de O_2

La proteína HIF es un factor de transcripción heterodimérico (HIF- α y HIF- β). Hay tres isoformas de HIF- α , las mejor caracterizadas son HIF-1 α y HIF-2 α , cuya actividad transcripcional está regulada a través de dos dominios de transactivación localizados hacia el extremo carboxilo terminal, llamados N-TAD y C-TAD.^{54,55}

HIF1- α es regulado directamente por la proteína von Hippel Lindau (pVHL), la cual, forma un complejo con las proteínas elongina C, elongina B, Cul2, la enzima E2 conjugada con ubiquitina y Rbx1; este complejo tiene actividad de ligasa E3 de ubiquitina, el cual se encarga de la poliubiquitina-

ción para su posterior degradación por el proteosoma 26S.⁵⁶

En presencia de oxígeno, HIF- α es hidroxilado enzimáticamente por miembros de la familia EGLN1-3 o PHD1-3, en uno de dos posibles residuos de prolina (Pro) dentro del dominio N-TAD.^{57,58} La hidroxilación de, Pro402 y/o Pro564, en la proteína HIF- α , genera un sitio de unión para la pVHL. En condiciones de hipoxia, los residuos de prolina de HIF- α no se hidroxilan y por lo tanto, no interactúan con pVHL, por esta razón, este dominio de HIF- α también se conoce como dominio de degradación único dependiente de oxígeno (ODDD).⁵⁹⁻⁶¹ En condiciones bajas de oxígeno, HIF- α se estabiliza, transloca al núcleo y se dimeriza con HIF- β formando un complejo activo que se une a elementos de respuesta en el promotor de sus genes blanco, permitiendo su transcripción.^{59,60}

Rajakumar, *et al.* (2006) comenzaron a estudiar esta ruta de degradación como probable causa de su sobre-expresión, no encontrando diferencias en la expresión de pVHL en la placenta de mujeres con embarazos normoevolutivos y PE; sin embargo, observaron un aumento en la hidroxilasa PHD-3, cuya probable participación sea la de reestablecer la concentración de HIF- α .^{62,63}

Actualmente estamos estudiando otros aspectos de la regulación de HIF- α , los datos que hemos obtenido nos indican que hay diferencias en la expresión de pVHL, cuando comparamos los grupos de mujeres con PE severa con respecto a los de PE leve y normotensas. También hemos analizado diferentes hidroxilasas que participan en esta vía y al igual que Rajakumar, observamos un aumento en la expresión de algunas de éstas (Datos en vías de publicación).

Debido a la compleja regulación de la expresión de HIF- α , es importante realizar un análisis de otras proteínas involucradas en su degradación, con el fin de entender la desregulación de esta vía de señalización, fundamental en la fisiopatología de la placenta de mujeres con PE.

Además de los diferentes mecanismos que pueden aumentar la expresión de HIF- α , existen factores genéticos que también pueden modificar su expresión. El gen *HIF1A* es muy polimórfico, Yamada, *et al.* (2005) describieron 35 polimorfismos, tres de los cuales se localizan en regiones codificantes, S28Y, P582S y A588T.⁶⁴ Tanimoto, *et al.* (2003) describieron que la presencia de los polimorfismos P582S y A588T pueden aumentar la actividad transcripcional de este gen en comparación con la isoforma común.⁶⁵ Estos polimorfismos se localizan en el exón 12, el cual codifica para el ODDD, dominio de vital importancia para la unión de HIF- α con pVHL. Per-

cy, *et al.* (2003) demostraron que el polimorfismo P582S no interviene en la hidroxilación del residuo de prolina 564, importante para el reconocimiento de la pVHL, pero sí le confiere mayor estabilidad a la isoforma con este polimorfismo.⁶⁶ Recientemente se ha estudiado la presencia de estos polimorfismos como factores de riesgo para diferentes enfermedades, en donde HIF- α se encuentra alterado.^{64,67-69}

Heino, *et al.* (2008) estudiaron estos polimorfismos y su relación con el desarrollo de PE en población finlandesa, sin encontrar una asociación.⁷⁰ Nosotros encontramos frecuencias similares a las reportadas en otras poblaciones, sin diferencias significativas cuando comparamos mujeres con PE y mujeres embarazadas normotensas, lo cual sugiere que otros factores asociados a HIF- α podrían participar en el desarrollo de PE.

En resumen, HIF- α tiene una participación fundamental para el desarrollo normal de la placenta, por lo que algunas alteraciones en su expresión y en sus genes blanco, podrían relacionarse con el desarrollo de PE.

CONCLUSIONES

La PE es un problema de salud pública en México y en el mundo, es responsable de una muy alta morbilidad y mortalidad materna. En el sector salud en México tiene implicaciones económicas importantes. Esta enfermedad sigue siendo un reto para la investigación biomédica, ya que su etiología es aún desconocida, lo que complica su detección temprana, su prevención y su manejo. Aunque se ha avanzado mucho en el estudio de múltiples genes involucrados en la fisiopatología, como son los genes KIR de las células NK deciduals y los que participan en la regulación de HIF, los cuales se han descrito en detalle a lo largo de esta revisión, no se ha encontrado la causa precisa que desencadena la enfermedad.

Con base en lo anterior, podemos concluir que se requiere más investigación realizada de forma integral, para conocer los aspectos genéticos y moleculares que permitan mejorar la prevención y manejo clínico de la PE, con la finalidad de poder disminuir los porcentajes de morbilidad y mortalidad del binomio feto-materno y la enorme inversión económica que representa para el sector salud.

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo es colaboración entre la UNAM y el Hospital de Ginecología No.4 del IMSS. Los autores

agradecen los apoyos recibidos de CONACyT, PAS-PA, DGAPA. UNAM.

REFERENCIAS

1. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006; 367: 1066-74.
2. Chandiramani M, Shennan A. Hypertensive disorders of pregnancy: A UK based perspective. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20: 96-101.
3. Lain KY, Roberts JM. Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. *JAMA* 2002; 287: 3183-6.
4. Von Dadarszen P, Magee L. What matters in preeclampsia are the associated adverse outcomes: the view from Canada. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20: 110-5.
5. Secretaría de Salud. Lineamiento Técnico. Prevención, diagnóstico y manejo de la preeclampsia/eclampsia. 4a. Ed. México, DF. 2007.
6. Velasco ME, Navarrete HE. Mortalidad materna en el IMSS, 1991-2005. Un periodo de cambios. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2006; 44: S121-S128.
7. Sibai BM. Biomarker for hypertension-preeclampsia: are we close yet? *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197: 1-3.
8. Moran C, Sandoval T, Duque X, González S, Moran S, Bermudez JA. Increased insulin levels independent of gestational overweighting women with preeclampsia. *Arch Med Res* 2006; 37: 749-54.
9. Roberts J, Gammill H. Preeclampsia recent insights. *Hypertension* 2005; 46: 1243-61.
10. Norwitz ER, Robinson JN, Reptke J. Prevention of preeclampsia: is it possible? *Clin Obstet Gynecol* 1999; 42: 436-54.
11. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Preeclampsia. *Lancet* 2005; 365: 785-97.
12. Barton JR, Sibai BM. Prediction and prevention of recurrent preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2008; 112: 359-72.
13. American College of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. ACOG Practice Bulletin No 33. *Obstet Gynecol* 2002; 99: 159-67.
14. Tuffnell DJ, Shennan AH, Waugh JJ, Walker JJ. The management of severe pre-eclampsia/eclampsia. Royal College of Obstetricians and Gynecologists, Guideline 10(A), London (UK): 2006, p. 1-11.
15. Coordinación de Salud Reproductiva y materno Infantil. Norma Técnico-Médica para la prevención y manejo de la preeclampsia-eclampsia. México: Instituto Mexicano del Seguro Social; 1995, p. 7-33.
16. Romero AJF, Tena AG. Epidemiología, clasificación y factores de riesgo en preeclampsia. En: Romero AJF, Tena AG, Jiménez SGA (eds.). Preeclampsia. Enfermedades hipertensivas del embarazo. Cap. 1. México: McGrawHill; 2009, p.1-15.
17. Velasco V, Navarrete E, Cardona J, Madrazo M. Mortalidad materna por preeclampsia-eclampsia en el Instituto Mexicano del Seguro Social 1987-96. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 1997; 35: 451-5.
18. Scifres CM, Nelson DM. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblasts cell death. *J Physiol* 2009; 587: 3453-8.
19. Ananth VC, Vintzileos MA. Medically indicated preterm birth: Recognizing the importance of the problem. *Clin Perinatol* 2008; 35: 53-67.
20. Kopcow D, Karumanchi A. Angiogenic factors and natural killer (NK) cells in the pathogenesis of preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2007; 76: 23-9.
21. Davison MJ, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad PK, Karumanchi AS, Quaggin S, et al. New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2440-8.
22. Dekker GA, Robillard PY. Preeclampsia: A couple's disease with maternal and fetal manifestations. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 699-710.
23. Caniggia I, Winter J, Lye S, Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: Implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* 2000; 21(Suppl. A): S25-S30.
24. Moffet KA. Natural Killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 656-63.
25. Di Santo PJ. Functionally distinct NK cell subsets: Developmental origins and biological implications. *Eur J Immunol* 2008; 38: 2927-68.
26. Koopman L, Kopcow H, Boyson J, Orange J, Chatz F, Masch R, et al. Human decidual NK cells are unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2007; 198: 1201-12.
27. Williams PJ, Bulmer JN, Searle RF, Innes BA, Robson SC. Altered decidual leukocyte in the placental bed in preeclampsia and fetal growth restriction: a comparison with late normal pregnancy. *Reproduction* 2009; 138: 177-84.
28. Li DX, Charnock-Jones S, Zhang E, Hiby S, Shazia M, Day K, et al. Angiogenic growth factors messenger ribonucleic acids in uterine Natural Killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1823-34.
29. Tabiasco J, Rabot M, Aguerre-Girr A, El Costa H, Berrebi A, Parant O, et al. Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties-A review. *Placenta* 2006; 27 suppl A: S34-S39.
30. Jacob H, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Prus D, Arnon T, Gazit R, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006; 12: 1065-74.
31. Smith SD, Dunk EC, Aplin DJ, Harris KL, Jones LR. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am J Pathol* 2009; 174: 1959-71.
32. Khakoo S, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models?. *Immunol Rev* 2006; 214: 186-201.
33. Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart AC, Beck S, Wilson M. The genomic context of Natural Killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* 2001; 181: 20-38.
34. Bashirova A, Martin P, Mc Vicar W, Carrington M. The killer immunoglobulin like receptor gene cluster: Tuning the genome for defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006; 7: 277-300.
35. Carrington M, Martin MP. The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 298: 225-57.
36. Hiby ES, Walker JJ, O'Shaughnessy MO, Redman WG, Carrington JT, Moffet A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of Preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004; 200: 957-65.
37. Rajakumar A, Conrad K. Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta. *Biol Reprod* 2000; 63: 559-69.
38. Caniggia I, Winter J.L. Hypoxia inducible factor-1: Oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic Pregnancies-A Review. *Placenta* 2002; 16(Suppl.) A: S47.S57.
39. Cross J. Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18: 71-6.
40. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoie-

- tin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 5447-54.
41. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
 42. Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 2002; 64: 1033-44.
 43. Genbacev O, Krtolica A, Kaelin W, Fisher S.J. Human cytotrophoblast expression of the von Hippel-Lindau protein is downregulated during uterine invasion in situ and upregulated by hypoxia in vitro. *Dev Biol* 2001; 233: 526-36.
 44. Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* 2000; 105: 577-87.
 45. Rajakumar A, Whitelock A, Weissfeld L, Daftary A, Markovic N. Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2a, in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod* 2001; 64: 499-506.
 46. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997; 99: 2152-64.
 47. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpunen T, et al. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* 2002; 160: 1405-23.
 48. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai JJ, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006; 12: 642-9.
 49. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350: 672-83.
 50. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 2006; 355: 992-1005.
 51. Kaelin WG. Proline hydroxylation and gene expression. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 115-28.
 52. Liu YV, Semenza GL. RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle* 2007; 6: 656-9.
 53. Koh MY, Powis G. HAF: the new player in oxygen-independent HIF-1alpha degradation. *Cell Cycle* 2009; 8: 1359-66.
 54. Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, et al. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signalling pathway. *J Biol Chem* 1997; 272: 8581-93.
 55. Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogaza K, et al. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: Their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 1999; 18: 1905-14.
 56. Stebbins C, Kaelin Jr W, Pavletich N. Structure of the VHL – elongin C – elongin B complex: Implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 1999; 284: 455-61.
 57. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF-alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing. *Science* 2001; 292: 464-8.
 58. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 2001; 20: 5197-206.
 59. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1a is mediated by an oxygen-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7987-92.
 60. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxia conditions. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642-7.
 61. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295: 858-61.
 62. Rajakumar A, Doty K, Daftary A, Markovic N, Conrad KP. Expression of von Hippel Lindau (pVHL) protein in placentae from normal pregnant women and women with preeclampsia. *Placenta* 2006; 27: 411-21.
 63. Rajakumar A, Michael HM, Daftary A, Jeyabalan A, Gilmour C, Conrad KP. Proteasomal activity in placentas from women with preeclampsia and intrauterine growth restriction: implications for expression of HIF-alpha proteins. *Placenta* 2008; 29: 290-9.
 64. Yamada N, Horikawa Y, Oda N, Lizuka K, Shihara N, Kishi S, et al. Genetic variation in the HIF-1a gene is associated with type 2 diabetes in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5841-7.
 65. Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, et al. Hypoxia-inducible factor-1a polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1779-83.
 66. Percy M, Mooney S, McMullin MF, Flores A, Lappin T, Lee F. A common polymorphism in the oxygen-dependent degradation (ODD) domain of hypoxia inducible factor-1a (HIF-1a) does not impair Pro-564 hydroxylation. *Mol Cancer* 2003; 2: 31-7.
 67. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 309-14.
 68. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Panagopoulos I, Maltezos E, Harris AL. C2028T polymorphism in exon 12 and dinucleotide repeat polymorphism in intron 13 of the HIF-1alpha gene define HIF-1alpha protein expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 53: 257-62.
 69. Hebert C, Norris K, Parashar P, Ord R, Nikitakis N, Sauk J. Hypoxia-inducible factor-1a polymorphisms and TSC1/2 mutations are complementary in head and neck cancers. *Mol Cancer* 2006; 5: 1-11.
 70. Heino S, Kaare M, Andersson S, Laivuori H. Non-synonymous sequence variants within the oxygen-dependent degradation domain of the HIF1A gene are not associated with pre-eclampsia in the Finnish population. *BMC Med Genet* 2008; 9: 96-101.

Reimpresos:

Dr. Marco Antonio Cerbón

Facultad de Química. Edificio F
Circuito Interior Universitario S/N,
04510, México, D.F., Coyoacán
Tel.: 5622-3820, fax: 5616-2010
Correo electrónico: mcerbon85@yahoo.com.mx

Recibido el 5 de septiembre de 2009.
Aceptado el 2 de diciembre de 2009.

Publicación

Sánchez-Rodríguez EN, **Nava-Salazar S**, Mendoza-Rodríguez CA, Romero-Arauz F, Morán C, Cerbón MA. Immune-endocrine alterations during preeclampsia. *Open Neuroendocrinol J* 2010, 3:143-151.

Immune-Endocrine Alterations During Preeclampsia

E.N. Sánchez-Rodríguez¹, S. Nava-Salazar*¹, C.A. Mendoza-Rodríguez¹, F. Romero-Arauz², C. Morán² and M.A. Cerbón¹

¹Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria S/N, México DF, CP 04510; ²Hospital de Ginecología y Obstetricia, No.4, IMSS, México City, México

Abstract: Preeclampsia is a pregnancy-related disorder exclusive to human beings, and represents a public health problem worldwide whose etiology is still unknown. As diverse studies have reported, an understanding of the onset and course of this disorder depends on the knowledge about the interaction between the physiological systems of the organism, such as the immune, vascular and endocrine systems. Recently, in Mexican women with preeclampsia we genotyped the family of KIR genes and studied the phenotype of NK cells in peripheral blood and the decidua. Moreover, we are characterizing the proteins, such as HIF-1 α and two of its more frequent genetic polymorphisms, as well as the pathways of their activation which participate in placental hypoxia. The aim of the current study is to review the most recent contributions regarding the participation of the immune and vascular system during the development of preeclampsia, and the immunoendocrine alterations which result of them.

Keywords: NK cells, KIR receptors, preeclampsia, angiogenesis, endometrium.

INTRODUCTION

Since the experiments conducted by Calzoari in 1898, which described the changes observed in the thymus of castrated animals, the evidence about the interaction between the endocrine and immunological systems has been accumulating and resulting in an ever greater consolidation of knowledge [1]. One of the principal challenges of immunologists as well as reproduction specialists is to understand these systems and their interactions during pregnancy, since a profound understanding of all the relevant factors is urgently needed. Strict control of complex factors involved in diverse processes, such as steroid hormones, immune system cells, Natural Killer (NK) cells [2-4], signaling molecules (e.g., cytokines and chemokines) [5, 6], growth factors, angiogenic factors, hypoxia factors [7], neurotrophins [8], among others (Fig. 1), is essential for the healthy acceptance of the fetus (including embryo implantation) and maintenance of a normal pregnancy based on an adequate development and vascularization of the placenta.

Any alteration in the immunoendocrine networks lead to reproductive disorders that include recurrent spontaneous abortions, infertility and preeclampsia (PE) [9]. The latter is a worldwide public health problem, one of main causes of maternal death, and one of the most complex obstetric complications, both for medical practice and research. Although the etiology of preeclampsia is yet to be fully elucidated, various hypotheses incorporating angiogenic, genetic, immunological and endocrinal factors have stemmed from diverse clinical and molecular studies [10]. The complex

interrelation of these factors accounts for the wide range of such hypotheses.

The aim of the present study is to describe the principal aspects related to immunoendocrine regulation during pregnancy and their implications for PE. We broach the principal hypothesis of the etiology of PE as well as the immunoendocrine factors of the endometrium, emphasizing the characterization and function of decidual NK cells (dNK) as well as angiogenic factors in the early stages of gestation.

IMMUNOENDOCRINE ASPECTS OF THE ENDOMETRIUM

The endometrium is a tissue that presents cyclical morphological changes, implicating processes of differentiation, proliferation, apoptosis, angiogenesis, vascularization, and recruitment of leukocytes [1]. From the endocrinological point of view, the majority of these processes have been widely studied. For instance, it is well known that during the development of the follicle, the maturation of the oocyte and ovulation, the female reproductive system is under the influence of hormones secreted by the pituitary (FSH and LH) and by the follicle (estradiol and progesterone) [11]. Yet in spite of the general recognition that these processes are accompanied by inflammatory mechanisms, such as the recruitment of lymphocytes, degradation of the extracellular matrix, and changes in the expression of various immune molecules (chemokines, integrins and adhesion molecules), such mechanisms have not been fully studied [12, 13].

The direct action of steroid hormones has been confirmed in isolated lymphocytes of peripheral blood, whose response seems to be sexually dimorphic [14]. This same proposal is held by the Morales-Montor group, which utilizes a murine model of infection and observes that the immune response is different in male and female animals, possibly due to the dimorphic expression of receptors for steroid sex hormones

*Address correspondence to this author at the UNAM, Facultad de Química, Edificio F., Ciudad Universitaria S/N, México DF, CP 04510; Tel: 5255-56223820; Fax: 5255-56162010; E-mail: s_nava_s@yahoo.com.mx

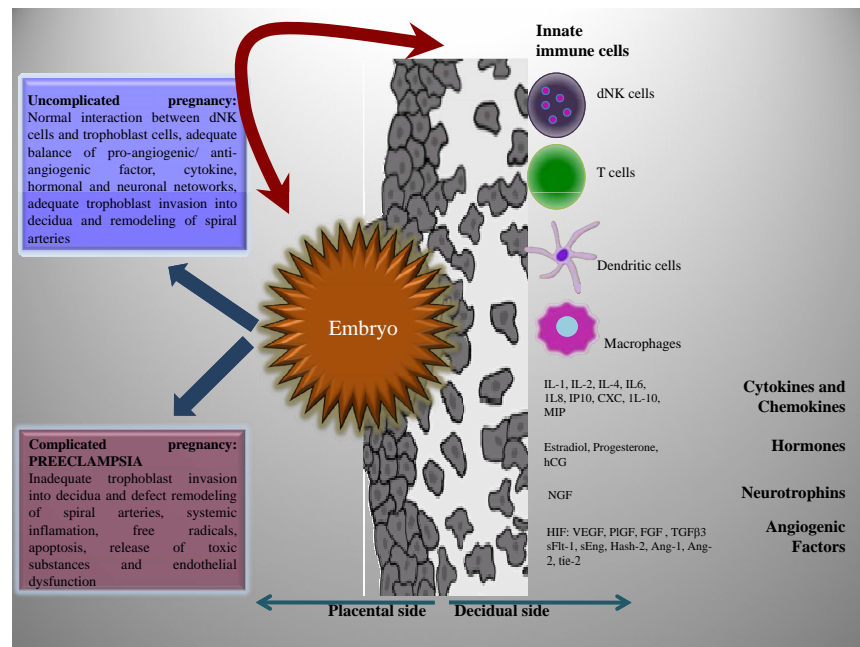


Fig. (1). Cross-talk between the embryo and the another involves the interaction between endocrine and immune systems.

in leukocytes [15, 16]. The implications of this proposal have profound repercussions not only on the current knowledge of the immune response against pathogenic agents and autoimmune diseases.

Whereas receptors for estrogens (alpha and beta) and progesterone have been identified on lymphocytes [14], only those for beta estrogen receptors have been found on decidual NK cells [17]. In the latter case the function of the beta estrogen could also be mediated by steroid sex hormones in an indirect manner, as evidenced by the fact that the stromal cell cultured from the endometrial tissue induces a great quantity of IL-15 when stimulated with progesterone, and that this cytokine is essential for the differentiation of NK cells [18]. The cell lines of NK cells (NK-92 and YT) express the receptor for prolactin and respond to *in vitro* stimulation by this hormone. Prolactin has synergic activity with IL-15, increasing the proliferation and cytotoxicity of NK cells [19].

During the menstrual cycle, the type and quantity of leukocytes that arrive to the endometrium vary depending on the phase of the cycle. During the proliferative phase principally T lymphocytes, macrophages, NK cells and dendritic cells have been detected. In the secretory phase, T lymphocytes diminish, dendritic cells remain constant, neutrophils appear and NK cells are abundant [20-22]. B lymphocytes are practically absent from this tissue during the entire cycle [23]. The functions performed by T lymphocytes, macrophages and neutrophils are directly related to the destruction of the corpus luteum [24]. The role of NK cells is not completely known, but it is thought that they are involved in decidualization [25].

During pregnancy the amount of leukocytes detected in the decidua (a new functional layer of the endometrium during pregnancy) differ from those described during the menstrual cycle. In the stage of embryonic implantation and the first weeks of pregnancy, NK cells constitute the greatest

percentage of leukocytes present (70%). The function of these cells has recently been recognized such as the production of cytokines, chemokines and angiogenic factors, which contributes to the formation of the placenta and the vascular changes in the endometrium [26-28]. Although some authors report that this cellular population disappears at the end of pregnancy, recent data from our lab show an important quantity of NK cells in the decidua of women at the end of their pregnancy (data submitted to be publish).

During the menstrual cycle there are three stages in the angiogenic processes, which: (i) repair the vascular bed during menstruation, (ii) work in synchrony with the rapid growth of the endometrium in the proliferative phase, and (iii) facilitate the growth of the arterioles in the secretory phase [29, 30]. The factors that can induce angiogenesis in the endometrium are the epidermal growth factor (EGF), the transforming growth factor α and β (TGF- α y TGF- β), the tumor necrosis factor α (TNF α), angiogenin, prostaglandin E₂ (PGE₂) and the vascular endothelium growth factor (VEGF), among others [31-33]. During the first weeks of pregnancy the angiogenic factors play a crucial role. The regulation of these factors is complex, as they depend on the cellular context and can be induced by changes in the concentration of oxygen, hormones, cytokines and phosphorylation cascades. VEGF is one of the principal inducers of angiogenesis, being essential for the normal growth of the endometrium as well as the implantation and development in the placenta. In consequence, the majority of the studies on angiogenic processes in the endometrium have focused on this factor [34-37].

1. Decidual NK Cells

NK cells comprise 10 to 15% of the lymphocytes in peripheral blood, where their phenotype is characterized by the absence of receptors for antigens and by CD56⁺, CD16^{+/−} surface markers [38]. NK cells can be divided in two subpopulations based on the density of the CD56 marker (bright

to heavy, or dim to medium). 90 to 95% of the circulating NK cells belong to the CD56^{dim} CD16⁺ phenotype and are highly cytotoxic. The remaining 5 to 10% have the CD56^{bright} CD16⁻ phenotype, contain less cytotoxic granules and are very efficient in the secretion of cytokines, especially IFN- γ , TNF- α and IL-6 [39, 40].

NK cells in the decidua during early gestation have been characterized. They possess a CD56^{bright} CD16⁻ phenotype, are not highly cytotoxic and are very efficient in the secretion of cytokines such as INF γ , IL-10 and TGF- β . At the level of messenger RNA the presence of growth factors for the vascular beds and placenta (VEGF and PlGF, respectively) have been detected [41, 42]. All of these elements are important in angiogenesis and the remodeling of uterine arteries during pregnancy.

Assays conducted by microarrays have compared NK cells from peripheral blood and decidual NK cells. In the latter cells some genes are found to be exclusively expressed, while others (such as those related with angiogenesis) are over expressed, suggesting that these two subpopulations of NK cells are quite distinct in the decidua [41, 43].

Jacob *et al.* (2006) recently demonstrated, through *in vitro* and *in vivo* studies, that NK cells participate in the invasion of the trophoblast, angiogenesis and the remodeling of the uterine arteries. When isolated decidual NK cells and those from peripheral blood are co-cultivate with a trophoblast cell line, only the former are capable of promoting migration, invasion and angiogenesis of these cells [28].

Another study done by Smith *et al.* (2009) suggests that NK cells participate in the uterine arterial remodeling, even independently from their interaction with trophoblast cells. That is, in the vascular remodeling phase, during which there were no trophoblast cells, the secretion of metalloproteinases by NK cells to the extracellular matrix favored the loss of vascular smooth muscle and as consequence the beginning of remodeling the vascular bed [44].

The mechanism by which decidual NK cells allow for the arrival and invasion of trophoblast cells to the decidua remains an enigma. From the immunological point of view, the trophoblast is a foreign agent that must be eliminated by the maternal immune system. Nevertheless, not only does it fail to be eliminated, on the contrary its implantation and invasion to the maternal decidua is promoted.

It has been suggested that the interaction of ligands expressed in trophoblastic cells, such as HLA-G, with NK cells receptors is responsible for the inhibition in the latter cells and their cytotoxic activity [45]. Kopcow *et al.* (2005) have demonstrated that the low cytotoxic capacity of decidual NK cells owes itself to their inability to form mature synapse activators, or to polarize the organizing centers of microtubules and granules that contain perforins facing the synapse [46].

2. Angiogenic Factors

The preservation of the morphology and function of villus as well as the regulation and differentiation of trophoblasts are critical for the placentation [47, 48]. In the first 8 weeks, a pregnancy develops in an environment of hypoxia, in which trophoblasts are maintained in a proliferative state and relatively undifferentiated, with an uninvase ph-

notype. From 10 to 12 weeks of gestation, the rapid increase in the concentration of oxygen promote the process of differentiation and invasion by trophoblasts [48, 49].

Under hypoxic conditions, the hypoxia inducible factor alpha (HIF- α) is activated, and this transcription factor induces angiogenic and non-angiogenic factors [34]. Angiogenic factors are indispensable for the normal development of the placenta, principally in relation to proliferation and vascularization processes and during the migration of trophoblastic cells towards the maternal region. Among the most important angiogenic factors are: VEGF, its VEGFR-1 (Flt1) and VEGFR-2 (KDR) receptors, the fibroblast growth factor (FGF), the platelet growth factor (PlGF) and angiotensin (ANG) [34, 50].

Studies on mice embryos demonstrate that the knockout of the VEGF gene presents an abnormal development of blood vessels and placenta formation, resulting in cardiovascular defects and causing the death of the product at day 11 of gestation. In addition, the heterozygote knockout of this gene, express low levels of VEGF leading to fetal and placental defects similar to homozygote, and causing death of the product at 11-12 days of gestation. A null mutation in the KDR receptor during pregnancy produces defects in the differentiation of the hemangioblasts, precursors of hematopoietic and angioblast cells. Embryos that lack the VEGFR-1/Flt-1 receptor develop angioblasts, but fail to form blood vessels [51-54]. In the human placenta, the union of VEGF with its Flt-1 receptor induces chemotaxis, stimulating the trophoblast invasion [55]. VEGF has also shown itself have many actions on endothelial cells such as: stimulator of the proliferation and migration, induction of an activator of the plasminogen and, an inducer of microvascular permeability [56-58]. PlGF is a weak inducer, compared to VEGF, of chemotaxis and proliferation of endothelial cells, possibly because it binds to the Flt-1 but not to the KDR receptor [59, 60].

FGF stimulates proliferation of endothelial cells as well as uterine and placenta arteries, and induces the differentiation of the embryonic germinal layers, principally of the mesoderm [61, 62]. VEGF and FGF have been associated with the regulation of placental blood flow and the production of nitric oxide (NO), a vasodilator that mediates the increase in uterine blood flow induced by estrogens [63-65].

HIF- α also can induce inhibitors of trophoblast differentiation, such as the transforming growth factor β 3 (TGF β 3) and Hash-2. Consequently, during the first 8 weeks of gestation, trophoblasts remain in a relatively undifferentiated and non-proliferate state. To the extent that the gestation age progresses and the concentration of oxygen increases, the expression of HIF- α decreases, resulting in diminished levels of its target genes and the complete differentiation of the trophoblasts [66, 67].

It is commonly recognized that during pregnancy the regulation of angiogenic factors is related to the concentration of oxygen, since the main regulator of these factors, HIF- α , is regulated in this respect [68-71]. However, a normal pregnancy involves immunological and endocrine factors as well. A less explored area is the role played by hormones in the regulation of angiogenic factors, although some studies have indeed been done to establish the influence of

hormones in angiogenic processes in the endometrium [72-74].

Angiogenesis in the endometrium involves processes of proteolytic degradation of the extracellular matrix, proliferation and migration of endothelial cells, and the formation of capillary vessels that supply blood for the growth of the endometrium. VEGF is an important factor in the regulation of these processes, as it is known that the interaction of VEGF with its VEGF-R2 receptor induces the recruitment and proliferation of endothelial cells, while interaction with its VEGF-R1 receptor induces endothelial cells to form capillary vessels and promotes their interaction with tightly bound proteins [51, 52]. Ang-1 and tie-2 participate in the maturity of these vessels that promote the recruitment of pericytes to them [75, 76]. On the other hand, Ang-2 can bind to tie-2, thus competitively inhibiting Ang-1 and causing the rupture of blood vessels. It has been speculated that this process has the aim of preventing the basal membrane from enclosing the endothelial cells, thus allowing VEGF to have access to these cells in order to induce proliferation [77, 78].

The regulation of the angiogenic factors in the endometrium is very complex. The first studies on rhesus monkeys suggested that during menstruation there is an environment of hypoxia and ischemia in the endometrium [79]. Nonetheless, studies in women that used different techniques for determining blood flow in the endometrium (xenon-133, doppler) did not show a low concentration of oxygen, which led to the questioning of former assumptions [80, 81].

It is known that steroid sex hormones play an important role in the remodeling of the endometrium during the menstrual cycle. Although the detection of receptors for steroid hormones and the discovery of their mechanism of action has been the subject of intense study in endothelial cells, there is still controversy about the expression of these receptors in endometrial endothelial tissue and their possible role in angiogenesis. On the one hand, there is evidence of an important participation of these hormones in angiogenesis [82, 83]. Studies on stromal cells *in vitro* found that estradiol and medroxyprogesterone acetate increase expression of the mRNA of VEGF, and experiments in rat uterus showed that estradiol (E₂) and progesterone also augment the expression of this factor [37, 84-87].

On the other hand, there is contradictory evidence about the location and regulation of the expression of estrogen response elements (EREs) in the promoter of the VEGF gene [88-94]. Stoner *et al.* (2000 and 2004) demonstrated that the alpha receptor for estrogens (ER α) does not interact directly with EREs on VEGF, but in fact does so with Sp1 and Sp3 transcription factors, which interact with the VEGF promoter after being induced by estradiol [95, 96].

In order to identify the transcription factors that interact with the VEGF promoter, Kazi *et al.* (2005) studied the effect of E₂ on the expression of VEGF by immunoprecipitation assays done with chromatin, finding that E₂ induces the recruitment of ER α and HIF- α to the VEGF promoter. The binding of HIF- α to the VEGF gene is transitory and is in accordance with the expression pattern of VEGF in the endometrium. ER α interacts with the VEGF promoter through the bond with Sp1 and Sp3. The binding of ER α with these factors is maintained even though the levels of the VEGF

messenger diminish, which suggests that other factors are probably involved in its expression. It has also been demonstrated that the binding of HIF-1 α to the VEGF promoter is necessary for the induction of the latter mediated by E₂ [97].

Other studies conducted on cell lines show that the expression of this factor increases through the influence of other hormones, growth factors and cytokines under conditions of a normal oxygen supply [98-101].

The increase in the expression of HIF-1 α by diverse factors has been associated with its activation by phosphorylation. These factors stabilize HIF-1 α and at the same time increase its expression levels and transcriptional activity. HIF- α can be phosphorylated by the PI3K and MAPK signaling pathways, and these can be activated by E₂ [102-104]. The angiogenic processes in the endometrium during pregnancy have still not been fully clarified and require further study.

PREECLAMPSIA

In the first trimester of pregnancy and the normal development of the placenta, great changes take place in the uterine vascular system. Extravillous trophoblast cells invade up to the first third of the myometrium in the uterine wall and interact with spiral arteries, replacing the vascular wall and causing arteries of the placenta and uterus to distend. As a consequence, the blood flow to the uterus increases, allowing for an adequate perfusion and a supply of sufficient nutrients for fetal growth [105, 106].

Preeclampsia is characterized by a deficient development of the placenta, accompanied by a superficial endovascular invasion of the trophoblast and an inadequate remodeling of spiral arteries in the decidua and myometrium. The result is placental hypoperfusion, oxidative stress and an exacerbated inflammatory response, leading to clinical manifestations in the mother, such as hypertension, proteinuria and/or indications of multi-systemic disorders, as well as the restriction of intrauterine fetal growth [10, 107, 108]. The principal hypotheses about the etiology of preeclampsia involve neuroendocrine and immunological factors, the most accepted being the immunological hypothesis and the angiogenic hypothesis [109].

1. Immunological Factors in PE

As aforementioned, at the moment of embryonic implantation the maternal decidua is completely infiltrated by NK cells. The specific recognition of trophoblast ligands by NK cell receptors causes the interaction of these two factors. The effector functions of NK cells depend on a very fine regulation between inhibitory and activating receptors, which can belong to distinct structural families: Immunoglobulin-like receptors (KIR), type C heterodimeric receptors of lectin (CD94/NKG), immunoglobulin-like transcripts (ILT) and cytotoxic receptors of NK cells (NCR) [110].

KIR receptors recognize histocompatibility molecules of the trophoblast, specifically HLA-G and HLA-C, the latter of which is the only highly polymorphic HLA expressed in trophoblast tissue. The interaction between the HLA molecules of the trophoblast and KIR receptors of maternal endometrial NK cells inhibits the cytotoxic activity of the latter cells and modulates their production of cytokines and growth

factors, thus favoring the growth of the trophoblast, the invasion of the endometrium and vascular remodeling, which are all necessary for the normal development of the placenta [111-113].

There are at least 14 different members of the family of KIR receptors. A study conducted on Caucasian women, which compared the genotype of KIR receptors in women with normal pregnancies and those with PE, found that the presence of genotype AA (inhibitor), particularly the *KIR2DL1* gene, in women with PE, combined with the HLA-C of group 2 in their babies increased the prevalence of this disorder. The frequency of this combination was two-fold greater in women with PE, representing an almost 50% greater frequency than in women with normal pregnancies. Given that this interaction is considered to be a strong inhibitory signal for NK cells, and that the over inhibition of decidual NK cells would avoid the adequate formation of the placenta caused by the secretion of cytokines and factors of vascular remodeling, it is probably the inhibition and not the activation of NK cells that predisposes women to PE. Contrarily, the presence of activating receptors could be a protective factor [114, 115].

2. Angiogenic Factors in PE

In the trophoblast of women with PE, the over expression of HIF- α and its target proteins has been found. These are principally non-angiogenic factors: soluble fms-like tyrosine 1 (sFlt-1) and soluble endoglin (sEng). Additionally, inhibitors of trophoblast (TGF β 3) differentiation have been found. sFlt-1 is a truncated variant of the membrane receptor VEGFR1, which antagonizes VEGF and PlGF. sEng acts in the same manner through its soluble receptor for TGF- β 1 [66, 116-118]. In women with PE a decrease in angiogenic factors and an increase in anti-angiogenic factors have been observed. Moreover, inhibitors of trophoblast differentiation have been found, which coincides with the phenotypes found in the placentas of these patients, characterized by an inadequate invasion due to an immature trophoblasts [119].

The imbalance between angiogenic and non-angiogenic factors has been proposed as one of the principal causes of the development of PE. Since HIF- α is the principal regulator of such factors, various work groups are studying the different pathways that could be responsible for its over expression in the placenta of women with PE [120, 121].

One of the most important and best characterized regulatory pathways of HIF- α is degradation by polyubiquitination, which depends on the concentration of oxygen [122]. The HIF protein is a heterodimeric transcription factor (HIF- α y HIF- β). The best characterized isoforms are HIF-1 α y HIF-2 α , whose transcriptional activity is regulated through two transactivation domains, N-TAD and C-TAD, located towards the extreme COOH-terminal [123, 124]. HIF-1 α is directly regulated by a complex with ubiquitin E₃ ligase activity. This complex, formed by the von Hippel Lindau protein (pVHL), elongin C and B, Cullin 2, and the E₂ enzyme conjugated with ubiquitin and Rbx1, is responsible for the polyubiquitination of HIF1- α , leading to its degradation by the 26S proteasome [125].

In the presence of oxygen, HIF- α is enzymatically hydroxylated by members of the EGLN1-3 or PHD1-3 family in an N-TAD domain, referred to as oxygen dependent deg-

radation domain (ODDD) [126-128]. Under conditions of scarce oxygen, HIF- α is stabilized, translocated to the nucleus, and dimerized with HIF- β , forming an active complex that binds with response elements in the promoter of its target genes, allowing for its transcription [126, 127].

Rajakumar studied diverse proteins that participate in this route of degradation, looking for the probable cause of the over expression of HIF- α . Whereas no differences in the expression of pVHL were found between the placenta of women with normal pregnancies and those with PE, in the latter cases an increase was observed in hydroxylase PHD-3, which may participate in reestablishing the concentration of HIF- α [129, 130].

Currently we are studying other proteins involved in the regulation of HIF- α . The results indicate that there are differences in the expression of pVHL in women with severe PE versus those who are normotensive with mild PE. Furthermore, we have analyzed different hydroxylases that participate in this pathway and like Rajakumar have found an increase in the expression of some of the HIF- α hydroxylases (data submitted to be published).

The expression of HIF- α could also be modified by genetic factors. Yamada *et al.* (2005) have described 35 polymorphisms of the HIF1A gene, three of which are located in coding regions S28Y, P582S and A588T [131]. Tanimoto *et al.* (2003) explained that the presence of P582S and A588T polymorphisms can increase the transcriptional activity of this gene in comparison with the common isoform [132]. Heino *et al.* (2008) studied these polymorphisms and their relation to the development of PE in a Finnish population, without finding any correlation between the presence of these variants of the HIF1A gene and the development of PE [133]. In a Mexican population we have found frequencies of these polymorphisms similar to those in other populations. Like Heino *et al.*, we did not observe any significant difference in these polymorphisms between pregnant normotensive women and those with PE, suggesting that other factors associated with HIF- α probably participate in the development of this disorder.

Diverse studies have indicated that 2-methoxyestradiol (2-ME) destabilizes the formation of microtubules and inhibits HIF- α [134, 135]. 2-ME is a metabolite produced from E₂ by the catechol-O-methyltransferase (COMT) enzyme, which increases its concentration during pregnancy [136, 137]. Kanasaki *et al.* (2008) demonstrated that mice with a COMT deficiency acquire a phenotype with characteristics similar to PE. They found that the levels of COMT and 2-ME were significantly less in women with PE compared to those who were pregnant and normotensive. In this way, they managed to establish the first model of human like-PE in mice and suggested that COMT and 2-ME could be good markers in the clinical diagnosis of PE [138].

Angiogenic factors are also regulated by immunological factors. Fons *et al.* (2006) demonstrated that the soluble HLA-G1 isoform (sHLA-G1) has anti-angiogenic properties *in vitro* and *in vivo*. In a model of neovascularization in rabbit cornea they showed that sHLA-G1 can decrease angiogenesis by inhibiting FGF [139].

Angiogenic factors have a fundamental participation in the normal development of the placenta. Hence, alterations in factors that regulate angiogenesis, such as HIF- α , COMT, 2-ME and HLA-G, are probably related to the development of PE.

CONCLUSION

Owing to the complexity of the regulation of placentation, it is important to continue developing an integral analysis of the distinct pathways involved, as well as of all of the other molecular and genetic mechanisms that could participate in the etiology of PE, especially in relation to the immune and endocrine systems. Such an integral analysis of the etiology of PE based on a better understanding of all of the factors of the physiopathology of the development of the placenta in women with PE could facilitate the discovery of better treatments for affected women.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from CONACyT and PAPIIT, ENSR and SNS are fellowships from CONACyT, México.

REFERENCES

- [1] Kayisli UA, Guzeloglu-Kayisli O, Arici A. Endocrine-immune interactions in human endometrium. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1034: 50-63.
- [2] Kodama T, Hara T, Okamoto E, Kusunoki Y, Ohama K. Characteristic changes of large granular lymphocytes that strongly express CD56 in endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod* 1998; 13: 1036-43.
- [3] Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 656-63.
- [4] Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63: 1-12.
- [5] Guzeloglu- Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS. The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. *Semin Reprod Med* 2009; 27: 62-79.
- [6] Dimitridis W, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 613-30.
- [7] Lunghi L, Ferreti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5: 6.
- [8] Tometten M, Blois S, Arck PC, Ed. *Immunology of pregnancy*. Basel, Switzerland: Karger 2005; pp. 145-8.
- [9] Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C, Jonsson Y, Sharma S, Eds. *Immunology of pregnancy*. Basel, Switzerland: Karger 2005; pp. 49-61.
- [10] Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365: 785-99.
- [11] Lea RG, Sandra O. Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. *Reproduction* 2007; 144: 389-404.
- [12] Van Mourkis MS, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *Leukoc Biol* 2009; 85: 4-19.
- [13] Garlanda C, Maina V, Martinez de la Torre Y, Nebuloni M, Locati M. Inflammatory reaction and implantation: the new entries PTX3 and D6. *Placenta* 2008; 29 (suppl B): 129-34.
- [14] Scariano JK, Emery-Cohen AJ, Pickett GG, Morgan M, Simons PC, Alba F. Estrogen receptors alpha (ESR1) and beta (ESR2) are expressed in circulating human lymphocytes. *J Recept Signal Transduct Res* 2008; 28: 285-93.
- [15] Morales-Montor J, Escobedo G, Vargas-Villavicencio JA, Larralde C. The neuroimmunoendocrine network in the complex host-parasite relationship during murine cisticercosis. *Curr Top Med Chem* 2008; 8: 400-7.
- [16] De León-Nava MA, Nava K, Soldevila G, *et al.* Immune sexual dimorphisms: effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 113: 57-64.
- [17] Henderson T, Saunders P, Moffett-King A, Groome N, Critchley D. Steroid receptor expression in uterine Natural Killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 440-9.
- [18] Okada H, Nakajima T, Sanezumi M, Ikuta A, Yasuda K, Kanzaki H. Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4765-70.
- [19] Sun R, LI AL, Wei HM, Tiang Z. Expression of prolactin receptor and response to prolactin stimulation of human NK cell lines. *Cell Res* 2004; 14: 67-73.
- [20] King A, Wellings V, Gardner L, Loke YW. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Immunol* 1989; 24: 195-205.
- [21] Kodama T, Hara T, Okamoto E, Kusunoki Y, Ohama K. Characteristic changes of large granular lymphocytes that strongly express CD56 in endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod* 1998; 13: 1036-43.
- [22] Kämmerer U, von Wolff M, Markert UR. Immunology of human endometrium. *Immunobiology* 2004; 209: 569-74.
- [23] Givan AL, White HD, Stern JE, *et al.* Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix and vagina. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38: 350-9.
- [24] Pate JL, Landis Keyes P. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes?. *Reproduction* 2001; 122: 665-76.
- [25] Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* 2007; 25: 445-53.
- [26] Starkey PM, Sargent L, Redman CWG. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology* 1998; 65: 129-34.
- [27] Moffet A, Trundley A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63: 1-12.
- [28] Jacob H, Goldman-Wohl D, Hamani Y, *et al.* Cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006; 12: 1065-74.
- [29] Rogers PAW, Au CI, Affandi B. Endometrial microvascular density during the normal menstrual cycle and following exposure to long-term levonorgestrel. *Hum Reprod* 1993; 8: 1396-404.
- [30] Rogers PA, Gargett CE. Endometrial angiogenesis. *Angiogenesis* 1998; 2: 287-94.
- [31] Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 217-39.
- [32] Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277: 48-50.
- [33] Zygumnt M, Herr F, Münstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110 (Suppl 1): S10-8.
- [34] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
- [35] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22.
- [36] Girling JE, Rogers PA. Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis* 2005; 8: 89-99.
- [37] Nardo LG. Vascular endothelial growth factor expression in the endometrium during the menstrual cycle, implantation window and early pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17: 419-23.
- [38] Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008; 112: 461-9.
- [39] Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009; 126: 458-65.
- [40] Wilk E, Kalippke K, Buyny S, Schmidt RE, Jacobs R. New aspects of NK cell subset identification and inference of NK cells' regulatory capacity by assessing functional and genomic profiles. *Immunobiology* 2008; 213: 271-83.
- [41] Koopman L, Kopcow H, Boyson J, *et al.* Human decidual NK cells are unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2007; 198: 1201-12.
- [42] Li DX, Charnock-Jones S, Zhang E, *et al.* Angiogenic growth factors messenger ribonucleic acids in uterine Natural Killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1823-34.

- [43] Tabiasco J, Rabot M, Aguerre-Girr M, *et al.* Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties. *Placenta* 2006; 27 (Suppl A): S34-9.
- [44] Smith DS, Dunk EC, Aplin DJ, Harris KL, Jones LR. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am J Pathol* 2009; 174: 1959-71.
- [45] Poehlmann TG, Schaumann A, Busch S, *et al.* Inhibition of term decidual NK cell cytotoxicity by soluble HLA-G1. *Am J Reprod Immunol* 2006; 56: 275-85.
- [46] Kopcow HD, Allan DS, Chen X, *et al.* Human decidual NK cells form immature synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 15563-8.
- [47] Caniggia I, Winter JL. Hypoxia inducible factor-1: Oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic Pregnancies - A Review. *Placenta* 2002; 16: S47-57.
- [48] Cross J. Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18: 71-6.
- [49] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 5447-54.
- [50] Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 2002; 64: 1033-44.
- [51] Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.
- [52] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, *et al.* Failure of blood island formation and vasculogenesis in flk-1 deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-6.
- [53] Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-42.
- [54] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435-9.
- [55] Clauss M, Weich H, Breier G, *et al.* The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 1996; 26: 271: 17629-34.
- [56] Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S, *et al.* A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene* 1994; 9: 2683-90.
- [57] Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, *et al.* Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 9709-16.
- [58] Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 1997; 15: 2169-77.
- [59] Hauser S, Weich HA. A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta. *Growth Factors* 1993; 9: 259-68.
- [60] Plaisier M, Rodrigues S, Willems F, Koolwijk P, van Hinsbergh VW, Helmerhorst FM. Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first-trimester decidual tissues. *Fertil Steril* 2007; 88: 176-87.
- [61] Klein PS, Melton DA. Hormonal regulation of embryogenesis: the formation of mesoderm on *Xenopus laevis*. *Endocr Rev* 1994; 15: 326-41.
- [62] Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev* 2000; 92: 55-81.
- [63] Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Monge JC, Mohamed F, Bendek MP, Stewart DJ. Role of nitric oxide in the angiogenic response *in vitro* to basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 1998; 82: 1007-15.
- [64] Kroll J, Waltengberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 743-6.
- [65] Osol G, Celia G, Gokina N, *et al.* Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H1381-7.
- [66] Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* 2000; 105: 577-87.
- [67] Genbacev O, Krtolica A, Kaelin W, Fisher SJ. Human cytotrophoblast expression of the von Hippel-Lindau protein is downregulated during uterine invasion *in situ* and upregulated by hypoxia *in vitro*. *Dev Biol* 2001; 233: 526-36.
- [68] Rajakumar A, Conrad KP. Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta. *Biol Reprod* 2000; 63: 559-69.
- [69] Adelman DM, Gertsenstein M, Nagy A, Simon MC, Maltepe E. Placental cell fates are regulated *in vivo* by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes Dev* 2000; 14: 3191-203.
- [70] Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus. *Placenta* 2003; 24: S86-93.
- [71] Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004; 114: 397-407.
- [72] Kayisli UA, Guzeloglu-Kayisli O, Arici A. Endocrine-immune interactions in human endometrium. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034: 50-63.
- [73] Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HO. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev* 2006; 27: 17-46.
- [74] Lea RG, Sandra O. Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. *Reproduction* 2007; 134: 389-404.
- [75] Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* 1995; 203: 80-92.
- [76] Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, *et al.* Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376: 70-4.
- [77] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.
- [78] Seval Y, Sati L, Celik-Ozenci C, Taskin O, Demir R. The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. *Placenta* 2008; 29: 809-15.
- [79] Markee JE. Menstruation in intraocular endometrial transplants in the rhesus monkey. *Contrib Embryol* 1940; 28: 219-308.
- [80] Fraser IS, Peek MJ. Effects of exogenous hormones on endometrial capillaries. *Am Assoc Adv Sci* 1992; 8: 67-79.
- [81] Gannon BJ, Carati CJ, Verco CJ. Endometrial perfusion across the normal human menstrual cycle assessed by laser Doppler fluxmetry. *Hum Reprod* 1997; 12: 132-9.
- [82] Goodger AM, Rogers PAW. Endometrial endothelial cell proliferation during the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1994; 9: 399-405.
- [83] Smith SK. Angiogenic growth factor expression in the uterus. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 162-73.
- [84] Cullinan-Bove K, Koos RD. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 1993; 133: 829-37.
- [85] Torry DS, Holt VJ, Keenan JA, Harris G, Caudle MR, Torry RJ. Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil Steril* 1996; 66: 72-80.
- [86] Hyder SM, Stancel GM, Chiappetta C, Murthy L, Boettger-Tong HL, Makela S. Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. *Cancer Res* 1996; 56: 3954-60.
- [87] Hervé MA, Meduri G, Petit FG, *et al.* Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. *J Endocrinol* 2006; 188: 91-9.
- [88] Umayahara Y, Kawamori R, Watada H, *et al.* Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem* 1994; 269: 16433-42.
- [89] Hyder SM, Shipley GL, Stancel GM. Estrogen action in target cells: selective requirements for activation of different hormone response elements. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 112: 35-43.
- [90] Paech K, Webb P, Kuiper GG, *et al.* Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* 1997; 277: 1508-10.
- [91] Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, Stancel GM. Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the

- potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000; 60: 3183-90.
- [92] Hyder SM, Stancel GM. Regulation of VEGF in the reproductive tract by sex-steroid hormones. *Histol Histopathol* 2000; 15: 325-34.
- [93] Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors α and β . *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10972-7.
- [94] Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2905-19.
- [95] Stoner M, Wang F, Wormke M, *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor expression in HEC1A endometrial cancer cells through interactions of estrogen receptor α and Sp3 proteins. *J Biol Chem* 2000; 275: 22769-79.
- [96] Stoner M, Wormke M, Saville B, *et al.* Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor α and SP proteins. *Oncogene* 2004; 23: 1052-63.
- [97] Kazi AA, Jones JM, Koos RD. Chromatin immunoprecipitation analysis of gene expression in the rat uterus *in vivo*: estrogen-induced recruitment of both estrogen receptor alpha and hypoxia-inducible factor 1 to the vascular endothelial growth factor promoter. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2006-19.
- [98] Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 26765-71.
- [99] Pagé EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 2002; 277: 48403-9.
- [100] Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 38205-11.
- [101] Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003; 63: 2330-4.
- [102] Berra E, Pagès G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 139-45.
- [103] Milanini-Mongiat J, Pouyssegur J, Pagès G. Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem* 2002; 277: 20631-9.
- [104] Reisinger K, Kaufmann R, Gille J. Increased Sp1 phosphorylation as a mechanism of hepatocyte growth factor (HGF/SF)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF) transcription. *J Cell Sci* 2003; 116: 225-38.
- [105] Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, *et al.* Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 2004; 114: 744-54.
- [106] Pinjnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006; 27: 939-58.
- [107] Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 233-8.
- [108] Davison MJ, Homuth V, Jeyabalan A, *et al.* New aspects in the pathophysiology of Preeclampsia. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2440-8.
- [109] Dekker GA, Robillard PY. Preeclampsia: a couple's disease with maternal and fetal manifestations. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 699-710.
- [110] Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart AC, Beck S, Wilson M. The genomic context of Natural Killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* 2001; 181: 20-38.
- [111] Bashirova A, Martin P, Mc Vicar W, Carrington M. The killer immunoglobulin like receptor gene cluster: Tuning the genome for defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006; 7: 277-300.
- [112] Carrington M, Martin MP. The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 298: 225-57.
- [113] Trowsdale J, Moffett A. NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. *Semin Immunol* 2008; 20: 317-20.
- [114] Hiby ES, Walker JJ, O'Shaughnessy MO, Redman WG, Carrington JT, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of Preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004; 200: 957-65.
- [115] Moffett A, Hiby SE. How does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia?. *Placenta* 2007; 21: S51-6.
- [116] Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome?. *J Clin Invest* 1997; 99: 2152-64.
- [117] Rajakumar A, Whitelock A, Weissfeld L, Daftary A, Markovic N. Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2a, in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod* 2001; 64: 499-506.
- [118] Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, *et al.* Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006; 12: 642-9.
- [119] Zhou Y, McMaster M, Woo K, *et al.* Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* 2002; 160: 1405-23.
- [120] Levine RJ, Maynard SE, Qian C, *et al.* Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350: 672-83.
- [121] Levine RJ, Lam C, Qian C, *et al.* Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 2006; 355: 992-1005.
- [122] Kaelin WG. Proline hydroxylation and gene expression. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 115-28.
- [123] Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, *et al.* Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signalling pathway. *J Biol Chem* 1997; 272: 8581-93.
- [124] Ema M, Hirota K, Mimura J, *et al.* Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: Their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 1999; 18: 1905-14.
- [125] Stebbins C, Kaelin Jr W, Pavletich N. Structure of the VHL - elongin C - elongin B complex: Implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 1999; 284: 455-61.
- [126] Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an oxygen-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7987-92.
- [127] Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxia conditions. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642-7.
- [128] Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295: 858-61.
- [129] Rajakumar A, Doty K, Daftary A, Markovic N, Conrad KP. Expression of von Hippel Lindau (pVHL) protein in placenta from normal pregnant women and women with preeclampsia. *Placenta* 2006; 27: 411-21.
- [130] Rajakumar A, Michael HM, Daftary A, Jeyabalan A, Gilmour C, Conrad KP. Proteasomal activity in placentas from women with preeclampsia and intrauterine growth restriction: implications for expression of HIF-alpha proteins. *Placenta* 2008; 29: 290-9.
- [131] Yamada N, Horikawa Y, Oda N, *et al.* Genetic variation in the HIF-1 α gene is associated with type 2 diabetes in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5841-7.
- [132] Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1a polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1779-83.
- [133] Heino S, Kaare M, Andersson S, Laiuori H. Non-synonymous sequence variants within the oxygen-dependent degradation domain of the HIF1A gene are not associated with pre-eclampsia in the Finnish population. *BMC Med Genet* 2008; 9: 96-101.
- [134] Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, *et al.* The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature* 1994; 368: 237-9.

- [135] Majeesh NJ, Escuin D, LaValle TM, *et al.* 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 2003; 3: 363-75.
- [136] Casey ML, MacDonald PC. Characterization of catechol-O-methyltransferase activity in human uterine decidua vera tissue. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145: 4537.
- [137] Barnea ER, MacLusky NJ, DeCherney AH, Naftolin F. Catechol-O-methyl transferase activity in the human term placenta. *Am J Perinatol* 1988; 5: 121-7.
- [138] Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, *et al.* Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature* 2008; 453: 1117-21.
- [139] Fons P, Chabot S, Cartwright JE, *et al.* Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* 2006; 108: 2608-15.

Received: October 07, 2009

Revised: December 25, 2009

Accepted: January 16, 2010

© Sánchez-Rodríguez *et al.*; Licensee *Bentham Open*.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.