



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

MARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL EN CORDÓN UMBILICAL Y EN
PLACENTA EN PREECLAMPSIA Y DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JORGE VALENCIA ORTEGA

DIRECTOR DE TESIS

DR. ARTURO ZÁRATE TREVIÑO[†] DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA

DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Aquel que ha sido mi fortaleza, mi guía, El que levanta mi cabeza: mi Dios.

A mi amada esposa, Patricia Chávez, cuya dulzura y amor me impulsan a ser un mejor hombre.

A mi madre, Gloria Ortega, un ejemplo de que ¡claro que se puede!

A Germán Hernández, un apoyo invaluable.

A mis sobrinos Oswaldo y Jonatán, los chicos más divertidos de la creación.

A mi maestra y amiga la Dra. Renata P. Saucedo, la alegría andando, salvo cuando se enoja.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	3
1 Introducción.....	5
1.1 Embarazo normal.....	5
1.1.1 Placentación.....	5
1.1.2 Inmunología.....	7
1.1.2.1 Inmunidad innata.....	8
1.1.2.2 Inmunidad adaptativa.....	13
1.1.2.3 Respuesta inflamatoria sistémica.....	15
1.1.3 Función endotelial.....	16
1.1.4 Cambio en el metabolismos de glucosa y lípidos.....	18
1.2 Preeclampsia.....	20
1.2.1 Diagnóstico.....	21
1.2.2 Preeclampsia temprana y tardía.....	22
1.2.3 Epidemiología.....	23
1.2.4 Fisiopatología.....	24
1.2.5 Inmunología.....	27
1.2.5.1 Inmunidad innata.....	27
1.2.5.2 Inmunidad adaptativa.....	29
1.3 Diabetes mellitus gestacional.....	30

1.3.1	Diagnóstico.....	30
1.3.2	Epidemiología.....	32
1.3.3	Fisiopatología.....	32
2	Justificación.....	36
3	Planteamiento del problema.....	37
4	Objetivo.....	38
5	Hipótesis.....	39
6	Metodología.....	40
7	Resultados.....	44
8	Discusión.....	51
9	Conclusión.....	60
10	Referencias.....	61
11	Derivados de la tesis.....	83
12	Anexos.....	84
13	Artículo.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Arterias espirales uterinas en el embarazo normal y la preeclampsia.....	25
Figura 2. Mecanismo fisiopatológico de la diabetes mellitus gestacional.....	33
Figura 3. Cociente placentario IL-8/IL1-RA en embarazo normal y preeclampsia.....	47
Figura 4. Expresión placentaria de IL-10 en embarazo normal y tipos de preeclampsia.....	49
Figura 5. Cociente placentario IL-8/IL-10 en embarazo normal y tipos de preeclampsia.....	50
Figura 6. Cociente placentario IL-8/IL1-RA en embarazo normal y tipos de preeclampsia.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características clínicas de las participantes.....	45
Tabla 2. Concentración umbilical de las citocinas y moléculas de adhesión.....	46
Tabla 3. Expresión placentaria de las citocinas y moléculas de adhesión.....	46
Tabla 4. Correlación entre la expresión placentaria y la concentración umbilical de citocinas y moléculas de adhesión en el grupo de mujeres con embarazo normal.....	47
Tabla 5. Correlación entre la expresión placentaria y la concentración umbilical de citocinas y moléculas de adhesión en el grupo de mujeres con preeclampsia.....	48
Tabla 6. Correlación entre la expresión placentaria y la concentración umbilical de citocinas y moléculas de adhesión en el grupo de mujeres con diabetes mellitus gestacional.....	48

RESUMEN

Antecedentes: La preeclampsia y la diabetes mellitus gestacional son dos de las principales complicaciones del embarazo con considerable impacto en la mortalidad y morbilidad perinatal. Además, ambos trastornos se asocian con efectos adversos a largo plazo tanto en la madre como en el recién nacido. Aunque se tratan de trastornos con distintas patogenias, se han observado algunas alteraciones comunes, por ejemplo, un estado proinflamatorio placentario; sin embargo, poco se ha estudiado en torno al estado inflamatorio y disfunción endotelial en circulación umbilical en ambas patologías y su posible relación con el estado placentario.

Objetivo: Comparar los niveles de expresión placentaria y las concentraciones umbilicales de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, ICAM-1 y VCAM-1, así como los cocientes TNF- α /IL-10, TNF- α /IL-1RA, IL-6/IL-10, IL-6/IL-1RA, IL-8/IL-10 e IL-8/IL-1RA en mujeres con preeclampsia o con diabetes mellitus gestacional versus mujeres con embarazo normal.

Materiales y métodos: Estudio transversal realizado con 50 mujeres con embarazo normal, 50 mujeres con preeclampsia y 25 con diabetes mellitus gestacional. La expresión génica placentaria de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, ICAM-1 y VCAM-1 se evaluó mediante ensayos de expresión relativa utilizando RT-PCR en tiempo real. Los niveles séricos de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1RA se midieron mediante ensayos de detección multianalito con la plataforma Luminex. Los niveles séricos de ICAM-1 y VCAM-1 se determinaron mediante ELISAs. Todos los ensayos se realizaron de acuerdo a los protocolos de los fabricantes. Los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron menores a 10%.

Resultados: En preeclampsia, la expresión placentaria de IL-10 [1.3×10^{-3} (0.7×10^{-3} - 2.3×10^{-3})] e IL-1RA [1.6×10^{-3} (1.0×10^{-3} - 2.9×10^{-3})] fueron menores y el cociente IL-8/IL-1RA [2.0 (1.5-2.9)]

fue mayor en comparación con el embarazo normal [IL-10, 3.3×10^{-3} (1.7×10^{-3} - 4.2×10^{-3}); IL-1RA, 5.7×10^{-3} (3.8×10^{-3} - 10.9×10^{-3}); IL-8/IL-1RA, 0.8 (0.4-1.7)]. No se observó diferencia en la expresión de TNF- α , IL-6, IL-8, ICAM-1 y VCAM-1, ni en el resto de los cocientes, entre estos grupos. En diabetes mellitus gestacional, no se observó diferencia en la expresión placentaria de las citocinas y moléculas de adhesión, ni en los cocientes, en comparación con el embarazo normal. Las concentraciones umbilicales de las citocinas y moléculas de adhesión, así como los cocientes de interés, no fueron estadísticamente diferentes en preeclampsia y en diabetes mellitus gestacional en comparación con el embarazo normal.

Conclusión: Nuestros resultados muestran que no existe un estado proinflamatorio ni disfunción endotelial en la circulación umbilical que se asocie con la preeclampsia o la diabetes mellitus gestacional. Solo en la preeclampsia se observa un estado placentario proinflamatorio. En ninguna de estas patologías existe relación entre los niveles de expresión placentaria y las concentraciones umbilicales de citocinas y moléculas de adhesión.

ABSTRACT

Background: Preeclampsia and gestational diabetes mellitus are both two of the main pregnancy complications with considerable impact on perinatal mortality and morbidity, respectively. In addition, both disorders are associated with long-term adverse effects in both the mother and the newborn. Although they are disorders with different pathogenesis, some common alterations have been observed, such as a placental pro-inflammatory state; however, there are few studies examining the relationship between this alteration and the inflammatory state and endothelial dysfunction in umbilical circulation in both pathologies.

Objective: To compare the placental gene expression levels and umbilical serum concentrations of TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, ICAM-1 and VCAM-1, along with the TNF- α /IL-10, TNF- α /IL-1RA, IL-6/IL-10, IL-6/IL-1RA, IL-8/IL-10 and IL-8/IL-1RA ratios in preeclamptic or gestational diabetes mellitus women compared with normal pregnant women.

Methods: This cross-sectional study was performed with 50 women with preeclampsia, 25 women with gestational diabetes mellitus and 50 women with normal pregnancy. Placental gene expression levels were measured by relative expression assays using real time RT-PCR. Serum concentrations of TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-1RA were measured by Luminex multianalyte assays. Serum concentrations of ICAM-1 and VCAM-1 were determined by enzyme-linked immunosorbent assays. All assays were performed according to the manufacturer's instructions. The coefficients of inter- and intra-assay variation were less than 10% for all analysis.

Results: In preeclampsia, placental expression of IL-10 [1.3×10^{-3} (0.7×10^{-3} - 2.3×10^{-3})] and IL-1RA [1.6×10^{-3} (1.0×10^{-3} - 2.9×10^{-3})] was lower, while placental IL-8/IL-1RA ratio [2.0 (1.5-2.9)]

was higher as compared with normal pregnancy [IL-10, 3.3×10^{-3} (1.7×10^{-3} - 4.2×10^{-3}); IL-1RA, 5.7×10^{-3} (3.8×10^{-3} - 10.9×10^{-3}); IL-8/IL-1RA, 0.8 (0.4-1.7)]. No significant differences were observed in the placental expression of TNF- α , IL-6, IL-8, ICAM-1 and VCAM-1 and umbilical concentrations of the cytokines and adhesion molecules between these groups. There were no significant differences in placental gene expression levels of each cytokine and adhesion molecule or the ratios between gestational diabetes mellitus and normal pregnancy. In both preeclampsia and gestational diabetes mellitus, there were no significant differences in umbilical concentrations of each cytokine and adhesion molecule or the ratios in comparison to normal pregnancy.

Conclusion: Our data demonstrated that there is no pro-inflammatory state or endothelial dysfunction in the umbilical circulation associated with preeclampsia and gestational diabetes mellitus. Only preeclampsia associates with a pro-inflammatory placental state. In both pathologies, there is no relationship between the levels of placental expression and the umbilical concentrations of cytokines and adhesion molecules.

1. INTRODUCCIÓN

El embarazo normal se caracteriza por una serie de cambios en la fisiología y anatomía materna que, de ser apropiados, convergen en una gestación libre de complicaciones; sin embargo, existen diversos factores que favorecen la aparición de complicaciones durante esta etapa. Dentro de éstas, la preeclampsia y la diabetes mellitus gestacional representan dos de las principales entidades patológicas con un impacto significativo en la mortalidad y morbilidad perinatal. Además, ambos trastornos se asocian con efectos adversos a largo plazo tanto en la madre como en el recién nacido. Por ejemplo, en la madre, la preeclampsia predispone a enfermedades cardiovasculares prematuras como hipertensión crónica, enfermedad cardíaca isquémica e infarto (1), mientras que en el recién nacido incrementa el riesgo de infarto, enfermedad coronaria y síndrome metabólico (2-4). Por su parte, la diabetes mellitus gestacional incrementa el riesgo de desarrollar obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular tanto en la madre como en el neonato (5).

1.1 EMBARAZO NORMAL

Los cambios anatómicos y fisiológicos característicos de la gestación generan un ambiente ideal para el desarrollo fetal. Éstos incluyen modificaciones que inician desde la implantación y afectan prácticamente a todos los órganos del cuerpo. En embarazos sin complicaciones, estos cambios se resuelven después del alumbramiento con mínimos efectos residuales. Es pues evidente que éstos derivan de la presencia de las nuevas células que se alojaron en el útero y que, en determinado momento, originaron la placenta.

1.1.1 Placentación

El inicio de un nuevo individuo se da por la unión de un óvulo y un espermatozoide, proceso conocido como fertilización. Así, se origina una célula llama cigoto, la cual experimenta una

serie de divisiones mitóticas y morfogénesis para dar lugar al blastocisto, un estadio embrionario con dos masas celulares: la externa y la interna. La primera, el trofoblasto, se conforma de células encargadas de la formación de la placenta y el corión, mientras que la segunda, el embrioblasto, da origen al embrión y otras membranas extraembrionarias (amnios, alantoides y saco vitelino). Aproximadamente 5 a 7 días después de la ovulación, el blastocisto se implanta en el endometrio uterino. Este proceso está regulado principalmente por las hormonas maternas estrógeno y progesterona, así como por señalizaciones locales que incluyen citocinas, factores de crecimiento, factores de transcripción, mediadores lipídicos y genes morfogénicos, que interactúan de manera autocrina, paracrina y yuxtacrina. En respuesta a la implantación del blastocisto, las células del estroma uterino experimentan una transformación llamada decidualización, en la que aumentan de volumen debido al almacenamiento de glucógeno, proteínas, lípidos y minerales, los cuales, a medida que las células trofoblásticas invaden el endometrio, se digieren y proveen los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo del embrión. Esta es la primera fuente de nutrientes para el embrión e incluso sigue utilizándose durante aproximadamente 8 semanas, a pesar de que el esbozo placentario comienza a proveer nutrientes una semana después de la implantación (6, 7).

Como se ha mencionado, el trofoblasto es el tipo celular encargado de la placentación, el cual se diferencia en dos capas: 1) una capa interna de células mononucleadas: el citotrofoblasto, y 2) una capa externa multinucleada: el sincitiotrofoblasto. La primera puede presentar una diferenciación más llamada citotrofoblasto extraveloso, ya que se origina del citotrofoblasto progenitor e invade el endo y miometrio. Se ha observado que esta capacidad invasiva se caracteriza por la expresión del receptor de quimiocinas CCR1 (8) y moléculas de adhesión (aVb3, a1b1, CD144, CD106 y CD31) (9), además de la producción de las metaloproteinasas 1,

2, 3, 9 y 14 (10, 11), útiles para la degradación de la matriz extracelular. Mediante este mecanismo de invasión, durante la primera semana posterior a la implantación se forman lagunas trofoblásticas, que posteriormente entran en contacto con sinusoides maternos para dar lugar a las vellosidades primarias. Conforme el embarazo avanza, el citotrofoblasto extraveloso logra invadir las arterias espirales uterinas y modificarlas mediante un proceso denominado pseudovasculogénesis, en el que reemplaza a las células endoteliales de los vasos cambiando su fenotipo epitelial a uno endotelial. De esta manera, el citotrofoblasto extraveloso le confiere a las arterias un mayor calibre y baja resistencia para establecer la adecuada perfusión placentaria. Es importante señalar que es en este proceso de placentación cuando se establecen las interfases materno-fetales. La interfase 1 se compone de las interacciones entre el citotrofoblasto extraveloso y las células deciduales, siendo la interfase dominante durante el embarazo temprano. La interfase 2 se conforma de las interacciones entre el sincitiotrofoblasto que recubre las vellosidades placentarias y las células maternas circulantes, la cual se activa a la par del establecimiento de la circulación utero-placentaria, aproximadamente en las semanas 8 y 9 de gestación, expandiéndose paralelamente al crecimiento placentario, para convertirse en la interfase dominante hacia el final del embarazo (12). Una observación importante es que, como parte del recambio y la reparación tisulares, la placenta libera a la circulación materna desechos como nudos sinciciales, trofoblasto mononuclear, micropartículas de sincitiotrofoblasto y nanopartículas de trofoblasto, que interactúan con las células circulantes y endoteliales, dando lugar así a una extensión de la interfase 2 (13).

1.1.2 Inmunología del embarazo

Durante el embarazo, el sistema inmune materno debe tolerar a la placenta, la cual actúa como un injerto semi-alogénico debido a la expresión de antígenos paternos. Una característica

fundamental del trofoblasto es su baja antigenicidad, ya que no expresa los antígenos leucocitarios humanos (HLA) HLA-A, -B y -D, que son moléculas con elevado potencial inmunogénico en trasplantes; pero, si expresa otras moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I. Por ejemplo, el citotrofoblasto extraveloso expresa las moléculas HLA-G, -E, -F y -C (14), mientras que el sincitiotrofoblasto solo expresa isoformas solubles de HLA-G que, interesantemente, tienen un efecto inhibitorio sobre células T (15). Esta limitada antigenicidad del trofoblasto es una característica clave para evitar el rechazo agudo y desarrollar tolerancia.

1.1.2.1 Inmunidad innata

El papel de las células de la inmunidad innata en la tolerancia materna no ha sido completamente dilucidado; sin embargo, se piensa que la regulación de la respuesta inflamatoria en esta interfase es fundamental para lograr dicha tolerancia (16). A continuación se describe dicha regulación por cada estirpe celular de la inmunidad innata.

Células NK

Las células asesinas naturales (NKs) son linfocitos que desempeñan importantes funciones en las respuestas de la inmunidad innata contra virus y bacterias. Durante las primeras semanas de gestación, las células NKs deciduales (dNKs) representan del 70 al 75% del total de leucocitos deciduales CD45⁺ (17, 18). Fenotípicamente, estas células son predominantemente CD56^{bright}CD16⁻CD160⁻ y poseen una baja actividad citotóxica, siendo esencialmente células inmunoreguladoras (19-21). En contraste, las células NK periféricas (pNKs) constituyen del 5-20% de los leucocitos en sangre en el adulto y poseen un fenotipo CD56^{dim}CD16⁺CD160⁺ (22-24). El mecanismo efector de estas células está determinado por sus receptores tanto inhibidores como activadores (25), dentro de los cuales los receptores tipo inmunoglobulina (KIR), receptores de la familia de la lectina tipo C (por ejemplo, el receptor CD94/NKG2) y

los receptores del leucocito tipo inmunoglobulina (ILTs) han sido los más estudiados. Para algunos de estos receptores, principalmente aquellos con actividad inhibitoria, las moléculas HLA son sus principales ligandos (26), por lo que se ha propuesto que, debido a que las dNKs se acumulan alrededor del trofoblasto extraveloso, la interacción a través de la unión receptor NK-HLA (27, 28) tiene una participación importante en la regulación de estas células.

HLA-G es una molécula cuyo gen codifica siete isoformas, de las cuales HLA-G5 y -G6, conocidas también como sHLA-G1 y -G2, respectivamente, son solubles (29). El citotrofoblasto extraveloso expresa tanto las isoformas asociadas a membrana como las solubles, mientras que el sincitiotrofoblasto, como ya se mencionó, solo expresa isoformas solubles (30). Se ha demostrado que HLA-G inhibe a las dNKs cuando se unen a los receptores CD94/NKG2, ILT2 y KIR2DL4 (31-37). Por lo que se ha propuesto que mediante este mecanismo se podría inhibir la citotoxicidad dNKs y promover la producción de citocinas y factores angiogénicos que facilitan la invasión del citotrofoblasto extraveloso y la remodelación vascular durante el proceso de placentación (28, 38-40). Otra molécula capaz de ser reconocida por receptores inhibidores y activadores, y que probablemente tenga un papel en la regulación, es HLA-C. Ésta juega un papel importante en el aloreconocimiento, ya que es la única molécula polimórfica del MHC clase I expresada en el citotrofoblasto extraveloso. La diversidad de receptores KIR maternos y de variantes alélicas de HLA-C sugiere la existencia de combinaciones KIR-HLA-C más favorables que otras para inhibir la capacidad citotóxica de las dNKs (41).

En relación a las pNKs, estas células pueden polarizarse hacia un fenotipo NK1, que expresa predominantemente $IFN\gamma$, o bien hacia un fenotipo NK2, que expresa IL-4,-5 y -13, dependiendo de los estímulos recibidos (42, 43). De manera interesante, el embarazo normal se caracteriza por un cambio de respuesta inmune de Th1, que produce IL-2, $IFN-\gamma$ y $TNF-\alpha$,

hacia Th2, que produce IL-4, -5, -10, y -13; la falla en esta polarización es característica de complicaciones del embarazo (44, 45). Las pNKs durante un embarazo normal muestran una polarización hacia NK2 (46), lo que probablemente contribuye a la respuesta Th2. Esta polarización puede deberse a que HLA-G, en sus formas solubles o asociadas a membrana en los desechos trofoblásticos, inhibe a las pNKs mediante su unión al receptor CD94/NKG2 (31).

Macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas encargadas de la eliminación de microbios, células muertas y otros desechos, así como de la presentación de antígenos a linfocitos T. Se han descrito muchos subgrupos de macrófagos, pero de manera general, pueden ser clasificados en dos grandes subgrupos: M1 o macrófagos activados clásicamente, con fenotipo IL-12^{high}IL-23^{high}IL-10^{low}, y M2 o macrófagos activados alternativamente, con fenotipo IL-12^{low}IL-23^{low}IL-10^{high}. Los macrófagos M1 son microbicidas y proinflamatorios, mientras que los M2 son reguladores, capaces de suprimir la inflamación (47-48). Los macrófagos se originan a partir de sus precursores en sangre periférica, los monocitos, los cuales migran a los tejidos, maduran y se diferencian en macrófagos (49). Los monocitos comprenden del 5 al 10% de los leucocitos en circulación y son una población heterogénea de subgrupos que se diferencian con base a la expresión de CD14 (receptor de lipopolisacárido) y CD16 (FcγR-II). Los principales subgrupos son el clásico, que consiste de monocitos CD14^{high}CD16⁻ y comprende del 90 al 95% de los monocitos totales; el no clásico, cuyo fenotipo es CD14^{low}CD16⁺; y el intermedio, que posee el fenotipo CD14^{high}CD16⁺ (50).

En el embarazo temprano, los macrófagos deciduales (dMacs) representan del 10 al 20% de la población leucocitaria CD45⁺ total (51, 52). Se ha observado que estas células tienen un perfil de expresión tipo M2 (53) y que sintetizan cantidades elevadas de IL-10, indoleamina 2,3-

dioxygenase (IDO) y HLA-DR, así como bajos niveles de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (54), lo que supone una función inmunorreguladora. Por lo tanto, se ha postulado que en la interfase 1 los dMacs tienen la función de regular la inflamación, favoreciendo así la tolerancia. Es importante mencionar que estas células también están involucradas en la invasión del citotrofoblasto extraveloso, la remodelación vascular (55) y en la fagocitosis de células apoptóticas durante la placentación (56). Una observación interesante es que la fagocitosis de células apoptóticas induce la producción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que favorece la respuesta Th2 (57) y la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ a linfocitos T reguladores (Tregs). Por otro lado, en un estudio en el cual macrófagos derivados de monocitos circulantes fueron expuestos a desechos trofoblásticos, se observó que la fagocitosis de estos desechos resulta en una menor expresión de moléculas MHC II, moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40 y B7H3), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), molécula de adhesión intercelular 1 y receptor para IL-8, mientras que la expresión de ligando 1 de muerte programada 1 (PD-L1) y de IDO aumentó. Además, se observó un incremento en la secreción de citocinas antiinflamatorias IL-10 y del antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1RA), mientras que la secreción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL12p70 e IL-8 disminuyó (58). Estos datos sugieren que la fagocitosis de desechos trofoblásticos procedentes de una placenta normal es útil para la diferenciación M2 de los dMacs.

Respecto a los monocitos, se ha demostrado que a lo largo del embarazo existe cierto grado de activación de estas células, ya que muestran una elevada expresión de CD11b, CD14 y CD64 (marcadores asociados a inflamación), así como una mayor producción de especies reactivas de oxígeno y de citocinas proinflamatorias IL1- β e IL-12 en comparación a los monocitos procedentes de mujeres no gestantes (59-61). No se conoce el mecanismo exacto de como

sucede esta activación, aunque probablemente el contacto de estas células con desechos placentarios, DNA fetal y citocinas tiene un papel relevante (62-64).

Células dendríticas

Las células dendríticas (DCs) son las células presentadoras de antígeno (APCs) más importantes (65). Los principales subgrupos de estas células son las DCs clásicas, las cuales se derivan de precursores CD11c⁺HLA-DR⁺ en la sangre y se ubican principalmente en los tejidos, el segundo subgrupo son las DCs plasmacitoides, que generalmente se encuentran en circulación y se diferencian a partir del precursor común de DCs o de progenitores linfoides comprometidos (66). Las DCs clásicas se pueden clasificar en relación a su estado de maduración en inmaduras, cuyo fenotipo es MHCII^{low}CD80/86^{low}IL-12⁻IL-10⁻, semimaduras, con el fenotipo MHCII^{high}CD80/86^{high}IL-12⁺⁺IL-10⁺⁺TNF- α ⁻, y maduras, que poseen el fenotipo MHCII^{high}CD80/86^{high}IL-12⁺⁺IL-10⁻TNF- α ⁺. Las funciones de cada uno de estos subgrupos difieren, por ejemplo, las DCs inmaduras inducen anergia en células T, mientras que las DCs semimaduras promueven el desarrollo de células T reguladoras (Tregs), siendo ambas fundamentales en el desarrollo de la tolerancia inmune. Por su parte, las DCs maduras muestran una fuerte actividad de presentación de antígeno, promoviendo así la activación de células T (67, 68).

Actualmente existe controversia en cuanto a la definición fenotípica de las DCs deciduales (dDCs); no obstante, en diversos estudios se han utilizado el fenotipo lin⁻ (CD3⁻CD19⁻CD56⁻CD14⁻) y HLA-DR⁺ para definir a estas células (69-71). Se ha observado que las dDCs, en el embarazo temprano, comprenden aproximadamente el 1% de la población celular total en la decidua. Estas células también poseen las características fenotípicas CD11c⁺, CD1a⁻ y CD123⁻, por lo que se piensa que tiene un origen mielóide como las DCs clásicas (70).

Asimismo, se ha reportado que en el primer trimestre del embarazo, las dDCs son principalmente inmaduras (70) y tienen la capacidad de promover la diferenciación de células T CD4⁺ al fenotipo Th2 (71). Además, el HLA-G en el trofoblasto extraveloso, al unirse a los receptores ILT2 e ILT4 de las dDCs, le confiere señales inmunorreguladoras (72).

1.1.2.2 Inmunidad adaptativa

El sistema inmune adaptativo se diferencia principalmente del sistema inmune innato en que posee especificidad de antígeno y memoria inmunológica. El hecho de que la preeclampsia es esencialmente una enfermedad de primigrávidas, y que el poco tiempo de cohabitación sexual y el cambio de paternidad son factores de riesgo para desarrollar esta enfermedad, sugiere que el sistema inmune adaptativo juega un papel relevante en este trastorno. Las principales células del sistema inmune adaptativo involucradas en la tolerancia inmune son linfocitos T CD4⁺ de distintos subgrupos que a continuación se describen.

Linfocitos T reguladores

Los linfocitos T reguladores (Tregs) son un subgrupo de células T con el fenotipo CD4⁺Foxp3⁺, indispensables en la tolerancia inmune hacia antígenos propios o extraños. Estas células se pueden clasificar en Tregs naturales (nTregs), derivadas del timo, y en Tregs inducidas (iTregs), diferenciadas en órganos linfoides periféricos (73). Dicha clasificación se realiza con base al factor de transcripción Helios, de manera que las nTregs son Helios⁺ y las iTregs son Helios⁻; no obstante, es necesario mencionar que probablemente este marcador no es apropiado para tal objetivo, ya que Helios ha sido propuesto como un marcador de activación y proliferación, no de diferenciación (74); además, se ha sugerido que las células Tregs Helios⁻ pueden representar un subgrupo de iTregs o nTregs (75).

Diversos estudios han demostrado que en el primer trimestre del embarazo normal existe un aumento de Tregs totales en la interfase 1 (76, 77), la cual es probablemente causada por la

estimulación de los aloantígenos del trofoblasto (78, 79). Utilizando Helios como marcador de diferenciación, un estudio reportó que este aumento de Tregs se debe principalmente al de iTregs y no de nTregs. Esto sugiere que en el embarazo normal, las iTregs son inducidas en los ganglios linfoides que drenan la decidua (80). Es importante mencionar que estas observaciones son consistentes con la idea de que las iTregs facilitan la tolerancia a antígenos propios y extraños, mientras que las nTregs están principalmente involucradas en la tolerancia a lo propio (81-83). Por otro lado, en la interfase 2 también se observa el aumento de Tregs (84, 85), ubicándose un máximo en el segundo trimestre de gestación. Se piensa que este aumento en sangre es consecuencia del observado en la interfase 1, ya que en la decidua el aumento es mayor que en circulación, y es ahí donde principalmente se lleva a cabo el estímulo por aloantígenos (79); no obstante, es importante considerar que otros factores como hormonas relacionadas al embarazo pueden influir en esta aumento (86).

Linfocitos Th17

Las células Th17 son un subgrupo de linfocitos T CD4⁺ que secretan las citocinas proinflamatorias IL-17 y -22 (87). Al igual que las Tregs, su diferenciación está determinada por TGF- β en una forma dependiente de la concentración (88), de tal manera que niveles elevados de este factor inducen la diferenciación hacia Tregs, mientras que en bajas concentraciones, y en presencia de niveles elevados de IL-6 (89) y de endoglina soluble (90), se favorece la diferenciación hacia Th17 (91). Pocos estudios han determinado el porcentaje de Th17 en la interfase 1 durante el embarazo normal. En el primer trimestre de gestación, un estudio reportó que el porcentaje de Th17 en la decidua es casi nulo (92). Contrario a esto, en otro trabajo se observaron porcentajes elevados de estas células en la decidua (93). Con base en esto, la presencia de células Th17 en la decidua queda demostrada; sin embargo, su abundancia relativa permanece en controversia. En circulación, el porcentaje de Th17 disminuye en el

embarazo normal y se han observado un cociente Treg/Th17 elevado (85), que refleja justamente la diferenciación preferente de las células T CD4⁺ hacia Tregs.

1.1.2.3 Respuesta inflamatoria sistémica

La inflamación es una respuesta básica del sistema inmune ante el daño tisular y las infecciones; no obstante, es esencial para el correcto funcionamiento de distintos mecanismos fisiológicos. La reproducción no es la excepción, pues se sabe que la ovulación, la menstruación, la implantación y el parto son procesos que poseen un componente inflamatorio (94). El embarazo mismo se caracteriza por un estado inflamatorio sistémico que, en algunos casos, puede ser tan marcado como aquel que se observa en pacientes con sepsis, pero, no daña a la madre en ninguna forma. La inflamación sistémica materna se caracteriza por leucocitosis, incremento en actividad fagocítica, polarización de monocitos hacia un fenotipo proinflamatorio, aumento en los niveles de proteína C reactiva y la polarización Th1-Th2 (12). Como ya se mencionó, éste último consiste en el cambio de una respuesta celular proinflamatoria Th1, que se observa en mujeres no embarazadas y se caracteriza por la producción de las citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ y TNF- α , a una antiinflamatoria Th2, con células productoras de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 y factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), en mujeres embarazadas (95). Desde su identificación, este cambio fue considerado el responsable de la tolerancia inmune materna, más aún cuando se observó su ausencia en algunas complicaciones de la gestación tales como aborto espontáneo, embarazo pretérmino y preeclampsia, que se consideran producto del rechazo inmune materno en mayor o menor medida (96). Este paradigma Th1-Th2 se planteó desde hace poco más de 25 años y es ampliamente conocido; no obstante, actualmente es considerado muy simplista y secundario, ya que realmente es consecuencia de los mecanismos propios de la tolerancia inmune materna; sin embargo, aunque la tolerancia es más compleja

que solo un cambio en la respuesta Th, se sigue observando una tendencia hacia la respuesta Th2 en la gestación libre de complicaciones.

1.1.3 Función endotelial

De manera normal, el endotelio vascular mantiene la fluidez de la sangre, regula el flujo sanguíneo, controla la permeabilidad de la pared del vaso y detiene la extravasación de leucocitos; sin embargo, en presencia de inflamación, el endotelio emplea diversos mecanismos con el objetivo de restablecer la homeostasis. El proceso de inflamación involucra la activación endotelial que se puede dividir en tipo 1, también llamada estimulación, que es una respuesta rápida que no requiere activar la transcripción génica; y en tipo 2, que es una respuesta dependiente de dicha activación. En ambos tipos, existen tres componentes principales subyacentes a los cuatro signos de la inflamación: un incremento en el flujo sanguíneo local, que se manifiesta como rubor y calor en tejidos inflamados; una extravasación localizada de líquido rico en proteínas plasmáticas (conocido como exudado) que se percibe como el tumor de tejidos inflamados; y un reclutamiento y activación de leucocitos circulantes que migran hacia el tejido infectado o dañado. El dolor, el último signo de la inflamación (si no se considera a la pérdida de función como el último), es causado por mediadores producidos por los leucocitos que actúan en las fibras nerviosas sensoriales del tipo C (97).

La activación tipo 1 es mediada por ligandos que se unen a receptores heterotriméricos acoplados a proteína G (GPCRs), tales como receptores de histamina H1. La señalización converge en la conversión del ácido araquidónico en prostaglandina I₂ (PGI₂) y en la activación de la oxido nítrico sintasa 3, la cual produce oxido nítrico (NO) (98). Estas moléculas actúan como vasodilatadores, ya que relajan el músculo liso vascular, lo que aumenta el flujo sanguíneo y la extravasación leucocitaria (principalmente neutrófilos). Paralelamente, se activa la enzima cinasa de la cadena ligera de la miosina, que fosforila a la miosina de cadena ligera y

resulta en la contracción de los filamentos de actina que forman parte de las uniones intercelulares del endotelio. Esto abre las uniones, promoviendo la extravasación de proteínas plasmáticas. La fosforilación de miosina de cadena ligera también favorece la exocitosis de los cuerpos de Weibel-Palade, que llevan a la P-selectina a la superficie celular, lo que favorece la diapédesis leucocitaria. La señalización mediante GPCRs dura de 10 a 20 minutos, después de lo cual los receptores se desensibilizan, lo que evita la reestimulación. Esto limita el grado de inflamación y extravasación de neutrófilos que la activación tipo 1 pueda causar (97, 99).

La activación tipo 2 responde a una respuesta inflamatoria persistente. Los principales mediadores de esta respuesta inflamatoria son las citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 producidas por leucocitos activados. La unión de estas citocinas a sus receptores generan una señalización que converge en la activación de los factores de transcripción factor nuclear - κ B (NF- κ B) y la proteína activadora 1 (AP-1). Estos factores inician la expresión de proteínas proinflamatorias tales la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión vasculo-celular tipo 1 (VCAM-1), la selectina-E y quimiocinas como CXCL8 y CCL2 (100). Similar a la activación tipo 1, la activación tipo 2 conduce a un incremento en el flujo sanguíneo y a la extravasación de proteínas y leucocitos, aunque de una manera más efectiva. La extravasación se debe a que las citocinas proinflamatorias estimulan la reorganización de la actina y tubulina del citoesqueleto, lo que rompe las uniones entre células endoteliales adyacentes. Estos cambios generados por citocinas proinflamatorias representan una lesión para la célula endotelial que puede conducir a su muerte. La lesión y muerte de la célula endotelial favorece la trombosis, ya que la célula apoptótica pierde sus funciones anticoagulantes debido a la baja exposición de heparán sulfato y al aumento de fosfatidilserina en la membrana, molécula que promueve la coagulación. Por su parte, el TNF- α y la IL-1 β inducen la producción del factor tisular, el cual es el principal iniciador de la coagulación. Además, la exposición de colágena de

la base sub-endotelial promueve la adhesión y activación de plaquetas. Mientras la activación tipo 1 se resuelve rápidamente debido a la desensibilización del receptor, la activación tipo 2 puede persistir tanto como estén presentes las citocinas proinflamatorias (97, 98). En estas condiciones de inflamación crónica, el endotelio no solo pierde sus funciones homeostáticas, sino que adquiere un fenotipo procoagulante, adhesivo y proinflamatorio, acompañado de estrés oxidativo y liberación de agentes vasoconstrictores. Esto se conoce como disfunción endotelial y es la causa del aumento de la resistencia periférica subyacente a manifestaciones clínicas como hipertensión arterial.

1.1.4 Cambios en el metabolismo de glucosa y lípidos

El embarazo es un estado diabetogénico en el que las adaptaciones en el metabolismo de la glucosa y lípidos permiten el crecimiento y desarrollo fetal, manteniendo una adecuada nutrición materna (101). El primer trimestre de embarazo se caracteriza por un aumento progresivo en la secreción de insulina y una mayor sensibilidad a esta hormona (102, 103). No se conocen a fondo los mecanismos que conducen a este incremento en la concentración de insulina. Un posible factor es el aumento de la masa de células β pancreáticas que, según estudios en animales, resulta de una combinación de hipertrofia e hiperplasia celular (104). En la gestación humana, se ha observado hiperplasia de los islotes pancreáticos (105). Así mismo, no se han identificado completamente los mecanismos subyacentes del aumento en la secreción de insulina de las células β . Se han aportado pruebas de una mayor actividad de la proteincinasa A o C en tejido pancreático y una mayor comunicación intercelular en los islotes pancreáticos de ratas preñadas en comparación con aquellas ingravidas (106); no obstante, aún no se conoce la relación de estos fenómenos con una mayor secreción de insulina.

A partir del segundo trimestre, inicia una disminución de la sensibilidad a la insulina progresiva (lo que se conoce como resistencia a la insulina) (103). El mecanismo que causa la resistencia a

la insulina en el embarazo no está completamente dilucidado; sin embargo, un estudio comparó la función del receptor de insulina en adipocitos abdominales obtenidos de mujeres embarazadas y no embarazadas, encontrando que los receptores estuvieron significativamente disminuidos en las células de las embarazadas. La actividad de la cinasa del receptor de insulina fue similar entre los grupos; sin embargo, las embarazadas tuvieron una disminución significativa en el transporte de glucosa mediado por GLUT-4 (107). Estos resultados sugieren que una disminución en el número de receptores de la insulina y un defecto post-receptor en la acción de la insulina, son las causas clave de la resistencia a la insulina inducida por el embarazo. En este sentido, el aumento en la concentración del lactógeno placentario humano, la hormona del crecimiento, la progesterona, el cortisol y la prolactina, es sumamente relevante (108). Se ha señalado que la administración de lactógeno placentario humano, progesterona o glucocorticoides a mujeres ingravidas produce los cambios metabólicos que indican trastorno de la acción de la insulina y que la exposición *in vitro* de tejido adiposo o músculo estriado a las hormonas que aumentan su concentración durante el embarazo, impide su captación de glucosa mediada por insulina, en particular cuando tal exposición incluye varias de ellas (109-111). En suma, estas hormonas disminuyen la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, principalmente en el tejido adiposo, músculo esquelético e hígado, interfiriendo en la señalización del receptor de la insulina y provocando una marcada disminución en la utilización de glucosa por estos tejidos. Para compensar los efectos de la resistencia a la insulina, las células β incrementan su capacidad de secreción de insulina, causando hiperinsulinemia gestacional (112).

La resistencia a la insulina en el embarazo avanzado es la resistencia fisiológica a la insulina más pronunciada que se ha observado en el humano; la sensibilidad corporal total a la insulina

durante el tercer trimestre de gestación disminuye entre 45 y 70% con respecto a las cifras fuera de la gestación (113).

Además de los cambios hormonales propios de la gestación, algunos estudios han implicado la participación del tejido adiposo en la resistencia a la insulina del embarazo. Durante el embarazo ocurren cambios importantes en la composición corporal de la mujer, caracterizados principalmente por un aumento de la masa grasa que puede variar de 2 a 6 kilogramos. En este sentido, y considerando que el tejido adiposo funciona como un órgano endocrino, el incremento de depósitos de masa grasa se relaciona con una mayor producción de citocinas y hormonas conocidas como adipocinas, las cuales contribuyen a la resistencia a la insulina del embarazo. Estas adipocinas son adiponectina, leptina, TNF- α y proteína de unión al retinol tipo 4 (RBP-4) (114-116). En la mayoría de las mujeres la resistencia a la insulina disminuye repentinamente en el posparto, ya que la respuesta compensatoria de las células β del páncreas de la madre es adecuada y el estímulo hormonal placentario en la sensibilidad a la insulina está ausente.

Las alteraciones en el metabolismo de lípidos incluyen principalmente la estimulación progresiva de la lipólisis y cetogénesis y el aumento en la concentración circulante de triglicéridos. Las hormonas placentarias promueven lipólisis durante el ayuno e hipertrigliceridemia después de ingerir alimentos. Estos cambios permiten a la madre utilizar las grasas como reservas de energía para: cubrir las necesidades de los tejidos periféricos, minimizar el catabolismo proteico y preservar la disponibilidad de glucosa y aminoácidos para el feto (101).

1.2 PREECLAMPSIA

La preeclampsia, más que un trastorno hipertensivo, es un síndrome que afecta prácticamente todo los órganos de la madre y cuyo desarrollo es impredecible, de manera que algunas mujeres

pueden presentar cifras elevadas de tensión arterial sin ninguna alteración orgánica, mientras que otras pueden presentar convulsiones con tan solo un mínimo aumento en la presión arterial. Como ya se ha mencionado, este trastorno hipertensivo del embarazo tiene un impacto considerable en la morbilidad perinatal y mortalidad materna.

1.2.1 Diagnóstico

Existe, en general, una convergencia en el diagnóstico de preeclampsia por parte de las distintas organizaciones, tales como el Colegio Estadounidense de Obstetras y Ginecólogos y la Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo, que son quizá las más renombradas. La primera organización establece dicho diagnóstico cuando se identifica la aparición de hipertensión (≥ 140 mm Hg sistólica o ≥ 90 mm Hg diastólica en dos ocasiones separadas por al menos 4 horas) después de la vigésima semana de gestación y proteinuria (≥ 300 mg/dL en orina de 24 horas o un cociente proteína/creatinina ≥ 0.3 o tira reactiva de 1+) o, en la ausencia de proteinuria, aparición de hipertensión con al menos una de las siguientes complicaciones: edema pulmonar, síntomas cerebrales o visuales, trombocitopenia (cuenta plaquetaria $< 100\ 000/\mu\text{L}$), alteración de la función hepática (concentraciones sanguíneas elevadas de transaminasas dos veces mayor de lo normal) o insuficiencia renal (creatinina sérica mayor que 1.1 mg/dL o una duplicación de la concentración de creatinina sérica en ausencia de otra enfermedad renal) (117). La segunda organización diagnostica a la preeclampsia con la aparición de hipertensión (mismas cifras que las del Colegio Estadounidense de Obstetras y Ginecólogos) a partir de la vigésima semana de gestación acompañada de una o más de las siguientes alteraciones: proteinuria (mismas cifras que las del Colegio Estadounidense, excepto el valor de tira reactiva que debe ser 2+), insuficiencia renal (creatinina sérica ≥ 1.02 mg/dL), alteración de la función hepática (concentraciones sanguíneas elevadas de transaminasas dos veces mayor de lo normal con o sin dolor del cuadrante superior

derecho o dolor abdominal epigástrico), complicaciones neurológicas (ceguera, dolor de cabeza, hiperreflexia, etc.) o hematológicas (cuenta de plaquetas <150 000/dL, coagulación intravascular diseminada o hemólisis) (118).

Por su parte, el Instituto Mexicano del Seguro Social, en la actualización del 2017 de su Guía de Práctica Clínica, menciona, en la sección de aspectos generales, que “La preeclampsia es un trastorno multisistémico cuyos criterios clínicos no han cambiado en la última década: edad gestacional mayor de 20 semanas, presión arterial mayor de 140/90 mm Hg, tira reactiva con 1+ o muestra aislada de orina con 30 mg de proteínas en dos muestras de 4 a 6 h. En ausencia de proteinuria, el diagnóstico de preeclampsia podría establecerse cuando la hipertensión gestacional es asociada con síntomas cerebrales persistentes, epigastralgia o dolor en cuadrante superior derecho con náusea o vómito, o bien trombocitopenia con alteraciones en las concentraciones de enzimas hepáticas.” Históricamente, el Instituto Mexicano del Seguro Social ha tenido como base al Colegio Estadounidense de Obstetras y Ginecólogos en sus guías sobre trastornos hipertensivos del embarazo (119).

1.2.2 Preeclampsia temprana y tardía

A finales de los años 70s e inicios de los 80s del pasado siglo, surgieron trabajos en los que se clasificó a la preeclampsia en dos entidades patológicas aparentemente distintas: la preeclampsia temprana, llamada así porque aparece antes de la 34ª semana de gestación, y la preeclampsia tardía, que se manifiesta a partir de la semana 34 en adelante. Desde entonces, numerosos trabajos han sustentado esta clasificación y cada tipo de preeclampsia ha sido asociado con diferentes marcadores bioquímicos, factores ambientales y genéticos de riesgo, características clínicas y pronóstico (120, 121).

La preeclampsia temprana es considerada un trastorno fetal comúnmente asociado a disfunción placentaria, reducción del volumen placentario, restricción del crecimiento intrauterino, alteraciones en la evaluación Doppler de las arterias uterinas y umbilicales, bajo peso del producto, disfunción multiorgánica, muerte perinatal y resultados maternos y neonatales adversos (122, 123). La preeclampsia tardía es considerada un desorden materno, es decir, el resultado de alteraciones maternas previas a la gestación. Este tipo de preeclampsia se asocia con una placenta sin alteraciones, volumen placentario normal, crecimiento fetal correcto, evaluación Doppler de las arterias uterinas y umbilicales normal, peso del producto normal y resultados maternos y neonatales más favorables (122, 124-126). A pesar de estos estudios, esta clasificación ha tenido poco impacto en la clínica, debido en parte al temor de complicaciones súbitas y a que no existen tratamientos específicos para cada tipo, por lo que es más bien una clasificación útil para la investigación por su potencial valor como variable confusora en el estudio de la patogenia.

1.2.3 Epidemiología

La preeclampsia, junto con la hipertensión crónica, la preeclampsia sobreagregada y la hipertensión gestacional, conforman el grupo de trastornos hipertensivos del embarazo, condiciones con gran impacto en la morbilidad y mortalidad materna. La mortalidad materna se define, según la Organización Mundial de la Salud, como “el deceso de una mujer durante el embarazo, el parto o las 6 semanas después del parto, independiente de la duración y el sitio del embarazo, debida a cualquier causa relacionada con o agravada por el embarazo mismo o su atención, pero no por causas accidentales o incidentales”. En el 2005, la Organización Mundial de la Salud reportó 536 000 muertes maternas en todo el mundo (127) y estimó que para el 2015 podrían ocurrir 303 000 muertes maternas (128), lo que indicaría una reducción de aproximadamente el 43%; no obstante, sigue siendo una cifra inaceptablemente alta (830

decesos diarios) y, aunque un número creciente de países ha logrado mejorar la salud y el bienestar de las madres, aquellos con mayor mortalidad y mala atención a la salud han hecho pocos progresos. En nuestro país, el Observatorio de Mortalidad Materna en México registró 861 muertes maternas en el 2013 y 872 en el 2014 (129), mientras que el Instituto Nacional de Estadística y Geografía registró 1019 y 1022 respectivamente en los mismos años (130).

Estas cifras permiten dimensionar el impacto de los trastornos hipertensivos del embarazo. En países desarrollados, son responsables del 16% de muertes; en América Latina y el Caribe, son la causa del 26%; en África y Asia contribuyen con el 9% (131, 132); mientras que en México, son responsables del 20.5 al 40% de los decesos maternos (130). Respecto a la preeclampsia en sí, su frecuencia oscila entre el 2 y 8% de los embarazos y se estima que del 10 al 15% de las muertes maternas se asocian directamente con este síndrome (132).

Por otro lado, se han descrito diversos factores de riesgo para el desarrollo de la preeclampsia, dentro de los que se ubican aquellos relacionados a una predisposición materna a enfermedad cardiovascular como edad avanzada (133, 134), hipertensión crónica (135, 136), diabetes tipo 2 (137, 138) y obesidad (139, 140); en cuanto a los genéticos podemos mencionar a los antecedentes familiares de preeclampsia (141, 142). Por su parte, los relacionados al embarazo *per se* incluyen el tamaño excesivo de la placenta (143) y elevada ganancia de peso durante el embarazo (144); mientras aquellos de índole inmunológico son primiparidad (145), cambio en la pareja sexual (146), poco tiempo de cohabitación sexual (147) y uso de anticonceptivos de barrera (148).

1.2.4 Fisiopatología

La fisiopatología de la preeclampsia no ha sido completamente dilucidada; sin embargo, se ha planteado un proceso de dos etapas. La primera consiste en una placentación defectuosa

caracterizada por la incorrecta invasión del trofoblasto extraveloso que impide la remodelación de las arterias espirales uterinas (figura 1), resultando en hipoxia e isquemia placentarias que desencadenan un proceso inflamatorio por el cual se liberan diversos factores a la circulación materna (150-152). Se ha sugerido que el defecto en la placentación es consecuencia de la ruptura parcial de la tolerancia inmune materna (153).

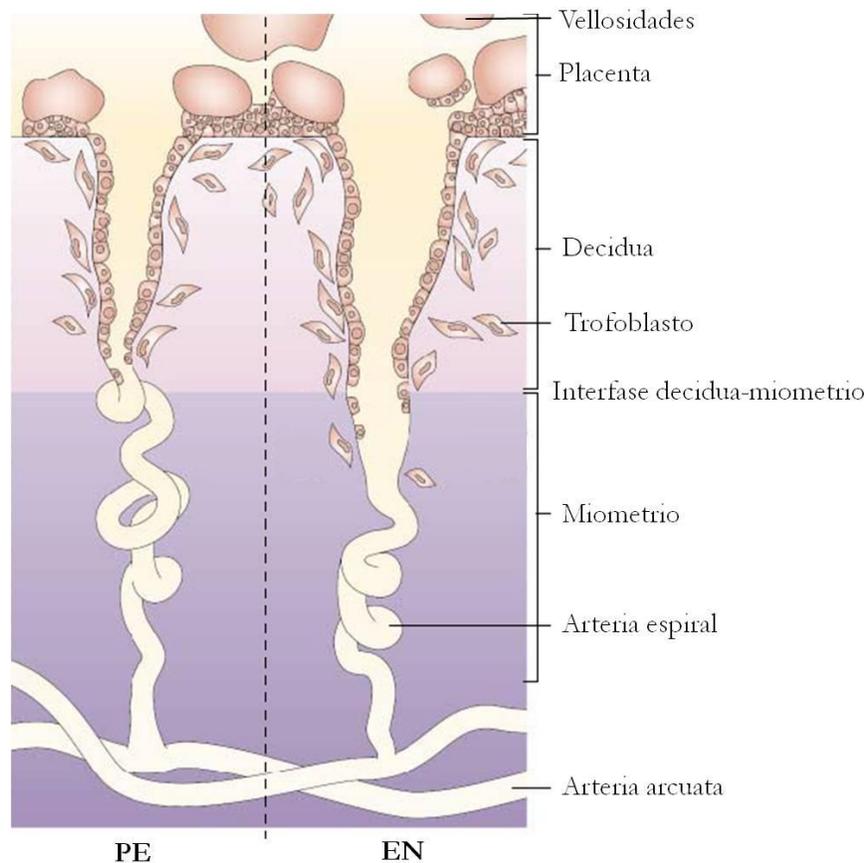


Figura 1. Arterias espirales uterinas en el embarazo normal y la preeclampsia. En el embarazo normal, las arterias espirales se modifican para conseguir un mayor calibre y baja resistencia al flujo, no así en la preeclampsia, donde conservan un bajo calibre y una elevada resistencia vascular. Modificada de la referencia 149. EN: embarazo normal; PE: preeclampsia.

La segunda etapa corresponde a la activación endotelial causada por los factores placentarios que implica aumento de la actividad de la vía NF- κ B, la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y selectina-E, así como otras señalizaciones intracelulares que

generan el desarrollo de una respuesta inflamatoria por parte del endotelio (154, 155). Por otro lado, se presenta un aumento de la concentración de agentes vasopresores y agregantes plaquetarios (endotelina-1 y tromboxano A₂), y una disminución de las sustancias vasodilatadoras y antiagregantes (óxido nítrico y prostaciclina) (156, 157). En suma, el fenotipo del endotelio es característico de una franca disfunción endotelial, el cual se acompaña de un estado de vasoconstricción, aumentando así la resistencia vascular periférica y la presión arterial. Probablemente este mecanismo persiste hasta el final del embarazo, ya que la preeclampsia comienza a resolverse únicamente cuando la placenta es expulsada (117). En este sentido, se ha planteado que durante el embarazo existe un desbalance en la producción de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α , IL-6 e IL-8, con respecto a las citocinas antiinflamatorias, como IL-10 e IL-1RA, en la interfase placenta-decidual (158). El desequilibrio en circulación a favor de las citocinas proinflamatorias puede causar disfunción endotelial, que le confiere un fenotipo adhesivo al endotelio vascular caracterizado por la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 y VCAM-1 (159).

Por otro parte, estudios previos han demostrado la asociación significativa entre la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino o bien con neonatos pequeños para edad gestacional; no obstante, pocos estudios se han enfocado en establecer la posible relación entre este síndrome y las alteraciones en la circulación fetal que pudieran explicar esta asociación.

Se ha sugerido que la preeclampsia se asocia con una respuesta inflamatoria exacerbada que se refleja en la circulación fetal. Por ejemplo, se ha reportado que los niveles circulantes maternos de IL-6 y de proteína C reactiva tienen una correlación positiva con sus respectivos niveles en circulación umbilical; sin embargo, aún se desconoce si la placenta juega un papel importante

en esta observación, ya sea mediante la producción directa de los mediadores inflamatorios o a través de un defecto en su función como barrera (160).

1.2.5 Inmunología

1.2.5.1 Inmunidad innata

Células NK

En la preeclampsia, diversos estudios han reportado una reducida expresión de HLA-G por el citotrofoblasto extraveloso (161, 162). Además, se ha observado una relación entre la genética de HLA-G y la preeclampsia, ya que este trastorno se asocia con la frecuencia del polimorfismo 14 bp ins/del 3'UTR (45-49), que causa una expresión aberrante y reducida de HLA-G por el trofoblasto, así como con la del alelo HLA-G 1597 Δ C (165), que suprime la expresión de isoformas de longitud completa de esta molécula. Esta expresión disminuida de HLA-G por el citotrofoblasto extraveloso podría condicionar una inhibición parcial o ausencia del potencial citotóxico de las células dNK, además de alterar su perfil de secreción de citocinas. Es importante mencionar que el papel de HLA-G en preeclampsia es objeto de discusión, ya que en algunos estudios no han observado asociación entre el polimorfismo 14 bp ins/del 3'UTR y la frecuencia del trastorno hipertensivo. Además, se ha reportado que la expresión de esta molécula en el trofoblasto de mujeres preeclámpticas no es diferente de la observada en el embarazo normal (166, 167). Aunado a esto, se ha planteado que si la expresión de esta molécula está reducida, se debe a la necrosis placentaria característica la preeclampsia (169), siendo el resultado y no la causa de la enfermedad.

En torno a HLA-C, la combinación del genotipo AA materno de receptores tipo inmunoglobulina (KIR) (madres que no muestran receptores KIR activadores) con la variante HLA-C2 en la placenta conduce a un incremento en el riesgo de PE (41). Los autores de este estudio concluyen que la interacción entre KIRs maternos y HLA-C en placenta tiene una

función en la regulación de la placentación más que en el aloreconocimiento; sin embargo, es probable que esta interacción influya en la regulación de la actividad citotóxica de las dNKs.

Respecto a la interfase 2, se ha reportado un cociente NK1/NK2 elevado en pacientes con preeclampsia comparada con embarazos normales (46). Esto sugiere que las células pNK contribuyen a la respuesta Th1 observada en la preeclampsia. Por otro lado, se ha observado que los niveles en circulación de HLA-G soluble en el primer trimestre de gestación son más bajos en mujeres que posteriormente desarrollan preeclampsia que en las pacientes con embarazo normal (169), fenómeno que persiste hacia el final de la gestación (170). Es importante reiterar la probable participación de esta molécula en la diferenciación de las pNKs, ya que la ausencia de su efecto inhibitorio en estas células podría favorecer el fenotipo NK1.

Macrófagos

Pocos estudios se han enfocado en el papel de los dMacs en la preeclampsia. En uno de ellos se analizó la distribución de dMacs CD14⁺ y se reportó una disminución en el cociente CD163/CD14 (CD163 se relaciona con un fenotipo M2), un incremento en el cociente DC-SIGN/CD14 (DC-SIGN se asocia a un fenotipo M1) y una expresión reducida de IL-10 en pacientes con preeclampsia pretérmino, lo cual sugiere un fenotipo proinflamatorio de los dMacs en este trastorno hipertensivo (171). En contraste, en otro estudio no se observó diferencia en la expresión de moléculas asociadas a un fenotipo proinflamatorio tales como HLA-DR, ICAM-3, DC-SING y CD14 dentro de las células CD45⁺ deciduales entre pacientes con preeclampsia y el embarazo normal (172).

Se ha sugerido que la incompleta eliminación de células apoptóticas, debido a su exceso subsecuente a la hipoxia placentaria, conduce a la liberación del contenido de los cuerpos apoptóticos e induce la producción de las citocinas proinflamatorias por parte de las células presentadoras de antígeno (APCs), dentro de las que se incluyen los dMacs (78). Esto hace

sentido con el hecho de que el embarazo gemelar, que se caracteriza por un mayor crecimiento placentario y, por ende, de una mayor producción de células apoptóticas, es un factor de riesgo para desarrollar preeclampsia (79).

Durante la preeclampsia, los monocitos de la interfase 2 presentan una mayor expresión de CD11b, ICAM-1 y CD14 (marcadores asociados a inflamación) (61, 175-177), citocinas proinflamatorias (178-182) y especies reactivas de oxígeno (61). Esto demuestra que en este trastorno hipertensivo los monocitos presentan un mayor grado de activación debido quizá a las grandes cantidades de desechos placentarios (183), citocinas proinflamatorias, factores antiangiogénicos (184) y ATP (185) liberados por la placenta preecláptica.

Células dendríticas

No existen muchos estudios enfocados en el papel de las células dDC en la preeclampsia. En un estudio se reportó que existe un incremento en el número de APCs DC-SIGN⁺CD83⁺ (CD83 es un marcador fenotípico de DCs maduras) en la decidua del primer trimestre (186, 187); sin embargo, es importante recordar que DC-SIGN es marcador de un grupo de APCs que puede incluir no solo a las DCs lin⁻HLA-DR⁺ sino a otras APCs, como los dMacs.

1.2.5.2. Inmunidad adaptativa

Linfocitos T reguladores

En la preeclampsia, no se observa diferencia en el porcentaje de linfocitos Tregs en la decidua en comparación con el embarazo normal, pero sí una disminución significativa en el porcentaje de iTregs (Helios⁺) (80). Esto sugiere que en la preeclampsia la falla en el aumento de iTregs es compensada por nTregs con el objeto de evitar el rechazo. Esta idea es sustentada por un estudio basado en cruces alogénicos de ratones deficientes de la secuencia conservada no codificante 1 (CNS1), necesaria para el desarrollo de iTregs pero no para nTregs, en el que se

observó reabsorción fetal parcial (aproximadamente 10%) y remodelación anormal de las arterias espirales, ésta última una característica de la preeclampsia (85).

En la interfase 2, se ha reportado una disminución en el porcentaje de Tregs en mujeres con preeclampsia comparable al observado en mujeres no embarazadas (188).

Linfocitos Th17

En la preeclampsia, poco se sabe sobre el porcentaje de Th17 en la decidua; sin embargo, se ha reportado que el porcentaje de estas células en la interfase 2 es mayor que en el embarazo normal y se ha observado un cociente Treg/Th17 disminuido (85, 189, 190), lo que es congruente con los niveles elevados de IL-6 y endoglina soluble reportados en la preeclampsia (90, 191).

1.3 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

La diabetes mellitus gestacional se define como intolerancia materna a la glucosa con aparición o primer reconocimiento durante el embarazo; sin embargo, solo se diagnostica cuando se identifica en el segundo o tercer trimestre de gestación, de lo contrario, debe considerarse como diabetes pregestacional. Como ya se ha mencionado, es una condición con considerables consecuencias maternas y fetales.

1.3.1 Diagnóstico

Varias organizaciones como la Organización Mundial de la Salud, la Federación Internacional de la Diabetes, la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes, la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de la Diabetes y el Embarazo, entre otras, han emitido criterios diagnóstico de diabetes mellitus gestacional; sin embargo, los criterios del Instituto Mexicano del Seguro Social se basan en los emitidos por la Asociación Americana de Diabetes, en los que se establecen dos estrategias para dicho diagnóstico (192):

1) Estrategia de un solo paso: realizar una prueba oral de tolerancia a la glucosa de 75 g en mujeres con edad gestacional de 24-28 semanas, no diagnosticadas previamente con diabetes, y medir la concentración de glucosa en ayuno, a la hora y a las 2 horas después de ingerir la glucosa. La prueba oral de tolerancia a la glucosa debe realizarse en la mañana después de un ayuno de al menos 8 h. El diagnóstico de diabetes gestacional se hace cuando uno de los siguientes valores de glucosa plasmática se alcanzan o exceden:

Ayuno: 92 mg/dL (5.1 mmol/L)

1 h: 180 mg/dL (10.0 mmol/L)

2 h: 153 mg/dL (8.5 mmol/L)

2) Estrategia de dos pasos:

a) Paso 1: realizar una prueba oral de tolerancia a la glucosa de 50 g en mujeres con edad gestacional de 24-28 semanas, no diagnosticadas previamente con diabetes, y medir la concentración de glucosa a la hora. Esta prueba oral de tolerancia a la glucosa debe realizarse sin ayuno. Si la concentración de glucosa es ≥ 130 mg/dL (7.2 mmol/L) se procede al segundo paso.

b) Paso 2: realizar una prueba oral de tolerancia a la glucosa de 100 g y medir la concentración de glucosa en ayuno, a la hora, a las 2 horas y a las 3 horas. El diagnóstico de diabetes mellitus gestacional se establece cuando al menos dos de los siguientes valores de glucosa plasmática se alcanzan o exceden (se debe elegir un solo criterio de los dos siguientes):

Carpenter-Coustan (193)

Grupo Nacional de información sobre Diabetes (194)

Ayuno: 95 mg/dL (5.3 mmol/L)

Ayuno: 105 mg/dL (5.8 mmol/L)

1 h: 180 mg/dL (10.0 mmol/L)

1 h: 190 mg/dL (10.6 mmol/L)

2 h: 155 mg/dL (8.6 mmol/L)

2 h: 165 mg/dL (9.2 mmol/L)

3 h: 140 mg/dL (7.8 mmol/L)

3 h: 145 mg/dL (8.0 mmol/L)

Cabe mencionar que el Colegio Estadounidense de Obstetras y Ginecólogos sugiere que un solo valor elevado puede ser utilizado para establecer el diagnóstico.

1.3.2 Epidemiología

La frecuencia de la diabetes mellitus gestacional varía en función a la población estudiada y los criterios diagnósticos utilizados. En nuestro país la prevalencia oscila entre el 3 y 19.6%. Se considera que más del 90% de los casos de diabetes que complican un embarazo son debidos a diabetes gestacional (195-197). Los factores de riesgo para desarrollar diabetes gestacional son la edad, el índice de masa corporal, la etnicidad (afroestadounidenses, latinas, asiáticas sudorientales e hindúes orientales tienen mayor riesgo), historia familiar de diabetes, macrosomía en producto previo y antecedente personal de diabetes gestacional (198). Con respecto este último, la tasa de recurrencia de diabetes gestacional varía entre el 30 y el 84%. Una importante observación es que del 3 al 65% de las mujeres que presentan diabetes gestacional en el embarazo desarrollan diabetes mellitus tipo 2 dentro de los 5 a 16 años posparto, lo que sin duda representa un grave problema de salud pública (199, 200).

1.3.3 Fisiopatología

La fisiopatología de la diabetes mellitus gestacional se caracteriza por resistencia a la insulina y disfunción de las células beta pancreáticas (figura 2) (201).

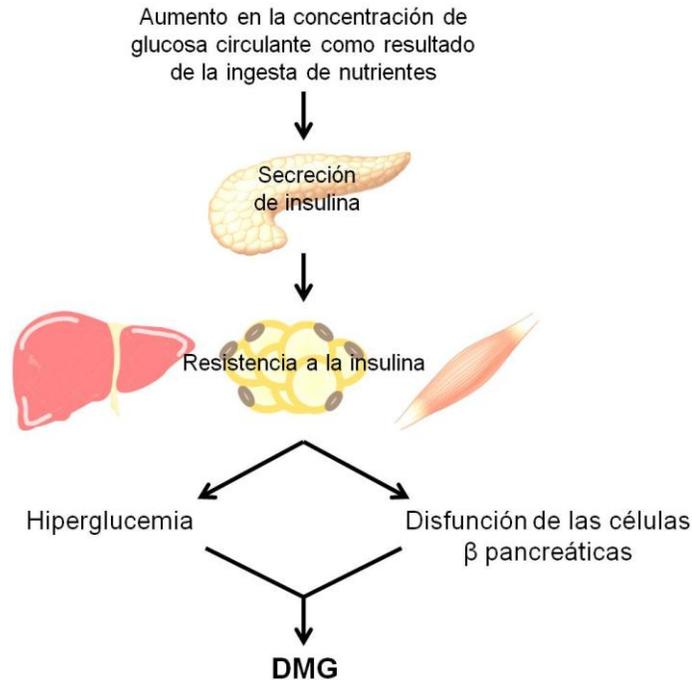


Figura 2. Mecanismo fisiopatológico de la diabetes mellitus gestacional. La resistencia a la insulina resulta de la alteración de la correcta acción de la insulina en los tejidos, principalmente en el hígado, tejido adiposo y muscular, de manera que la captura de la glucosa circulante por parte de éstos es deficiente. Ante esto, las células pancreáticas responden con una mayor producción de insulina, pero tal reto puede conducir al agotamiento celular que imposibilita el retorno al estado euglucémico, dando lugar a la hiperglucemia característica de la diabetes gestacional. DMG: diabetes mellitus gestacional.

La resistencia a la insulina en el embarazo puede ser resultado de la obesidad materna y la producción placentaria de hormonas diabetogénicas. Respecto a la primera, se sabe que el tejido adiposo produce numerosas sustancias hormonales denominadas adipocinas, las cuales intervienen en la regulación de la ingesta, el gasto energético, la homeostasis de la glucosa (leptina, adiponectina, resistina, visfatina y proteína estimulante de la acilación), la respuesta inmune inflamatoria (TNF- α , IL-6, IL-1, proteína C reactiva, amiloide sérico A, haptoglobina, proteína 1 quimioatrayente de los monocitos), la función vascular (angiotensinógeno,

angiotensina, resistina), la coagulación sanguínea (inhibidor del activador del plaminógeno-1 y factor tisular), la vía del complemento (adipsina) y la angiogénesis (factor de crecimiento vascular endotelial) (202).

Las adipocinas pueden ejercer su efecto sobre la resistencia a la insulina al interferir con la señalización de insulina en el músculo esquelético (203), mientras que la adiponectina actúa sobre la proteína quinasa activada por adenin monofosfato, la cual regula de manera negativa la proteína mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), molécula que participa en la degradación del sustrato de receptor de insulina (204). En mujeres con diabetes mellitus gestacional, quienes tienen menor concentración de adiponectina, se incrementa la activación de la ruta de la mTOR contribuyendo a la degradación del sustrato de receptor de insulina.

En lo que respecta a las moléculas proinflamatorias, el TNF- α induce resistencia a la insulina al disminuir la fosforilación de las tirosinas del receptor de insulina y promover la fosforilación de serina del sustrato de receptor de insulina-1, lo cual bloquea la unión de esta molécula al receptor de insulina (205). Por su parte, la IL-1 β disminuye la expresión del sustrato de receptor de insulina (206), mientras que la IL-6 también induce resistencia a la insulina al inhibir la síntesis del transportador de glucosa-4 (207). Asimismo, la mayoría de las adipocinas pueden inducir resistencia a la insulina en el tejido adiposo, el cual está formado por diversas estirpes celulares como adipocitos, macrófagos, linfocitos, fibroblastos y células endoteliales. En la obesidad, existen concentraciones mayores de diversas adipocinas, principalmente TNF- α e IL-6, las cuales son producidas por los adipocitos. Estas citocinas actúan de manera autocrina para inducir lipólisis y liberación de ácidos grasos, que a su vez estimulan a los receptores tipo Toll de los adipocitos y macrófagos activando la vía NF- κ B, lo que inicia la expresión génica de estas mismas citocinas proinflamatorias, además de IL-1 β .

De esta manera, el tejido adiposo contribuye, mediante la síntesis de citocinas proinflamatorias, en el bloqueo de la señalización de insulina (202, 207). Este estado proinflamatorio se puede extender a la circulación materna y ejercer un efecto en el endotelio vascular, confiriéndole un fenotipo adhesivo que favorece la diapédesis leucocitaria, lo que a su vez favorece la inflamación sistémica en la diabetes mellitus gestacional (208).

En cuanto a las hormonas placentarias, se ha sugerido que la progesterona, el cortisol, la prolactina y el lactógeno placentario humano tienen un importante papel causal en la resistencia a la insulina durante el embarazo. En modelo murino, también se ha observado que estas hormonas inducen resistencia a la insulina (209); sin embargo, esto no se ha dilucidado por completo en humanos; pero, al parecer, es el lactógeno placentario humano el principal inductor (210).

2. JUSTIFICACIÓN

La preeclampsia y la diabetes mellitus gestacional son dos de las principales complicaciones del embarazo con considerable efecto en la morbilidad y mortalidad perinatal. Además, ambas se relacionan con efectos adversos a largo plazo tanto en la madre como en el recién nacido. Estas patologías son perfectamente diferenciables entre sí, pues se tratan de alteraciones con base inmunológica o metabólica, respectivamente; no obstante, comparten mecanismos fisiopatológicos tales como un estado proinflamatorio placentario; sin embargo, poco se ha estudiado en torno a la relación de esta alteración con el estado inflamatorio y disfunción endotelial en circulación umbilical en ambas patologías. Esto pone de relieve la pertinencia del presente trabajo, en miras de una mejor comprensión fisiopatológica de estos trastornos, principalmente en lo relacionado a la placenta y la circulación fetal. Por lo tanto, el presente trabajo pretende evaluar la relación entre los niveles de expresión placentaria y las concentraciones umbilicales de citocinas pro y antiinflamatorias, así como de moléculas de adhesión en mujeres con preeclampsia en comparación con mujeres con embarazo normal.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Pocos estudios se han enfocado en la relación de la preeclampsia o la diabetes mellitus gestacional con alteraciones en la circulación fetal. Se ha sugerido que en la preeclampsia la respuesta inflamatoria materna se refleja en la circulación fetal; no obstante, se desconoce el mecanismo subyacente. En la diabetes mellitus gestacional existe una respuesta inflamatoria materna cuyo efecto en la circulación umbilical ha recibido poca atención. Probablemente la placenta juega un papel relevante en el estado inflamatorio y disfunción endotelial de la circulación umbilical mediante la desregulación en la producción de citocinas pro y antiinflamatorias y la extensión a dicha circulación.

Con base en esto, ¿existe diferencia en la expresión placentaria de citocinas pro y antiinflamatorias, o en el balance de estas, así como de moléculas de adhesión en mujeres con preeclampsia o diabetes mellitus gestacional en comparación con mujeres que cursan con embarazo normal? ¿Se asocia la alteración en la producción placentaria de citocinas pro y antiinflamatorias con la inflamación y disfunción endotelial en la circulación umbilical?

4. OBJETIVO

3.1 General

Comparar los niveles de expresión placentaria y las concentraciones umbilicales de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, ICAM-1 y VCAM-1, así como los cocientes TNF- α /IL-10, TNF- α /IL-1RA, IL-6/IL-10, IL-6/IL-1RA, IL-8/IL-10 e IL-8/IL-1RA en mujeres con preeclampsia o con diabetes mellitus gestacional versus mujeres con embarazo normal.

3.2 Específicos

1. Determinar los niveles de expresión placentaria de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, ICAM-1 y VCAM-1 en los grupos de estudio
2. Determinar las concentraciones umbilicales de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, ICAM-1 y VCAM-1 en los grupos de estudio.
3. Determinar los cocientes TNF- α /IL-10, TNF- α /IL-1RA, IL-6/IL-10, IL-6/IL-1RA, IL-8/IL-10 e IL-8/IL-1RA placentarios y umbilicales.

5. HIPÓTESIS

Los niveles de expresión placentaria y las concentraciones umbilicales de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, ICAM-1 y VCAM-1, así como en los cocientes $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-10}$, $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-1RA}$, $\text{IL-6}/\text{IL-10}$, $\text{IL-6}/\text{IL-1RA}$, $\text{IL-8}/\text{IL-10}$ e $\text{IL-8}/\text{IL-1RA}$ en mujeres con preeclampsia o diabetes mellitus gestacional son mayores en comparación con mujeres que cursan con embarazo normal, asociándose a un estado proinflamatorio en placenta y circulación umbilical que culminan con disfunción endotelial.

6. METODOLOGÍA

Este es un estudio transversal con muestreo no probabilístico por conveniencia realizado con 50 mujeres con preeclampsia, 25 mujeres con diabetes mellitus gestacional y 50 mujeres con embarazo normal. El protocolo de investigación fue evaluado y aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica y la Comisión de Ética y Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de registro R-2013-785-005. Todas las pacientes fueron programadas para cesárea, lo que permitió una entrevista previa en la que se realizó la invitación a participar en el estudio explicando claramente en qué consistía éste. Las pacientes que aceptaron participar firmaron una carta de consentimiento informado.

Las variables independientes fueron preeclampsia, diabetes mellitus gestacional y embarazo normal. Las dependientes fueron los niveles de expresión placentaria y las concentraciones umbilicales de las citocinas y moléculas de adhesión de interés, así como los cocientes citocina proinflamatoria/citocina antiinflamatoria. Las covariables fueron edad materna, índice de masa corporal previo al embarazo, tensión arterial, paridad, peso y talla del neonato. Las variables confusoras fueron edad gestacional y tratamiento.

5.1 Participantes

Todas las muestras se obtuvieron de mujeres sometidas a cesárea sin trabajo de parto en el Hospital de Gineco Obstetricia No. 3 del Centro Médico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social. El diagnóstico de preeclampsia se realizó de acuerdo a los criterios diagnóstico del Colegio Estadounidense de Obstetras y Ginecólogos (117). El diagnóstico de diabetes mellitus gestacional se realizó con base a los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (192) utilizando los valores de Carpenter-Coustan. Mujeres con gestación múltiple, ruptura prematura de membranas, diabetes mellitus tipo 2, hipotiroidismo, nefropatía,

enfermedades autoinmunes, hipertensión crónica y defectos fetales genéticos/estructurales fueron excluidas del estudio. El embarazo normal se definió como aquel sin ninguna complicación con indicación de cesárea por circular de cordón, presentación podálica, cesárea previa o decisión de la madre.

5.2 Recolección de muestras

En el preoperatorio, se tomó muestra de sangre venosa del área antecubital. Inmediatamente después de la expulsión de la placenta se tomaron muestras de sangre de la vena umbilical y de tejido placentario. Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 400 x g por 15 minutos y el suero se almacenó a -75°C. Para evitar sesgo en la recolección de tejido, las muestras placentarias se obtuvieron de 5 puntos aleatorios de la cara materna (~0.5 cm² cada punto). Cada muestra tisular fue enjuagada brevemente con agua tratada con dietilpirocarbonato para quitar el exceso de sangre y depositada en un tubo criogénico con 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen™, CA, USA) que se transportó dentro de una bolsa en un contenedor con nitrógeno líquido para posteriormente almacenarlo a -75°C.

5.3 Extracción de RNA

Las muestras tisulares fueron homogenizadas y centrifugadas a 12,000 x g a 4°C. Del sobrenadante se extrajo y purificó RNA utilizando Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research Corp, CA, EUA) de acuerdo al protocolo del fabricante. La concentración de RNA se cuantificó por espectrofotometría y la integridad se evaluó por electroforesis (anexo 1). El RNA se aisló de cada uno de los 5 puntos de la placenta y se combinaron equitativamente para obtener la mezcla de RNA utilizada para el análisis de expresión.

5.4 Síntesis de cDNA y qPCR

El cDNA se sintetizó a partir de 1 µg de RNA utilizando el kit SuperScript® III First-Strand (Invitrogen™, CA, USA) (anexo 2). La qPCR se realizó en el instrumento StepOnePlus™ Real-Time PCR System utilizando Taqman® Gene Expression Assays y Taqman® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante con las siguientes etapas: ciclo inicial a 50 °C por 2 min seguido de 95 °C por 10 min y 40 ciclos de 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min (anexo 3). Todos los ensayos Taqman mostraron una $R^2 > 0.994$ y una eficiencia entre 99.65 y 100.8%. La cuantificación relativa se realizó con método $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{\text{Gen de interés}} - Ct_{\text{Control endógeno}}$) utilizando el transcrito de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control endógeno. Todos los oligos y sondas se adquirieron de Applied Biosystems: TNF- α (Hs01113624_g1), IL-6 (Hs00985639_m1), IL-8 (Hs00174103_m1), IL-1RA (Hs00893626_m1), IL-10 (Hs00961622_m1), ICAM-1 (Hs00164932_m1), VCAM-1 (Hs01003372_m1) y GAPDH (PN 4326317E).

5.5 Ensayos multianálisis y ELISAs

Los niveles séricos de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1RA se midieron mediante ensayos multianálisis en el equipo Luminex® MAGPIX® System utilizando ensayos Custom Luminex® (Invitrogen™, CA, USA) con sensibilidades de 5, 1, 5, 0.5 y 30 pg/mL, respectivamente. Los niveles séricos de ICAM-1 y VCAM-1 se determinaron mediante ELISA (R&D Systems, MN, USA) con sensibilidades de 0.022 y 0.6 ng/mL, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron de acuerdo a los protocolos de los fabricantes (anexo 4-6). Los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron menores a 10%.

5.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 21 (IBM Corp, NY, USA). La normalidad de las variables continuas se evaluó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para los grupos con una $n=50$ y la prueba Shapiro-Wilk para aquel con una $n=25$. No se observó distribución normal, por lo que el análisis estadístico se realizó con pruebas no paramétricas. Las variables continuas se analizaron con la prueba de U Mann–Whitney para la comparación de dos grupos no relacionados y la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de más de dos grupos independientes. En cuanto a las variables categóricas se utilizó la prueba Chi-cuadrada. Por su parte, para calcular correlaciones se utilizó la prueba de Spearman. Se realizó el ajuste en función al tratamiento y la edad gestacional mediante análisis estratificado y análisis de covarianza (ANCOVA), respectivamente. Las variables continuas se expresaron como mediana (rango intercuartílico) y las variables categóricas como número (porcentaje). Se consideró como significativo todo valor de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

Características clínicas

En la tabla 1 se muestran las características clínicas de las pacientes. La edad gestacional al momento de la cesárea, así como el peso y la talla del neonato fueron significativamente menores, mientras que la tensión arterial al momento de la toma de sangre y el porcentaje de neonatos pequeños para edad gestacional fueron significativamente mayores en preeclampsia. El 80% de las mujeres con preeclampsia fueron tratadas con sulfato de magnesio, hidralazina y/o alfametildopa. De las 50 mujeres con preeclampsia, 30 (60%) presentaron preeclampsia temprana y 20 (40%) tardía.

Por otro lado, el porcentaje de neonatos grandes para edad gestacional fue mayor en diabetes mellitus gestacional. Todas las mujeres con diabetes recibieron terapia nutricional y el 20% fueron tratadas con insulina.

Concentración umbilical

En la tabla 2 se muestra la concentración umbilical de las citocinas y moléculas de adhesión. No se observó diferencia significativa de estos valores ni de los cocientes entre los grupos.

Expresión placentaria

En la tabla 3 se muestra la expresión placentaria de las moléculas de estudio. La expresión de IL-10 e IL-1RA fue menor y el cociente IL-8/IL-1RA (figura 3) fue estadísticamente mayor en preeclampsia. La expresión de TNF- α , IL-6, IL-8, ICAM-1, VCAM-1 y el resto de los cocientes no fueron diferentes entre los grupos.

En todos los grupos, la expresión placentaria y la concentración umbilical de cada molécula no correlacionaron (tablas 4-6). Por otro lado, al realizar el ajuste en función al tratamiento y a la edad gestacional se observaron las mismas similitudes estadísticas.

Tabla 1. Características clínicas de las participantes.

Variable (unidad de medida)	Embarazo normal (n=50)	Preeclampsia (n=50)	Diabetes mellitus gestacional (n=25)
Edad (años)	28.0 (23.0-32.0)	28.5 (23.0-34.3)	32.0 (27.5-36.0)
Edad gestacional al momento de la cesárea (semanas)	38.3 (38.0-39.0)	33.0 (31.0-36.8)*	38.6 (38.0-39.0)
IMC previo al embarazo (kg/m ²)	25.5 (22.5-29.3)	26.5 (23.9-30.0)	28.6 (26.0-34.0)
Tensión arterial al momento de la toma de sangre (mmHg)			
Sistólica	116.0 (109.8-121.3)	142.0 (122.0-154.0)*	114.0 (106.8-127.8)
Diastólica	70.0 (66.5-76.3)	87.0 (72.0-97.0)*	68 (59.5-74.5)
Primigravida	12 (24.0%)	19 (38.0%)	3 (12.0%)
Peso del neonato (kg)	3.2 (2.9-3.4)	1.9 (1.4-2.5)*	3.7 (3.2-3.9)
Talla del neonato (cm)	50.0 (49.0-51.5)	42.0 (39.0-48.3)*	52.0 (49.8-53.0)
Neonato PEG	1 (2.0%)	20 (40.0%)*	0 (0%)
Neonato AEG	43 (86.0%)	29 (58.0%)	14 (56%)
Neonato GEG	6 (12.0%)	1 (2.0%)	11 (44.0%)*

Las variables continuas se expresan como mediana (rango intercuartílico) y las variables categóricas como número (porcentaje). IMC: índice de masa corporal; PEG: pequeño para edad gestacional; AEG: adecuado para edad gestacional; GEG: grande para edad gestacional.

* $p < 0.05$ vs EN.

Tabla 2. Concentración umbilical de las citocinas y moléculas de adhesión.

Molécula (unidad de concentración)	Embarazo normal (n=50)	Preeclampsia (n=50)	Diabetes mellitus gestacional (n=25)
TNF- α (pg/ml)	9.3 (6.0-14.0)	8.8 (5.1-13.3)	8.3 (5.8-14.8)
IL-6 (pg/ml)	6.9 (5.8-7.6)	6.0 (4.9-8.1)	5.8 (4.0-6.9)
IL-8 (pg/ml)	51.7 (14.6-159.6)	40.0 (12.3-100.6)	57.5 (22.4-92.6)
IL-10 (pg/ml)	6.9 (2.6-7.9)	5.7 (1.9-7.8)	7.8 (2.7-8.1)
IL-1RA (pg/ml)	63.7 (47.7-126.1)	70.3 (44.0-122.3)	56.5 (36.0-92.6)
ICAM-1 (ng/ml)	150.2 (132.0-188.0)	132.2 (105.3-178.8)	146.4 (127.3-174.7)
VCAM-1 (μ g/ml)	2.0 (1.7-2.4)	2.3 (1.4-3.0)	1.9 (1.7-2.2)

Los valores se expresan como mediana (rango intercuartílico).

Tabla 3. Expresión placentaria de las citocinas y moléculas de adhesión.

	$2^{-\Delta Ct}$		
Transcrito	Embarazo normal (n=50)	Preeclampsia (n=50)	Diabetes mellitus gestacional (n=25)
TNF- α	3.3×10^{-3} (1.9×10^{-3} - 14.7×10^{-3})	2.1×10^{-3} (1.7×10^{-3} - 3.3×10^{-3})	2.9×10^{-3} (1.2×10^{-3} - 12.3×10^{-3})
IL-6	3.8×10^{-3} (2.8×10^{-3} - 11.2×10^{-3})	2.2×10^{-3} (1.3×10^{-3} - 3.1×10^{-3})	2.6×10^{-3} (1.6×10^{-3} - 9.2×10^{-3})
IL-8	5.4×10^{-3} (2.1×10^{-3} - 8.3×10^{-3})	3.1×10^{-3} (2.1×10^{-3} - 7.1×10^{-3})	5.6×10^{-3} (1.8×10^{-3} - 9.2×10^{-3})
IL-10	3.3×10^{-3} (1.7×10^{-3} - 4.2×10^{-3})	1.2×10^{-3} (0.7×10^{-3} - 2.3×10^{-3})*	3.1×10^{-3} (2.0×10^{-3} - 3.9×10^{-3})
IL-1RA	5.7×10^{-3} (3.8×10^{-3} - 1.1×10^{-2})	1.6×10^{-3} (1.1×10^{-3} - 2.9×10^{-3})*	6.0×10^{-3} (3.1×10^{-3} - 1.2×10^{-2})
ICAM-1	2.3×10^{-3} (1.0×10^{-3} - 3.5×10^{-3})	2.7×10^{-3} (0.8×10^{-3} - 3.3×10^{-3})	1.9×10^{-3} (0.9×10^{-3} - 4.0×10^{-3})
VCAM-1	2.8×10^{-2} (1.5×10^{-2} - 5.1×10^{-2})	2.4×10^{-2} (1.2×10^{-2} - 3.6×10^{-2})	3.2×10^{-2} (2.1×10^{-2} - 5.5×10^{-2})

Los valores se expresan como mediana (rango intercuartílico). * $p < 0.05$ vs. EN

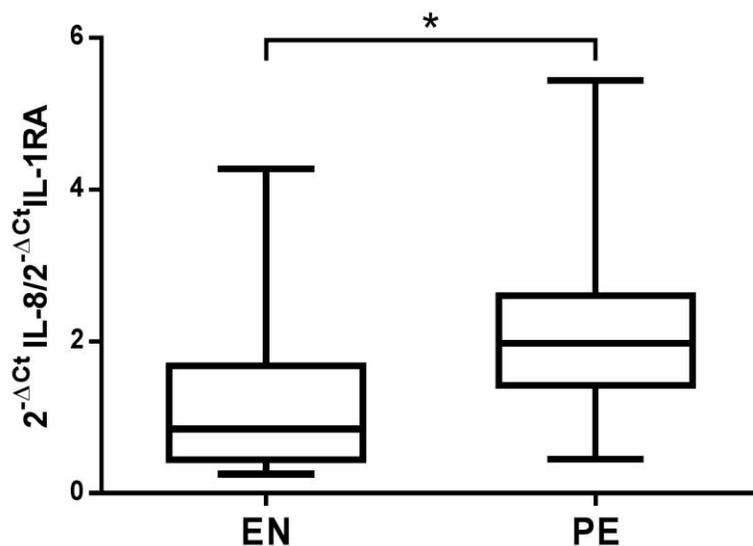


Figura 3. Cociente placentario IL-8/IL1-RA en embarazo normal y preeclampsia. EN, n=50; PE, n=50, * $p < 0.05$. EN: embarazo normal; PE: preeclampsia.

Tabla 4. Correlaciones entre la expresión placentaria y la concentración umbilical de citocinas y moléculas de adhesión en el grupo de mujeres con embarazo normal.

		Concentración umbilical						
		TNF- α	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1RA	ICAM-1	VCAM-1
Nivel de expresión placentaria	TNF- α	$\rho=0.38$ $p=0.17$	$\rho=0.16$ $p=0.56$	$\rho=0.48$ $p=0.07$	$\rho=0.66$ $p=0.11$	$\rho=0.43$ $p=0.88$	$\rho=0.30$ $p=0.26$	$\rho=0.01$ $p=0.69$
	IL-6	$\rho=0.17$ $p=0.56$	$\rho=0.22$ $p=0.43$	$\rho=0.40$ $p=0.14$	$\rho=0.62$ $p=0.14$	$\rho=0.23$ $p=0.40$	$\rho=-0.08$ $p=0.76$	$\rho=0.10$ $p=0.69$
	IL-8	$\rho=-0.20$ $p=0.47$	$\rho=-0.09$ $p=0.74$	$\rho=0.23$ $p=0.41$	$\rho=-0.20$ $p=0.68$	$\rho=-0.13$ $p=0.65$	$\rho=0.35$ $p=0.26$	$\rho=0.10$ $p=0.70$
	IL-10	$\rho=0.24$ $p=0.39$	$\rho=-0.31$ $p=0.91$	$\rho=0.33$ $p=0.23$	$\rho=0.66$ $p=0.11$	$\rho=0.04$ $p=0.89$	$\rho=0.14$ $p=0.58$	$\rho=-0.19$ $p=0.46$
	IL-1RA	$\rho=0.04$ $p=0.90$	$\rho=0.02$ $p=0.93$	$\rho=0.18$ $p=0.51$	$\rho=0.55$ $p=0.21$	$\rho=-0.86$ $p=0.76$	$\rho=0.29$ $p=0.24$	$\rho=-0.79$ $p=0.75$
	ICAM-1	$\rho=0.09$ $p=0.75$	$\rho=0.17$ $p=0.53$	$\rho=0.31$ $p=0.25$	$\rho=0.51$ $p=0.24$	$\rho=-0.02$ $p=0.95$	$\rho=0.33$ $p=0.18$	$\rho=0.02$ $p=0.95$
	VCAM-1	$\rho=-0.01$ $p=0.98$	$\rho=0.22$ $p=0.42$	$\rho=0.38$ $p=0.16$	$\rho=0.29$ $p=0.52$	$\rho=-0.18$ $p=0.51$	$\rho=0.04$ $p=0.86$	$\rho=0.04$ $p=0.87$

ρ (rho): coeficiente de correlación de Spearman ; p : nivel de significancia

Tabla 5. Correlaciones entre la expresión placentaria y la concentración umbilical de citocinas y moléculas de adhesión en el grupo de mujeres con preeclampsia.

		Concentración umbilical						
		TNF- α	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1RA	ICAM-1	VCAM-1
Nivel de expresión placentaria	TNF- α	$\rho=0.06$ $p=0.85$	$\rho=0.40$ $p=0.23$	$\rho=0.26$ $p=0.43$	$\rho=0.21$ $p=0.11$	$\rho=0.30$ $p=0.29$	$\rho=-0.29$ $p=0.39$	$\rho=-0.23$ $p=0.50$
	IL-6	$\rho=-0.32$ $p=0.33$	$\rho=0.46$ $p=0.33$	$\rho=0.13$ $p=0.71$	$\rho=0.43$ $p=0.56$	$\rho=-0.21$ $p=0.54$	$\rho=-0.47$ $p=0.14$	$\rho=-0.48$ $p=0.13$
	IL-8	$\rho=-0.19$ $p=0.60$	$\rho=0.15$ $p=0.67$	$\rho=0.49$ $p=0.15$	$\rho=0.50$ $p=0.39$	$\rho=0.38$ $p=0.27$	$\rho=-0.26$ $p=0.47$	$\rho=-0.23$ $p=0.50$
	IL-10	$\rho=0.24$ $p=0.51$	$\rho=-0.55$ $p=0.88$	$\rho=-0.20$ $p=0.58$	$\rho=0.50$ $p=0.39$	$\rho=0.37$ $p=0.29$	$\rho=0.15$ $p=0.68$	$\rho=0.26$ $p=0.47$
	IL-1RA	$\rho=-0.10$ $p=0.77$	$\rho=0.36$ $p=0.30$	$\rho=0.20$ $p=0.58$	$\rho=0.42$ $p=0.20$	$\rho=0.32$ $p=0.36$	$\rho=-0.43$ $p=0.21$	$\rho=-0.36$ $p=0.31$
	ICAM-1	$\rho=-0.06$ $p=0.86$	$\rho=0.49$ $p=0.68$	$\rho=0.02$ $p=0.91$	$\rho=0.41$ $p=0.54$	$\rho=0.35$ $p=0.33$	$\rho=-0.32$ $p=0.37$	$\rho=-0.35$ $p=0.43$
	VCAM-1	$\rho=0.28$ $p=0.41$	$\rho=0.13$ $p=0.70$	$\rho=0.03$ $p=0.91$	$\rho=0.46$ $p=0.15$	$\rho=0.32$ $p=0.32$	$\rho=0.01$ $p=0.79$	$\rho=-0.12$ $p=0.572$

ρ (rho): coeficiente de correlación de Spearman ; p : nivel de significancia

Tabla 6. Correlaciones entre la expresión placentaria y la concentración umbilical de citocinas y moléculas de adhesión en el grupo de mujeres con diabetes mellitus gestacional.

		Concentración umbilical						
		TNF- α	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1RA	ICAM-1	VCAM-1
Nivel de expresión placentaria	TNF- α	$\rho=0.23$ $p=0.46$	$\rho=0.35$ $p=0.64$	$\rho=0.43$ $p=0.76$	$\rho=0.01$ $p=0.22$	$\rho=0.06$ $p=0.13$	$\rho=0.18$ $p=0.55$	$\rho=0.53$ $p=0.10$
	IL-6	$\rho=0.52$ $p=0.12$	$\rho=0.68$ $p=0.19$	$\rho=0.47$ $p=0.91$	$\rho=0.03$ $p=0.78$	$\rho=0.20$ $p=0.44$	$\rho=-0.19$ $p=0.59$	$\rho=0.21$ $p=0.32$
	IL-8	$\rho=0.77$ $p=0.63$	$\rho=0.60$ $p=0.53$	$\rho=0.42$ $p=0.38$	$\rho=0.21$ $p=0.75$	$\rho=0.63$ $p=0.66$	$\rho=0.16$ $p=0.67$	$\rho=0.49$ $p=0.22$
	IL-10	$\rho=0.23$ $p=0.75$	$\rho=0.77$ $p=0.11$	$\rho=0.02$ $p=0.33$	$\rho=0.08$ $p=0.44$	$\rho=0.61$ $p=0.38$	$\rho=0.36$ $p=0.21$	$\rho=0.19$ $p=0.43$
	IL-1RA	$\rho=0.34$ $p=0.70$	$\rho=0.06$ $p=0.21$	$\rho=0.12$ $p=0.63$	$\rho=0.24$ $p=0.12$	$\rho=0.43$ $p=0.53$	$\rho=0.62$ $p=0.53$	$\rho=0.62$ $p=0.52$
	ICAM-1	$\rho=0.19$ $p=0.53$	$\rho=0.44$ $p=0.26$	$\rho=0.37$ $p=0.25$	$\rho=0.52$ $p=0.63$	$\rho=0.26$ $p=0.27$	$\rho=0.48$ $p=0.65$	$\rho=0.73$ $p=0.25$
	VCAM-1	$\rho=0.35$ $p=0.27$	$\rho=0.73$ $p=0.35$	$\rho=0.36$ $p=0.22$	$\rho=0.55$ $p=0.34$	$\rho=0.26$ $p=0.64$	$\rho=0.51$ $p=0.69$	$\rho=0.23$ $p=0.43$

ρ (rho): coeficiente de correlación de Spearman ; p : nivel de significancia

Preeclampsia temprana y tardía

La expresión placentaria de IL-10 fue menor en mujeres con preeclampsia temprana en comparación con aquellas con preeclampsia tardía o con embarazo normal (figura 4). La expresión del resto de citocinas y moléculas de adhesión no fueron diferentes entre estos tres grupos.

Los cocientes placentarios IL-8/IL-10 e IL-8/IL-1RA (figuras 5 y 6, respectivamente) fueron mayores en mujeres con preeclampsia temprana que en preeclampsia tardía y embarazo normal. No se observó diferencia en el resto de los cocientes.

La concentración umbilical de citocinas y moléculas de adhesión no fueron diferentes entre los tipos de preeclampsia.

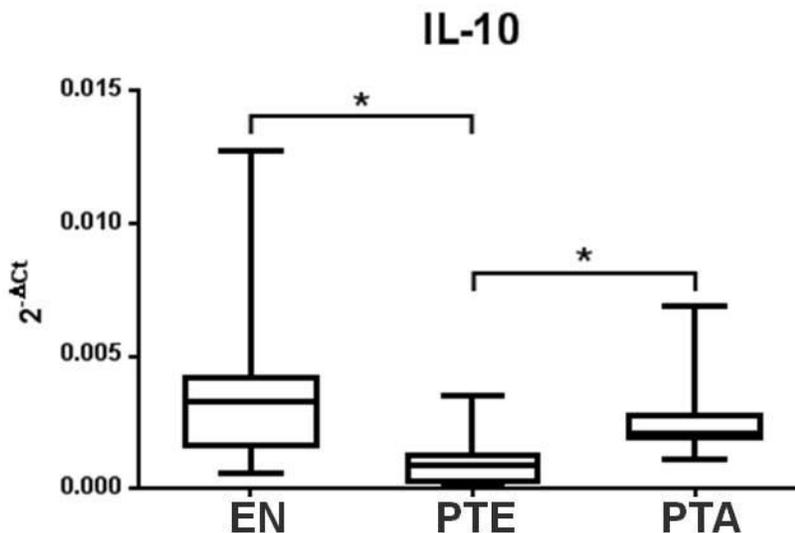


Figura 4. Expresión placentaria de IL-10 en embarazo normal y tipos de preeclampsia. EN, n=50; PTE, n=30, PTA, n=20, * $p < 0.05$. EN: embarazo normal; PTE: preeclampsia temprana; PTA: preeclampsia tardía.

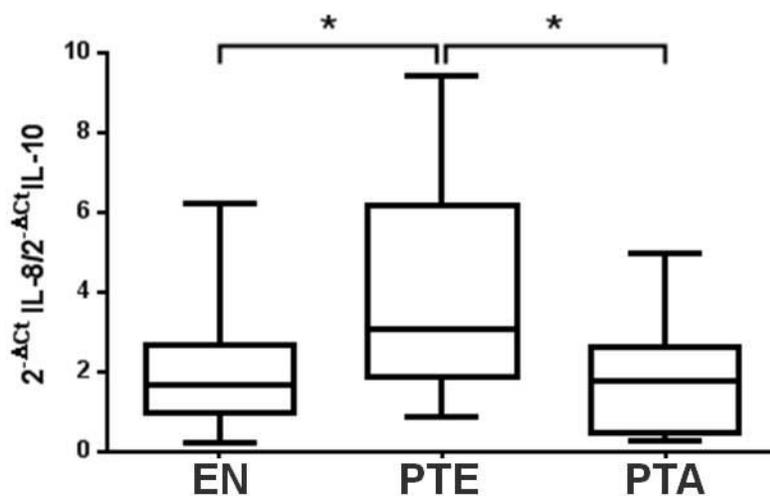


Figura 5. Cociente placentario IL-8/IL-10 en embarazo normal y tipos de preeclampsia. EN, n=50; PTE, n=30, PTA, n=20, * $p < 0.05$. EN: embarazo normal; PTE: preeclampsia temprana; PTA: preeclampsia tardía.

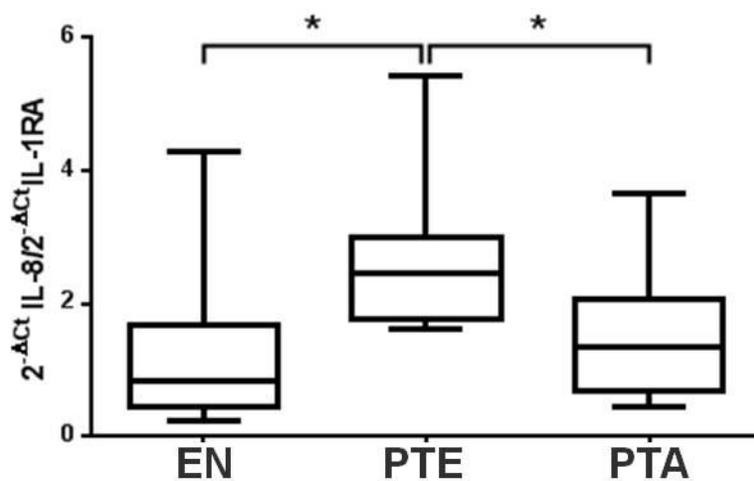


Figura 6. Cociente placentario IL-8/IL-1RA en embarazo normal y tipos de preeclampsia. EN, n=50; PTE, n=30, PTA, n=20, * $p < 0.05$. EN: embarazo normal; PTE: preeclampsia temprana; PTA: preeclampsia tardía.

8. DISCUSIÓN

La preeclampsia y la diabetes mellitus gestacional son patologías con distintas etiologías; sin embargo, comparten algunos mecanismos fisiopatológicos tales como la resistencia a la insulina y el estado proinflamatorio materno y placentario (211-213). El grupo de trabajo involucrado en este proyecto tiene como líneas de investigación dichos mecanismos en ambas patologías, lo que explica la inclusión de mujeres con preeclampsia o diabetes mellitus gestacional en este trabajo. Es necesario aclarar que en este estudio no se realizó la comparación entre el grupo de mujeres con preeclampsia y el grupo de pacientes con diabetes mellitus gestacional debido a que metodológicamente, el estudio de enfermedades se realiza mediante la comparación con un grupo control. Además, el hecho de que distintas patologías compartan algunos mecanismos fisiopatológicos no justifica su comparación, ya que, como es el caso de las patologías aquí estudiadas, difieren sustancialmente en otros y en la base de su patogenia como son la inmunológica o metabólica, respectivamente.

El trabajo de parto tanto a término como pretérmino involucra una respuesta proinflamatoria en la interfase feto-materna caracterizada por un aumento en la producción de las citocinas IL-6 e IL-8 (214, 215), por lo que en el presente trabajo se decidió analizar placentas de mujeres sometidas a cesárea y sin trabajo de parto. Para evitar sesgo en las determinaciones placentarias de estas moléculas. Además, debido a que la placenta es un órgano heterogéneo, el análisis de expresión se realizó mezclando equitativamente el RNA de cinco puntos aleatorios de la cara materna. Por otro lado, el efecto general de una respuesta inmune humoral está dictado principalmente por el balance entre citocinas pro y antiinflamatorias. Se sabe que en el embarazo normal el balance respuesta proinflamatoria/respuesta reguladora sistémico presenta un cambio hacia un estado regulador. Se ha sugerido que en la preeclampsia este cambio no

ocurre o se revierte en etapas tempranas del embarazo y, en consecuencia, se manifiesta un estado proinflamatorio (216). Con base en esto, en este estudio no solo se compararon los niveles absolutos de las citocinas entre los grupos, sino también los cocientes citocina proinflamatoria/citocina antiinflamatoria, esto pensando en que las patologías pueden asociarse, más que con diferencias en los valores absolutos, con un desbalance citocínico, tal como se ha observado en la preeclampsia (217).

En este estudio, se observó que la expresión placentaria de TNF- α , IL-6, IL-8, ICAM-1 y VCAM-1 fue similar entre los grupos de preeclampsia y embarazo normal, resultados que concuerdan con Marusic et al. (218) quienes, mediante inmunohistoquímica, hallaron que la expresión proteica de TNF- α fue similar en mujeres con preeclampsia y el grupo control pareado por edad gestacional. Benyo et al. (219), mediante RT-PCR y ELISA en homogenados placentarios, observaron que tanto la expresión génica como la proteica de TNF- α fue similar en preeclampsia y su grupo control normotenso de término. En contraste, Weel et al. (220), utilizando ELISA en homogenados placentarios e inmunohistoquímica, observaron mayores niveles de expresión proteica de TNF- α en preeclampsia en comparación con el grupo control de término; sin embargo, utilizaron homogenados placentarios que incluían tanto cara materna como fetal. Por otro parte, nuestros resultados sobre la expresión placentaria de IL-6 también concuerdan con Marusic et al. (218) y Benyo et al. (219) quienes no observaron diferencia entre los grupos. Respecto a IL-8, mediante RT-PCR en tiempo real, Sun L et al. (221) hallaron mayores niveles de expresión génica de esta citocina en preeclampsia que en su grupo control; no obstante, su método de muestreo fue susceptible a sesgo porque solo analizaron un punto de la cara materna de la placenta.

En lo que se refiere a las citocinas antiinflamatorias, nuestros resultados mostraron que la de IL-10 e IL-1RA fue menor en la preeclampsia al compararse con el grupo control. Estos resultados concuerdan con Makris A et al. (222) quienes, utilizando inmunohistoquímica y RT-PCR en tiempo real, mostraron una menor expresión génica y proteica de IL-10 en preeclampsia en comparación con su grupo control de término. Por su parte, Weel et al. (220) observaron la misma diferencia con respecto a la expresión placentaria de IL-10. Ahora bien, se sabe que IL-10 bloquea la activación del factor NF- κ B inhibiendo así la síntesis de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-8 (223, 224), de manera que este efecto antiinflamatorio es menos pronunciado en preeclampsia, la cual se asocia con un proceso inflamatorio. Para nuestro conocimiento, este es uno de los primeros estudios en publicar niveles de expresión placentaria de IL-1RA en preeclampsia. De hecho, solamente un trabajo previo cuantifica la secreción de IL-1RA a partir de un modelo in vitro de perfusión placentaria (225). Este estudio contrasta con los datos reportados por nosotros, debido a que describe un incremento en la perfusión obtenida de la cara materna, por lo que es necesario realizar más estudios para determinar con exactitud los niveles de esta molécula en placentas preeclámpticas al comparar con placentas normales. De manera interesante, a pesar de que no observamos diferencia en la expresión de IL-8, los resultados obtenidos del análisis de los cocientes muestran que la relación IL-8/IL-1RA fue mayor en preeclampsia que en el embarazo normal. El IL-1RA se une al receptor tipo 1 de IL-1, produciendo un mecanismo inhibitorio de la actividad de esta citocina, por lo que funciona como factor antiinflamatorio. Se sabe que IL-1 β induce la expresión de IL-8 en diversos tipos celulares (226), de manera que los menores niveles de IL-1RA relativos a mayores niveles de IL-8 en preeclampsia, se pueden explicar por un mayor actividad de IL-1 β , sugiriendo que este trastorno hipertensivo se asocia con un desbalance citocínico proinflamatorio placentario; sin embargo, es necesario realizar otros

estudios debido a que en el presente trabajo no se determinaron los niveles ni la actividad de IL-1 β .

Finalmente, considerando los resultados obtenidos de la disminución en la expresión placentaria de IL-1RA e IL-10, así como el desbalance citocínico proinflamatorio en preeclampsia, podemos proponer que este síndrome obstétrico se asocia con un estado proinflamatorio y una falla en la respuesta antiinflamatoria compensatoria a nivel placentario.

Es de conocimiento general que las pruebas acumuladas durante años han señalado a la placenta como el órgano que sostiene los mecanismos fisiopatológicos subyacentes de la preeclampsia, pues, como ya se ha mencionado, ésta tiende a resolverse una vez expulsada la placenta. En este sentido, es necesario mencionar que el presente trabajo deriva de uno más grande en el que, además de la expresión placentaria y las concentraciones umbilicales, se midieron la expresión decidual y las concentraciones maternas circulantes de las citocinas y moléculas de adhesión de estudio (227). De manera similar, no se observó diferencia estadística en la expresión decidual ni en las concentraciones maternas (excepto con VCAM-1 que fue significativamente mayor en circulación materna en preeclampsia con respecto al grupo de pacientes que cursaron con embarazo normal). Además, ninguna de estas mediciones (placentaria, decidual, materna y umbilical) correlacionaron entre ellas en los grupos de estudio. En este sentido, si se piensa que la placenta sostiene la fisiopatología de la preeclampsia a través de un desbalance en la producción de citocinas pro y antiinflamatorias, nuestros resultados sugieren que no es así, sino que si bien existe un desbalance citocínico placentario a favor de un estado proinflamatorio, éste no se asocia con un estado inflamatorio decidual, ni con las concentraciones de las citocinas en circulación materna y umbilical.

Existen pocos estudios respecto a la expresión placentaria de moléculas de adhesión. En contraste a nuestros resultados, Goksu et al. (228), utilizando inmunohistoquímica, observaron que en preeclampsia la síntesis placentaria de ICAM-1 fue mayor que su grupo control de término; no obstante, utilizaron criterios diagnóstico distintos a los de este trabajo y su tamaño de muestra fue considerablemente menor al de nuestro estudio; no obstante, nuestro análisis comparativo tuvo en poder estadístico menor a 80%. Por otro lado, a pesar de las diferencias en el muestreo, nuestros resultados sobre VCAM-1 concuerdan con Jaakkola K et al. (229) y Tziotis J et al. (230), quienes mostraron, mediante inmunohistoquímica, que la síntesis de VCAM-1 en el lecho placentario fue similar entre preeclampsia y el grupo control.

Existen pocos trabajos sobre las concentraciones umbilicales de citocinas y moléculas de adhesión en preeclampsia. Para nuestro conocimiento, este es uno de los primeros estudios en publicar concentraciones umbilicales de IL-10 e IL-1RA en preeclampsia. No se observaron diferencias en la concentración umbilical de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, ICAM-1 y VCAM-1 entre los grupos. Tosun et al. (231), reportaron mayores niveles umbilicales de TNF- α , IL-6 e IL-8 en preeclampsia. Catarino et al. (232), no observaron diferencias en los niveles umbilicales de TNF- α e IL-6; pero, sí en los niveles de VCAM-1 siendo mayores en preeclampsia. Krauss T et al. (233), observaron que los niveles umbilicales de ICAM-1 y VCAM-1 eran similares entre el grupo con preeclampsia y el grupo control. Cabe mencionar que, en comparación con estos trabajos, el presente tuvo un mayor tamaño de muestra; sin embargo, en el análisis comparativo de las mediciones en circulación umbilical entre los grupos el poder estadístico fue menor a 80%, lo que pone de relieve la necesidad de aumentar el tamaño de muestra. Estos datos sugieren que, en la preeclampsia, no se observa un desbalance en la producción de citocinas pro y antiinflamatoria ni disfunción endotelial en la circulación umbilical y que las alteraciones a nivel placentario no se reflejan en la circulación umbilical.

Esto tiene congruencia con el hecho de que la preeclampsia se asocia con complicaciones fetales, tales como restricción del crecimiento intrauterino, trombocitopenia neonatal y displasia broncopulmonar; que se piensa resultan de la hipoxia y la isquemia placentarias, o de lo prematuro del feto, de manera que, parece que no existen complicaciones fetales de naturaleza inflamatoria sino solo aquellas derivadas de la menor disponibilidad de nutrientes y oxígeno y de la interrupción temprana del embarazo (234).

En cuanto a los tipos de preeclampsia, la expresión de IL-10 fue estadísticamente menor, mientras que los cociente IL-8/IL-10 e IL-8/IL-1RA fueron significativamente mayores en placentas de mujeres con preeclampsia temprana en comparación con placentas provenientes de pacientes con preeclampsia tardía o embarazo normal. Con respecto a los niveles maternos de IL-6 determinados en el estudio realizado paralelamente, se observó que fueron mayores en preeclampsia tardía en comparación con preeclampsia temprana y embarazo normal. Esto concuerda con la literatura en donde se propone que la preeclampsia temprana se relaciona con con alteraciones placentarias y la tardía con alteraciones maternas (120). Es importante mencionar que probablemente la falta de consenso en diversos estudios sobre la preeclampsia puede deberse a diferencias en la frecuencia de estos dos tipos en las poblaciones de estudio.

Por otro lado, la inflamación se asocia con el desarrollo de diabetes mellitus gestacional, incluso representa el puente entre diabetes gestacional y el riesgo de una futura diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular en la madre. Se ha sugerido que durante el primer y segundo trimestre, esta inflamación está principalmente sostenida por el tejido adiposo, leucocitos circulantes y células endoteliales, mientras que hacia el final del embarazo, la placenta contribuye con esta inflamación sistémica (235). En mujeres con diabetes mellitus gestacional, algunos estudios han mostrado mayores niveles de expresión génica de IL-6 y TNF, así como un mayor número de macrófagos activados en placenta de término (236-238).

En este trabajo no se observó diferencia en los niveles de expresión placentaria, en las concentraciones umbilicales de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, ICAM-1 y VCAM-1, ni de los cocientes de estudio entre los grupos de diabetes mellitus gestacional y embarazo normal. Nuestros resultados placentarios de TNF- α , IL-6, IL-8 concuerdan con los de Kleiblova, et al. (239) quienes utilizando RT-PCR cuantitativa, observaron la misma expresión génica de TNF- α , IL-6 e IL-8 entre sus grupos de diabetes gestacional y control. Para nuestro conocimiento, no hay estudios respecto a expresión placentaria de ICAM-1 y VCAM-1 en diabetes mellitus gestacional, así como de la concentración umbilical de las citocinas y moléculas de adhesión analizadas en este trabajo.

La barrera placentaria se conforma del sincitiotrofoblasto, el citotrofoblasto, mesodermo y células endoteliales de los vasos de las vellosidades (240). A lo largo del embarazo, la barrera placentaria disminuye su grosor, de manera que al final de la gestación suele ser menor de 2 μ m. Se han observado daños en el sincitiotrofoblasto y en células endoteliales de vasos de las vellosidades causados por factores isquémicos. En esta circunstancia, la barrera puede sufrir rupturas y la sangre materna puede mezclarse con la fetal causando una reacción de rechazo. Algunos estudios han reportado datos de ruptura de esta barrera en la preeclampsia (241). En este estudio, en todos los grupos, la expresión placentaria y la concentración umbilical de cada citocina y molécula de adhesión no correlacionaron entre sí. Esto se puede interpretar como que no existe influencia directa de la producción de estas moléculas en este tejido sobre la circulación umbilical, lo cual es de esperarse al considerar que la barrera placentaria está totalmente, o en su mayoría, intacta.

Las limitaciones del presente estudio son el tamaño de muestra, que requiere aumentarse para aquellas comparaciones en las que no se observó diferencia significativa, ya que el poder estadístico fue menor al 80%. Esto es particularmente necesario para el grupo de mujeres con

diabetes mellitus gestacional ya que se conformó de 25 pacientes. Otras limitantes son que no se excluyó la posibilidad de cambios postranscripcionales en la expresión placentaria, que los grupos de estudio no fueron pareados por edad gestacional y que las mujeres con preeclampsia y con diabetes mellitus gestacional tuvieron tratamiento. Debido a esto, la expresión placentaria y la concentración umbilical de los marcadores se ajustaron por edad gestacional y se observaron las mismas similitudes o diferencias, según sea el caso, lo que sugiere que éstas no fueron afectadas por dicha variable; sin embargo, hay que considerar que en otro estudio en el que se midieron concentraciones de citocinas a lo largo del embarazo (10, 18, 26 y 35 semanas de gestación) se observó que éstas varían durante la gestación (242). En este trabajo no se identificó tal efecto de la edad gestacional, debido quizá a que todas las pacientes estaban en el tercer trimestre de gestación. Muy probablemente la expresión placentaria y la concentración umbilical también varían a lo largo del embarazo.

Por otro lado, debido a que el 80% de las mujeres con preeclampsia recibieron tratamiento, se realizó el análisis en función a esta variable y no se observaron diferencias significativas, lo que sugiere que el tratamiento no influyó en los resultados; sin embargo, el poder estadístico fue menor a 80%. En contraste, otros estudios han mostrado que el sulfato de magnesio puede tener efecto en la producción placentaria de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1RA (225, 243, 244); sin embargo, el modelo utilizado podría no representar las condiciones *in vivo*, ya que cada placenta analizada se dispuso en una cámara de perfusión con solución salina y se cateterizaron la vena y las arterias placentarias y a través de la primera se realizaba la perfusión con la solución de sulfato de magnesio, la cual tenía retorno por las arterias. Por otro lado, no se sabe si la hidralazina y la alfametildopa afectan la síntesis de citocinas. A pesar de esto, este trabajo resulta relevante para el conocimiento de los mecanismos subyacentes a la preeclampsia en el tercer trimestre de gestación, planteando que el sostenimiento de la preeclampsia por

parte de la placenta no sucede a través de un desbalance en la producción de citocinas pro y antiinflamatorias.

Para tener un panorama más amplio e integral de lo que, en términos de inflamación y disfunción endotelial, sucede en la preeclampsia y en la diabetes mellitus gestacional, es necesario un estudio longitudinal con mediciones en circulación materna y en cada uno de los trimestres de gestación de citocinas pro y antiinflamatorias así como moléculas de adhesión y otros marcadores, por ejemplo, porcentaje de las distintas células del sistema inmune y marcadores de estrés oxidativo. Para el caso de las evaluaciones en la interfase feto-materna a lo largo del embarazo, y considerando que no se deben utilizar métodos invasivos de muestreo, se propone evaluar la expresión génica y la concentración de las moléculas mencionadas, e incluso el porcentaje de células inmunes, en exudado cervicovaginal, lo cual quizá represente una aproximación de lo que está sucediendo en dicha interfase.

9. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados muestran que no existe un estado proinflamatorio o de disfunción endotelial en la circulación umbilical que se asocie con la preeclampsia o la diabetes mellitus gestacional. Solo en la preeclampsia se observa un estado placentario proinflamatorio. En ninguna de estas patologías existe relación entre los niveles de expresión placentaria y las concentraciones umbilicales de citocinas y moléculas de adhesión.

10. REFERENCIAS

1. Meads CA, Cnossen JS, Meher S, et al. Methods of prediction and prevention of preeclampsia: systematic reviews of accuracy and effectiveness literature with economic modelling. *Health Technol Assess.* 2008;12:1-270.
2. Osmond C, Kajantie E, Forsén TJ, et al. Infant growth and stroke in adult life: the Helsinki Birth Cohort Study. *Stroke* 2007; 38:264–270.
3. Eriksson JG, Forsén T, Tuomiheto J, et al. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ* 2001; 322:949–953.
4. Barker DJ, Martyn CN, Osmond C, et al. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *BMJ* 1993; 307:1524–1527.
5. Catalano PM, Kirwan JP, Haugel-de Mouzon S, et al. Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus. *J Nutr* 2003;133: 1674–1683.
6. Zhang S, Haiyan L, Shuangbo K, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med* 2013;34:939-980.
7. Hernández M, Valencia J, Ríos B, et al. Elementos de la implantación y placentación, aspectos clínicos y moleculares. *Reproducción* 2014; 7:102-116.
8. Sato Y, Higuchi T, Yoshioka S, et al. Trophoblasts acquire a chemokine receptor, CCR1, as they differentiate towards invasive phenotype. *Development* 2003;130:5519–5532.
9. Laresgoiti E, Gómez N, Olson DM. An immunological insight into the origins of preeclampsia. *Hum Reprod Update* 2010;16:510–524.
10. Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, et al. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* 1998;291:133–148.
11. Bai SX, Wang YL, Qin L, et al. Dynamic expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, -9, and -14) and the tissue inhibitors of MMPs (TIMP-1, -2, and -3) at the implantation site during tubal pregnancy. *Reproduction* 2005;129:103–113.

12. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman C. NK cells and human pregnancy – an inflammatory view. *Trends Immunol* 2006;27:399-404
13. Pantham P, Askelund KJ, Chamley LW. Trophoblast deportation part II: A review of maternal consequences of trophoblast deportation. *Placenta* 2011 32:724-731.
14. Apps R, Murphy SP, Fernando R, et al. Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allo-type specificities of anti-HLA antibodies. *Immunology* 2009;127:26-39.
15. Solier C, Aguerre M, Lenfant F, et al. Secretion of pro-apoptotic intron 4-retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast. *Eur J Immunol* 2002;32:3576-3586.
16. Trowsdale J, Betz AG. Mother's little helpers: Mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol* 2006;7:241-246.
17. Geiselhart A, Dietl J, Marzusch K, et al. Comparative analysis of the immunophenotypes of decidual and peripheral blood large granular lymphocytes and T cells during early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1995;33:315-322.
18. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000;6:28-36.
19. Higuma S, Sasaki Y, Miyazaki S, et al. Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2005;54:21-29.
20. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset. *Blood* 2001;97:3146-3151.
21. Kopcow HD, Allan DS, Chen X, et al. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:15563-15568.
22. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* 2006;118:1-10.
23. Le Bouteiller P, Tabiasco J, Polgar B, et al. CD160: a unique activating NK cell receptor. *Immunol Lett* 2011;138:170-175.

24. Le Bouteiller P, Barakonyi A, Giustiniani J, et al. Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16963–16968.
25. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 2004;23:255-259.
26. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 2001;19:291-330.
27. Haller H, Radillo O, Rukavina D, et al. An immunohistochemical study of leucocytes in human endometrium, first and third trimester basal decidua. *J Reprod Immunol* 1993;23:41-49.
28. Hanna J, Goldman D, Hamani Y, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006;12:1065-1074.
29. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, et al. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J* 2005;19:681–693.
30. Ishitani A, Sageshima N, Lee N, et al. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol* 2003;171:1376–1384.
31. Soderstrom K, Corliss B, Lanier L, et al. CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells. *J Immunol* 1997;159:1072–1075.
32. Rajagopalan S, Long EO. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 1999;189:1093-1100.
33. Chumbley G, King A, Robertson K, et al. Resistance of HLA-G and HLA-A2 transfectants to lysis by decidual NK cells. *Cellular Immunol* 1994;155:312-322.

34. Rouas N, Marchal RE, Kirszenbaum M, et al. The alpha 1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5249-5254.
35. Chen LJ, Han ZQ, Zhou H, et al. Inhibition of HLA-G expression via RNAi abolishes resistance of extravillous trophoblast cell line TEV-1 to NK lysis. *Placenta* 2010;31:519-527.
36. Cantoni C, Verdiani S, Falco M, et al. A putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur J Immunol* 1998;28:1980-1990.
37. Colonna M, Navarro F, Bellon T, et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1997;186:1809-1818.
38. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. NK cells and pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 2007;76:40-44.
39. Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, et al. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol* 2006;4:e9.
40. van der Meer A, Lukassen HG, van Cranenbroek B, et al. Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells. *Mol Hum Reprod* 2007;13:123-133.
41. Hiby S, Walker J, O'Shaughnessy K, et al. Combination of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004;200:957-965
42. Peritt D, Robertson S, Gri G, et al. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* 1998;161:5821-5824.
43. Deniz G, Akdis M, Aktas E, et al. Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN- γ -secreting and IFN- γ -nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol* 2002;32:879-884.

44. Kwak JY, Gilman A, Kim CE. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. *Chem Immunol Allergy* 2005;88:64–79.
45. Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2003;59:161-173.
46. Borzychowski AM, Croy BA, Chan WL, et al. 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.
47. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 2013;229:176–185.
48. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122:787–795.
49. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953–964.
50. Ziegler L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116:e74–80.
51. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, et al. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991;6:791-798.
52. Rieger L, Honig A, Sutterlin M, et al. Antigen-presenting cells in human endometrium during the menstrual cycle compared to early pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:488-493.
53. Gustafsson C, Mjosberg J, Matussek A, et al. Gene expression profiling of human decidual macrophages: evidence for immunosuppressive phenotype. *PLoS One* 2008;3:e2078.
54. Heikkinen J, Mottonen M, Komi J, et al. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunol* 2003;131:498–505.

55. Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, et al. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am J Pathol* 2009;174:1959–1971.
56. Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, et al. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2004;51:275-282.
57. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2002;109:41-50.
58. Abumaree MH, Chamley LW, Badri M, et al. Trophoblast debris modulates the expression of immune proteins in macrophages: a key to maternal tolerance of the fetal allograft? *J Reprod Immunol* 2012;94:131-141.
59. Naccasha N, Gervasi MT, Chaiworapongsa T, et al. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in normal pregnancy and maternal infection. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:1118–1123.
60. Luppi P, Haluszczak C, Betters D, et al. Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women. *J Leukoc Biol* 2002;72:874–884.
61. Sacks GP, Studena K, Sargent IL, et al. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:80-86.
62. Redman CW, Tannetta DS, Dragovic RA, et al. Review: does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* 2012;33:S48–S54.
63. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:705–708.
64. Faas MM, van Pampus MG, Anninga ZA, et al. Plasma from preeclamptic women activates endothelial cells via mono-cyte activation in vitro. *J Reprod Immunol* 2010;87:28–38.

65. Erlebacher A, Vencato D, Price KA, et al. Constraints in antigen presentation severely restrict T cell recognition of the allogeneic fetus. *J Clin Invest* 2007;117:1399–411.
66. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1219-1226.
67. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002;23:445-449.
68. Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 2006;108:1435-1440.
69. Ban YL, Kong BH, Qu X, et al. BDCA-1C, BDCA-2C and BDCA-3C dendritic cells in early human pregnancy decidua. *Clin Exp Immunol* 2008;151:399–406.
70. Gardner L, Moffett A. Dendritic cells in the human decidua. *Biol Reprod* 2003;69:1438–1446.
71. Miyazaki S, Tsuda H, Sakai M, et al. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *J Leukoc Biol* 2003;74:514–522.
72. Apps R, Gardner L, Sharkey AM, et al. A homodimeric complex of HLA-G on normal trophoblast cells modulates antigen-presenting cells via LILRB1. *Eur J Immunol* 2007;37:1924-1937.
73. Lee HM, Bautista JL, Hsieh CS. Thymic and peripheral differentiation of regulatory T cells. *Adv Immunol* 2011;112:25–71.
74. Akimova T, Beier UH, Wang L, et al. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* 2011;6:e24226
75. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2012;188:976–980.

76. Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, et al. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol* 2004;136:373–378.
77. Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, et al. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells from the peripheral blood to the deciduas in human pregnancy. *J Immunol* 2008;180:5737–5745.
78. Kahn DA, Baltimore D. Pregnancy induces a fetal antigen-specific maternal T regulatory cell response that contributes to tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:9299–9304.
79. Rowe JH, Ertelt JM, Xin L, et al. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature* 2012;490:102–106.
80. Hsu P, Santner B, Dahlstrom J, et al. Altered decidual DC-SIGNC antigen presenting cells and impaired regulatory T cell induction in preeclampsia. *Am J Pathol* 2012;181:2149–2160.
81. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009;30:626–635.
82. Yadav M, Stephan S, Bluestone JA. Peripherally induced tregs – role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front Immunol* 2013;4:232.
83. Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T Cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol* 2012;30:733–758.
84. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, et al. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25⁺CD4⁺ regulatory T-cell subset. *Immunology* 2004;112:38–43.
85. Santner B, Peek MJ, Khanam R, et al. Systemic increase in the ratio between Foxp3⁺ and IL-17-producing CD4⁺ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol* 2009;183:7023–7030.
86. Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S, et al. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell compartment. *J Immunol* 2004;173:2227–2230.

87. Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485–517.
88. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, et al. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24:677–688.
89. Kimura A, Kishimoto T. IL 6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 2010;40:1830–1835.
90. 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.
91. Hatton RD. TGF-beta in Th17 cell development: the truth is out there. *Immunity* 2011;34:288–290.
92. Mjosberg J, Berg G, Jenmalm MC, et al. FOXP3C regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biol Reprod* 2010;82:698–705.
93. Nakashima A, Ito M, Yoneda S, et al. Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:104–109.
94. Nadeau-Vallée M, Obari D, Palacios J, et al. Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *Reproduction* 2016;152;R277-R292.
95. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, et al. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* 2009;16:206-215.
96. Orsi NM, Tribe RM. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol.* 2008;20:462-469.
97. Pober JS, Sess WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007;7:803-815.

98. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990;50:537–544.
99. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 2004;84:869–901.
100. Ley K, C Laudanna, MI Cybulsky, et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7:678-689.
101. King JC. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1218S-1225S.
102. Phelps RL, Bergenstal R, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. Relationships between plasma insulin and proinsulin during late pregnancy in normal and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;41:1085-1091.
103. Ryan EA, O’Sullivan MJ, Skyler JS. Insulin action during pregnancy: studies with the euglycemic glucose clamp technique. *Diabetes* 1985;34:380-389.
104. Aerts L, Van Assche FA. Ultrastructural changes of the endocrine pancreas in pregnant rats. *Diabetologia* 1975;11:285-289.
105. Van Assche FA, Aerts L, De Prins FA. A morphological study on the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1978;85:818-820.
106. Hubinot CJ, Dufrane SP, Malaisse WJ. Effect of pregnancy upon the activity of protein kinase A and C in rat pancreatic islets. *Horm Metab Res* 1985;17:104
107. Ciraldi TP, Kettel M, El-Roeiy A. Mechanisms of cellular insulin resistance in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:635-641.
108. Ryan EA, Enns L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:341-347.

109. Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, et al. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islets B-cells division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islets function during pregnancy. *Endocrinology* 1993;132:879-887.
110. Beck P, Daughaday WH. Human placental lactogen: studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man. *J Clin Invest* 1967;46:103-110.
111. Barbour LA, Shao J, Qiao L, et al. Human placental growth hormone causes severe insulin resistance in transgenic mice. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:512-517.
112. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1667-1672.
113. Bergman RN. Toward a physiological understanding of glucose tolerance: minimal model approach. *Diabetes* 1989;38:1512-1527.
114. Sánchez-Muñoz F, García-Macedo R, Alarcón-Aguilar F, et al. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gac Med Mex* 2005;141:505-12.
115. Ategbo JM, Grissa O, Yessoufou A, et al. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4137-4143.
116. Winzer C, Wagner O, Festa A, et al. Plasma adiponectin, insulin sensitivity, and subclinical inflammation in women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004;27:1721–1727.
117. American College of Obstetricians and Gynecologists Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013;122:1122–1131.
118. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens* 2014; 4:97–104.
119. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la Preeclampsia en segundo y tercer nivel de atención, Instituto Mexicano del Seguro Social. Evidencias y recomendaciones. Catálogo

maestro de guías de práctica clínica: IMSS-020-08. Consultado en junio 2018. Disponible en <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/020GER.pdf>

120. Raymond D, Peterson E. A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv* 2011;66:497-506.

121. von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2003;22:143–148.

122. Obed SA, Aniteye P. Birth weight and ponderal index in preeclampsia: a comparative study. *Ghana Medical J* 2006;40:8–13.

123. Ihle BU, Long P, Oats J. Early onset preeclampsia: recognition of underlying renal disease. *Br Med J* 1987;294:79–81.

124. Onah HE, Iloabachie GC. Conserative management of early-onset preeclampsia and fetomaternal outcome in Nigeria. *J Obstet Gynaecol* 2002;22:357–362.

125. Crispi F, Llurba E, Dominguez C, et al. Predictive value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early- versus late-onset preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;31:303–309.

126. Dissanayake VH, Samarasinghe HD, Morgan L, et al. Morbidity and mortality associated with preeclampsia at two tertiary care hospitals in Sri Lanka. *J Obstet Gynaecol Res* 2007;33:56–62.

127. Maternal mortality in 2005. Estimates developed by WHO, UNICEF, UNFPA and The World Bank. World Health Organization, 2007.

128. Trends in MMR from 1990 to 2015. Trends in Maternal Mortality: 1990 to 2015. World Health Organization, 2015: 22-24.

129. Observatorio de Mortalidad Materna. Consultado el 22 de mayo del 2017. www.omm.org.mx/index.php/indicadores-nacionales/numeralias-de-mortalidad-materna

130. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Consultado en noviembre del 2017. www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/

131. Khan KS, Wojdyla D, Say L, et al. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006;367:1066-1074.

132. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 2009;33:130-137.
133. Hansen JP. Older maternal age and pregnancy outcome: a review of the literature. *Obstet Gynecol Surv* 1986;41:726-742
134. Zhang J, Zeisler J, HatchMC, et al. Epidemiology of pregnancy-induced hypertension. *Epidemiol Rev* 1997;19:218-232.
135. Mabie W, Pernoll M, Biswas M. Chronic hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 1986;67:197-205
136. Moutquin J, Rainville C, Giroux L. A prospective study of blood pressure in pregnancy: prediction of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1985;151:191-196.
137. Garner P, D'Alton M, Dudley D, et al. Preeclampsia in diabetic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163:505-508.
138. Siddiqi T, Rosenn B, Mimouni F, et al. Hypertension during pregnancy in insulin-dependent diabetic women. *Obstet Gynecol* 1991;77:514-519.
139. Sibai B, Ewell M, Levine R. Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1003-1010.
140. Bodnar LM, Catov JM, Klebanoff MA, et al. Prepregnancy body mass index and the occurrence of severe hypertensive disorders of pregnancy. *Epidemiology* 2007;18: 234-239.
141. Carr DB, Epplein M, Johnson CO, et al. A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:965-972.
142. Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, et al. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N Engl J Med* 2001;344:867-872.
143. Zhang J, Zeisler J, Hatch MC, et al. Epidemiology of pregnancy-induced hypertension. *Epidemiol Rev* 1997; 19:218-232.

144. Thomson A, Billewicz W. Clinical significance of weight trends during pregnancy. *BMJ* 1957;1:243-247.
145. Redman C. Immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol* 1991;15:257-262.
146. Li DK, Wi S. Changing paternity and the risk of preeclampsia/eclampsia in the subsequent pregnancy. *Am J Epidemiol* 2000;151:57-62.
147. Robillard P, Hulsey T, Perianin J, et al. Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet* 1994;344:973-975.
148. Klonoff-Cohen H, Savitz D, Cefalo R, et al. An epidemiologic study of contraception and preeclampsia. *JAMA* 1989;262:3143-3147.
149. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:656-663.
150. Steegers E, Von Dadelszen P, Duvekot JJ, et al. Pre-eclampsia. *Lancet* 2010;376:631-644.
151. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension* 2008;51:970-975.
152. Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, et al. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4299-308.
153. Valencia-Ortega J, Zárate A, Saucedo R, et al. Implicaciones clínicas de la investigación básica de la preeclampsia: tolerancia inmunológica. *Ginecol Obstet Mex* 2015;83:505-514.
154. Collins T, Read M, Neish A, et al. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *Faseb J* 1995;9:899-909.
155. Yency H, Jeanne-Marie K, Brian ES, et al. E-Selectin dependent signaling via the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular endothelial cells. *J Immunol* 2000; 165:2142-2148.
156. Poston L. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Pharmacol Rep* 2006;58:69-74.
157. Granger J, Alexander B, Llinas M, et al. Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation* 2002;9:147-160.
158. Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract* 2013;22:8-19.

159. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Rev Immunol* 2007;7:803-815.
160. Catarino C, Santos-Silva A, Belo L, et al. Inflammatory disturbances in preeclampsia: relationship between maternal and umbilical cord blood. *J Pregnancy* 2012;2012:684384.
161. Goldman DS, Ariel I, Greenfield C, et al. Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2000;6:88-95.
162. O'Brien M, McCarthy T, Jenkins D, et al. Altered HLA-G transcription in pre-eclampsia is associated with allele specific inheritance: possible role of the HLA-G gene in susceptibility to the disease. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1943-1949.
163. Hylenius S, Andersen AM, Melbye M, et al. Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. *Mol Hum Reprod* 2004;10:237-246.
164. Zhang Z, Li Y, Zhang LL, et al. Association of 14 bp insertion/deletion polymorphism of the HLA G gene in father with severe preeclampsia in Chinese. *Tissue Antigens* 2012;80:158–164.
165. Loisel DA, Billstrand C, Murray K, et al. The maternal HLA-G 1597 Δ C null mutation is associated with increased risk of pre-eclampsia and reduced HLA-G expression during pregnancy in African-american women. *Mol Hum Reprod* 2013;19:144-152.
166. Vianna P, Dalmaz CA, Veit TD, et al. Immunogenetics of pregnancy: role of a 14 bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic brazilian women. *Hum Immunol* 2007;68:668-674.
167. Iversen AC, Nguyen OT, Tommerdal LF, et al. The HLA G14 bp gene polymorphism and decidual HLA-G 14bp gene expression in pre-eclamptic and normal pregnancies. *J Reprod Immunol* 2008;78:158-165.

168. Sageshima N, Ishitani A, Omura M, et al. Necrotic feature of the trophoblasts lacking HLA-G expression in normal and preeclamptic placentas. *Am J Reprod Immunol* 2003;49:174-182.
169. Yie SM, Taylor RN, Librach C. Low plasma HLA-G protein concentrations in early gestation indicate the development of preeclampsia later in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:204-208.
170. Darmochwal-Kolarz D, Kolarz B, Rolinski J, et al. The concentration of soluble HLA-G protein are elevated during mid-gestation and decreased in pre-eclampsia. *Folia Histochem Cytobiol* 2012;50:286-291
171. Schonkeren D, van der Hoorn M, Khedoe P, et al. Differential distribution and phenotype of decidual macrophages in preeclamptic versus control pregnancies. *Am J Pathol* 2011;178:709-717.
172. Rieger L, Segerer S, Bernar T, et al. Specific subsets of immune cells in human decidua differ between normal pregnancy and preeclampsia - a prospective observational study. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:132.
173. Yui J, Garcia M, Wegmann TG, et al. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994;15:819-835.
174. Young BC, Wylie BJ. Effects of twin gestation on maternal morbidity. *Semin Perinatol* 2012;36:162-168.
175. Mellembakken JR, Aukrust P, Olafsen MK, et al. Activation of leukocytes during the uteroplacental passage in preeclampsia. *Hypertension* 2002;39:155-160.
176. Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Pacora P, et al. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:792-797.
177. Luppi P, Tse H, Lain KY, et al. Preeclampsia activates circulating immune cells with engagement of the NF-kappaB pathway. *Am J Reprod Immunol* 2006;56:135-144.

178. Sacks GP, Redman CWG, Sargent IL. Monocytes are primed to produce the Th1 type cytokine IL-12 in normal human pregnancy: an intracellular flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 2003;131:490–497.
179. Sakai M, Tsuda H, Tanebe K, et al. Interleukin-12 secretion by peripheral blood mononuclear cells is decreased in normal pregnant subjects and increased in preeclamptic patients. *Am J Reprod Immunol* 2002;47:91–97.
180. Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007;57:177–185.
181. van Nieuwenhoven AL, Moes H, Heineman MJ, et al. Cytokine production by monocytes, NK cells and lymphocytes is different in preeclamptic patients as compared with normal pregnant women. *Hypertens Pregnancy* 2008;27:207–224.
182. Brewster JA, Orsi NM, Gopichandran N, et al. Host inflammatory response profiling in preeclampsia using an in vitro whole blood stimulation model. *Hypertens Pregnancy* 2008;27:1–16.
183. Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta* 2000;21:597–602.
184. Steinberg G, Khankin EV, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Thromb Res* 2009;123:S93–S99.
185. Spaans F, Vos PD, Bakker WW, et al. Danger signals from ATP and adenosine in pregnancy and preeclampsia. *Hypertension* 2014;63:1154–1160.
186. Huang SJ, Chen CP, Schatz F, et al. Pre-eclampsia is associated with dendritic cell recruitment into the uterine decidua. *J Pathol* 2008;214:328–336.
187. Scholz C, Toth B, Santoso L, et al. Distribution and maturity of dendritic cells in diseases of insufficient placentation. *Am J Reprod Immunol* 2008;60:238–245.

188. Samstein R, Josefowicz S, Arvey A, et al. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 2012;150:29-38.
189. Toldi G, Rigo J, Stenczer B, et al. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2011;66:223–229.
190. Darmochwal D, Kludka M, Tabarkiewicz J, et al. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2012;93:75–81.
191. Sharma A, Satyam A, Sharma JB. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 2007;58:21–30.
192. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in Diabetes 2018. *Diabetes Care* 2018;41:S13-S27.
193. Carpenter MW, Coustan DR. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1982;144:768–773.
194. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;28:1039-1057.
195. Contreras SJ, Forsbach G, Vazquez RJ, et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and pregnancy in Mexico. *Int J Gynaecol Obstet* 1991;34: 205-210.
196. Forsbach G, Contreras J, Fong G, et al. Prevalence of gestational diabetes and macrosomic newborns in a Mexican population. *Diabetes Care* 1998;11:235-238.
197. Meza E, Barraza L, Martínez G, et al. Gestational diabetes in a Mexican-U.S. border population: Prevalence and epidemiology. *Rev Inv Clin* 1995;47:433-438.
198. Kuhl C. Etiology and pathogenesis of gestational diabetes. *Diabetes Care* 1998;21:B19-B26.
199. Bellamy L, Casa JP, Hingorani AD, et al. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2009;373:1773-1779.

200. Retnakaran R. Glucose tolerance status in pregnancy: A window to the future risk of diabetes and cardiovascular disease in young women. *Curr Diabetes Rev* 2009;5:239-244.
201. Chiefari E, Arcidiacono B, Foti D, et al. Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *J Endocrinol Invest* 2017;40:899-909.
202. Sánchez-Muñoz F, García-Macedo R, Alarcón-Aguilar F, et al. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gac Med Mex* 2005;141:505-12.
203. Ategbo JM, Grissa O, Yessoufou A, et al. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4137-4143.
204. Winzer C, Wagner O, Festa A, et al. Plasma adiponectin, insulin sensitivity, and subclinical inflammation in women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27:1721–1727.
205. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665–668.
206. Ballak DB, Stienstra R, Tack CJ, et al. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine* 2015;75:280-290.
207. Garvey WT, Maianu L, Hancock JA, et al. Gene expression of GLUT4 in skeletal muscle from insulin resistant patients with obesity, IGT, GDM, and NIDDM. *Diabetes* 1992;41:465-475.
208. Sáez T, de Vos P, Sobrevia L, et al. Is there a role for exosomes in foetoplacental endothelial dysfunction in gestational diabetes mellitus? *Placenta* 2018;61:48-54.
209. Ryan EA, Enns L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:341-347.
210. Handwerger S, Freemark M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:343-356.
211. Scioscia M, Gumaa K, Rademacher TW. The link between insulin resistance and preeclampsia: new perspectives. *J Reprod Immunol* 2009;82:100-105

212. Redman CW, Sargent IL. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response—a review. *Placenta* 2003;24:S21–S27.
213. Lekva T, Norwitz ER, Aukrust P, et al. Impact of systemic inflammation on the progression of gestational diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2016;16:26
214. Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, et al. Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol* 2008;79:50-57
215. Norman JE, Bollapragada S, Yuan M, et al. Inflammatory pathways in the mechanism of parturition. *BMC Pregnancy Childbirth* 2007;1;7 Suppl 1:S7
216. Pinheiro MB, Martins-Filho OA, Mota AP, et al. Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine* 2013;62:165-173
217. Dong M, He J, Wang Z, et al. Placental imbalance of Th1- and Th2-type cytokines in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84:788-793.
218. Marusic J, Prusac IK, Tomas SZ, et al. Expression of inflammatory cytokines in placentas from pregnancy complicated with preeclampsia and HELLP syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26:680-685
219. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, et al. Expression of Inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2505-2512
220. Weel IC, Baergen RN, Romão-Veiga M, et al. Association between placental lesions, cytokines and angiogenic factors in pregnant women with preeclampsia. *PLoS One* 2016;11:1-15.
221. Sun L, Mao D, Cai Y, et al. Association between higher expression of interleukin-8 (IL-8) and haplotype -353A/-251A/+678T of IL-8 gene with preeclampsia. *Medicine* 2016;95:1-6.
222. Makris A, Xu B, Yu B, et al. Placental Deficiency of Interleukin10 (IL10) in preeclampsia and its relationship to an IL10 promoter polymorphism. *Placenta* 2006;27:445-45.
223. Wang P, Wu P, Anthes JC, et al. Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood* 1994;83:2678-2683.

224. Wang P, Wu P, Siegel MI, et al. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995;270:9558-9563.
225. Amash A, Holcberg G, Sapir O, et al. Placental secretion of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in preeclampsia: effect of magnesium sulfate. *J Interferon Cytokine Res* 2012;32:432-441.
226. Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol* 1995;17:103-108.
227. Valencia-Ortega J, Zárate A, Saucedo R, et al. Placental proinflammatory state and maternal endothelial dysfunction in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2018;13:1-8.
228. Goksu AY, Nazli M, Elis S. Significance of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expressions in preeclamptic placentae. *Endocrine* 2012;42:125-131.
229. Jaakkola K, Jokimaa V, Kallajoki M, et al. Pre-eclampsia does not change the adhesion molecule status in the placental bed. *Placenta* 2000;21:133-141.
230. Tziotis J, Malamitsi-Puchner A, Vlachos G, et al. Adhesion molecules expression in the placental bed of pregnancy with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 2002;109:197-201.
231. Tosun M, Celik H, Avci B, et al. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in normal pregnancy and in pregnancy complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010;23:880-886.
232. Catarino C, Santos-Silva A, Belo L, et al. Inflammatory disturbances in preeclampsia: relationship between maternal and umbilical cord blood. *J Pregnancy* 2012;2012:684384.
233. Krauss T, Azab H, Dietrich M, et al. Fetal plasma levels of circulating endothelial cell adhesion molecules in normal and preeclamptic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;78:41-45.
234. Backes CH, Markham K, Moorehead P, et al. Maternal preeclampsia and neonatal outcomes. *J Pregnancy* 2011;2011:214365.
235. Lekva T, Norwitz ER, Aukrust P, et al. Impact of systemic inflammation on the progression of gestational diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2016;16:26

236. Mrizak I, Grissa O, Henault B, et al. Placental infiltration of inflammatory markers in gestational diabetic women. *Gen Physiol Biophys* 2014;33:169–76.
237. Yu J, Zhou Y, Gui J, et al. Assessment of the number and function of macrophages in the placenta of gestational diabetes mellitus patients. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2013;33:725–729.
238. Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P, et al. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory path-ways. *Diabetes* 2003;52:2951–2958.
239. Kleiblova P, Dostalova I, Bartlova M, et al. Expression of adipokines and estrogen receptors in adipose tissue and placenta of patients with gestational diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol* 2010;314:150-156.
240. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology* 2009;24:147-158.
241. de Luca Brunori I, Battini L, Brunori E, et al. Placental barrier breakage in preeclampsia: ultrastructural evidence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;118:182-189.
242. Ferguson KK, Meeker JD, McElrath TM, et al. Repeated measures of inflammation and oxidative stress biomarkers in preeclamptic and normotensive pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2017;216:527.
243. Amash A, Weintraub AY, Sheiner E, et al. Possible therapeutic effect of magnesium sulfate in preeclampsia by the down-regulation of placental tumor necrosis factor-alpha secretion. *Eur Cytokine Netw* 2010;21:58-64.
244. Amash A, Holcberg G, Sheiner E, et al. Magnesium sulfate normalizes placental interleukin-6 secretion in preeclampsia. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30:683-690.

11. DERIVADOS DE LA TESIS

Artículos:

Valencia-Ortega J, Zárate A, Saucedo R, et al. Placental proinflammatory state and maternal endothelial dysfunction in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2018; 13:1-8.

Saucedo R, **Valencia J**, Gutiérrez C, et al. Gene variants in the FTO gene are associated with adiponectin and TNF-alpha levels in gestational diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 2017; 9:32.

Valencia J, Zárate A, Saucedo R, et al. Implicaciones clínicas de la investigación básica de la preeclampsia: tolerancia inmunológica. *Ginecol Obstet Mex* 2015; 83:505-514.

Zárate A, Saucedo R, **Valencia J**, et al. Early disturbed ischemia and hipoxia creates immune alteration and vascular disorder causing preeclampsia. *Arch Med Res* 2014; 45: 519-524.

Hernández M, **Valencia J**, Ríos B, et al. Elementos de la implantación y placentación, aspectos clínicos y moleculares. *Reproducción* 2014; 7:102-116.

Capítulos en libros:

Renata Saucedo, **Jorge Valencia**, Claudia Gutiérrez, et al. The retinol binding protein-4 (RBP4) gene and gestational diabetes. *Nutrition and Diet in Maternal Diabetes*. Humana Press, 2018.

Renata Saucedo, **Jorge Valencia**, Claudia Gutiérrez, et al. The role of leptin in gestational diabetes mellitus. *Leptin: production, regulation and functions*. Nova Science Publishers, 2017.

Renata Saucedo, **Jorge Valencia**, María Isabel Peña-Cano, et al. Breastfeeding and gestational diabetes. *Gestational diabetes*. IntechOpen, 2018.

12. ANEXOS

Anexo 1. Extracción y purificación de RNA total de placenta.

1. Previo a la extracción de RNA, las muestras se descongelaron y homogenizaron por completo utilizando un micro homogenizador.
2. El tejido homegenizado se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml para su centrifugación a 12,000 x g durante 10 minutos a 4 °C.
3. Se recolectó 600 µl del sobrenadante y se transfirieron a un nuevo tubo.
4. Se le añadieron 600 µl de etanol (1:1) y se mezclaron vigorosamente.
5. Se transfirieron 800 µl de esta mezcla a una columna Zymo-Spin™ IIC con su respectivo tubo colector. Se centrifugaron 30 s a 16,000 x g (en adelante, todas las centrifugaciones son en estas condiciones a menos que se indique lo contrario) y se transfirió la columna a un tubo recolector nuevo.
6. Se realizó el tratamiento con DNasa
 - Se adicionaron directamente 400 µl de solución amortiguadora de lavado de RNA a la columna y se centrifugó. Se decantó el tubo colector
 - Se añadió una mezcla de 5 µl de DNasa reconstituida con 75 µl de solución amortiguadora de digestión de DNA y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 30 s. Se decantó el tubo colector.
 - Se adicionaron a la columna 400 µl de la solución de prelavado y se centrifugó. Se decantó el tubo colector. Este paso se repitió una vez más.
7. Se adicionaron 700 µl de solución amortiguadora de lavado de RNA. Se centrifugó durante 2 min. Se transfirió la columna a un tubo nuevo libre de nucleasas.
8. Por último, se adicionaron directamente a la columna matriz 15 µl de agua libre de nucleasas y se centrifugó 1 min.

Se procedió a la cuantificación y evaluación de la integridad del RNA.

Cuantificación del RNA

La cuantificación y determinación de la pureza se realizó por espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000 utilizando 1 µl de RNA.

Integridad del RNA

La integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa con la metodología descrita a continuación:

1. Se preparó el gel de agarosa al 1.5%, pesando 0.75 g de agarosa y disolviéndola en 50 ml de solución TAE (calentando para disolver completamente).
2. A esta solución se le agregaron 2 μ l de Bromuro de Etidio (BrEt).
3. Antes de que la solución gelificara completamente se vertió en la cámara de electroforesis y con ayuda de un peine se hicieron de los pozos.
4. Una vez que el gel solidificó, se procedió a cargar en los pozos una mezcla de 1 μ l de solución de carga más 3 μ l de muestra de RNA.
5. Se separó la muestra en el gel durante 15 minutos aproximadamente.
6. Posteriormente, se utilizó el fotodocumentador Gel Doc XR+(Bio-Rad) para visualizar el RNA teñido y así verificar su integridad.

Anexo 2. Retrotranscripción

La retrotranscripción se realizó en el termociclador Veriti (Applied Biosystems) con las cantidades mostradas en la tabla anexa 1. Se realizó la reacción 1 y, una vez terminada, se procedió a la segunda reacción. Al finalizar la retrotranscripción, las muestras de cDNA obtenidas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Tabla anexa 1. Reactivos para la retrotranscripción.

Reacciones de la Retrotranscripción	
Reacción 1	
<ul style="list-style-type: none">• 1 μg RNA (6 μl de muestra)• 1 μl Primer (oligo dT)• 1 μl Annealing buffer	} <i>65 °C x 5 min</i>
Reacción 2	
<ul style="list-style-type: none">• 10 μl 2x First-Strand Reaction Mix• 2 μl Super script^R III/Rnase OUTTM enzyme Mix	} <i>50 °C x 50 min</i> <i>85 °C x 5 min</i>

Anexo 3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

La reacción de la PCR-tiempo real se realizó en el equipo StepOnePlus (Applied Biosystems) preparando la placa de PCR con los reactivos, muestras y ensayos Taqman de interés (tabla anexa 2). Las muestras se procesaron por triplicado.

Tabla anexa 2. Reactivos para PCR-tiempo real.

Reacción
<ul style="list-style-type: none">• 10 µl de master mix• 1 µl de ensayo TaqMan• 7 µl de agua libre de nucleasas• 2 µl de cDNA (100 ng)
20 µl volumen total de la reacción

Las condiciones fueron las siguientes:

Etapas	Configuración
Hold (UNG)	50 °C x 2 min
Hold	95 °C x 10 min
Ciclo (40 ciclos)	95 °C x 15 s 60 °C x 1 min

Se obtuvieron los Ct de cada gen de interés y se procedió al análisis $2^{-\Delta Ct}$.

Anexo 4. Ensayos de detección multianalito de las citocinas TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1RA.

1. Las muestras se descongelaron completamente, se mezclaron (con pipeta) y se centrifugaron a 14,000 x g durante 10 min a 4 °C.
2. Se reconstituyeron los dos estándares con 500 μ l de diluyente de ensayo y se mezclaron para generar un volumen total de 1 mL. Con este estándar se realizaron una serie de diluciones 1:3 para generar los otros 6 puntos de la curva, siendo el diluyente la solución considerada como blanco.
3. El frasco con 1X perlas con anticuerpos se homogenizó mediante vortex durante 30 s y se sonicó 30 s antes de uso. Se adicionaron 25 μ l de 1X perlas con anticuerpos en cada uno de los 96 pozos de la placa. Siempre se protegió de la luz la placa con perlas.
4. Se realizaron dos lavados con 200 μ l de solución de lavado 1X. Importante el uso del separador magnético en todo lavado. Todos los lavados son iguales.
5. Se adicionaron 25 μ l de solución de incubación en cada pozo.
6. Se adicionaron 50 μ l de los estándares diluidos en cada pozo asignado a los estándares.
7. Se adicionaron 50 μ l del blanco en los pozos asignados.
8. Se adicionaron 25 μ l de diluyente de ensayo seguido de 25 μ l de la muestra en los pozos asignados a las muestras
9. Se cubrió la placa con una película adhesiva y se incubó por 2 h a temperatura ambiente sobre un agitador orbital en función.
10. Posteriormente se decantó la placa y se realizaron dos lavados.
11. Se adicionaron 50 μ l de 1X anticuerpo detector biotinilado a cada pozo. Se cubrió nuevamente la placa y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente sobre un agitador orbital en función.
12. Se decantó la placa y se realizaron dos lavados.
13. Se adicionó 50 μ l de 1X solución de estreptavidina-ficoeritrina a cada pozo. Se cubrió nuevamente la placa y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente sobre un agitador orbital en función.
14. Se decantó la placa y se lavó tres veces.
15. Se adicionó 150 μ l de solución de lavado en cada pozo, se cubrió la placa, se agitó 3 min y se procedió al análisis en el equipo MAGPIX.

Anexo 5. ELISA para la cuantificación de ICAM-1.

1. Las muestras se descongelaron completamente, se mezclaron (con pipeta) y se diluyeron 1:20 con el diluyente calibrador.
2. Se reconstituyó el estándar con 1 ml de agua destilada. Se tomaron 40 μ l del estándar reconstituido y se le adicionaron 900 μ l de diluyente calibrador para crear el primer punto de la curva. Con éste, se realizaron una serie de diluciones 1:2 para generar los otros 6 puntos de la curva. El blanco fue el diluyente calibrador.
3. Se adicionaron 100 μ l de estándares, blancos y muestras según la configuración de la placa de 96 pozos. Se cubrió la placa con una película adhesiva y se incubó por 1 h a temperatura ambiente sobre un agitador orbital en función.
4. Se decantó la placa y se realizaron cuatro lavados con 400 μ l de solución de lavado. En cada lavado se removió por completo el líquido de los pozos. Todos los lavados se realizaron de la misma manera.
5. Se adicionaron 200 μ l del conjugado a cada pozo. Se cubrió nuevamente la placa y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente sobre un agitador orbital en función.
6. Se decantó la placa y se realizaron cuatro lavados.
7. Se adicionó 200 μ l de la solución sustrato a cada pozo. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente protegida de la luz.
8. Se adicionó 50 μ l de solución de paro en cada pozo. Se cubrió la placa, se agitó 1 min y se procedió a determinar la densidad óptica en el lector de placas a 450 nm con corrección de 570 nm. Las densidades se analizaron con un programa para ajuste de curva logístico de cuatro parámetros.

Anexo 6. ELISA para la cuantificación de VCAM-1.

1. Las muestras se descongelaron completamente, se mezclaron (con pipeta) y se diluyeron 1:20 con el diluyente calibrador.
2. Se reconstituyó el estándar con 1 ml de agua destilada. Se tomaron 250 μ l del estándar reconstituido y se le adicionaron 250 μ l de diluyente calibrador para crear el primer punto de la curva. Con éste, se realizaron una serie de diluciones 1:2 para generar los otros 5 puntos de la curva. El blanco fue el diluyente calibrador.
3. Se adicionaron 100 μ l del conjugado en cada pozo.
4. Se adicionaron 100 μ l de estándares, blancos y muestras según la configuración de la placa de 96 pozos. Se cubrió la placa con una película adhesiva y se incubó por 1.5 h a temperatura ambiente.
5. Se decantó la placa y se realizaron cuatro lavados con 400 μ l de solución de lavado. En cada lavado se removió por completo el líquido de los pozos. Todos los lavados se realizaron de la misma manera.
6. Se adicionó 100 μ l de la solución sustrato a cada pozo. Se incubó durante 20 min a temperatura ambiente protegida de la luz.
7. Se adicionó 50 μ l de solución de paro en cada pozo. Se cubrió la placa, se agitó 1 min y se procedió a determinar la densidad óptica en el lector de placas a 450 nm con corrección de 570 nm. Las densidades se analizaron con un programa para ajuste de curva logístico de cuatro parámetros.

Placental Proinflammatory State and Maternal Endothelial Dysfunction in Preeclampsia

Jorge Valencia-Ortega², Arturo Zárate³, Renata Saucedo¹,
Marcelino Hernández-Valencia², José G. Cruz², Edgardo Puello²

¹Endocrine Research Unit, Centro Médico Nacional Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico.
²UMAC Hospital de Gineco-Obstetricia No. 2, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

Keywords

Preeclampsia - Adhesion molecules - Cytokines - Placenta -
Uterus - Umbilical cord

Abstract

Objective: To analyze the placental and ductal gene expression and maternal and umbilical serum concentrations of tumor necrosis factor alpha, interleukin 5 (IL-5), IL-8, IL-10, E-selectin receptor antagonist (E-TRA), intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) along with the proinflammatory/anti-inflammatory cytokine ratio in women with preeclampsia (PE) vs. women with normal pregnancy (NP), and to analyze PE classified as early (EO) and late-onset (LO). **Methods:** This cross-sectional study was performed with 50 women with PE (EO = 33, LO = 20) and 50 women with NP. Tissue gene expression levels were measured by real-time RT-PCR. Cytokines and adhesion molecules serum concentrations were measured by immunoassays. **Results:** In PE, placental expression of IL-10 and E-TRA was lower, while placental IL-8, IL-TRA ratio and maternal concentrations of VCAM-1 were higher vs. NP. In EO, placental expression of E-TRA was lower, while placental IL-5/IL-10 and IL-5/IL-TRA ratios were higher than LO and NP. Maternal concentrations of IL-6 were higher in LO than EO and NP. Throughout PE, maternal VCAM-1 concentrations were

higher vs. NP. No significant differences were observed in the ductal expression and umbilical concentrations of the markers between the groups. Conclusions: PE associates with a proinflammatory placental state; however, EO associates with a proinflammatory placental state, while LO associates with a proinflammatory placental state in a RhoA and type 2 associated with maternal endothelial dysfunction.

© 2016 Jorge VA, et al.

Introduction

Preeclampsia (PE) is a pregnancy complication characterized by the appearance of hypertension with multiorgan disorders starting from the 20th week of gestation. Worldwide, this disorder affects 2–6% of pregnancies and it represents one of the main causes of perinatal morbidity and mortality [1, 2]. The etiology of PE is unknown; however, it is thought that it is a result of deficient remodeling of the uterine spiral arteries, which cause placental hypoxia-ischemia and the production of factors that alter decidual cellular mechanisms. These factors then generate a diverse production of mediators in the placental-decidual interface and migrate into the maternal circulation, altering endothelial function [3]. This mechanism probably persists until the end of the pregnancy, since PE starts to resolve

KARGER

© 2016 Jorge VA, et al.

E-Mail: info@karger.com
www.karger.com/gf

Basic Science
Reproductive Research Unit
Centro Médico Nacional Instituto Mexicano del Seguro Social
GYN, Mexico City (Mexico)
J.VA@guaymas.gyns.com

only when the placenta is delivered [9]. In this sense, it has been thought that during pregnancy the placental-ocidual interface shows an imbalance in the production of proinflammatory, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), IL-8, and anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and IL-1 receptor antagonist (IL-1RA). This imbalance is reflected in maternal and umbilical circulation [5, 6]. The circulatory imbalance in favor of the proinflammatory cytokines can cause endothelial dysfunction by providing an adhesive phenotype to the vascular endothelium characterized by the expression of adhesion molecules such as the intercellular adhesion molecule (ICAM-1) and the vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) [7]. Although the description of this physiopathological mechanism is not novel, to our knowledge, there are no studies in which the placental and decidual gene expression as well as the maternal and umbilical concentrations of the markers mentioned have been analyzed.

On the other hand, PE is a heterogeneous disorder, and it has been suggested that early- (EO) and late-onset (LO) PE could have differing physiopathological pathways [8, 9], which is why evaluating the mechanism previously described, while considering this classification, is a matter of interest.

Therefore, the objective of the present study was to evaluate the placental and decidual gene expression and maternal and umbilical serum concentrations of TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, ICAM-1, and VCAM-1 along with the proinflammatory/anti-inflammatory cytokine ratio (TNF- α /IL-10, TNF- α /IL-1RA, IL-6/IL-10, IL-6/IL-1RA, IL-8/IL-10, and IL-8/IL-1RA) in women with PE vs women with normal pregnancy (NP) in the third trimester of gestation, and to analyze PE classified as EO and LO.

Materials and Methods

The investigation protocol was evaluated and approved by the Mexican Commission of Scientific Research and the Ethics and Science Commission of the Instituto Mexicano del Seguro Social. Before the sample collection, all participants signed an informed consent form.

Participants

This is a cross-sectional study conducted with 50 women with NP and 50 women with PE (EO $n = 30$, LO $n = 20$). All samples were obtained from women who underwent a cesarean procedure at the Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. The diagnosis of PE was confirmed on the basis of a diagnosis established by the American College of Obstetrics and Gynecologists [4]. It was classified as EO when it appeared before week 34 and as LO when it appeared at week 34 or

after. We were with labor, until the gestational period was complete of mothers: gestational diabetes mellitus, hypothyroidism, fetal growth restriction, detect or non detect pregnancy pathology, such as preeclampsia, eclampsia, chronic kidney disease, hypertension, were excluded from the study. NP was defined as those that did not have any complications.

Sample Collection

In the preoperative period, a venous blood sample was acquired from the antecubital fossa. Immediately after the extraction of the placenta, a blood sample was taken from the umbilical cord and three samples were acquired from the placenta and the decidua. Blood samples were centrifuged at 400g for 15 min and the serum was stored at -75°C . To avoid bias in the tissue collection, placental samples were obtained from a random area of the maternal side ($\pm 0.7\text{ m}^2$ from each area). Decidual samples were taken by superficial scraping of the endometrium and were also obtained from a random area. Each tissue sample was briefly rinsed in water treated with diethylpyc carbonate to remove excess blood, and then placed in a cryogenic tube with 1 mL of lysis buffer (RNeasy Lysis Buffer, Qiagen, Carlsbad, CA, USA), which was transported in a bag inside liquid nitrogen until finally stored at -70°C .

RNA Extraction

Tissue samples were homogenized and centrifuged at $12,000\text{ g}$ at 4°C . From the supernatant, RNA was purified using Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research Corp., CA, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was measured by spectrophotometry. RNA was purified from each of these areas of the placenta to avoid any possibility of different RNA obtained for gene expression analysis. This same process was followed for the decidual samples.

cDNA Synthesis and qPCR

cDNA was synthesized from a μg of RNA using the SuperScript[®] III First-Strand RT kit (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA). Analytically qPCR was performed on the StepOnePlus[®] Real-Time PCR System using Taqman[®] Gene Expression Assays and Taqman[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. For the relative quantification, the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method was used with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) transcript as endogenous control. All the primers and probes were acquired from Applied Biosystems: TNF- α (H01112601_g1), IL-6 (H00556002_m1), IL-8 (H00374103_m1), IL-1RA (H00899326_m1), IL-10 (H00926222_m1), ICAM-1 (H00386032_m1), VCAM-1 (H00100372_m1), and GAPDH (FN45393179).

Maternal to Amnion and Decidua Levels (normal or elevated) Assays

Serum concentrations of TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, and IL-1RA were measured by multiplex assays by the Luminex[®] MAGPIX[®] System using Custom Luminex[®] Assays (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA) with sensitivities set at: 5, 1, 5, 0.5, and 30 pg/mL, respectively. Serum concentrations of ICAM-1 and VCAM-1 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (RnD Systems, Minneapolis, MN, USA), with sensitivities set at 0.02 and 0.05 ng/mL, respectively. All assays were performed according to the manufacturer's instructions. The coefficients of intra- and inter-assay variation were less than 10% for all assays.

Table 1. Clinical characteristics of NP and PE

	NP (n = 24)	PE (n = 20)
Maternal age, years, median (IQR)	28.0 (25.0–30.0)	28.7 (25.0–31.5)
Gestational age at delivery, weeks, median (IQR)	38.2 (38.0–38.0)	35.0 (34.0–35.0)*
Pre-pregnancy BMI, kg/m ² , median (IQR)	23.0 (22.0–26.0)	26.0 (23.0–32.0)
Blood pressure at blood draw, mm Hg, median (IQR)		
Systolic	116.0 (100.0–121.0)	142.0 (122.0–154.0)*
Diastolic	79.0 (68.0–79.0)	87.0 (72.0–90.0)*
Pregnancies, n %	13 (54.0)	14 (70.0)
Neonatal weight, kg, median (IQR)	3.2 (2.9–3.4)	1.8 (1.4–2.2)*
Neonatal birth height, cm, median (IQR)	50.0 (49.0–51.0)	42.0 (39.0–43.0)*
Small-for-gestational age neonates, n %	1 (4.0)	8 (40.0)*

* $p < 0.05$ vs NP.

EM, body mass index; NP, normal pregnancy; PE, preeclampsia; IQR, interquartile range.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS program version 21. Normality of the continuous variables was evaluated with the Shapiro-Wilk test and a normal distribution was not observed. Therefore, the statistical analysis was performed with non-parametric testing. Continuous variables were analyzed with the Mann-Whitney U test and categorical variables with the chi-square test. The Kendall-McBride test was used to analyze categorical variables in more than 2 independent groups. To calculate correlation, the Spearman test was conducted. The adjustment in function of treatment and gestational age was performed by multivariate and covariance analysis (ANCOVA), respectively. Continuous variables were expressed as median (interquartile range) and categorical variables as a number (percent). Any difference was considered significant if $p < 0.05$.

Results

Clinical Characteristics

Table 1 shows the clinical characteristics of the participants by group of study. Gestational age at the moment of the cesarean and the weight and size of the neonate were lower in PE, while the arterial blood pressure at the moment of the blood draw and the percentage of the small-for-gestational age neonates (those whose birth weight was below the 10th percentile for the gestational age) were higher when compared to NP. In the PE group, 80% of the women received treatment with magnesium sulfate, hydralazine, and/or alpha-metildopa.

Placental and Decidual Gene Expression

In placenta, gene expression levels of IL-10 and IL-1RA were lower in PE, and the IL-6/IL-1RA ratio was higher in comparison to NP (Fig. 1). Placental gene ex-

pression levels of TNF- α , IL-5, IL-8, VCAM-1 and VCAM-1 did not differ between the groups (data not shown, Table 1); for all analyses cited material, see [www.hindawi.com/doi/10.1155/2020/401087](https://doi.org/10.1155/2020/401087).

There was no difference in decidual gene expression levels of each marker or the ratios between the groups (data not shown, Table 2).

Maternal and Umbilical Concentrations

Table 2 shows the maternal and umbilical concentrations of each marker. Only maternal VCAM-1 concentrations were different between the groups, their values being higher in PE. No differences were observed between the ratios of the different groups (data not shown). Only the PE group showed a correlation between maternal VCAM-1 concentrations and systolic ($r = 0.41, p < 0.05$) and diastolic ($r = 0.56, p < 0.001$) blood pressure. No significant differences were observed between the umbilical concentrations of the markers and the ratios in the different groups (data not shown).

In both groups, the placental and decidual gene expression levels, as well as the maternal and umbilical concentrations of each marker were not correlated (data not shown). On the other hand, when the adjustment in function to treatment and gestational age was performed, the same statistical differences were observed.

EO and LO PE

In placenta, the IL-10 gene expression was lower in EO, while the IL-6/IL-1RA ratio was higher, in comparison to LO and NP (Fig. 2). Maternal concentrations of IL-6 were higher in EO compared to EO and NP (Fig. 3). In both subtypes of PE, maternal

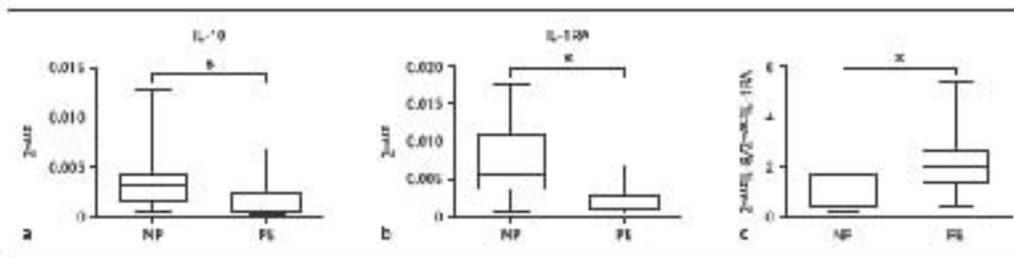


Fig. 1. a Placental gene expression levels of IL-9. b Placental gene expression levels of IL-1RA. c Placental IL-8/IL-1RA ratio. NP, $n = 50$; PE, $n = 50$. * $p < 0.05$. IL-8, interleukin 8; IL-10, interleukin 10; IL-1RA, IL-1 receptor antagonist; NP, normal pregnancy; PE, preeclampsia.

Table 2. Maternal and umbilical serum concentrations of cytokines and adhesion molecules in NP and PE

	NP, median (IQR)		PE, median (IQR)	
	maternal concentration	umbilical concentration	maternal concentration	umbilical concentration
TNF- α , pg/ml	90 (5.8–11.7)	4.5 (0.3–11.0)	9.7 (6.1–18.9)	8.2 (5.8–14.8)
IL-6, pg/ml	4.4 (1.8–7.2)	3.9 (1.5–7.8)	5.7 (3.6–12.0)	5.1 (1.0–8.9)
IL-8, pg/mL	23.8 (11.2–37.5)	51.7 (14.5–159.6)	62.8 (10.5–134.3)	57.5 (22.4–92.5)
IL-10, pg/mL	7.6 (2.5–19.0)	2.9 (2.5–3.9)	16.3 (5.2–27.7)	7.3 (2.7–8.1)
IL-1RA, pg/mL	80.0 (50.8–147.5)	50.7 (47.7–126.1)	117.8 (47.7–181.7)	56.2 (5.0–92.5)
ICAM-1, ng/mL	274.0 (211.3–411.6)	150.2 (122.0–183.0)	220.5 (211.0–357.4)	146.4 (127.3–174.7)
VCAM-1, μ g/mL	0.8 (0.5–3.7)	3.0 (1.7–3.4)	0.9 (0.8–1.2)*	1.9 (1.7–2.2)

* $p < 0.05$, vs. maternal concentrations of NP.

NP, normal pregnancy; PE, preeclampsia; IQR, interquartile range; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; IL, interleukin; IL-1RA, IL-1 receptor antagonist; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

VCAM-1 concentrations were higher than those in NP. There were no differences between decidua gene expression and umbilical concentrations of the markers with regards to the subtype of PE.

Discussion

We observed that placental gene expression levels of TNF- α , IL-6, IL-8, ICAM-1, and VCAM-1 were similar between NP and PE, while those of IL-10 and IL-1RA were lower in PE than NP. These results are in line with the findings of Maruse et al. [10] who, by immunohistochemistry, observed that the protein expression of TNF- α was similar in patients with PE and gestational-age-matched controls. Benay et al. [11] used ELISA in placental homogenates and semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), and they observed that both protein

and gene expressions of TNF- α were similar in the PE and term control group. In contrast, Weel et al. [12], by ELISA in placental homogenates and immunohistochemistry, observed higher protein expression levels of TNF- α in PE than those in the term control group; however, they used homogenates that included both the fetal and maternal sides of the placenta. Our results about the placental gene expression of IL-6 also concur with Maruse et al. [10] and Benay et al. [11]. With respect to IL-8, Sun et al. [13] reported higher levels of gene expression of this cytokine in PE in comparison to the term control group by real time RT-PCR; however, their sampling method was susceptible to bias because they analyzed only 1 point of the maternal side of the placenta. We did not observe a difference in the IL-8 gene expression, but there was a difference in the IL-8/IL-1RA placental ratio, which was higher in PE than NP. This finding suggests that PE is more closely associated with a placental proinflammatory cytokine imbalance than

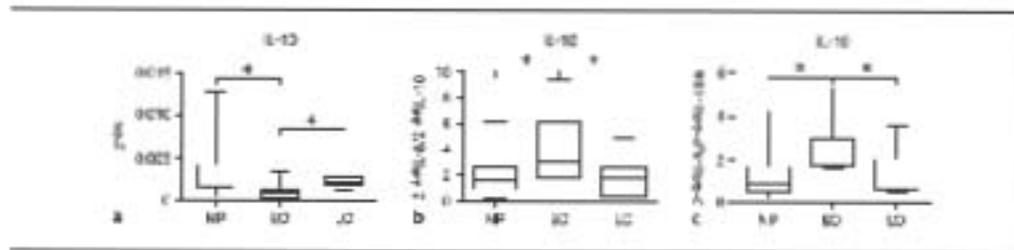


Fig. 2. a Placental gene expression levels of IL-10. b Placental IL-6/IL-10 ratios. c Placental IL-6/IL-1RA ratios. NP, normal pregnancy; EO, early-onset EO; LO, late-onset.

with absolute IL-8 expression levels. In regard to the IL-10 expression levels, our results are in accordance with those of Malara et al. [14] who, by immunohistochemistry and real-time RT-PCR, showed reduction in both protein and gene expressions of this anti-inflammatory cytokine in PE than those in the term control group. Correspondingly, West et al. [12] observed the same difference with respect to IL-10 placental expression. To our knowledge, this is the first study to publish placental gene expression levels of IL-1RA in PE. IL-1RA is the antagonist of the IL-1RI receptor, which inhibits the binding of proinflammatory cytokines IL-1 α and IL-1 β therefore acting as an anti-inflammatory factor. In this study, a lower placental expression of IL-1RA was observed in PE, which along with the IL-10 results, leads to the idea that PE is associated with lack of a compensatory anti-inflammatory response at the placental level. This failure, along with the proinflammatory cytokines imbalance, suggests a proinflammatory placental state in PE. There are few studies with respect to the placental expression of these cytokines. In contrast to our results, Givoni et al. [15], by immunohistochemistry, observed that the placental protein expression of ICAM-1 in PE was higher than that of the term control group; however, their sample size was considerably lower than our sample size. On the other hand, despite the sampling differences and the different experimental methods used (immunohistochemistry), our VCAM-1 results correspond to those of Isakola et al. [16], who demonstrated that protein expression of VCAM-1 in the placental bed was similar in patients with PE and gestational age matched controls. Trotsis et al. [17], by immunohistochemistry, observed that protein expression of VCAM-1 in the placental bed was similar to that in the PE and gestational control group.

Decidua is composed of stromal cells, immune cells, blood, glands, and lymphatic vessels [18]. Studies have

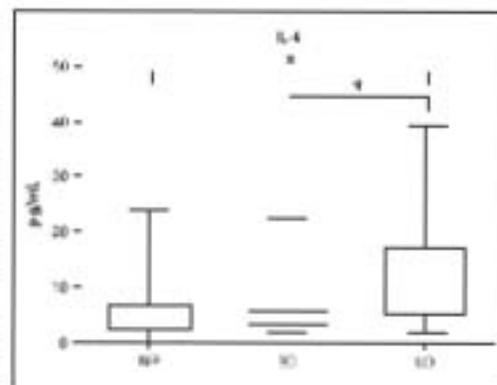


Fig. 3. Maternal serum concentrations of IL-6. NP, normal pregnancy; EO, early-onset EO; LO, late-onset.

analyzed the cytokines of these decidual cell types in PE [19,20], however, to our knowledge, this is the first study that has analyzed the general decidual expression of the molecular markers studied. We did not observe a difference in decidual expression levels between the groups. This leads to the idea that in PE the alterations principally occur at the placental level.

With respect to the maternal concentrations, we did not observe significant differences in the maternal concentrations of TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, and ICAM-1 between the groups studied. There is controversy with respect to the concentrations of these proteins in PE [21–23]. On the other hand, we observed that the maternal concentrations of VCAM-1 were higher in PE.

Other works concur with this observation [21, 25, 29]. Interestingly, in the PE group, maternal ICAM-1 concentrations were the only parameter that correlated with systolic and diastolic blood pressure. In relation to this, Molvarec et al. [21] and Kim et al. [29] observed higher maternal concentrations of ICAM-1 in PE; however, their PE groups had systolic and diastolic blood pressure means higher than 160 and 100 mm Hg respectively. It is possible that, in this study, no difference was observed in the maternal concentrations of ICAM-1 because the blood pressure was lower than that of Molvarec et al. [21] and Kim et al. [29]. Our data about maternal adhesion molecule concentrations suggest that in PE the maternal endothelial dysfunction persists up to the third trimester of gestation.

There are few studies about the levels of umbilical cytokines and adhesion molecules in PE. To our knowledge, this is the first study that has published umbilical concentrations of IL-10 and IL-1RA in PE. We did not observe differences in the umbilical concentrations of TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, ICAM-1, and VCAM-1 between the groups. Tosun et al. [47] reported high umbilical concentration levels of TNF- α , IL-6, and IL-8 in PE. Catarino et al. [6] did not observe differences in the umbilical levels of TNF- α and IL-6, but they did see higher levels of VCAM-1 in PE. Kruss et al. [32] observed that the umbilical levels of ICAM-1 and VCAM-1 were similar in PE and NP. It is worth mentioning that in comparison to these studies, ours had a greater sample number. This suggests that PE is not associated with a typical umbilical cord with endothelial dysfunction in the umbilical circulation.

In both groups, the expression in placenta and decidua, as well as the maternal and umbilical concentration of each marker, do not correlate. This tells us that there probably is an indirect influence between the production of these factors and the maternal and umbilical concentration, so that the circulation markers are perhaps produced primarily by peripheral and endothelial cells. Additionally, it is suggested that if the placenta is the physiopathological center of PE, it does not undergo a systematic disorder through the cytokines studied.

In the placenta, the expression of IL-10 was statistically lower, while the IL-8/IL-10 and IL-8/IL-1RA ratios were significantly higher in EO, in comparison to LO and NP. Maternal concentrations of IL-6 were statistically higher in LO in comparison to EO and NP. In both subtypes of PE, maternal VCAM-1 concentrations were higher than those in NP. Dogan et al. [33] concur with this observation. They observed higher maternal VCAM-1 levels in both subtypes of PE in comparison to healthy

pregnant women. These data suggest that at the end of the pregnancy, EO and LO present distinct physiopathological pathways, since the first is associated with a proinflammatory placental state, while the second is associated with maternal systemic inflammation; however, both subtypes are associated with maternal endothelial dysfunction data. In accordance with our results, other studies have suggested that EO is associated with placental alterations and LO with maternal alterations [54, 35]. It is important to mention that perhaps the lack of consensus in various studies about PE could be due to differences in the frequency of these 2 subtypes in the study populations.

The limitations of this study lie in the sample size, as well as the possible effects of post-transcriptional changes in tissue expression; another limitation was that the study groups were not matched by gestational age and that 80% of the women with PE had pharmacological treatment. In this study, the placental and decidual expressions, as well as the maternal and umbilical concentration of the markers, were adjusted by gestational age and the same differences were observed, which suggests that these were not affected by any specific variable. However, we must consider that the maternal concentration of cytokines has been observed to vary in function with the week of gestation [36] and the placental and decidual expressions, as well as the fact that umbilical concentration probably also varies over the duration of the pregnancy. On the other hand, due to the fact that 80% of the women with PE received treatment, the analysis was done in terms of the function of this variable and no significant differences were observed; this suggests that the treatment did not influence the results. In contrast studies have shown that magnesium sulfate can have an effect on the placental production of cytokines TNF- α , IL-6, and IL-1RA [37–38]; however, the model used may not represent in vivo conditions. It is not known if hydralazine and alprametydopa affect cytokine synthesis. Despite that, this study is relevant to the knowledge of the underlying mechanisms in PE in the third trimester of gestation, which can be useful for the improvement of treatment plans that seek to avoid the early interruption of the pregnancy.

Conclusion

In general, PE is associated with a proinflammatory placental state and maternal endothelial dysfunction; however, EO is associated with a proinflammatory pla-

central state, while LO is associated with systemic maternal inflammation. Both subtypes are associated with maternal and fetal clinical outcomes.

Acknowledgments

L.V.-C. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and received fellowship from CONACyT. A.Z., R.S., and M.H.-V. hold a fellowship from CONACYT.

Statement of Ethics

The investigation protocol was evaluated and approved by the National Commission of Scientific Research and the Ethics and Science Commission of the Instituto Mexicano del Seguro Social. Before the sample collection, all participants signed an informed consent letter.

References

- 1 Khan AA, Wojcicki J, Septh, G, Karmaliya AM, Yasukochi PB. WHO analysis of causes of cardiovascular diseases represents evidence. *Lancet* 2019; **393**:1066-1074.
- 2 Daly L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Current Pregnancy* 2009; **25**: 1-8.
- 3 Emswiler A, Savaris B, Adreoni J, Marcell F, Mendez M. Inflammatory pathways and maternal and fetal outcomes in preeclampsia and eclampsia: a review. *Obstet Gynecol* 2014; **65**: 519-524.
- 4 American College of Obstetricians and Gynecologists. High blood pressure in pregnancy. *Hypertension in pregnancy*. Washington, American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013.
- 5 Rajkumar S. Cytokines and their players in the pathophysiology of preeclampsia. *Medicine Post* 2010; **11**: 8-10.
- 6 Catalano C, Santos-Silva A, Bete L, et al. Inflammatory circulation in preeclampsia: relationship between maternal and umbilical cord. *PLoS One* 2017; **12**: e0170284.
- 7 Eyles B, Ross PG. Endothelial dysfunction in cerebral and placental blood flow. *Stroke* 2007; **38**: 400-405.
- 8 Hirokawa S. Trophoblast incidence of preeclampsia: not between and various associated with early versus late onset disease. *Am J Obstet Gynecol* 2011; **205**: 5621-5644.
- 9 Pielouso CG, Frey P, Comani L, et al. The endothelial dysfunction factors to maternal and fetal associated with preeclampsia. *Prenat Diagn* 2014; **34**: 874-877.

Disclosure Statement

The authors report that they have no conflicts of interest to disclose.

Funding Source

This work was supported by the scientific grant from IMSS (HS/1675/PROFAPRO/16/21). IMSS did not take part in the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript, or in the decision to submit it for publication.

Author Contribution

L.V.-C., A.Z., R.S., M.H.-V., J.G.C., and E.P. conceived the conception and design. L.V.-C. and J.S. contributed to the analysis and interpretation of data. All authors contributed to the drafting of the article, critical revision, and final approval of the manuscript.

- 10 Mariani J, Jansen B, Tomas M, Karim A, Rajkumar S. Expression of inflammatory cytokines in placental trophoblasts in preeclampsia and HELLP syndrome. *Maternal Fetal Neonatal Med* 2013; **24**: 243-246.
- 11 Kozak DF, Iwanaga A, Balkus CW, Sano C, Trivedi CP. Expression of inflammatory cytokines in placenta from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **95**: 2515-2521.
- 12 Wolf HG, Berger H, Benda-Vogel M, et al. Association between placental cytokine release and angiogenic factors in pregnant women with preeclampsia. *Placenta* 2014; **35**: 1-7.
- 13 Kim J, Woo J, Cho Y, et al. Association between placental expression of interleukin-1 β and interleukin-15 and preeclampsia. *Medicine (Baltimore)* 2016; **95**: e1227.
- 14 Matra A, Sarkar T, Thomsen L, Moushey A. Placental deficiency of interleukin-10 (IL-10) in preeclampsia and its relationship to IL-10 promoter polymorphism. *Placenta* 2004; **25**: 442-451.
- 15 Tokun A, Nishi M, Hori S. Significance of placental endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in preeclampsia. *Endocrine* 2014; **47**: 101-107.
- 16 Sakuma E, Okuma Y, Katakami M, Ishikawa Y, Shibata P. Preeclampsia does not change the placental cytokine network in the placental cord. *Placenta* 2005; **26**: 342-348.
- 17 Imoto J, Matsumoto Tachino A, Okada G, Uemura C, Michiue S. Adhesion molecule expression in the placenta in preeclampsia with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 2002; **109**: 195-201.
- 18 Cho H, Han CT, Han JF, He Y, Yang WS. Endometrial stromal cells are conditioned to secrete interleukin-6, interleukin-8, and leukemia-inhibitory factor. *Genes* 2016; **7**: 18.
- 19 Nakayoshi T, Ishimaru U, Sasada M, et al. Placental cytokine distribution and cytokine secretion in third trimester decidua in normal pregnancy and preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2017; **208**: 47-51.
- 20 Leckstrom CJ, Yeo CP, Basso M, et al. Interleukin-6-related inflammatory cytokines regulate placental expression of vascular adhesion cells. *Am J Pathol* 2000; **157**: 57-67.
- 21 Andrews A, Santos A, Wharton S, et al. Interleukin-6 levels in placenta in circulating leukocytes, preeclampsia, and other obstetric and angiogenic factors in normal pregnancy and preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; **10**: 14.
- 22 Santos A, Santos A, IB Sharma, Lopez L. IL-6 and inflammatory markers (TNF- α , IL-1 β and IL-10) in preeclampsia, normotensive pregnancy and healthy non-pregnant women. *Am J Reprod Fert* 2017; **9**: 1-10.
- 23 Basile A, Muddat E, Alan E, Uzun H, Aydin S, Jansen and Marcell 2016. *Am J Obstet Gynecol* 2016; **215**: 1013-1019.
- 24 Omer A, Targui A, Sak M, et al. Serum levels of angiogenic factors: vascular endothelial growth factor-1 in preeclampsia relationship with disease severity. *Archives Med Research* 2013; **46**: 1073-1077.

- 25 Mikić J, Puhlić M, A. Begić, J. Ramović, J. Štalo L, Čubrigoja AA. Pre- or Laminatory cytokine levels in HIV infected and uninfected pregnant women with and without preeclampsia. *J Cell Oncol* 2017;13:1-8.
- 26 Akinci H, Çimen N, Şenel A, et al. Fetal concentrations of interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α concentrations in fetal and Neonatal plasma patients with preeclampsia. *BMJ Open* 2016;16:1-5.
- 27 Pichler MJ, Olin A, Martin-Lillo, et al. New gene expression profiles with a cyto-kinase network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine* 2012;52:165-171.
- 28 Martins-Catão MA, Tavares-Baldregh BM, Vargas-Filho V, et al. Increased serum levels of inflammatory mediators and consequent cytochrome P-450 1B1 in the peripheral blood of pregnant women with severe preeclampsia. *Braz J Med Biol Res* 2014;47:1035-1040.
- 29 Kim SY, Ryu HK, Yang H, et al. Maternal serum levels of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in preeclampsia. *J Korean Med Sci* 2004;19:655-652.
- 30 Kim DR, Aguin P, Gukil LL, et al. Increased levels of sICAM-1 and E-selectin levels of VEOP in acute preeclampsia. *Am J Hypertens* 2004;17:152-153.
- 31 Tamas M, Csik H, Székely T, et al. Altered levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor- α in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26:151-155.
- 32 Kraus I, Ambler G, Durrant M, Agarwal MG. Fetal plasma levels of circulating interleukin-6, soluble intercellular adhesion molecule-1 and sE-selectin in normal and preeclamptic pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;79:41-45.
- 33 Lopez A, Duru M, Laine U, Miettinen M. The vascular endothelial adhesion molecules, E-selectin and intercellular adhesion molecule-1, and their expression in preeclampsia. *Gin Exp Obstet Gynecol* 2014;41:311-324.
- 34 Saperov T, Ferenec R. A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Chin J General Surg* 2011;46:487-503.
- 35 Nima DB, Zaida M, M. Laiter DC, et al. Preeclampsia and low cord serum Angiopoietin-2 levels. *Am J Hypertens* 2007;20:1067-1071.
- 36 Ferguson LC, Minkin JJ, Minkova L, et al. Repeated episodes of inflammation and oxidative stress biomarkers in preeclampsia and normotensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2017;216:527.e1-527.e12.
- 37 Akinci A, Winkler AT, Tazari E, et al. Fasting thyroxine effect of magnesium sulfate prophylaxis by the development of multiple small umbilical artery-alpha-arteries. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:151-154.
- 38 Akinci A, H. Akinci G, Tazari E, et al. Magnesium sulfate treatment of preeclampsia. *Int J Gynecol Obstet* 2013;119:493-497.
- 39 Akinci A, Winkler AT, Soper L, et al. Maternal markers of interleukin-1 and interleukin-6 superior response in preeclampsia when an angiotensin inhibitor. *Int J Gynecol Obstet* 2011;112:422-424.