

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**CARACTERIZACIÓN DE COMPONENTES CITOTÓXICOS DE EXTRACTOS  
PLACENTARIOS DE PACIENTES CON PREECLAMPSIA Y SUS EFECTOS *IN*  
*VITRO* SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES NORMALES**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

**LENKA PATRICIA PIMENTEL VELÁZQUEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

MÉXICO D.F. SEPTIEMBRE 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# **CARACTERIZACIÓN DE COMPONENTES CITOTÓXICOS DE EXTRACTOS PLACENTARIOS DE PACIENTES CON PREECLAMPSIA Y SUS EFECTOS *IN VITRO* SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES NORMALES**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el invaluable apoyo del Posgrado en Ciencias Biológicas para la realización de esta tesis.

Agradezco el valioso apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca de maestría (número de registro de becario 199278) y por haber permitido la realización del Programa de Ciencias Biológicas.

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro Zentella Dehesa en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ).

Agradezco de manera especial el apoyo brindado por el Dr. Felipe Vadillo Ortega, Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) por proporcionar el material biológico y el apoyo técnico para la realización de este proyecto.

Agradezco al Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis y estuvo formado por:

Dr Alejandro Zentella Dehesa	INCMNSZ e Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
Dr Felipe Vadillo Ortega	Dirección de Investigación del INPer
Dra Imelda López Villaseñor	Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

# **CARACTERIZACIÓN DE COMPONENTES CITOTÓXICOS DE EXTRACTOS PLACENTARIOS DE PACIENTES CON PREECLAMPSIA Y SUS EFECTOS *IN VITRO* SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES NORMALES**

## **RECONOCIMIENTOS**

Gracias al Dr. Alejandro Zentella por todas las lecciones y toda la paciencia y sobre todo por haber permitido que desarrollara este proyecto en libertad de pensamiento. Por haberme dejado crecer científicamente y haber guiado adecuadamente mis ideas.

Gracias por la invaluable asesoría técnica de la Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez. Gracias también por todo el apoyo complementario e indispensable, no solo técnico, sino humano.

Reconozco el apoyo especial, no solo técnico sino humano de la M. en C. Gabriela Galicia Vázquez (INCMNSZ), y del Dr. Alfonso Martínez Flores y la M. en C. Auroa Espejel Nuñez (INPer)

Gracias por el apoyo de todos los compañeros de trabajo del laboratorio de Bioquímica del INCMNSZ y del INPer.

Gracias a todos los Maestros del Posgrado de Ciencias Biológicas que participaron en mi formación como científica.

---

**CARACTERIZACIÓN DE COMPONENTES CITOTÓXICOS DE EXTRACTOS  
PLACENTARIOS DE PACIENTES CON PREECLAMPSIA Y SUS EFECTOS *IN*  
*VITRO* SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES NORMALES**

**DEDICATORIA**

A la Dra. Martha Zentella de Piña y al Dr. Enrique Piña Garza por haberme ayudado a descubrir las primeras páginas de la Ciencia Médica, y por ser un gran ejemplo en todas las esferas de la vida.

A Kiki y Ray por haberme enseñado a cuestionar cada movimiento y haber fomentado el Espíritu Científico en mi vida.

A André por todo lo que me ha enseñado, por ser el mejor maestro que he tenido y por ser la luz que ilumina mi vida.

A mis hijos por todo su amor y todas las lecciones que corresponderá aprender de cada uno de ellos.

A Darío por ser el Roble que crece en mi Tierra. Por todo su apoyo, por ser mi amor y mi fuerza, por permitirme crecer a su lado.

## INDICE

---

AGRADECIMIENTOS  
RECONOCIMIENTOS  
DEDICATORIA  
INDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN .....	5
1. Preeclampsia.....	5
Definición.....	5
Cuadro clínico.....	6
Diagnóstico.....	7
Diagnóstico diferencial.....	7
Clasificación.....	8
<i>Preeclampsia leve</i>	
<i>Preeclampsia severa</i>	
<i>Eclampsia</i>	
Manejo.....	9
Tratamiento farmacológico.....	10
Pronóstico.....	12
Prevención.....	12
Fisiopatología de la preeclampsia.....	13
Factores asociados.....	13
<i>Implantación inadecuada</i>	
<i>El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el fenotipo de adhesión vascular del citotrofoblasto invasor</i>	
<i>Matriz decidual extracelular y moléculas de adhesión celular</i>	
<i>Tono vascular</i>	
Teorías sobre la fisiopatología de la preeclampsia.....	16
<i>Etiología</i>	
<i>Isquemia placentaria</i>	
<i>Lipoproteínas de muy baja densidad</i>	
<i>Mala adaptación inmune</i>	
<i>Elastasa</i>	
<i>Citocinas</i>	
<i>Radicales libres</i>	
<i>Preeclampsia como enfermedad genética</i>	
Relación con enfermedades autoinmunes y crónico-degenerativas.....	34
2. Embarazo y morbimortalidad materna y neonatal.....	36
Mortalidad materna.....	36
Definición.....	36

Incidencia de la preeclampsia, morbilidad materna y morbimortalidad perinatal asociadas.....	37
3. Endotelio .....	40
Fisiología del endotelio.....	40
Factores relajantes y de contracción derivados del endotelio.....	41
Disfunción endotelial.....	41
II. ANTECEDENTES.....	42
Preeclampsia como enfermedad endotelial.....	42
<i>Endotelio y preeclampsia</i>	
<i>Grados de injuria endotelial durante el embarazo patológico</i>	
Oxido nítrico y preeclampsia.....	42
Inmunomodulación gestacional y su regulación por citocinas.....	44
Preeclampsia y estado trombofílico del embarazo.....	46
Preeclampsia como enfermedad endotelial compleja.....	47
Preeclampsia y factores circulantes y placentarios.....	49
III. JUSTIFICACIÓN.....	50
IV. HIPÓTESIS.....	51
V. OBJETIVOS.....	52
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
Diseño experimental.....	53
Obtención y análisis de homogenados placentarios.....	54
Obtención de homogenados.....	54
Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE).....	54
Medición de la concentración de citocinas.....	55
Ensayos.....	56
Obtención de células endoteliales humanas.....	56
Células de linfoma U937.....	57
Reducción de bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) <b>2,5</b> - difeniltetrazolio (MTT).....	57
Conteo por exclusión de azul de tripano.....	58
Ensayo de adhesión.....	58
Análisis estadístico.....	59
VII. RESULTADOS .....	60
Datos clínicos.....	60
Caracterización de homogenados placentarios.....	65
<i>Cuantificación proteica</i>	
<i>Patrones de bandeo</i>	
<i>Composición de los homogenados</i>	

Citotoxicidad celular.....	70
Reducción de bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT).....	71
Ensayo de adhesión.....	73
VIII. DISCUSIÓN.....	76
Datos clínicos.....	76
Caracterización de homogenados placentarios.....	77
<i>Cuantificación proteica</i>	
<i>Patrones de bandeo</i>	
<i>Composición de los homogenados</i>	
Citotoxicidad celular.....	80
Reducción de bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT).....	81
Ensayo de adhesión.....	82
IX. CONCLUSIONES .....	84
X. BIBLIOGRAFIA .....	85



# CARACTERIZACIÓN DE COMPONENTES CITOTÓXICOS DE EXTRACTOS PLACENTARIOS DE PACIENTES CON PREECLAMPSIA Y SUS EFECTOS *IN VITRO* SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES NORMALES

## RESÚMEN

---

Los estados hipertensivos del embarazo representan un problema de salud por su repercusión sobre la salud materno fetal. La preeclampsia, también llamada toxemia, es la presencia de hipertensión y proteinuria que aparecen en el embarazo, si este cuadro se complica con convulsiones se hace diagnóstico de eclampsia. De acuerdo con los datos presentados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) estos trastornos se encuentran asociados a una elevada morbilidad materna y perinatal, siendo la primera causa de muerte.

Los mecanismos fisiopatológicos de la PE se encuentran actualmente en estudio y debate, el estrés oxidativo es la vía final que provoca daño endotelial en la preeclampsia. Queda por definir la naturaleza de los factores derivados de la placenta de una paciente con esta patología así como, definir a nivel molecular los cambios en el fenotipo endotelial y definir si existe un efecto tóxico.

En este trabajo se estudió si el homogenado placentario de pacientes preeclámpicas daña a las células endoteliales *in vitro* debido a la liberación de factores tóxicos. Se determinó si el homogenado placentario de pacientes con PE causa daños en células endoteliales cultivadas y si este se relaciona con la severidad del cuadro clínico. Para lo anterior se estudiaron homogenados placentarios provenientes de 10 placentas de embarazadas con toxemia (2 de ellas manejadas con aspirina 100 mg/día) en comparación con 10 pacientes embarazadas sanas. De los homogenados se midió la concentración de proteínas con el método de Bradford, se determinaron diferentes concentraciones de citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) por medio de multiplex, y se corrieron geles de acrilamida teñidos con plata para determinar el patrón de bandeo proteico. Por otro lado se cultivaron células de endotelio de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) y se expusieron a los homogenados obtenidos para determinar la reducción de bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT) para determinar estrés celular. La

adhesión a células U937 se cuantificó para saber si los homogenados activan al endotelio. Finalmente la citotoxicidad fue determinada por conteo por exclusión con azul de tripano. Los resultados obtenidos no muestran diferencias en la cantidad proteica ni en la composición de citocinas, salvo la elevación de IL-1 en los homogenados de pacientes sanas, sin embargo el patrón de bandeo proteico es completamente diferente entre uno y otro grupo, y se distingue además un tercer grupo: el de las pacientes con PE manejadas con bajas dosis de aspirina. No hubo diferencias para la citotoxicidad celular, sin embargo, si se observó mayor activación endotelial tras 8 horas de exposición a homogenado de placenta con PE al comparar la activación posterior a la exposición a placenta sana, aunque no fue estadísticamente significativo. Finalmente, la reducción de MTT fue estadísticamente mayor para las HUVEC expuestas a homogenado de placenta con PE. Aunque los resultados obtenidos sugieren que el homogenado de placenta preecláptica tiene efectos deletéreos en el endotelio cultivado, los factores que provocan este daño aun no han sido identificados, sin embargo la complejidad de la enfermedad nos hace suponer que pudieran ser diferentes mezclas de factores las que provocan el daño para cada caso en particular.

# CHARACTERIZATION OF CYTOTOXIC COMPOUNDS OF PLACENTAL EXTRACTS FROM PREECLAMPTIC WOMEN AND THEIR *IN VITRO* EFFECTS ON NORMAL ENDOTHELIUM

## ABSTRACT

---

Hypertension complicating pregnancy is a major public health problem around the world being one of the three more common causes of materno-fetal morbidity and mortality. Preeclampsia is defined as hypertension and proteinuria during pregnancy and its major complication known as eclampsia includes the presence of seizures.

Its etiology remains unknown although the oxidative stress is the final way of endothelial damage in preeclampsia. No single factor responsible of preeclampsia has being found and it is not known whose factors from placenta could be responsible of the disease. Moreover the molecular changes in the endothelium as not being studied.

The aim of our study was to determine if extracts from placenta of preeclamptic women contain factors that cause endothelial cell damage and to study if low dose aspirin treatment could modify this damage.

Protein concentration, cytokine levels (IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) and protein bands were studied from placental extracts of 10 preeclamptic and 10 normotensive women. Two of the patients with preeclampsia where treated with low dose aspirin 2 weeks before delivery. Placental extracts were added to cultures of normal human umbilical vein endothelial cells and their effect on cytotoxicity, adhesion, and oxidative stress where determined (by trypan blue cell counting, adhesion of U937 cells and MTT reduction respectively).

There were no differences neither protein nor cytokine quantification, except for IL-1 that was more elevated in the extracts obtained from normotensive women. The study of the proteic bands clearly shows three groups: one composed by normotensive women, a second that include preeclamptic women and a third group characterized by preeclamptic

women treated with low dose aspirin. It is very interesting that this last group was alike the group of normotensive women.

There were no differences on adhesion and cytotoxicity but placental extracts from normotensive and preeclamptic women were cytotoxic to endothelial cells after 12 hours of incubation. After 8 hours of incubation only extracts from preeclamptic women were cytotoxic ( $p < 0.005$ ).

Our results show a different protein composition between groups. Also more oxidative stress was documented in the cells exposed to placental extract from preeclamptic women, suggesting the presence of a cytotoxic factor (s).

---

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. Preeclampsia

---

### **Definición**

La preeclampsia es un síndrome clínico caracterizado por hipertensión con disfunción orgánica múltiple, proteinuria, edema (Burrow 1996, Tierney 2003).

Se define como un incremento en la TA de al menos 140/90 mmHg después de la semana 20 de gestación, combinado con proteinuria (> 300 mg en 24 horas) (Esplin 2001, Roberts 2003). Las mediciones de la presión arterial elevadas deben ser medidas al menos 2 ocasiones con por lo menos 6 horas de separación (Wilson 2003, Barrilleaux 2002). La proteinuria puede ser una toma simple de orina al azar que indique al menos 30 mg/dL (Wilson 2003) ó ++ en dos muestras de orina (Myers 2002) según el tipo de prueba. El criterio del incremento de 30 mmHg en la presión sistólica y/o 15 mmHg en la presión diastólica respecto a valores previos a la semana 20 de gestación ha sido eliminado por ser poco específico (Roberts 2003).

Como la proteinuria puede ser una manifestación tardía, Roberts y cols. (Roberts 2003) indican sospechar la preeclampsia en una embarazada con hipertensión acompañada de cefalea, dolor abdominal o anomalías en los exámenes de laboratorio.

La hipertensión que sobreviene en la preeclampsia es causada por un aumento de la resistencia vascular periférica. El gasto cardiaco suele ser menor que en el embarazo normotensivo. El flujo renal y la tasa de filtración glomerular (GFR) descienden en la preeclampsia de un 62-84%. Una reducción de la GFR del 50% duplica la creatinina sérica. Un aumento de la creatinina sérica de 0.5-1 mg/dL o del BUN de 8-16 mg/dL representa una disminución de la GFR del 50%. El ácido úrico aumenta antes que haya una elevación medida de la creatinina o BUN. Como en la preeclampsia no hay aumento de la

producción de ácido úrico la hiperuricemia indica una disminución de la depuración renal. La hiperuricemia ( $>5.5$  mg/dL) es un marcador valioso para diferenciar la preeclampsia de todas las demás causas de hipertensión durante el embarazo.

Hay aumento súbito de peso con edema, sobre todo en cara y manos, aunque el edema no constituye actualmente parte del cuadro (Sibai 2005). Es probable que la retención de sodio que tiene lugar en la preeclampsia esté causada por depleción de volumen y reducción de GFR. Pese a la retención de sodio, el volumen plasmático en la preeclampsia está disminuido respecto al embarazo normotensivo. La hipertensión *per se* causa desplazamiento preferencial de líquido del espacio intravascular al intersticial.

## **Cuadro clínico**

El inicio suele ser insidioso y no acompañarse de síntomas. Es más común en nulíparas jóvenes o multíparas mayores. Tiene prevalencia familiar y afecta más a quienes tienen hipertensión previa. Son frecuentes la cefalea, alteraciones visuales y epigastralgia. Hay aumento rápido de peso con edema de cara y manos, elevación de la tensión arterial y proteinuria, comienza más frecuentemente después de la semana 32 de gestación, pero puede aparecer antes, sobre todo en mujeres con nefropatía o hipertensión preexistentes. Cuando la preeclampsia aparece en el primer trimestre es casi patognomónica de mola hidatiforme (Burrow 1996).

Rara vez la proteinuria precede a la hipertensión. En la preeclampsia la proteinuria puede variar de niveles mínimos (500 mg/día) a niveles en rango nefrótico.

Hay hipertensión, sobre todo diastólica. En el examen del fondo de ojo hay estrechamiento arteriolar segmentario con aspecto húmedo brillante, indicador de edema de retina. El edema de pulmón es una complicación común de la preeclampsia, causado generalmente por insuficiencia ventricular izquierda. La trombocitopenia puede ser marcada, ocurre en 5.4-10.9% de los embarazos (Burrow 2001) y sugiere púrpura trombocitopénica idiopática y si se acompaña de signos neurológicos, recuerda la púrpura trombocitopénica trombótica.

El dolor abdominal es frecuente, puede ser incluso de origen pancreático, y si la amilasa está aumentada es posible llegar al diagnóstico de pancreatitis aguda. La excreción de ácido úrico está disminuida principalmente por aumento de la reabsorción tubular y decremento en su depuración renal; con elevación de sus niveles séricos. El ácido úrico sanguíneo se correlaciona bien con la severidad de la enfermedad, en el embarazo normal sus niveles son 3.8 mg/dL, mientras que en la preeclampsia aumentan a 6.7-9.0 mg/dL (Pridjian 2002).

Las complicaciones fetales incluyen sufrimiento y muerte fetal, disgenesia tubular renal, anuria e hipoplasia.

El síndrome de HELLP caracterizado por preeclampsia severa con hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y plaquetopenia puede acompañarse de ictericia severa. Aparece en 4-10% de los casos de preeclampsia (Haddad 2002).

## **Diagnóstico**

Cuadro clínico compatible, medida de TA y exámenes de laboratorio con biometría hemática completa, química sanguínea incluyendo ácido úrico; perfil de lípidos, pruebas de función hepática, bilirrubinas séricas, creatinina sérica, depuración de creatinina en 24 horas, LDH, fibrinógeno, tiempo de protrombina y tiempo parcial de tromboplastina activada (Tierney 2003, Pridjian 2002). En gabinete: radiografía de tórax en PA.

Hasta el momento no existe un marcador específico que permita el diagnóstico preciso ni temprano de la enfermedad, ni tampoco existe una Norma Oficial Mexicana para su prevención, diagnóstico y manejo, a pesar de la gran morbimortalidad de la que es responsable.

## **Diagnóstico diferencial**

Hipertensión gestacional o inducida por el embarazo: es la hipertensión "nueva" con presión arterial >140/90 mmHg que aparece en etapas avanzadas del embarazo (>20 semanas) en dos tomas, pero sin estar asociada a signos de preeclampsia (en especial sin proteinuria) (Myers 2002, Roberts 2003). En general se presenta en multíparas, obesas,

antecedente familiar de hipertensión y puede complicarse con hipertensión arterial esencial crónica después de la resolución del embarazo (Burrow 1996).

La hipertensión crónica es aquella que comienza antes del embarazo o aquella hipertensión del embarazo que no presentó signos de preeclampsia y persiste después de 12 semanas postparto (Roberts 2003).

Otra patología con la que debe hacerse diagnóstico diferencial es la púrpura trombótica trombocitopénica (TTP) debido a la hemólisis y alteraciones neurológicas pueden confundirse o pueden coexistir con preeclampsia (Pridjian 2002). Apoya el diagnóstico de TTP la pentada clásica de fiebre, hemólisis intravascular, falla renal, trombocitopenia y alteraciones neurológicas (Burrow 2001).

## **Clasificación**

La preeclampsia se clasifica en leve y severa de acuerdo a la severidad del cuadro (Tierney 2003, Pridjian 2002, Haddad 2002). La tabla 1.1 muestra los signos que están o no presentes en cada una.

### *Preeclampsia leve*

No hay presencia de disfunción orgánica. Si no hay proteinuria y la sospecha diagnóstica es alta, la ganancia súbita de peso o edema orienta al diagnóstico.

### *Preeclampsia severa*

Cualquier dato de disfunción orgánica. Presión arterial sistólica mayor a 160 mm Hg o diastólica mayor a 110 mm Hg más proteinuria >5 g por día y evidencia de daño a órgano blanco: cefalea, alteraciones visuales, confusión, dolor en hipocondrio derecho o hipogastrio, función hepática alterada, proteinuria, oliguria, edema pulmonar, anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, oligohidramnios y restricción de crecimiento uterino.

### *Eclampsia*

Es la presencia de convulsiones generalizadas antes, durante y dentro de los 7 días siguientes al parto generalmente precedidas de preeclampsia. La incidencia es de 1 en 2



000-3 000 embarazos. Cuarenta y cuatro por ciento ocurre posparto y 33% dentro de las 48 horas siguientes al parto (Pridjian 2002). Le preceden intensos dolores de cabeza y cambios visuales.

Signo	Preeclampsia leve	Preeclampsia severa
Presión arterial sistólica	<150 mm Hg	>160 mm Hg
Presión arterial diastólica	<100 mm Hg	>110 mm Hg
Proteinuria	>300 mg /24 h	> 5 g en 24 g
Cefalalgia	No	Si
Anomalías visuales	No	Si
Dolor abdominal alto	No	Si
Oliguria	No	<500 mL en 24 h
Convulsiones	No	Si (Eclampsia)
Creatinina sérica	Normal o ligeramente elevada <1 mg/dL	> 1 g/ mL
Aspartato aminotransferasa (AST)	Normal o ligeramente elevada <70 U/L	>70 U/L
Bilirrubina	Normal o ligeramente elevada < 1.2 g/dL	>1.2 mg/dL
Ácido úrico	Normal o ligeramente elevada < 6 mg/dL	>8 mg/dL
Lactato deshidrogenasa (LDH)	Normal o ligeramente elevada < 600 U/L	> 600 U/L
Cuenta plaquetaria	Normal o ligeramente elevada > 100, 000/mm <sup>3</sup>	<100, 000 / mm <sup>3</sup>
Edema pulmonar	No	Si
Restricción de crecimiento fetal	No	Si
Oligohidramnios	No	Si

Tabla 1.1. Clasificación de la preeclampsia

## Manejo

El manejo no debe retrasarse y cualquier sospecha de preeclampsia debe tratarse como urgencia considerando el parto lo antes posible. Si la preeclampsia es leve (TA <140/90, proteinuria <500 mg/día, función renal normal, ácido úrico sérico <4.5 mg/dL, recuento plaquetario normal y sin evidencia de HELLP) se puede mantener a la paciente en reposo y monitorización continua si el embarazo aún no es de término, y considerar la aplicación de inductores de madurez pulmonar. Cualquier signo de agravamiento será indicación de terapia antihipertensiva y considerar el parto, en especial si la gesta es mayor a 32 semanas (Burrow 1996, Pridjian 2002, Haddad 2002).

El parto es el único tratamiento definitivo. Se debe reducir la TA a cifras entre 140/90 y 120/80 antes del parto (Haddad 2002, Anumba 1999). La presencia de eclampsia o síndrome de HELLP son indicaciones absolutas de parto.

La medicación antihipertensiva deberá iniciarse si la presión arterial diastólica es igual o mayor a 90 mmHg y hay evidencia de daño a órgano blanco. Mujeres que han recibido terapia antihipertensiva han demostrado un descenso en la incidencia de EVC y complicaciones cardiovasculares. La meta de la terapia antihipertensiva es reducir la presión arterial materna sin comprometer la perfusión útero placentaria. Por cada 10 mmHg de reducción en la presión arterial se reduce el crecimiento fetal en aproximadamente 145 g (Haddad 2002).

La actitud terapéutica actual es conservadora, sólo se indica la terapia antihipertensiva cuando hay evidencia de daño a órgano blanco o cuando es indispensable realizar el parto, donde se sigue el protocolo obstétrico correspondiente. (Haddad 2002, Anumba 1999). Un embarazo menor de 32 semanas se deberá tratar conservadoramente si el cuadro clínico así lo permite, si es mayor de 32 semanas se inducirá el parto.

## **Tratamiento farmacológico**

Los suplementos de calcio (2g / día) reducen la TA y la incidencia de hipertensión en el embarazo, ya que se disminuye la capacidad de respuesta a la angiotensina II, lo que sugiere un aumento en la síntesis de PGI<sub>2</sub> (Burrow 1996) podrían ser benéficos en comunidades con dieta baja en calcio, su utilidad en pacientes sin déficit se encuentra aún en evaluación (Myers 2002, Pridjian 2002).

De acuerdo a la hipótesis etiopatogénica de estrés oxidativo se ha intentado dar antioxidantes como profilaxis, pero no se ha mostrado evidencia de su utilidad, aunque ya existen estudios hechos en mujeres con alto riesgo para preeclampsia que han mostrado disminución de la incidencia de preeclampsia en el grupo tratado (Burrow 1996, Seongho 2007), pero los estudios son pequeños y aislados. En una revisión sistemática reciente se publicó que los suplementos combinados de vitamina C y E no reducen el riesgo de preeclampsia, ni de pérdidas fetales, muerte neonatal, restricción en el crecimiento

intrauterino o parto pretérmino y que no deberán emplearse hasta que se tengan evidencia suficientes que apoyen sus beneficios (Polizos 2007).

El tratamiento con antihipertensivos previene el edema de pulmón, edema cerebral y la hemorragia cerebral. Los únicos fármacos absolutamente contraindicados en el embarazo son los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los bloqueadores de los receptores de angiotensina II. Los diuréticos han mostrado seguridad al usarse durante el embarazo (Barrilleaux 2002) pero en caso de preeclampsia su uso no es aceptado, excepto la furosemida cuando hay insuficiencia cardiaca (Pridjian 2002). Los IECA y bloqueadores de receptores de angiotensina provocan oligohidramnios, estenosis de la arteria renal fetal, muerte fetal, disgenesia tubular renal, anuria e hipoplasia craneal y pulmonar.

Los medicamentos preferidos debido a su seguridad son la  $\alpha$ -metildopa, los beta bloqueadores y vasodilatadores (hidralazina) (The seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure 2003). En las tablas 2.1 y 3.1 se muestran los diferentes antihipertensivos que pueden ser utilizados, sus dosis, posibles efectos colaterales y si son de primera elección o no (Barrilleaux 2002).

Medicamento	Dosis usual para uso no agudo	Efectos adversos	Comentarios
<b>Metildopa</b>	250-1500 mg dos veces al día, máximo 3 g/día	Hipotensión postural, mareos, lipotimia, retención de líquidos	Potencia ligera. Uso común
<b>Hidralazina</b>	10, 20, 50, 100 mg tres o cuatro veces al día, máximo 400 mg/día	Cefalalgia, palpitaciones, lupus inducido por fármacos	Comunmente usado para <a href="#">control</a> a corto plazo
<b>Labetalol</b>	100, 200 o 300 mg, máximo 2 400 mg/día	Cefalalgia, bloqueo cardiaco, boca seca, temblor	No usar en asma o insuficiencia cardiaca congestiva. Usar con precaución en diabetes
<b>Nifedipina</b>	Sólo usar nifedipina de larga acción. 30-60 mg como inicio, luego 30, 60, 90 mg. Máximo 120 mg/día	Cefalalgia, fatiga, mareo, edema periférico, constipación	Gran efecto para disminuir una presión arterial muy alta
<b>Felodipina</b>	5-10 mg/día máximo 10 mg dos veces al día	Igual que nifedipina	Efecto selectivo sobre músculo liso vascular

<b>Tiazida</b>	12.5 mg incrementarlo 25 mg diario	Hipocalemia, hiponatremia, hiperuricemia, retraso de crecimiento intrauterino	Alteraciones electrolíticas
<b>Furosemida</b>	20-40 mg/día máximo 160 mg dos veces al día	Igual que tiazidas	Igual que tiazidas

Tabla 2.1. Antihipertensivos usados durante el embarazo (Barrileaux 2002, Sibai 2005).

Régimen	Terapia primaria	Fármaco secundario	Tercer fármaco
<b>Anteparto</b>			
<b>I</b>	Metildopa	labetalol	Hidralazina
<b>II</b>	Felodipina	Diurético	Labetalol
<b>III</b>	Felodipina	labetalol	Hidralazina
<b>IV</b>	Hidralazina	Labetalol	Diurético
<b>Postparto</b>			
<b>I</b>	Hidralazina	Nifedipina XL/felodipina	Labetalol
<b>II</b>	Nifedipina XL/felodipina	Labetalol	Diurético
<b>III</b>	IECA	Bloqueador de canales de calcio	Beta-bloqueador

Tabla 3.1. Estrategias para el control de hipertensión crónica en el embarazo/postparto

## Pronóstico

La preeclampsia causa efectos cardiovasculares en etapas tardías de la vida (Burrow 1996). La probabilidad de tener otro embarazo complicado con preeclampsia aumenta tras un intervalo amplio entre embarazos y edad materna avanzada. También se ha asociado con riesgo elevado de padecer diabetes a futuro. Mujeres que padecieron síndrome de HELLP tienen alto riesgo de 23% de padecer preeclampsia en un embarazo subsecuente y 19% de probabilidades de recurrencia del síndrome de HELLP. (Pridjian 2002). Se deberá determinar si existen anticuerpos antifosfolípidos, deficiencia de factor V de Leiden, resistencia a la proteína C activada e hiperhomocisteinemia. (Pridjian 2002).

## **Prevención**

El control prenatal adecuado y un adecuado estilo de vida antes y durante el embarazo pueden evitar que se presente la enfermedad que como se presenta más frecuentemente en población con estado socioeconómico bajo. La vigilancia de la ganancia ponderal adecuada, no excesiva; monitoreo cuidadoso de la TA y excreción urinaria de proteínas son parte del protocolo de prevención.

Se ha descrito que la aspirina a dosis bajas (50-150 mg/día) reduce en 15% la incidencia de preeclampsia (Myers 2002, Pridjian 2002) aunque los resultados son contradictorios, no se ha establecido claramente la asociación con sangrado y abrupcio placentae (Pridjian 2002).

Los suplementos de calcio 1-2 g/día se recomiendan solo en pacientes con baja ingesta de calcio en la dieta (Myers 2002, Pridjian 2002).

El aumento en el consumo de antioxidantes como vitamina C y E son promisorios como preventivos de preeclampsia en mujeres de alto riesgo, sin embargo, no se ha determinado su eficacia en estudios prospectivos en grandes cohortes (Haddad 2002).

## **Fisopatología de la PE**

### **Factores asociados a la fisopatología**

#### *Implantación inadecuada*

En la preeclampsia y en algunos casos de restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), los cambios fisiológicos de las arterias espirales están restringidos a la porción decidual de éstas, por lo que aproximadamente el 30 a 50% del lecho placentario arteriolar se escapa por completo de la invasión trofoblástica endovascular (Khong 1986, Pijnenborg 1991, Meekins 1994). Los segmentos miometriales quedan anatómicamente intactos y sin dilatar así como las terminaciones nerviosas de las arterias espirales. Es frecuente encontrar citotrofoblasto en el lumen de las arterias espirales en la PE y el RCIU, obstrucción de los vasos por ateromas, e infiltrado mononuclear perivascular, la aterosclerosis aguda y la trombosis

pueden ser los causantes de infartos placentarios, también se ha encontrado lipoproteína frecuentemente asociada con la aterosclerosis (Meekins 1994 A, Meekins 1994 B).

### ***El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el fenotipo de adhesión vascular del citotrofoblasto invasor***

El VEGF es un factor de crecimiento asociado a la angiogénesis con acción específica en el endotelio y se expresa vastamente en la interfase feto-materna. Durante la implantación, se expresa predominantemente en las células de epitelio uterino, posteriormente en los macrófagos de la decidua que son la fuente principal de su expresión. Se encontró que el trofoblasto de transición del primer trimestre y el trofoblasto extraveloso expresan el receptor para VEGF. La expresión de esta molécula aumenta con la hipoxia, la neovascularización inducida por hipoxia mejora la oxigenación del tejido y así se produce retroalimentación negativa sobre el VEGF. Este mecanismo homeostático tiene particular importancia en el primer trimestre, cuando la tensión del oxígeno en el trofoblasto vellosos es particularmente baja. VEGF puede estar involucrado en la expresión de marcadores endoteliales que permiten la invasión citotrofoblástica. Se ha demostrado que induce la expresión de integrinas en las células endoteliales asociadas con invasión angiogénica; estas integrinas son parte de las moléculas que el endotelio expresa *de novo* y que permiten la invasión del citotrofoblasto.

### ***Matriz decidual extracelular y moléculas de adhesión celular***

Las células del trofoblasto no son citolíticas pero secretan enzimas que afectan la matriz extracelular. Los estudios inmunohistoquímicos han localizado activador del plasminógeno así como metaloproteinasas y colagenasas en el trofoblasto extraveloso (Pijnenborg 1996, Hofmann 1994, Moll 1990). La actividad de las metaloproteinasas depende de una gran gama de mediadores. Su secreción es dependiente de plasmina e inhibida por la fracción beta de la gonadotropina coriónica humana, que favorece un sistema autócrino regulador. La IL1 $\beta$  es estimulante y ya que el trofoblasto la secreta y expresa su receptor podría haber un asa autócrina estimulante. Otro candidato potencial que puede simular la colagenasa tipo IV es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ).

La migración celular depende de la adhesión, unión y tracción de las proteínas de anclaje a la matriz extracelular. La unión a ciertos receptores de la matriz extracelular media no solo la adhesión sino también el crecimiento y la diferenciación celulares. El comportamiento del trofoblasto durante la implantación también está controlado por las proteínas de la matriz extracelular de la decidua. Las células se unen a las proteínas de la matriz extracelular por medio de moléculas de adhesión. Las cuatro principales familias de éstas incluyen a las integrinas, las caderinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas y las selectinas. La caderina E está implicada en la diferenciación del citotrofoblasto en sincitiotrofoblasto, las integrinas median la adhesión a la matriz extracelular. Las integrinas son glicoproteínas transmembranales formadas por subunidades alfa y beta unidas de manera no covalente. La especificidad de los ligandos de las integrinas está determinada por las diferentes combinaciones de unión de las subunidades. Así, el inicio de la migración y el comportamiento invasivo del trofoblasto se asocia con un cambio en la expresión de las integrinas que cambian la tendencia inicial de unión del trofoblasto a la lámina basal (laminina) hacia la unión al estroma (fibronectina) de la matriz (Pijnenborg 1996, Burrows 1994, Loke 1995).

Este cambio de las integrinas por el citotrofoblasto invasor es anormal en la preeclampsia. La invasión del lecho placentario por el trofoblasto en pacientes preeclámpicas no regula negativamente a la beta 4 y no hace el cambio de las subunidades de la integrina alfa 6 a alfa 5 y alfa 1. Se ha observado menor adhesión a las proteínas de la matriz extracelular fibronectina y vitronectina en embarazos de preeclámpicas (Pijnenborg 1996) esto refleja probablemente las diferencias en la expresión de las integrinas por el trofoblasto. Por otro lado Divers en 1995 no encontró diferencias en los niveles de expresión de las integrinas en el trofoblasto de pacientes sanas y con PE. Por lo que concluimos que la diferenciación anormal del citotrofoblasto en la PE no es necesariamente un mecanismo primario. Una explicación alternativa sería una interacción anormal entre el trofoblasto y las células linfoides de la decidua (Loke 1995). Sin embargo, sigue siendo incierto si este fenómeno está mediado por un efecto directo de la hipoxia del citotrofoblasto en el lecho placentario que altera la expresión de las integrinas, o si se trata de un incremento en la acción de la VEGF.

### *Tono vascular*

En el embarazo normal hay un incremento de 8 a 10 veces en la prostaciclina. La síntesis del tromboxano A2 (TxA2) también se encuentra incrementada en el embarazo normal, el resultado neto es una dominancia de las prostaciclina sobre el TxA2 (Meagher 1993, Wang 1991). La dominancia de las prostaciclina explica por qué hay una respuesta refractaria a la angiotensina II en el embarazo normal, aunque su papel como hormona circulante está en debate debido a su corta vida media (Meagher 1993, Gant 1973). Sin embargo, las prostaciclina no son los principales vasodilatadores del embarazo (Conrad 1986, Mukaddam 1994). Una variedad de factores peptidos reguladores liberados en un ambiente esteroide adecuado, juegan un papel importante en esta regulación (citocinas, proteínas de unión, factores de crecimiento) (Fay 1991, Morris 1996). El óxido nítrico (NO<sub>2</sub>) es un importante mensajero, pero ciertamente no el único que induce vasodilatación en el embarazo normal (Morris 1996, Ahogas 1991). En animales encintas la inhibición crónica del óxido nítrico impide que se presente la falta de respuesta a la angiotensina y la vasopresina y eventualmente produce un síndrome parecido a la preeclampsia. El NO<sub>2</sub> no es la sola explicación a la gran vasodilatación que se presenta en el embarazo normal. Se ha probado la existencia de otros vasodilatadores derivados del endotelio que causan vasodilatación en el embarazo (Pascoal 1996).

El NO<sub>2</sub> juega ciertamente un papel más importante que las prostaciclina en el mantenimiento del tono vascular bajo en los vasos feto-placentarios (Myatt 1992, Myatt 1993). Por medio de inmunohistoquímica se ha localizado sintasa de NO<sub>2</sub> en placentas de término, expresada fuertemente en el sincitiotrofoblasto pero no en las células endoteliales de los vasos feto-placentarios ni el citotrofoblasto. Solo una pequeña parte del NO<sub>2</sub> producido en el lecho placentario está destinada a contribuir en la vasodilatación uteroplacentaria (Morris 1995). Otros estudios encontraron actividad significativamente incrementada de la sintasa de NO<sub>2</sub> en la membrana basal y el tejido veloso placentario, comparada con la actividad del endotelio vascular.



## Teorías sobre la fisiopatología de la preeclampsia

En la PE la dominancia biológica del TxA2 sobre las prostaciclina podría explicar la falta de estimulación normal del sistema renina-angiotensina, la hipovolemia consecuente y el incremento de la respuesta vascular a la angiotensina II y la norepinefrina (Meagher 1993, Gant 1973, Baker 1991, Friedman 1988). Se ha reportado reducción en los niveles de excreción urinaria de metabolitos de prostaciclina previo al cuadro clínico, por otro lado la biosíntesis placentaria y plaquetaria de TxA2 está aumentada en la PE (FitzGerald 1990). La producción de prostaciclina placentaria está reducida (Woodworth 1994). Aunque la relación TxA2-prostaciclina provee una explicación para la vasoconstricción, la destrucción plaquetaria y la disminución del flujo útero-placentario, existen muchas evidencias de que este síndrome no es un simple estado de deficiencia de prostaciclina (Friedman 1990, Zeeman 1992). Se sabe que hay una deficiencia endotelial generalizada en la preeclampsia que incluye niveles aumentados del antígeno relacionado al factor VIII, de la fibronectina total y celular, trombosmodulina, de endotelina, de la actividad del factor de crecimiento, que hay alteraciones en el balance del activador/inhibidor del plasminógeno tisular y del balance de la prostaciclina/TxA2 (Friedman 1994, Barton 1991). La endoteliosis glomerular, los cambios endoteliales del lecho placentario, los vasos uterinos y otros vasos, son claras evidencias de daño morfológico endotelial en la PE (Shanklin 1989, Barton 1991). Algunos experimentos *in vitro* con suero de pacientes con PE no causan específicamente daño endotelial pero sí activan vías específicas del metabolismo endotelial (Endresen 1995) que podrían relacionarse con las alteraciones vasculares *in vivo*. Los resultados de los estudios de la producción de NO<sub>2</sub> en la preeclampsia han arrojado resultados controversiales: los niveles plasmáticos de nitrito y nitrato se han encontrado disminuidos, sin variaciones o incrementados, en comparación con los de pacientes normotensas (Friedman 1995, Brown 1995). Sin embargo, el mejor indicador *in vivo* de la producción de NO<sub>2</sub> es la excreción urinaria de nitritos, se ha encontrado disminución de los metabolitos de NO<sub>2</sub> en orina, pero no en plasma de pacientes con PE (Davidge 1996). Las concentraciones plasmáticas de inhibidores de sintasa de NO<sub>2</sub> se han encontrado elevadas en pacientes con PE, comparadas con los niveles de pacientes con embarazos normales o con HAS gestacional. El NO<sub>2</sub> causa decremento significativo en la resistencia arterial uterina en pacientes que presentan un elevado índice de la resistencia arterial.

En la PE la disfunción del endotelio y la agregación plaquetaria preceden al incremento de la formación de trombina y fibrina (Ramsay 1992, Halligan 1994). La inadecuada producción de antiagregantes como prostaciclina y NO<sub>2</sub> son una explicación atractiva para la activación plaquetaria que se produce en la capa interna de las arterias espirales. Las plaquetas se adhieren y liberan gránulos densos que contienen TxA<sub>2</sub> y serotonina que contribuyen a la agregación plaquetaria e inducen la formación de fibrina. Se ha sugerido que si se encontrara endotelio intacto en las arterias espirales, el incremento en la serotonina proveniente de las plaquetas activaría los receptores S<sub>1</sub> lo que induciría una recuperación parcial de la liberación de prostaciclina y NO<sub>2</sub> (Vanhoutte 1991). La prostaciclina local puede estimular el sistema renina-angiotensina utero placentario y así inducir la liberación de angiotensina II que podría mejorar la perfusión útero placentaria al incrementar la presión sanguínea materna y formar un estímulo extra para la secreción de prostaciclina y NO<sub>2</sub> por los vasos uterinos.

En la PE y la restricción en el crecimiento intrauterino (RCIU) la unidad fetoplacentaria se caracteriza también por su balance en el sistema TxA<sub>2</sub>/prostaciclina (Mitsubishi 1994) en lo que concierne a la síntesis de óxido nítrico por el sincitio trofoblasto, se ha encontrado que la sintasa se encuentra disminuida en placentas de pacientes con PE en comparación de pacientes sanas (Morris 1995). Otros autores no encontraron diferencias en la producción de NO<sub>2</sub> al medir niveles de nitritos en placentas sanas y de preeclámpticas (Wang 1994). Ghabour (Ghabour 1995) encontró con técnicas inmunohistoquímicas que la sintasa de NO<sub>2</sub> se expresa principalmente en la porción apical de las placentas de pacientes con PE y de manera difusa, pero para las pacientes sanas se encontró expresión basal puntual en las placentas. La diferenciación del cititrofoblasto en sincitiotrofoblasto se asocia con expresión de sintasa de NO<sub>2</sub> (Eis 1995). Las alteraciones en la expresión endotelial de sintasa de NO<sub>2</sub> en las pacientes con PE, podría ser resultado del daño placentario y los procesos de reparación de éste, más que un mediador primario.

### *Etiología de la preeclampsia*

La activación del endotelio o su disfunción parece tener un papel central en la patogénesis de la preeclampsia, pero ¿qué causa estos daños endoteliales en la preeclampsia? Cuatro hipótesis son actualmente tema de intensas investigaciones. Para mayor claridad, estas

hipótesis se describen por separado, sin embargo, debe considerarse que no se excluyen mutuamente sino que en realidad interactúan.

*Isquemia placentaria.* De acuerdo al grupo de investigadores de Oxford, la preeclampsia es una enfermedad placentaria en dos estadios. En el primero se afectan las arterias espirales y esto resulta en una deficiente irrigación placentaria. El segundo estadio comprende los resultados de ésta placenta isquémica sobre el binomio materno-fetal (Smarason 1993, Chua 1991). Se encontró que las membranas de las microvellosidades de las placentas normales y preeclámpticas suprimen la proliferación del endotelio, convirtiéndolo en una monocapa rota que posteriormente adquiere una forma parecida a la de un panal de abejas (Smarason 1993). La exportación de tejido placentario, también presente en el embarazo normal, está aumentada en la preeclampsia. Aunque este transporte de tejido trofoblástico podría, en teoría, ejercer un efecto sistémico al disminuir la producción pulmonar de NO<sub>2</sub> (según el grupo de Oxford), el incremento en la microexportación de membranas de las microvellosidades del sincitiotrofoblasto está en realidad más relacionado con la disfunción sistémica endotelial de la preeclampsia (Sargent 1994, Chua 1991). El incremento en la liberación de sincitiotrofoblasto en la preeclampsia, podría explicarse por el crecimiento del sincitio que podría alongarse con largos pedículos (Sargent 1994). La proliferación del citotrofoblasto y la formación de estos crecimientos de sincitiotrofoblasto, podrían representar mecanismos de reparación de la placenta. La preeclampsia se asocia con acumulación de glucógeno en el sincitiotrofoblasto lo que podría ser otra manifestación de esta exportación y proliferación aumentada del cito y sincitiotrofoblasto (Arkwright 1993). La producción de TxA<sub>2</sub> por vellosidades del citotrofoblasto disminuye cuando madura en sincitiotrofoblasto (Ding 1994) se ha descrito un factor tóxico endotelial proveniente del sincitiotrofoblasto en placentas de pacientes con preeclampsia, pero no en placentas de pacientes sanas (Naicker 2003).

La isquemia placentaria causa disfunción endotelial y ésta podría ser una explicación atractiva para el síndrome de la preeclampsia, sin embargo diversas evidencias pueden contradecir ésta hipótesis. Primero, si la isquemia placentaria fuera causante de la disfunción endotelial, se presentaría un cuadro parecido en la madre y el feto pero no es así. Por otro lado, la cronología de los componentes del cuadro clínico materno, no coinciden

con la hipótesis de la isquemia placentaria. Algunos autores han encontrado que la disfunción endotelial está presente desde el primer trimestre o incluso antes (Lockwood 1990, Taylor 1990, Alexander 2007) por lo que este daño no coincide con la presentación del cuadro en estadios avanzados del embarazo. Normalmente durante el primer trimestre el trofoblasto se encuentra en un medio con baja concentración de oxígeno, y esta “hipoxia” relativa es importante para el adecuado desarrollo del trofoblasto, ya que estados asociados a un aumento en el flujo se asocian con mala evolución del embarazo (Jaffe 1995). Las bajas cantidades de oxígeno, afectan la función del trofoblasto en el embarazo avanzado, se ha reportado que los cambios histológicos provocados en el cito y sincitio trofoblasto por hipoxia en placentas del tercer trimestre, son muy similares a los observados en la preeclampsia severa (Cross 1996). El problema básico con la hipótesis del grupo de Oxford es que los estudios se basan en pacientes que ya desarrollaron la enfermedad. El incremento en la exportación de sincitiotrofoblasto, que es de suma importancia en esta hipótesis, parece ser un evento tardío en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, este fenómeno puede ser clínicamente importante ya que puede estar involucrado en el desarrollo de la hipertensión severa refractaria al manejo y el vasoespasmo que se presenta en los estadios finales de la preeclampsia severa y la eclampsia.

*Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)* y prevención de la citotoxicidad. Se ha reportado que en la preeclampsia los ácidos grasos libres circulantes (AGL) se incrementan entre 15 y 20 semanas antes de la presentación clínica de la enfermedad (Lorentzen 1994). El suero de pacientes preeclámpicas tiene índices elevados de la relación ácidos grasos libres (AGL): albúmina y actividad lipolítica incrementada lo que resulta en un aumento de la incorporación celular de AGL para ser esterificados en triacilglicéridos (TAG) (Halliwell 1992, Endresen 1993). De los AGL se ha encontrado que los ácidos grasos oléico, el linoléico y palmítico, están aumentados en un 37, 25 y 25% respectivamente. El ácido linoleico reduce la liberación de prostaciclina estimulada por la trombina en un 30 a 60% y el ácido oleico en un 10 a 30%, mientras que el ácido palmítico no tiene efecto. La incubación con ácido linoleico reduce los niveles de GMPc en un 70% y la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria en un 10 a 45% (Endresen 1994). La albúmina plasmática existe en diferentes formas isoeléctricas con puntos isoeléctricos de entre 4.8 a 5.6. Entre más AGL se una a la albúmina más bajo será el punto isoeléctrico. La

albúmina plasmática previene la toxicidad celular solo cuando su punto isoeléctrico se encuentra en 5.6. Ya que elevadas proporciones de AGL: albúmina causan un cambio de 5.6 a 4.8 en el punto isoeléctrico de la albúmina, las pacientes con preeclampsia tendrán menores niveles de albúmina “protectora” con respecto a embarazadas normotensas. Una baja protección tóxica contra las VLDL resultaría en acumulación citotóxica de TAG en las células endoteliales (Arbogast 1994, Wakatsuki 2000).

De acuerdo al grupo de Arbogast, el embarazo aumenta las necesidades de energía y esto provoca incremento de la concentración de VLDL. En las mujeres con bajos niveles de albúmina el aumento en el transporte de AGL del tejido adiposo al hígado reduciría la prevención de la citotoxicidad a un punto en el que se presente la toxicidad de las VLDL provocando así daño endotelial (Arbogast 1994).

Al igual que para la hipótesis de la isquemia placentaria, es difícil concebir un aumento tan fuerte en las demandas de energía que pueda provocar una alteración tan marcada de la proporción de las VLDL y los factores protectores de citotoxicidad y subsecuentemente disfunción endotelial, sobre todo en el primer trimestre del embarazo. Más bien el aumento de AGL y la acumulación endotelial de TAG son eventos tempranos y probablemente de suma importancia en la preeclampsia y podrían reflejar el estrés oxidativo mediado por citocinas causado por la isquemia placentaria y/o activación de los leucocitos (Saltar 1996). Por otro lado, se ha encontrado que tanto las LDL como las lipoproteínas de alta densidad (HDL), provenientes de suero de pacientes con PE, son más susceptibles a sufrir oxidación, comparadas con las provenientes de pacientes sanas (Wakatsuki 2000).

*Maladaptación inmune.* El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) está estrechamente relacionado con el rechazo de órganos trasplantados e incluye genes que comprenden los antígenos humanos de los leucocitos (HLA). Se ha encontrado que las células del trofoblasto que están en contacto con la sangre materna no expresan en MHC clase I ni los aloantígenos tipo II, mientras que las que están en contacto con el tejido materno son positivas para MHC tipo I. Durante el primer trimestre el sincitiotrofoblasto y las vellosidades coriónicas del citotrofoblasto no expresan los aloantígenos del MHC clase I, que se expresa solo en el citotrofoblasto extravelloso y en las puntas de las células

columnares de las arterias espirales uterinas. La familia de genes HLA tipo I comprende glicoproteínas altamente polimórficas (HLA-A, HLA-B, HLA-C) que se expresan en prácticamente todos los tejidos y participan en la presentación de antígenos de péptidos autólogos a las células T. Al menos 3 genes más de HLA I (E, F y G) han sido identificados, son los llamados no clásicos y son altamente homólogos a los clásicos. HLA-E y HLA-F se expresan en muchos tejidos fetales y adultos. Por otro lado, el HLA-G se expresa solamente en la cara materno fetal del trofoblasto extraveloso, donde están ausentes los antígenos HLA I clásicos y los HLA II. Esta expresión restringida sugiere que el HLA-G juega un papel muy importante en la tolerancia inmune de la madre hacia el feto, que representa un tejido semialogénico (Loke 1997, Sargent 1993, Carosella 1996, Shorter 1993). El gen del HLA-G se caracteriza por estar en un locus cuyo grado de polimorfismo es muy bajo y que además no afecta casi nada sus patrones proteicos. Estudios muy interesantes han demostrado expresión de alelos diferentes en la población Afro-Americana, así como mutaciones del gen de HLA-G en neonatos con restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), lo que contrasta con los hallazgos en caucásicos que muestran un polimorfismo mínimo de éste gen.

Estudios en la expresión de antígenos de superficie de CD-45 han demostrado que la decidua contiene un gran número de células de origen medular. En la fase secretora tardía del endometrio una población especial, secreta CD-56, un marcador de los granulocitos periféricos. Estas células son muy parecidas a las NK pero no tienen una actividad tan fuerte como los NK circulantes. Aproximadamente el 75% de las células deciduales expresan CD45, lo que refleja su origen medular (aproximadamente 45% granulocitos, 19% de macrófagos y 8% de células T). Mientras el embarazo progresa, la población de macrófagos y células T permanece constante, pero el número de granulocitos uterinos desciende dramáticamente (Starkey 1993, Satio 1993, Deniz 1994).

La función de las células de la familia NK como los granulocitos uterinos, es matar células blanco deficientes en la expresión de MHC más que reconocer la presencia de MHC extraño (Klein 1994, Chumbley 1990, Ljunggren 1990). Sin embargo la falta de expresión de moléculas clásicas HLA tipo I en el trofoectodermo y el citotrofoblasto invasor, no es suficiente para explicar su protección de las células parecidas a NK. La expresión de un

antígeno tipo I no clásico en la superficie del citotrofoblasto invasor es una buena explicación a este paradigma (Jurisicova 1996). Es el denominado HLA-G, que además es capaz de inhibir la actividad de las NK de los granulocitos uterinos contra el trofoblasto en la interfase materno-fetal (Loke 1997, Satio 1993, Chumbley 1994). Así, la ausencia de expresión de moléculas HLA clásicas y la presencia de HLA-G en el citotrofoblasto invasor son de suma importancia en la protección del trofoblasto ante un ataque citotóxico por reconocimiento del sistema inmune (Sargent 1996, Carosella 1996, Shorter 1993). Durante la gestación, las células extravelosas del citotrofoblasto mantienen la habilidad de regular positivamente la expresión de HLA-G, pareciera que deben mantener al sistema inmune materno permanentemente alejado. Por otro lado, las células del citotrofoblasto expresan características invasoras solo de manera transitoria, se ha descrito expresión de metaloproteinasas e integrina solo al principio del embarazo (McMaster 1995). Se ha descrito expresión disminuida de ARNm para HLA-G en tejido coriónico de pacientes con PE comparado con tejido de pacientes sanas. Sin embargo, un estudio más profundo reveló que este era efecto más bien de la conocida disminución en el número de células trofobásticas y no en sí de la expresión de ARNm. La expresión de HLA-C por células del trofoblasto está coordinada con la expresión de HLA-G, pareciera que son necesarias como parte del grupo de moléculas HLA tipo I que participan en el reconocimiento de las NK y previenen la lisis.

Otras alternativas para en el papel de los linfocitos granulares y las células CD-56 uterinas podría ser que su función secretora ante la invasión por el trofoblasto positivo para HLA-G sea clave en el crecimiento e invasión (King 1991). El inmunotrofismo (sea la actividad de los leucocitos deciduales) podría favorecer el crecimiento trofoblástico (Wegmann 1998). Así como la creciente producción de los factores estimuladores de colonias provenientes de los macrófagos deciduales y la placenta misma, son factores que parecen estar estrechamente relacionados con las interacciones decidua-trofoblasto durante las etapas tempranas del embarazo, ya que estimulan a los macrófagos endometriales, la producción de lactógeno placentario por el trofoblasto, y la síntesis de gonadotropina coriónica (Giudice 1994). Se sabe que diferentes citocinas participan en el desarrollo temprano del embarazo. El factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , y el factor estimulador de colonias 1 (CSF-1) han sido implicados en la

adhesión del blastocisto y la implantación, proliferación e invasión del trofoblasto. Ya que el TNF- $\alpha$ , y los IFN  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  y el TGF- $\beta$ -1 se producen en la unidad útero placentaria e inhiben la síntesis de DNA por el trofoblasto, podrían estar participando en la regulación del crecimiento del trofoblasto. Por otro lado IL-1, GM-CSF e IL-6 podrían tener efecto estimulante sobre el crecimiento del trofoblasto. Es importante comentar que todos estos efectos se llevan a cabo bajo una estrecha interacción con los corticoesteroides y las prostaglandinas (Starkey 1993, Aoki 1993, Giudice 1994).

La acción diferente y mutuamente inhibida de las 2 poblaciones de células T fue descrita hace más de 20 años (Mosmann 1991). Las células tipo Th1 secretan IL-2, IFN- $\gamma$ , y linfotoxina. En contraste las células Th2 secretan IL-4, IL-6 e IL-10 (Mosmann 1993). Las células Th1 participan en la inmunidad mediada por células y las reacciones de hipersensibilidad retardada, mientras que las células Th2 participan en la inmunidad mediada por anticuerpos y las respuestas alérgicas. En el embarazo hay predominancia de la respuesta Th2 y se ha propuesto que el éxito de éste depende de la inhibición de la respuesta Th1 secundaria a la activación de la respuesta Th2 (Wegmann 1993, Dong 2005). Esta hipótesis se refuerza con la observación de que las enfermedades autoinmunes mediadas por respuesta celular, como la artritis reumatoide, mejoran durante el embarazo, mientras que las enfermedades asociadas a producción de auto anticuerpos, empeoran (Varner 1991). Muchos factores participan en la regulación y el mantenimiento inmunoendócrino del embarazo. La prostaglandina E2 tiene muchas propiedades inmunodepresoras, incluyendo la inhibición de todas las células del sistema inmunológico (Goodwin 1983). La IL-10 inhibe potencialmente la función inmune por medio de dos mecanismos: (1) directamente como factor inhibidor de la síntesis de citocinas y (2) indirectamente como inductor de la hormona adenocorticotrópica. A pesar de la importancia de esta observación, hay que decir que los ratones con delección del gen IL-10 se reproducen sin problema (Kuhn 1993).

Además de las citocinas, el crecimiento fetal y placentario está parcialmente regulado por los factores de crecimiento similares a insulina (IGF) y por sus proteínas de unión (IGFBP-1 o proteína placentaria 12). Las sustancias trofoblásticas como el lactógeno placentario estimulan la producción hepática materna de IGF-1. Por otro lado, las células que unen la



IGF-1 cambian durante la diferenciación trofoblástica (Jones 1995). El peso fetal se correlaciona positivamente con los niveles fetales y maternos de IGF-1. El IGFBP-1 producido por las células del estroma decidual favorece el crecimiento trofoblástico al inhibir el IGF-1. Los niveles elevados de IGFBP-1 en las semanas 16-24 de la gestación en embarazos que desarrollarán PE e RCIU sugieren que su sobreproducción podría ser al menos parcialmente responsable de la placentación anormal (Jones 1995, Jones 1993, Milio 1994). En contraste otros investigadores han encontrado niveles bajos de IGFBP-1 en el segundo trimestre en mujeres con PE, en comparación con embarazadas sanas. Hasta el momento, no se puede explicar con certeza el papel de estas sustancias basados en estos hallazgos.

Los estudios epidemiológicos sugieren que los mecanismos inmunes deben tener un papel en la etiología de la PE (Redman 1991, Robillard 1993, Trupin 1996). La PE genuina es primariamente una enfermedad de primigestas. Un embarazo previo normal se asocia con una incidencia mucho menor de la enfermedad, incluso un aborto previo confiere cierta protección. El efecto de la multiparidad, se pierde con el cambio de pareja, entonces la PE puede ser un problema asociado con primipaternidad más que con primigravidez (Robillard 1993). En un reporte que incluía 5068 nulíparas y 5800 multíparas 573 con nuevas parejas, se encontró que la incidencia de PE era similar en las nulíparas y las multíparas con nueva pareja (3.2 y 3% respectivamente), mientras que la incidencia para las multíparas era significativamente menor (1.9%). Por otro lado, los embarazos logrados con inseminación heteróloga y donación de ovocitos, tienen mayor incidencia de PE (Serhal 1989). Existen numerosas evidencias que asocian a la PE con alteraciones inmunológicas. Al principio del segundo trimestre las mujeres que desarrollarán PE tienen menor proporción de células T, comparadas con aquellas que permanecen normotensas (Bardeguéz 1991). Se han encontrado anticuerpos antiendotelio en el 50% de las mujeres con PE, en comparación con 15% de los casos control (Rappaport 1990). En las paredes de las arterias espirales uterinas se han encontrado depósitos de inmunoglobulinas (IgM), complemento (C3) y fibrina, principalmente en zonas ateroscleróticas. Se infiere participación inmunológica importante en el desarrollo de la aterosclerosis por la similitud de las lesiones que se desarrollan en el rechazo a los aloinjertos. Sin embargo, la aterosclerosis aguda ocurre principalmente en las arterias que no han sufrido los cambios fisiológicos mediados por la invasión trofoblástica,

así, si se considera la analogía con el rechazo de injertos, se tendría que suponer que el feto está rechazando a la madre (Labarrere 1988).

¿Cuál es la relación entre una mala adaptación inmune y la activación endotelial en la PE? La decidua contiene una abundante cantidad de células de origen medular. Cuando estas células se activan pueden liberar una gran cantidad de mediadores que interactúan con las células endoteliales.

*Elastasa.* Los neutrófilos activados liberan elastasa y otras proteasas tóxicas que pueden destruir la integridad del endotelio. Los niveles plasmáticos de elastasa son significativamente mayores en mujeres con PE y su elevación se correlaciona con niveles elevados de endotelina y antígeno relacionado al factor VIII, lo que apoya su participación como causa de la disfunción endotelial en la PE. El número de neutrófilos deciduales positivos para elastasa es mayor en embarazos complicados con PE y se correlaciona positivamente con los niveles de ácido úrico (Butterworth 1991, Greer 1991).

*Citocinas.* Los estudios se han enfocado al TNF- $\alpha$  y la IL-1 ya que los cambios endoteliales que provocan son muy similares a los descritos en PE. Estas citocinas favorecen la generación de trombina, factor activador de plaquetas, antígeno relacionado al factor VIII, e inhibidor-activador de plasminógeno-1, la permeabilidad celular, y la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, el incremento en la actividad de sintasa de NO<sub>2</sub> y el aumento de varias prostaglandinas (Yoshizumi 1993, Chen 1996). Además, en muchos estudios se ha encontrado niveles en aumento de TNF- $\alpha$  en la toxemia, aunque aún es controversial si este aumento ocurre después de la instalación del cuadro y si ocurre solo en embarazos complicados además con RCIU (Kupfermine 1994, Schiff 1994, Meekins 1994), tampoco se ha logrado concluir cuál es su origen (Benyo 2001). La detección de TNF- $\alpha$  es complicada debido a su corta vida media y a la posible interferencia de sus receptores solubles. Podrían ser decepcionantes las conclusiones hechas a partir de los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$ . Sus receptores solubles podrían ser mejores indicadores de su actividad. Existen 2 receptores específicos para TNF- $\alpha$  con pesos moleculares de 55 y 75 kd (p55 y p75 respectivamente). Estos pueden encontrarse como proteínas solubles que se unen específicamente al TNF- $\alpha$ . Se sabe que los niveles de receptores de TNF aumentan si

aumenta su ligando, y por lo tanto tiene un efecto protector contra la producción excesiva de TNF- $\alpha$ . Ya que los receptores tienen una vida media más larga, actúan como “huellas” de la actividad de TNF- $\alpha$ . Se ha encontrado que los niveles de p55 y p75 se encuentran elevados en pacientes con PE, comparados con aquellos de pacientes con embarazos normales (Kupferminc 1995, Stark 1995). Entonces, el aumento en los niveles de TNF- $\alpha$  reportado en las pacientes con PE podría ser real (Vince 1995). El origen de éste podría ser los leucocitos deciduales (activados) o la placenta misma, ya que el sincitiotrofoblasto contiene RNAm para TNF $\alpha$  (Kupferminc 1994). La preeclampsia se parece en algunos aspectos a una respuesta de fase aguda, que podría estar mediada por la elevación de IL-6 (Greer 1994, Benyo 2001). En la respuesta de fase aguda se presentan cambios característicos de las proteínas plasmáticas que también se encuentran en la PE como hipoalbuminemia, reducción de la transferrina y aumento de ceruloplasmina,  $\alpha$ -antitripsina, y haptoglobulina. La IL-6 tiene también efectos específicos en el endotelio como incremento de la permeabilidad, estimulación de la síntesis del factor activador de plaquetas, del factor de crecimiento derivado de plaquetas, y de la síntesis de prostaciclina. Se sabe que los radicales libres de oxígeno inducen la síntesis endotelial de IL-6. Se cree que la acción de la IL-6 está estrechamente ligada a la del TNF- $\alpha$ . Mientras que la IL-6 produce retroalimentación negativa en la producción del TNF $\alpha$ , su producción en la decidua y el trofoblasto se incrementa por TNF $\alpha$  e IL-1 (Silver 1993). Los niveles de IFN- $\gamma$  también están incrementados en la PE (Toohey 1994), ésta regula positivamente la expresión endotelial de ICAM-1 y la síntesis de IL-6, lo cual también podría explicar los niveles elevados de IL-6 plasmática en la PE. Por otro lado, los niveles de IL-8 y GM-CSF no se han encontrado modificados en pacientes con toxemia con respecto a embarazadas sanas (Greer 1994).

Las células endoteliales disfuncionales se activan, y producen proteínas de superficie que median la adherencia a células de inflamación. Este proceso inductivo está mediado por citocinas producidas por células de inflamación y por el endotelio activado. Se produce la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria endotelial, como la selectina E (específica del endotelio), VCAM-1, e ICAM-1. La PE se asocia con aumento en la expresión de estas moléculas y esto podría ser un evento temprano (Toohey 1994, Lyall 1994). El incremento de estas proteínas de adhesión refleja incremento en su expresión endotelial y explica la

activación leucocitaria en la preeclampsia (Greer 1991). La interacción anormal leucocito-endotelio en la PE se limita a la circulación materna como lo demuestran los niveles no alterados de moléculas de adhesión y elastasa en los vasos placentarios de la placenta y el plasma fetal (Greer 1991, Lyall 1995).

*Radicales libres.* La preeclampsia se asocia con estrés oxidativo, en el que los factores pro-oxidantes dominan sobre los antioxidantes y provocan potencialmente daño tisular y endotelial (Cheeseman 1993). Los radicales libres de oxígeno favorecen la formación de peróxidos lípidos. La peroxidación de lípidos, una vez iniciada, se propaga por sí misma. Los peróxidos lípidos se encuentran aumentados incluso en embarazadas normales, lo que sugiere que el embarazo normal produce cierto grado de estrés oxidativo. Los niveles de peróxidos lípidos, se encuentran aún más aumentados en la preeclampsia y se correlacionan con el incremento en la TA, pero no con la evolución perinatal (Hubel 1989, Walsh 1994, Dekker 1991, Uotila 1993, Wakatsuki 2000). Las lesiones de los vasos deciduales en las preeclámpticas, se parecen a los ateromas, en ambas se encuentra necrosis fibrinoide de la pared del vaso y acumulación de células espumosas, ambos indicadores de oxidación de lipoproteínas de muy baja densidad (Esterbauer 1993, Hubel 1989, Kloner 1989).

Los leucocitos activados podrían ser responsables en gran parte, de la producción de radicales libres en la PE. Por otro lado, también, por medio de la producción de citocinas, podrían causar conversión irreversible de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa y provocar así, liberación endotelial de radicales libres de oxígeno (Friedl 1989, Becker 1993, Phan 1989). Los radicales libres junto con la elastasa pueden causar sinérgicamente el daño endotelial (Friedl 1989, Ward 1991, Varani 1989). La placenta es otra fuente de radicales libres en la PE, la producción de peróxidos lípidos placentarios se correlaciona con el incremento en la producción placentaria de Tx<sub>A2</sub> (Wash 1994). El metabolismo del ácido araquidónico genera radicales libres de oxígeno tanto por la vía de la lipooxigenasa como por la de la ciclooxigenasa, pero la ciclooxigenasa genera más de mil veces más superóxido que la lipooxigenasa (Higgs 1983). Se ha propuesto que los neutrófilos podrían activarse al circular en el espacio intervelloso y tener contacto con los peróxidos lípidos generados por el trofoblasto (Wash 1994). También se ha probado incremento en los peróxidos lípidos en plaquetas y eritrocitos (Garzetti 1993).

Los radicales libres causan un daño endotelial muy parecido a los cambios vistos en la preeclampsia (Hubel 1989, Walsh 1994). Los peróxidos lípidos estimulan la síntesis de prostaglandina H pero inhiben a la sintasa de prostacilcina, así los niveles aumentados de peróxidos lípidos en la toxemia favorecen la producción de TxA2 derivado de plaquetas. Los radicales libres disminuyen la producción de NO2 endotelial e inhiben la sintasa de NO2 (Katusic 1994, Yang 1994) los peróxidos lípidos alteran la permeabilidad proteica capilar y podrían estar involucrados en el edema y la proteinuria (Varani 1989, Walsh 1994). Los peróxidos lípidos provocan trombosis al incrementar la liberación de trombina y disminuir la de antitrombina y activador de plasminógeno endotelial (Kugiyama 1993). Los peróxidos lípidos alteran la fluidez de la membrana celular al incrementar la incorporación de colesterol, de ácidos grasos oxidados y de lipoproteínas de baja densidad. En la PE, estos cambios han sido descritos para las plaquetas, los eritrocitos y las células del trofoblasto (Garzetti 1993, Cester 1988). Esto puede explicar al menos parcialmente por qué la incubación de células endoteliales con plasma de pacientes preeclámpticas incrementa la concentración endotelial de triacilglicéridos, provocando cambios en las características fisiológicas del endotelio (Endresen 1995, Endresen 1992, Saltar 1996).

Los antioxidantes son una familia diversa de compuestos que previenen la sobreproducción y el daño celular causado por los radicales libres. Aunque el cuadro en la preeclampsia es muy complejo, aparentemente no puede caracterizarse simplemente como un estado global de deficiencia de antioxidantes (Uotila 1994, Chappel 1999). Una paradoja aparente de la teoría del estrés oxidativo en la preeclampsia es la función antioxidante del ácido úrico – que está aumentado- (Beker 1993, Many 1996). En la preeclampsia la captura plasmática de radicales libres acuosos está francamente aumentada y gran parte de este incremento es a causa del ácido úrico (Outila 1994, Many 1996). Aunque el incremento de la actividad de la xantina oxidasa puede contribuir al estrés oxidativo en la toxemia, la hiperuricemia, puede tener un papel antioxidante (Many 1996).

La vitamina E es el principal antioxidante lipo-soluble. Se ha encontrado que, al contrario del embarazo normal, en la PE severa se encuentran incrementados los niveles de peróxidos lípidos y disminuidos los de vitamina E, este descontrol se correlaciona con el incremento de tromboxano y decremento de la prostaciclina (Wang 1991), así como con el aumento de

la tensión arterial (Jain 1995). Muchos otros autores no han encontrado disminución de los niveles de vitamina E en la PE (Uotila 1993, Uotila 1994, Rebelo 1996).

La generación de radicales libres altamente tóxicos que inician la peroxidación lípida y las reacciones que causan su propagación, requieren la presencia de hierro de bajo peso molecular y otros metales de transición. Así, un grupo importante de antioxidantes son aquellos que se unen a los iones metálicos de manera que no generen especies de radicales libres, incluyendo la transferrina, la albúmina, y la ceruloplasmina (Aust 1990, Halliwell 1992). Cuando el tejido nervioso cerebral se somete a homogenización en solución amortiguadora, los lípidos endógenos sufren una rápida peroxidación como resultado de una transición de metales liberados de las células. La capacidad del plasma de inhibir esta peroxidación, nos da una idea de la acción antioxidante de éste. La peroxidación es inhibida por diversos agentes quelantes del hierro, se han utilizado herramientas que midan la función antioxidante por secuestro de metales y se ha encontrado aumento de la capacidad antioxidante del plasma de pacientes con embarazos normales, mientras que se ha encontrado 50% de reducción de actividad antioxidante en las preeclámpticas (Many 1996).

Los niveles de glutatión eritrocitario y la actividad de glutatión peroxidasa, otro sistema de eliminación de peróxidos lípidos, se encuentran elevados en la PE, esta elevación podría representar una respuesta compensatoria (Dekker 1991). Por otro lado, se han encontrado niveles de glutatión peroxidasa disminuidos en placentas de preeclámpticas comparadas con placentas normales, pero los niveles podrían no ser los mismos en tejidos y en eritrocitos.

El ácido ascórbico, el  $\alpha$ -tocoferol y el  $\beta$ -caroteno, son potentes antioxidantes provenientes de la dieta. El ácido ascórbico es el principal antioxidante hidrosoluble, sus niveles se han encontrado considerablemente disminuidos en pacientes con PE leve y severa, mientras que los niveles de  $\alpha$ -tocoferol y el  $\beta$ -caroteno se han encontrado disminuidos solo en preeclampsia severa (Mikhail 1994). Así, durante la PE, estos antioxidantes podrían estar actuando como mediadores del daño celular, en los tejidos, dando como resultado, una disminución en los niveles plasmáticos. Los antioxidantes hidrosolubles, podrían consumirse más rápidamente, seguidos por los liposolubles. La disminución en la

capacidad de los antioxidantes que unen metales y de los placentarios, podría ser de crucial importancia en el inicio y la propagación de la peroxidación lípida en la preeclampsia (Walsh 1994, Many 1996, Davidge 1992).

Se ha propuesto que las citocinas, en especial el TNF- $\alpha$ , podrían contribuir a estrés oxidativo en la preeclampsia (Stark 1993, Dong 2005). El daño mitocondrial, es el primer efecto detectable de daño en cultivos celulares, algunos estudios han encontrado que la preeclampsia se asocia con daño mitocondrial similar (Shanklin 1989, Shanklin 1990, Barton 1991). El desequilibrio oxidativo en la preeclampsia, se encuentra probablemente muy ligado a la actividad de las citocinas, principalmente TNF- $\alpha$ . Los antioxidantes inhiben de manera selectiva la liberación de TNF- $\alpha$ , ya que controlan la oxidación-reducción de la glutatión-peroxidasa, que actúa como un modulador endógeno muy importante de la producción de TNF- $\alpha$ . En la mitocondria, el TNF- $\alpha$  provoca la liberación de radicales libres de oxígeno con la subsecuente formación de peróxidos lípidos. Si estos no son removidos junto con la subsecuente reducción en la glutatión peroxidasa oxidada, se provoca toxicidad celular grave.

La mala-adaptación inmune es una hipótesis atractiva para explicar muchos de los bien conocidos efectos de la PE. Debemos enfatizar que aunque ciertamente las pacientes con PE presentan características inmunopatológicas, aún queda por resolver como estas alteraciones inmunológicas resultan en preeclampsia. Las inmunoglobulinas, el complejo inmune, el complemento y los depósitos de fibrina en los vasos deciduales podrían ser el efecto de la obstrucción capilar, más que su causa; se han descrito cambios análogos en las vellosidades coriónicas de placentas isquémicas. Tampoco los depósitos glomerulares de IgG, IgM y complemento son prueba directa del origen inmunológico de estas lesiones. La hipótesis de la mala adaptación inmune, no se excluye mutuamente con la hipótesis de la isquemia placentaria. La mala-adaptación inmune puede ser la causa de la mala implantación y así causar isquemia placentaria. Además, la isquemia placentaria provee una explicación alternativa para los cambios en las citocinas (Cornard 1997) y el estrés oxidativo de la PE. Las células placentarias expresan eritropoyetina, una molécula prototipo de la regulación de hipoxia en mamíferos. Algunas secuencias de ADN de TNF- $\alpha$  e IL-1 son casi homologas al gen de respuesta a hipoxia de la eritropoyetina, lo que provee una

hipótesis posible, pero aún mal entendida de la relación molecular entre la hipoxia y la estimulación de la producción de citocinas (Cornard 1997).

*Preeclampsia como enfermedad genética.* La preeclampsia severa y la eclampsia tienen cierta tendencia familiar. En un estudio se encontró una incidencia del 26% en hermanas con preeclampsia pero solo 8% en sus cuñadas (similar a la población abierta) (Chesley 1968). Muchos estudios reportan un alelo común que actúa como un “gen maestro” que confiere susceptibilidad para desarrollar preeclampsia. La preeclampsia podría asociarse con un gen único recesivo o un gen dominante con penetrancia incompleta. La herencia multifactorial puede ser otra posibilidad (Cooper 1993, Arngrimsson 1990). La principal razón para sospechar la existencia de un gen materno como única explicación para el desarrollo de PE, es la alta concordancia en el desarrollo de la enfermedad en un pequeño grupo (n=10) de gemelos monozigotos (Thornton 1991). El incremento de la incidencia de la enfermedad en hijas de madres con eclampsia es otra razón para sospechar la presencia de un gen materno asociado, aunque la herencia multifactorial y la participación del genotipo fetal, podrían ser otra explicación (Cooper 1993, Arngrimsson 1990). Un ejemplo del impacto del genotipo fetal es la asociación entre el síndrome de HELLP y un síndrome fetal metabólico raro (Wilcken 1993) así como el incremento de la incidencia en la preeclampsia en los casos de fetos con aneuploidías (Boyd 1987). También existe evidencia de que la predisposición genética de desarrollar la enfermedad esta mediada por genes que intervienen en la implantación y la placentación (Arngrimsson 1994).

Hay datos no concluyentes sobre la participación de los antígenos HLA. Muchos estudios reportan un incremento de la compatibilidad al HLA entre las pacientes con PE y sus parejas (Cooper 1993), mientras que otros han demostrado mutaciones en el gen del HLA-G en neonatos afro-americanos con RCIU.

Se han estudiado ampliamente las alteraciones genéticas del receptor de angiotensina II ya que cambios en su expresión podrían estar involucrados en la regulación de la vasodilatación de los vasos uteroplacentarios y fetales (Cox 1996, Knock 1994). La participación “genética” del TNF- $\alpha$  como mediador de una disfunción mitocondrial (que



provocaría PE) se basa en el incremento de la incidencia de preeclampsia severa en una familia con alteraciones en una de las oxidoreductasas mitocondriales (Torbergesen 1989). Un grupo de investigadores observó disminución en la expresión de genes mitocondriales en placentas de pacientes preeclámpticas (Furui 1994). Por otro lado, se ha demostrado aumento del RNAm del TNF- $\alpha$  en leucocitos de pacientes con PE comparados con pacientes con embarazos normales, este aumento en la expresión de TNF- $\alpha$  puede estar relacionado con el alelo TNF-1 que se encuentra elevado en la PE (Chen 1996, Vural 2006).

Existen más evidencias desde el punto de vista genético que inmunológico que explican la participación de los antígenos placentarios y fetales en la fisiopatología de la PE. Se ha propuesto que existe un conflicto genético entre los genes maternos y fetales. Los genomas materno y fetal tienen funciones diferentes durante el desarrollo. La impronta genómica paterna es más importante que la materna en el desarrollo normal de los tejidos placentarios y las membranas extraembrionarias (Haig 1993). Esto se demuestra claramente cuando se presentan aberraciones cromosómicas en el desarrollo, como es el caso de las molas completas en las que una doble fecundación del ovocito da por resultado un embarazo molar, patología en la que la preeclampsia severa puede presentarse antes de las 20 semanas de gestación. Experimentos con animales sugieren que la impronta genómica está relacionada en la expresión placentaria de HLA (Kanbor-Shakir 1990).

De acuerdo a la teoría del conflicto genético, los genes fetales se seleccionan para aumentar el aporte de nutrientes hacia el feto y los genes maternos se seleccionan para limitar el aporte, con el fin de proteger a la madre. El fenómeno de la impronta genómica significaría que un conflicto similar se estaría presentando entre los genes fetales derivados de la madre y los derivados del padre.

Un autor propuso que la invasión trofoblástica tiene 3 consecuencias: (1) el feto gana acceso directo a la sangre arteriosa materna, así la madre no podría disminuir el aporte de nutrimentos al feto sin disminuir los propios, (2) el volumen de sangre que llega a la placenta no está controlado (localmente) por la madre y (3) la placenta es capaz de liberar hormonas y otras sustancias directamente a la circulación materna. La hipótesis del

conflicto genético propone que los factores placentarios (de origen genético fetal) actúan incrementando la presión arterial materna, mientras que los factores maternos reducen la presión arterial. También sugiere que se reduce la resistencia vascular materna al inicio del embarazo con el fin de racionar los nutrientes al feto y posteriormente se presenta un aumento fisiológico de ésta, lo que representa el “cambio del poder” mientras el feto crece. El corolario es que los factores placentarios contribuyen al incremento del gasto cardiaco materno. Los factores placentarios incrementan preferentemente la resistencia no placentaria ya que las arterias útero-placentarias han sido modificadas y no responden a los vasoconstrictores. Los efectos intrínsecos de una elevada presión arterial materna son finalmente benéficos para el feto (desde este panorama).

La hipótesis del conflicto de Haig predice que los genes fetales van a desviar la circulación materna hacia el espacio intervelloso incrementando la presión de perfusión (tensión arterial materna) (Haig 1993). La línea que divide a las pacientes normotensas de las hipertensas es arbitraria ya que la presión arterial materna representa un continuo de cambios. La hipótesis del conflicto genético predice que la posición materna en este continuo, está determinada por el balance entre los factores fetales que incrementan la presión arterial materna y los factores maternos que la regulan hacia la baja. Este mecanismo puede estar actuando en los casos de hipertensión del embarazo (sin proteinuria) en los que el pronóstico fetal es bueno. En contraste, en la PE la hipertensión es por vasoconstricción y no por aumento del gasto cardiaco. La placenta hipóxica puede liberar factores citotóxicos que dañan el endotelio materno y causan vasoconstricción e incrementan la presión arterial materna. En estas circunstancias se producen fetos semi-alimentados, con pesos bajos al nacer, que luchan por un mejor aporte, con consecuencias graves para la madre. Así la disfunción endotelial puede ser propuesta como la “estrategia fetal” de alto riesgo para incrementar la resistencia no placentaria cuando el aporte sanguíneo útero-placentario es deficiente. Esta estrategia fetal podría incluir no solo riesgos durante la etapa prenatal, sino también consecuencias a largo plazo. Recientemente se encontró en una cohorte de niños de 12 años, que los hijos de madres que habían padecido preeclampsia tenían cifras más elevadas de TA que aquellos que habían sido productos de embarazos sin complicaciones, estos resultados apoyan la participación de los genes fetales en la PE (Tenhola 2006).

## **Relación de la preeclampsia con enfermedades autoinmunes y crónico-degenerativas**

La hipertensión crónica, la diabetes, la obesidad, y las enfermedades autoinmunes predisponen a las mujeres a desarrollar PE (Dekker 1995, Wolfberg 2004).

La relación entre preeclampsia y obesidad es muy compleja, muchos mecanismos podrían estar involucrados. La obesidad se caracteriza por aumento del volumen circulante, incremento del gasto cardiaco e hipertensión. El aumento del gasto cardiaco con la vasodilatación compensatoria puede dejar los lechos capilares expuestos a elevadas presiones sistémicas y aumento del flujo, provocando eventualmente disfunción endotelial que predisponga a PE. La obesidad también se asocia con dislipidemia, incremento de la liberación de ácidos grasos libres, altos niveles de colesterol y triacilglicéridos, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (Wolf 2001). Las mujeres con PE tienen una relativa resistencia a la insulina e hiperinsulinemia durante la enfermedad, así como meses después del embarazo. Estos cambios metabólicos pueden, al menos en teoría, causar un descontrol de las VLDL y provocar citotoxicidad. Los altos niveles de insulina pueden provocar directamente hipertensión ya sea por incremento de la actividad simpática o al incrementar la reabsorción renal de sodio. En la obesidad, la hiperinsulinemia puede agravar el estrés oxidativo mediado por citocinas (Cunningham 1994). La combinación de resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia resultante, forman parte del síndrome X, que incluye intolerancia a la glucosa, incremento de los triacilglicéridos, bajos niveles de colesterol de alta densidad, hipertensión, hiperuricemia, lipoproteínas de baja densidad más densas y más pequeñas, y altos niveles del activador-inhibidor de plasminógeno-1, estos adultos presentaron frecuentemente restricción en el crecimiento uterino al nacer (Wolf 2001). Se ha descrito que las mujeres que padecieron PE serán más propensas a desarrollar hipertensión en los años posteriores de su vida (Burrow 1996).

La preeclampsia severa de aparición temprana se asocia con una alta incidencia de desórdenes acompañantes como deficiencia de la proteína S, mutación del factor V de la cascada de coagulación, hiperhomocisteinemia, y anticuerpos anticardiolipina, que pueden causar un cuadro más agresivo y acelerado, al inducir una interacción anormal entre las

células endoteliales, las plaquetas, los leucocitos y la cascada de los factores de coagulación y los factores fibrinolíticos (Dekker 1995).

Se ha encontrado que existe un riesgo incrementado de padecer PE (al menos 4 veces más) en pacientes con enfermedades autoinmunes. El lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y el síndrome antifosfolípido se asocian con un aumento del riesgo de hasta 5 veces. Estas mujeres también tienen riesgo aumentado de pérdidas gestacionales (hasta 46%), y de que sus fetos tengan RCIU y sean prematuros (Wolfberg 2004). En un estudio que comparó 3,403 pacientes embarazadas con enfermedades reumatológicas contra 671,221 embarazadas sanas, encontró que la incidencia de preeclampsia era mayor en mujeres que padecían lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, síndrome de Sjörgren, polimiositis y dermatomiositis, pero la asociación no fue consistente durante todo el estudio (Skomsvoll 2000).

## 2. Embarazo y morbimortalidad materna y neonatal

---

### **Mortalidad materna**

Las muertes maternas no son eventos aislados. Constituyen una verdadera tragedia de salud pública vistas tanto cualitativa como cuantitativamente, y como tal deben ser enfrentadas. Alrededor de 600 mil mujeres fallecen anualmente en el mundo por causas maternas. Datos del año 2001 señalan que entre 20,000 y 30,000 mujeres murieron en América Latina y el Caribe (RSMALC 2003) y 1,253 en México. Si bien en las décadas pasadas se observó una tendencia decreciente en la tasa de mortalidad materna en nuestro país, en los últimos 12 años se ha mantenido relativamente estable (SSA 2002).

Estas muertes son altamente preocupantes, más aún porque conforme a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la gran mayoría de ellas es evitable con los recursos que dispone actualmente la medicina y el grado de desarrollo de nuestro país. La tragedia se agrava aún más por el número de mujeres que padecen secuelas. Así, por cada muerte materna acaecida, la OMS estima que entre 30 y 100 mujeres quedan, en menor o mayor grado discapacitadas, las cuales en su gran mayoría, no reciben ningún tipo de atención. Es decir, además del número de muertes, anualmente 50 millones de mujeres se ven afectadas por las secuelas derivadas de la morbilidad materna. Esta morbilidad es prolongada y a menudo debilitante cuando menos para 15 millones de ellas (FIC 2003).

### **Definición**

La OMS (1992) definió a la mortalidad materna como "la muerte de una mujer mientras está embarazada o dentro de los 42 días después de la terminación del embarazo, independientemente de la duración y lugar del mismo, producida por cualquier causa relacionada o agravada por el embarazo o su manejo, pero no por causas accidentales o incidentales".

Esta definición se considera limitada, ya que no permite identificar la real dimensión de la mortalidad materna ya que deja fuera los fallecimientos posteriores a los 42 días. Para tratar de superar este último aspecto, en forma paralela a la anterior definición, se ha empezado a utilizar el lapso de 11 meses, denominando a las defunciones que ocurren en este periodo como: "muertes maternas tardías".

La tabla 1.2 muestra las principales causas de mortalidad materna en el año 2002 en México (Elu MC 2004). Las variaciones más significativas en la distribución de las causas de mortalidad materna del año 2002, comparadas con el año 2001, son las siguientes: los "trastornos hipertensivos en el embarazo..." (primera causa) disminuyen de 37.7 a 34.8%, al igual que "otras complicaciones del embarazo y el parto" (tercera causa) que pasan de 19.4 a 10.6%; en contraste, la "hemorragia del embarazo, anteparto, parto y puerperio" aumentó de 20.8 a 24.9%.

No.	Causa	Porcentaje
1	Trastornos hipertensivos del embarazo	34.8
2	Hemorragia del embarazo, anteparto, parto y puerperio	24.9
3	Otras complicaciones del embarazo y parto	16.6
4	Aborto	6.8
5	Causas obstétricas indirectas	6.8
6	Sepsis y otras infecciones puerperales	5.0
7	Otras complicaciones del puerperio	4.5
8	VIH/SIDA	0.4
9	Muerte obstétrica de causa no especificada	0.2

Tabla 1.2. Principales causas de mortalidad materna en México (2002)

Observamos que en México las enfermedades hipertensivas del embarazo son la principal causa de muerte materna, representan más de un tercio de los casos de mortalidad. En países donde el control prenatal no es adecuado, la preeclampsia-eclampsia explica el 40-80% de las muertes maternas, estimándose un total de 50,000 por año.

## **Incidencia de la preeclampsia, morbilidad materna y morbimortalidad perinatal asociadas**

A nivel mundial la preeclampsia es una de las causas más importantes de morbimortalidad materna y perinatal afectando del 2 al 7% de los embarazos en nulíparas sanas (Sibai 2005).

La tabla 2.2 presenta las 4 principales complicaciones del embarazo a nivel mundial, estas patologías pueden dejar secuelas graves en la madre y son responsables de un elevado número de muertes maternas (Karchmer 2006).

Complicación	Incidencia (% de nacidos vivos)	Número de casos/año	Muertes maternas (año 2000)	Secuela principal para sobrevivientes
Hemorragias postparto	10.5	13'795,000	132,000	Anemia severa
Sepsis	4.4	5'768,000	79,000	Infertilidad
Preeclampsia-eclampsia	3.2	4'152,000	63,000	No evaluada
Distocia	4.6	6'038,000	42,000	Fístula, incontinencia

Tabla 2.2. Principales causas de morbilidad materna y sus secuelas.

En este análisis de la morbilidad mundial, se encuentra que la enfermedad hipertensiva del embarazo ocupa el tercer lugar precedida por las hemorragias y la sepsis, aunque como vimos, en México ocupa el primer lugar, sin embargo, los errores en la estimación real de la mortalidad materna parten del llenado incorrecto de los certificados de defunción y de aquí se derivan estadísticas erróneas, ya que la mortalidad materna en México se comporta igual que en otros países de tercer mundo y sabemos que son precisamente éstos quienes contribuyen de manera más importante con las altas cifras de morbi-mortalidad materna, no solo por la carencia de servicios médicos, sino también por la elevada tasa de fertilidad que presentan (Elu 2004).

Analicemos ahora las causas de morbi-mortalidad perinatal que aunque están muy ligadas a las causas maternas, no son forzosamente las mismas. Los indicadores de mortalidad perinatal constituyen en la actualidad los evaluadores más eficaces de las condiciones del desarrollo de un país y del seguimiento obstétrico de las embarazadas y su hijo. Para mejorar la mortalidad perinatal es necesario enfatizar el trabajo profiláctico y concretar los trabajos de investigación sobre aquellos factores que favorecen la prematuridad y la hipotrofia fetal que a su vez propician un aumento de los daños neurológicos y retraso mental en el producto al nacimiento, es decir, de los futuros recién nacidos. Bajo estas condiciones y como el período fetal es la piedra angular en lo que se refiere a la reducción de tales indicadores, deben identificarse los factores de riesgo que se puedan presentar en la

gestación, el parto y en el período de fertilidad de la vida de la pareja, para ofrecerles atención y cuidados especializados.

Recientemente se reportó que las 4 principales causas de mortalidad perinatal son: enfermedades hipertensivas del embarazo, malformaciones (causas genéticas), ruptura prematura de membranas y alteraciones placentarias asociadas con gestorragia (Hernandez-Cabrera 2003). Estas patologías (a excepción de la genética) son todas responsables de fetos con bajo peso al nacer y sobre todo de nacimientos prematuros, primera causa absoluta de morbi-mortalidad perinatal.

La preeclampsia se presenta en el 3 a 14% de todos los embarazos a nivel mundial, cada año mueren 50,000 mujeres en el mundo por preeclampsia. Es la primera causa de muerte materna en México, en el año 2000 la Secretaría de Salud reportó 466 muertes maternas relacionadas a este trastorno representando una mortalidad de 35.17%. La presencia de hipertensión gestacional condiciona una marcada alteración en la homeostasis materna y un ambiente uterino desfavorable para el feto, destinado con frecuencia al nacimiento prematuro, por lo que el producto pretérmino no solo tendrá que afrontar los riesgos inherentes a su prematuridad sino además el efecto de la hipertensión materna, muchas veces complicada por el efecto de los medicamentos administrados a la madre. Hasta la fecha no se conoce con precisión la causa de la hipertensión inducida por el embarazo, pero sí se ha asociado importantemente su relación con un pobre nivel de salud, siendo más alta su incidencia en países en vías de desarrollo (Inglaterra 4.8%, EUA 5-8% vs México 12-22%) (Karchmer 2006).

La preeclampsia se presenta en el 10% de los embarazos menores de 34 semanas, la hipertensión gestacional en el 6% y la hipertensión crónica en el 3%. Sus complicaciones son responsables del 20-25% de las muertes perinatales.



# 3. Endotelio

---

## **Fisiología del endotelio**

Hoy se ha descubierto que el endotelio es el órgano más grande de la economía del mamífero. Sin embargo, el estudio de sus funciones y disfunciones es relativamente reciente. Es sorprendente reconocer que si bien William Harvey al comienzo del siglo XVII descubrió que la sangre se desplazaba en un circuito cerrado, hallazgo investigativo que revolucionó la Medicina, hace apenas 25 años que se ha iniciado el florecimiento del estudio del endotelio. Se ha observado que este órgano extraordinario, siendo una estructura unicelular invisible que tapiza tanto los vasos sanguíneos como los linfáticos y las cavidades cardíacas, dirige el funcionamiento de todo el sistema cardiovascular. Desde el trabajo pionero de Furchgott y Zawadzki (1980), el endotelio ha sido reconocido como el más importante regulador de la homeostasis vascular. Las células endoteliales, como unión de los vasos celulares, están estratégicamente ubicados entre las células sanguíneas circulantes y las células sanguíneas fijas, así como las células musculares vasculares. En una persona con un peso corporal de 70 kg, el endotelio cubre un área aproximada de 700 m<sup>2</sup> y pesa alrededor de 1 a 1.5 kg. La integridad funcional del endotelio es crucial para el mantenimiento del flujo sanguíneo y la capacidad antitrombótica, porque el endotelio libera factores humorales que controlan la relajación y la contracción, la trombogénesis y la fibrinólisis, así como la activación de plaquetas y la inhibición de las mismas. Por lo tanto, el endotelio contribuye a controlar la presión y flujo sanguíneos, así como el tono vascular. Ahora está claro, que la función endotelial contribuye no solamente a los desórdenes cardiovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión, la insuficiencia cardíaca, que conducen a hipoperfusión, oclusión vascular, y daño terminal o destrucción del órgano sino también en los estados hipertensivos del embarazo. Ya que no es motivo de este trabajo el estudio del endotelio, solo resumiremos brevemente algunos de los aspectos de su función y disfunción que están directamente relacionados con la PE.

## Factores relajantes y de contracción derivados del endotelio

La figura 1.3 resume los principales mecanismos que actúan en la relajación-contracción del músculo liso vascular controlado por el endotelio.

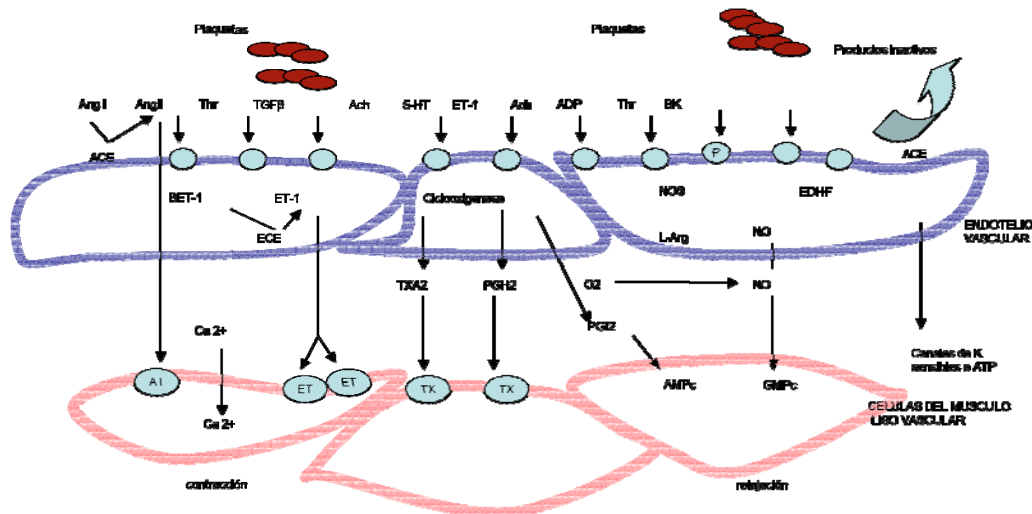


Figura 1.3 Mediadores vasoactivos liberados por el endotelio. El endotelio produce factores que inducen la relajación y la contracción. Ang = angiotensina, ACE = enzima convertidora de la angiotensina, Ach = acetilcolina, ADP= adenosin difosfato, ATP = adenosin trifosfato, BK = bradiquinina, cAMP/cGMP = adenosin y guanosin monofosfato ciclicos, ECE = enzima convertidora de endotelio, EDHF = factor hiperpolarizante derivado del endotelio, ET-1 = endotelina-1, 5 HT = 5-hidroxi-triptainina (serotonina), L-Arg = L-arginina, NO = óxido nítrico, NOS = óxido nítrico sintetasa, O = anión superóxido, PGH = prostaglandina H, PGI = prostaciclina, TGF = factor de crecimiento transformador B<sub>1</sub>, Thr = trombina, TXA<sub>2</sub> = tromboxano A<sub>2</sub>. Los círculos representan receptores, (AT = angiotensinérgico, B = bradiquinerérgico, ET = receptor endotelina, M = muscarínico, T = receptor de tromboxano, S = receptor de serotonina, P = receptor de adenosin fosfato)

## Disfunción Endotelial

La disfunción endotelial está caracterizada por un desbalance en los factores de relajación y contracción derivados del endotelio. Puede ser la causa o la consecuencia de enfermedades vasculares (y de preeclampsia) y es conocida medianamente como marcador de factores de riesgo cardiovascular. Es interesante que la disfunción endotelial precede las alteraciones en la estructura vascular, indicando un papel protector de endotelio intacto funcionalmente. Mientras que algunos vasos son particularmente propensos a desarrollar disfunción endotelial y aterosclerosis (arterias coronarias epicárdicas, arterias grandes, tales como la aorta o la arteria iliaca), otros parecen ser inertes (la arteria mamaria interna, la arteria braquial).

# PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Las alteraciones hipertensivas que acompañan al embarazo determinan una complicación obstétrica frecuente y de notable morbimortalidad materna y perinatal. Además es una entidad de prevalencia sostenida, a pesar de los grandes esfuerzos para su control, con la búsqueda de medidas preventivas. Sin embargo, el pronóstico es susceptible de modularse mejorando el diagnóstico temprano.

La preeclampsia es la manifestación hipertensiva más frecuente del embarazo, siendo ésta una enfermedad de gran complejidad, de múltiples etiologías, para la cual se requiere un manejo de alto nivel.

A pesar de todas las investigaciones hechas alrededor de la preeclampsia, se desconoce hasta la actualidad cuales son los factores primarios que causan el daño endotelial en la preeclampsia y su origen aún es especulativo. La mejoría del cuadro después de la resolución del embarazo, sugiere que los factores implicados tienen una vida media corta.

La existencia de daño endotelial secundario a factores presentes en el suero provenientes de la placenta se basa en los cambios observados en las placentas de pacientes preeclámpicas y en las evidencias de citotoxicidad de células endoteliales *in vivo* e *in vitro* del suero de pacientes con PE.

Por otro lado se ha reportado que el manejo con bajas dosis de aspirina retrasa la aparición de la preeclampsia y mejora así el pronóstico materno-fetal. Si se determinaran los factores séricos responsables de las primeras manifestaciones del cuadro, sería posible hacer diagnóstico temprano y oportuno por medio de pruebas en sangre materna. Esto permitiría identificar a las pacientes que están en riesgo de padecer la enfermedad y tratarlas oportunamente. Más aún, si estos factores fueran susceptibles de ser bloqueados o modificados se podría prevenir que la enfermedad evolucionara hasta etapas en las que pone en peligro el bienestar del binomio. En este trabajo se estudiará el homogenado placentario de placentas toxémicas, y su efecto sobre el endotelio. Se pretende contribuir así a la identificación del famoso factor X (o factores) que permitieran el diagnóstico precoz

de la enfermedad y eventualmente su manejo temprano y oportuno. Por otro lado se quiere estudiar si hay algún efecto sobre el homogenado placentario –y el daño endotelial *in vitro*– en las pacientes con enfermedad hipertensiva del embarazo que reciben aspirina a baja dosis.

# ANTECEDENTES

---

## **Preeclampsia como enfermedad endotelial**

### **Endotelio y PE**

*Grados de injuria endotelial durante el embarazo patológico.* Clásicamente el endotelio ha sido considerado una capa de células poligonales con importantes funciones de barrera física que garantiza la contingencia intravascular. Este comportamiento de barrera mecánica semipermeable mantiene la presión oncótica intersticial. Se conoce la bondad de ciertos endotelios, para permitir el tránsito transcelular de albúmina. Esta característica endotelial define el coeficiente de reflexión de Staverman, que corresponde a la permeabilidad endotelial para las moléculas circulantes.

El endotelio es una capa diáfana monocelular que reviste la superficie luminal de todos los vasos sanguíneos. Participa en una gran diversidad de efectos hemostáticos que ya se han mencionado previamente.

Revisando los anteriores datos hay justificación para considerar el endotelio como un órgano de gran versatilidad, susceptible de gran especialización y digno de ser considerado como el director de orquesta de la homeostasis corporal.

Durante el embarazo es necesaria la indemnidad endotelial para garantizar fenómenos particulares de este modelo biológico: la inmunomodulación, la adaptación circulatoria, la simbiosis placentaria etc. De esta manera, la gestación debe ser considerada como un estado de hiperactividad endotelial. El endotelio participa en importantes funciones de barrera de filtración y barreras inmunológicas.

Existen ciertas consideraciones especiales durante el embarazo. La barrera placentaria implica la presencia de una membrana endotelial de origen fetal, adosada a una capa de sincitiotrofoblasto que comparten importantes funciones respiratorias, secretorias y nutritivas.

## **Oxido Nítrico y preeclampsia**

Este gas endógeno se encuentra modulado durante el embarazo por el hiperestrogenismo feto-placentario. La ubicuidad del óxido nítrico (NO<sub>2</sub>) determina la gran importancia de esta molécula para regular procesos vasculares, crecimiento celular, consolidación de la memoria reciente, fenómenos inmunológicos citotóxicos y agregación plaquetaria.

El principal sitio de síntesis de Oxido Nítrico es el endotelio. Además se produce a nivel de las neuronas del hipocampo, de los macrófagos y de los nervios periféricos. El óxido nítrico es sintetizado a partir del aminoácido arginina, por una familia de enzimas, la sintasas del NO<sub>2</sub>.

Existen dos grandes formas de sintasa del óxido nítrico: una enzima constitutiva, localizada a nivel endotelial y neuronal.

La enzima presenta características estructurales muy importantes:

1. Similitud estructural con citocromos.
2. Capacidad de reducir y oxidar el NADP.
3. Labilidad frente a la hemoglobina.
4. Susceptibilidad a múltiples estímulos que modulan su actividad: estrógenos, corticoides, calcio, estrés tangencial vascular.

El hiperestrogenismo propio del embarazo, explica un reclutamiento sistémico de la sintasa del óxido nítrico endotelial. Ha sido complejo cuantificar de manera exacta el aumento de la síntesis del óxido nítrico por los endotelios maternos y fetales. Sin embargo, se ha encontrado una mayor excreción urinaria de GMPc durante la gestación, fenómeno indirecto que obedece a una mayor actividad del NO<sub>2</sub> (Gragner 2000).

El segundo mensajero, reclutado cuando el NO<sub>2</sub> actúa a nivel celular es el GMPc. Este mecanismo es compartido con la Hormona Natriurética Auricular (HNA). Este último péptido también se encuentra hiperactivo durante el embarazo. Sin embargo, existe una asincronía entre el momento que se eleva la eliminación del GMPc urinario durante el embarazo, y la elevación de la HNA.

El primer evento ocurre desde el primer trimestre del embarazo, y el último evento ocurre durante el tercer trimestre y ostensiblemente durante la primera semana de puerperio. Esta incongruencia conduce a la búsqueda de una sustancia putativa que reclute la actividad del NO desde las primeras semanas del embarazo.

Probablemente esto sea consecuencia directa de las concentraciones crecientes de estrógenos circulantes, fabricados desde la unidad feto-placentaria. Los estrógenos regulan la expresión celular de la sintasa del óxido nítrico endotelial. Quizás, el endotelio que responde de manera más temprana durante el embarazo aumentando la actividad del NO es el renal. La vasomodulación de los circuitos renales comienza desde la sexta semana del embarazo y parece depender de la actividad de la Relaxina secretada por el Cuerpo lúteo.

La hiperactividad del NO<sub>2</sub> endotelial durante el embarazo puede explicar los siguientes mecanismos de la fisiología obstétrica:

- La refractariedad a los vasoconstrictores circulantes

- La hiperfiltración glomerular

- El remodelamiento especial del circuito vascular fetoplacentario, con pérdida de la innervación autónoma y disminución de la muscularización de las arterias espirales

- La hemorreología circulatoria funicular

Adicionalmente es tentativo especular qué el NO<sub>2</sub> sintetizado a nivel miometrial puede participar en la quiescencia uterina presente durante el embarazo, la cual termina para iniciar el trabajo de parto (Gragner 2000).

Existen varias evidencias de que la disminución del NO<sub>2</sub> durante el embarazo puede estar involucrada en la fisiopatología de la preeclampsia. Se ha propuesto que la isquemia placentaria puede ser la causante de la reducción de la síntesis renal de NO<sub>2</sub>; por otro lado, se ha encontrado elevación del GMPc y de la excreción de nitritos/nitratos en modelos de ratas hipertensas, otros estudios ha demostrado que al inhibir las NOS en ratas se presentan efectos similares al cuadro de PE (proteinuria, hipertensión) (Alexander 1999).

La síntesis y la actividad del NO<sub>2</sub> endotelial se aumenta desde muy temprano durante la gestación normal. Aunque existen evidencias de que la disminución del NO<sub>2</sub> se relaciona con la fisiopatología de la preeclampsia, no es aún claro cuál es el mecanismo de acción y si éste es un proceso primario o secundario en el desarrollo de la enfermedad.

## **Inmunomodulación gestacional y su regulación por citocinas**

El éxito inmunológico del embarazo radica en un balance linfocitario a favor de citocinas Th2. La actividad de linfocitos Th1, se encuentra probablemente bloqueada desde que se instala la barrera celular hematoplacentaria y se reactiva durante el trabajo de parto.

Las citocinas clásicas Th1 son el TNF- $\alpha$ , el IFN- $\gamma$  y la IL-2. La administración de estas citocinas, ó la elevación endógena de ellas por mecanismos no esclarecidos, conducen a un pésimo pronóstico gestacional. Algunas hormonas que participan durante el embarazo podrían explicar parcialmente el paradigma Th1/Th2. La progesterona modula una respuesta decidual Th2, mientras que la relaxina regula una respuesta Th1, así, la falta o exceso de éstas durante ciertas etapas del embarazo, podría también estar implicada en el desarrollo de PE. Recientemente se reportó que la administración de progesterona retarda los efectos hipertensivos del TNF- $\alpha$  y previene el incremento de los niveles de tromboxano en modelos de ratas preeclámpticas, aunque aún se necesitan más estudios antes proponer la suplementación de progesterona en embarazadas, estos datos indican que la progesterona podría disminuir o prevenir la hipertensión y la disfunción endotelial de la PE (Briery 2006) El endotelio participa de manera muy activa en el diálogo molecular entre las citocinas y el reclutamiento de células inflamatorias. Esta es una propiedad ostensible de todos los endotelios venulares, comportamiento hiperactivo durante el curso clínico del síndrome HELLP, donde la patología endotelial principal se localiza en el sinusoides hepático. De esta manera la célula endotelial participa de manera importante en la expresión de antígenos, las moléculas de adhesividad celular, la respuesta diapedésica leucocitaria, los factores angiogénicos.

Todas estas funciones deben ser moduladas de manera específica durante el embarazo para evitar la expresión de antígenos de histocompatibilidad trofoblástico, la migración trofoblástica, la apoptosis placentaria entre otros. Además, el endotelio puede también sintetizar citocinas de manera directa y comportarse como una célula inflamatoria secretora de sustancias parácrinas. Por ejemplo, la barrera hematoplacentaria, conformada por una película endotelial fetal, en contacto con sincitiotrofoblasto, produce IL10, que suprime la respuesta citolítica Th1.

Se ha estudiado ampliamente el efecto de diversas citocinas en el embarazo y al PE. Se ha reportado que el TNF- $\alpha$  y la IL-1 simulan cambios descritos en PE. Los niveles de TNF se encuentran aumentados de 2 a 3 veces en pacientes con PE con respecto a pacientes con embarazos normoevolutivos. Se sabe que el TNF favorece la formación de endotelina, reduce la vasodilatación por acetil-CoA, produce daño oxidativo mitocondrial, formación



de radicales libres y peróxidos lipídicos. Los niveles de IL-6 también se encuentran aumentados en la PE (Conrad 1997).

Algunos estudios se han realizado para determinar por qué el aumento de TNF- $\alpha$  produce HAS, activa el endotelio y reduce la función renal. La inyección de lipopolisacárido de *E. Coli* (LPS) provoca activación del sistema inmunológico con liberación de TNF- $\alpha$ . En un modelo de ratas preñadas a las que se inyectaba LPS se provocaban efectos similares a la PE (HAS, proteinuria, agregación plaquetaria) (Hubel 1999). En otro modelo se inyectó una infusión de TNF- $\alpha$  por 5 días a dosis de 50 ng/dL de los 14 a los 19 días de gestación y esto provocó hipertensión y reducción de la función renal (Granger 1999).

## **Preeclampsia y estado trombofílico del embarazo**

Siempre la gestación ha sido considerada como un momento biológico pre-trombótico. Las explicaciones bioquímicas son muy claras: con escasas excepciones todos los factores de coagulación sintetizados en el hígado materno están aumentados, adicionalmente la placenta es capaz de sintetizar inhibidores del plasminógeno, que disminuyen de manera importante la fibrinólisis durante el embarazo. Esta clásica hipercoagulabilidad del embarazo, no explica la baja cifra de fenómenos trombóticos clínicos durante la gestación. No es lógico, considerar que durante 40 semanas se prepare la actividad exagerada de la coagulación, que se necesita cuando ocurre el alumbramiento. De esta manera, el equilibrio procoagulante-anticoagulante, que garantiza el éxito reológico del espacio interveloso, y por ende la respiración fetal depende de la integridad endotelial y probablemente de la síntesis decidual y trofoblástica de factores anticoagulantes naturales como el Péptido Asociado al embarazo (PPA-P) y la Anexina.

Es fundamental la mínima expresión de receptores para Selectina P y trombomodulina a nivel de la membrana endotelial durante el embarazo, para evitar una tendencia trombofílica durante el embarazo. El endotelio debe comportarse como un órgano eminentemente anti-trombótico durante la gestación.

Recordemos la capacidad endotelial de almacenar en sus gránulos de Weibel-Palade, factor de Von Willebrand, el cual es degranulado de manera significativa, durante la elevación fisiológica de oxitocina, durante el periodo expulsivo del trabajo de parto.

*Modulación de la barrera microcirculatoria de permeabilidad durante la gestación.* Los endotelios de los territorios capilares de la economía materna regulan el tráfico de solutos y solventes desde el compartimento intravascular, hacia el intersticial. Este permanente equilibrio de tonicidad hidros cópica intersticial define el volumen circulante efectivo que debe repletar un territorio vascular expandido durante la gestación. Los endotelios capilares manifiestan una virtud estructural muy importante, están en contacto íntimo con células perivasculares de propiedades contráctiles: los pericitos ó células de Rouget.

Estas células mantienen prolongaciones celulares que se adosan a la membrana endotelial y dependiendo del grado de contracción o relajación aumentan o disminuyen el tráfico intercelular capilar. Es frecuente encontrar edemas hacia el final del embarazo normal. Esto depende de un aumento del coeficiente de ultrafiltración capilar.

Quizás, esté determinado por la actividad pericitaria, por disminución de uniones intercelulares, o aumento de la tonicidad oncótica intersticial. Probablemente la barrera hematoplacentaria posee importante capacidad de modular el contenido total de agua corporal fetal. Es curioso recordar la gran capacidad de transporte pinocitósico vesicular que manifiesta el endotelio del cordón umbilical. La causa de una mayor permeabilidad capilar durante el embarazo es desconocida, existiendo múltiples candidatos putativos: estrógenos, óxido nítrico, citocinas, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, inervación simpática, cininas etc. La mayor permeabilidad capilar encontrada durante la toxemia edematosa ha sido atribuida a un aumento considerable del factor de crecimiento vascular (VEGF) secretado por los endotelios o los pericitos.

## **La preeclampsia como enfermedad endotelial compleja**

La preeclampsia es un síndrome polimórfico que virtualmente puede afectar cualquier sistema de la economía materna. Desde hace 11 años, la entidad ha sido explicada en su fisiopatología como una endoteliopatía generalizada. Las evidencias clínicas y bioquímicas que explican la universal disfunción endotelial en el momento clínico y pre-clínico de la entidad son múltiples, muchas moléculas han sido propuestas: proteínas de muy baja densidad, peróxidos lípidos, factor de necrosis tumoral, citocinas proinflamatorias, prostaglandinas, óxido nítrico, endotelina, moléculas de adhesión y factores de la cascada de coagulación. Pero el gran ausente es un candidato único que esclarezca el dilema eterno

del denominado factor X. Probablemente una sustancia fabricada endógenamente por el trofoblasto que determina el daño endotelial. Un modelo actual para explicar el daño endotelial de la preeclampsia surge del aumento endógeno de radicales libres oxidativos: radical hidroxil (HO), anion superóxido (O=), peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y anión peroxinitrito (ONOO). Estos radicales libres actúan sobre ácidos grasos poli-insaturados o colesterol de las membranas celulares o lipoproteínas determinando disfunción y daño celular a nivel endotelial. Esto probablemente ocurre cuando el organismo está menguado de su capacidad endógena de compensar síntesis de oxidantes mediante anti-oxidantes endógenos: tocoferol, ascorbato, ácido úrico, bilirrubinas, ácido retinoico, selenio, ácido linoleico, magnesio entre otros. La causa del estrés oxidativo exagerado que durante el embarazo conduce a la preeclampsia probablemente sea multifactorial y debe implicar múltiples mecanismos:

- Hipoxia trofoblástica.
- Hiperactividad de neutrófilos en el lecho placentario.
- Disonancia inmunológica con hiperactividad de citocinas inflamatorias.
- Daño tisular fetal.
- Deficiencia genética o nutricional de antioxidantes endógenos.
- Hiperlipidemia
- Síndrome de reperfusión tisular

El daño endotelial encontrado durante el curso evolutivo de la preeclampsia explica las múltiples manifestaciones del síndrome: la sensibilidad vascular a los constrictores (hipertensión arterial, isquemia tisular), proteinuria, edema generalizado, RCIU (que refleja un tráfico anormal de aminoácidos esenciales entre la madre y el feto), trombocitopenia, fragilidad eritrocitaria, glomeruloendoteliosis, aterosclerosis placentaria, aumento circulante de Antígeno relacionado con el factor Von Willebrand, incremento de los niveles circulantes de fibronectina y endotelinas, alteración en la síntesis de activador del plasminógeno tisular, disminución de la Antitrombina III.

De acuerdo a estas evidencias, se han propuesto algunos medicamentos con potencial beneficio experimental para modular el daño oxidativo encontrado en la preeclampsia: como el alopurinol, por su capacidad inhibitoria de la xantina-oxidasa, el gosypol, por su capacidad para inactivar radicales libres, la N-acetilcisteína por su capacidad de estimular

la glutatión sintetasa, los inhibidores de la superóxido dimutasa, las vitaminas E, A y C por su acción antioxidante, los flavonoides y carvediol, la pentoxifilina, la progesterona.

Probablemente la mejor comprensión del daño endotelial presente durante el curso de la preeclampsia conduzca al encuentro de un fármaco mágico, quizás de la lista anterior, que detenga la progresión de la enfermedad y permita el éxito, del fracaso actual de los tratamientos expectantes.

## **Preeclampsia y factores circulantes y placentarios**

La evidencia de que el suero de pacientes preeclámpicas y específicamente algunas sustancias del suero, daña a las células endoteliales *in vitro*, sugiere la existencia de uno o varios factor(es) citotóxico(s) circulante(s) (Powers 1998, Heyl 1999, Arechavaleta-Velazco 2000, Myers 2005). Algunos datos sugieren que el trofoblasto puede ser la fuente del factor o factores causantes del daño endotelial. Evidencia histopatológica, epidemiológica y experimental señalan a la reducción de la perfusión trofoblástica como el primer y más consistente cambio en la PE. La ocurrencia de la enfermedad en embarazos ectópicos uterinos y embarazos molares, indica que ni factores uterinos ni fetales se requieren. Existen muchas evidencias de que las arterias espirales no perfunden el espacio intervelloso adecuadamente y no adquieren los cambios morfológicos del embarazo normal. Durante la implantación normal, las arterias espirales aumentan al menos cuatro veces su diámetro y pierden sus componentes nervioso, elástico y muscular; estos cambios se extienden a través de la decidua y en la porción miometrial de los vasos y parecen estar totalmente establecidos hacia la semana 20. En vasos de mujeres preeclámpicas, estos cambios no se producen, y más aún, muchos son ocluidos por material fibrinoide y presentan invasión por células espumosas adyacentes, como sucede en la aterosclerosis. Estos trastornos tienen claramente el potencial de reducir la perfusión trofoblástica. La reducción en la perfusión trofoblástica, provocaría a su vez respuesta de éste tejido con liberación hacia el sistema de factores perjudiciales cuyo blanco es el endotelio. La figura 1.2 a manera de resumen, muestra las complejas relaciones entre las teorías de la preeclampsia.

# JUSTIFICACION

---

Las alteraciones hipertensivas que acompañan al embarazo determinan una complicación obstétrica frecuente y de notable morbimortalidad materna y perinatal. Además es una entidad de prevalencia sostenida, a pesar de los grandes esfuerzos para su control, con la búsqueda de medidas preventivas. Sin embargo, el pronóstico es susceptible de modularse mejorando el diagnóstico temprano.

La preeclampsia es la manifestación hipertensiva más frecuente del embarazo, siendo ésta una enfermedad de gran complejidad, de múltiples etiologías, para la cual se requiere un manejo de alto nivel.

A pesar de todas las investigaciones hechas alrededor de la preeclampsia, se desconoce hasta la actualidad cuales son los factores primarios que causan el daño endotelial en la preeclampsia y su origen aún es especulativo. La mejoría del cuadro después de la resolución del embarazo, sugiere que los factores implicados tienen una vida media corta.

La existencia de daño endotelial secundario a factores presentes en el suero provenientes de la placenta se basa en los cambios observados en las placentas de pacientes preeclámpicas y en las evidencias de citotoxicidad de células endoteliales *in vivo* e *in vitro* del suero de pacientes con PE.

Por otro lado se ha reportado que el manejo con bajas dosis de aspirina retrasa la aparición de la preeclampsia y mejora así el pronóstico materno-fetal. Si se determinaran los factores séricos responsables de las primeras manifestaciones del cuadro, sería posible hacer diagnóstico temprano y oportuno por medio de pruebas en sangre materna. Esto permitiría identificar a las pacientes que están en riesgo de padecer la enfermedad y tratarlas oportunamente. Más aún, si estos factores fueran susceptibles de ser bloqueados o modificados se podría prevenir que la enfermedad evolucionara hasta etapas en las que pone en peligro el bienestar del binomio. En este trabajo se estudiará el homogenado placentario de placentas toxémicas, y su efecto sobre el endotelio. Se pretende contribuir así a la identificación del famoso factor X (o factores) que permitieran el diagnóstico precoz

de la enfermedad y eventualmente su manejo temprano y oportuno. Por otro lado se quiere estudiar si hay algún efecto sobre el homogenado placentario –y el daño endotelial *in vitro*– en las pacientes con enfermedad hipertensiva del embarazo que reciben aspirina a baja dosis.

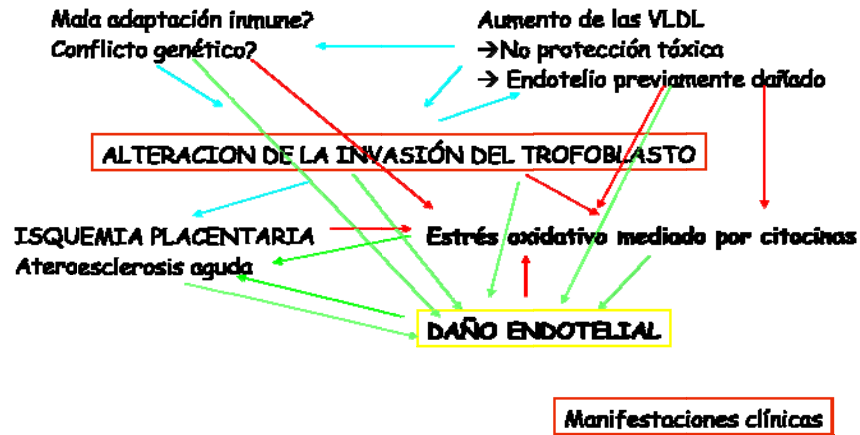


Figura 1.2. Relación entre las diferentes teorías de la preeclampsia.

## OBJETIVOS

Objetivo general. Determinar si el homogenado placentario de pacientes con preeclampsia contiene mayor cantidad de proteínas y linfocinas comparado con el homogenado placentario de pacientes sanas y ver si causa daños en células endoteliales cultivadas. Determinar si esta composición y estos daños son diferentes en las pacientes que fueron tratadas con aspirina a baja dosis.

Objetivos específicos:

1. Obtener muestras de homogenados de placenta de pacientes con enfermedad hipertensiva del embarazo (manejadas o no con aspirina) y pacientes sanas (controles) y llevar a cabo una caracterización básica de los mismos:
  - Revisar los expedientes clínicos para recabar los datos relacionados con la evolución de las madres y sus hijos: edad materna, paridad, antecedente de enfermedad, manejo, días de evolución del cuadro, niveles máximos de TA, proteinuria, tipo de resolución, peso placentario y niveles de líquido amniótico (cuando estaban registrados), y por otro lado peso fetal y Apgar.
  - Medir la expresión de proteínas en los homogenados placentarios por medio de la técnica de Bradford

- Determinar la expresión de citocinas (tipo Th1, Th2 y proinflamatorias) sometiendo los homogenados a ensayo con multiplex.
  - Estudiar el patrón protéico en los homogenados placentarios con gel de acrilamida con tinción de plata
2. Estudiar el efecto de los homogenados placentarios en cultivos primarios de endotelio humano:
- Medir la reducción de MTT
  - Estimar si la exposición de células endoteliales al homogenado provoca citotoxicidad, medida como exclusión con azul tripano.
  - Estudiar si el homogenado placentario puede activar al endotelio, por medio de un ensayo de adhesión.

## HIPOTESIS

---

La placenta es el origen de los factores citotóxicos liberados a la circulación materna y el homogenado placentario de pacientes con PE produce citotoxicidad en células endoteliales *in vitro*. Esta citotoxicidad endotelial se correlaciona con la severidad del cuadro clínico, de manera que la preeclampsia severa y la eclampsia producen mayor daño endotelial *in vitro*. La composición del homogenado placentario es diferente en placentas de pacientes sanas y pacientes toxémicas. El homogenado placentario de pacientes preeclámpticas contiene factores tóxicos que dañan el endotelio. Este daño endotelial es menor en las pacientes con enfermedad hipertensiva del embarazo que son manejadas con ácido acetil salicílico a bajas dosis (100mg por día).



# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## **Diseño experimental**

Las actividades realizadas se resumen en la figura. Primero se obtuvieron homogenados placentarios que fueron sometidos a estudio para evaluar sus características: se cuantificaron niveles de proteína y se determinaron sus patrones de bandeo proteico en geles de acrilamida teñidos con plata. Su composición fue parcialmente estudiada al determinar por MULTIPLEX la concentración de 10 diferentes citocinas. Posteriormente se establecieron cultivos de endotelio obtenido de venas de cordón umbilical humano (HUVEC). Se evaluó la capacidad del homogenado placentario de activar el endotelio con un ensayo de adhesión heterólogo así como la capacidad de provocar estrés oxidativo por medio de la reducción de MTT, por otro lado, se determinó también la citotoxicidad por exposición a homogenados placentarios por conteo celular por exclusión con azul tripano. La figura 1.6 muestra el diseño experimental.

## **Obtención y análisis de homogenados placentarios**

### **Obtención de los homogenados placentarios**

Las placentas fueron obtenidas de pacientes sanas con embarazos de término, cesárea programada sin trabajo de parto y sin patologías fetales o maternas o pacientes con preeclampsia (definida como hipertensión  $>140/90$  arterial y proteinuria  $>30\text{mg/dL}$ ) del Instituto Nacional de Perinatología (InPer), el protocolo de este trabajo fue evaluado y aprobado previamente por el comité de ética del InPer. También se incluyó un grupo pequeño de pacientes de la consulta privada que previamente habían aceptado donar sus placentas firmando consentimiento informado y que fueron tratadas con aspirina a bajas dosis (100mg por día).

Las muestras de placenta fueron obtenidas inmediatamente después del alumbramiento, se lavaron con solución salina isotónica. Se tomaron entre 20 y 80g de tejido a los cuales se agregaron 2 mL de medio M-199 (Gibco/BRL, EUA) por cada gramo de tejido placentario. Se homogenizó con politrón, posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 3,500 g a 4°C, el sobrenadante fue ultracentrifugado a 27,000g durante una hora a 4°C. Finalmente se recolectó el sobrenadante y se almacenó a 4°C.

Se utilizaron 30 $\mu\text{L}$  de cada homogenado placentario para determinar el contenido de proteína con el reactivo comercial de Bradford, utilizando concentraciones de 0-16 $\mu\text{g/mL}$  de albúmina bovina sérica (BSA) para la curva patrón.

### **Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)**

El SDS-PAGE es un método para analizar cualitativamente mezclas proteicas. Este método se basa en la separación de proteínas de acuerdo a su tamaño. En este proyecto se utilizó el método Laemmli.

Para separar las proteínas presentes en los homogenados placentarios se realizó una electroforesis de tipo SDS-PAGE, con un gel concentrador de acrilamida al 4% y un gel separador de acrilamida al 10%. Se tomaron 3  $\mu\text{g}$  de proteína de cada lote de homogenado

placentario y se diluyeron en un amortiguador de muestra 5x que contiene el agente reductor beta mercaptoetanol (0.5%). Posteriormente las muestras se colocaron a ebullición en baño maría durante 15 minutos y después se cargaron en el gel. Las muestras se corrieron a 80 V durante 30 min. Para que se concentraran antes de entrar al gel separador, y después, se aumentó el voltaje a 100 V durante 1-2 horas (Walker 1996).

Tinción con plata. Para visualizar el patrón de bandeo proteico de los homogenados placentarios que se separaron con la técnica SDS-PAGE se realizó una tinción de plata de los geles obtenidos. Esta depende de la unión de plata iónica a las proteínas y su posterior reducción a su forma metálica. La resolución de este método es de 0.1 ng por banda. En este proyecto se utilizó el método alcalino con plata amoniacal que se describe a continuación (Walker 1996).

Después de realizar la SDS-PAGE, los geles de acrilamida se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) al 20% durante 12 horas. Se pusieron en contacto con una solución acuosa de etanol al 40% y ácido acético al 10%, haciendo dos lavados durante 30min. Posteriormente se lavaron 2 veces con agua destilada por 20 min. Después se sensibilizaron con una solución de glutaraldehído al 10% por 30 min. Se realizaron 3 lavados por 20 min con agua destilada. Los geles se impregnaron durante 30 min con una solución de plata amoniacal (solución acuosa de nitrato de plata al 20% y óxido de sodio al 0.2% e hidróxido de amonio al 45% aforando con 50mL con agua destilada). A continuación los geles fueron lavados 3 veces con agua destilada por 5 min. Finalmente se revelaron las bandas con una solución acuosa de formaldehído en un ambiente ácido (0.02% formaldehído, 0.05% ácido cítrico). El revelado se detuvo con una solución de etanol al 40% y ácido acético al 10%. Para preservar los geles se efectuaron 3 lavados de un minuto cada uno con agua destilada. Se conservaron en solución de preservación (10% etanol, 4% glicerol). Todas las incubaciones y lavados se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con agitación suave (Walker 1996).

## **Medición de la concentración de citocinas**

El equipo Bio- Plex (Bio Rad) utiliza un método modificado de ELISA empleando microesferas que tienen adheridos anticuerpos para las citocinas que se analizaron. La concentración de citocinas se estimó mediante el uso de anticuerpos secundarios acoplados a un fluorocromo. Este equipo es capaz de medir la concentración de diferentes citocinas al mismo tiempo, al exponer diferentes tipos de microesferas (un tipo para cada citocina) mezcladas junto con 50  $\mu$ L de muestra. El límite inferior de detección de la concentración de citocinas es de 2 pg/mL aproximadamente. La concentración de IL-2, IL-4, IL6, IL8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-1 $\alpha$  fue calculada con el equipo Bio-Plex (Bio-Rad) de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante para la medición de citocinas.

## **Ensayos**

### **Obtención de células endoteliales humanas**

Las células endoteliales derivadas de vena umbilical humana (HUVEC) fueron extraídas de cordones provenientes de pacientes con embarazos de término sin ninguna complicación y se incluyeron cordones obtenidos por parto o cesárea indiferentemente (Jaffe 1973). Los cordones se obtuvieron del hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS); el protocolo de investigación de este proyecto fue aprobado por el Comité de Evaluación Interno del IMSS.

Los cordones fueron recolectados en solución salina isotónica y manejados bajo condiciones de esterilidad. Se canalizó la vena umbilical y se lavó 3 veces con solución salina para limpiar residuos de sangre. Posteriormente se llenó la vena con solución de colagenasa IV al 0.02% (preparada en solución de HEPES pH 7.4), y se incubó durante 20min a 37°C para obtener las células por disgregación enzimática. Al final de este tiempo se colectó la solución y se lavaron nuevamente los cordones con el fin de obtener la mayor cantidad de células posible, se detuvo la acción de la colagenasa colocando 0.5ml de suero fetal bovino (SFB). Se colectaron las células obtenidas y se centrifugaron a 1000 g durante 10 min. Se aspiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en medio M-199 (Gibco/BRL,

EUA) suplementado con glutamina (Gibco) al 1%, 0.1 mg de extracto de pituitaria de bovino, rico en factor de crecimiento endotelial (Biomedical Technologies Inc EUA), 0.1 mg/mL de heparina (Sigam EUA), 10% de SFB y antibiótico-antimicótico al 1% (Jaffe 1973). Por cada 4 cordones utilizados para la obtención de células se utilizó una caja de Petri de 68cm<sup>2</sup> para la siembra.

Las HUVEC se incubaron en medio M-199 suplementado en incubadora con humedad relativa del 100%, a 37°C y en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, saturada de H<sub>2</sub>O y fueron utilizadas para los experimentos cuando llegaron a confluencia entre los días 3 a 4 posteriores al cultivo. Entre los pases 1 y 3 fueron sembradas a una densidad de 3x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> en placas de 12, 24 o 48 pozos (Corning EUA).

Para realizar los experimentos las células HUVEC se crecieron hasta 50-80% de confluencia, se desprendieron del plato con tripsina 0.1 % (Sigma, St. Louis, MO) y se contaron con ayuda de una cámara de Neubauer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania). Se sembraron a 20, 000 células por cm<sup>2</sup> y cuando llegaron a confluencia se agregaron 5 mg/mL de proteína de homogenado placentario de placenta preecláptica o sana (n=10 para cada situación) y se incubaron por el tiempo indicado en una atmósfera controlada con 100% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>. El grupo control fue aquel que no se expuso a ningún tipo de homogenado placentario. Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

### **Células de linfoma U937**

Las células U937 fueron obtenidas de de la compañía American Type Culture Collection (ATCC, EUA) y se mantuvieron en cultivo de acuerdo a las indicaciones con medio RPMI (Gibco) suplementado con 10% SFB y antibiótico-antimicótico al 1% (penicilina 100U/mL, estreptomicina 100µg/mL, anfotericina B 0.25 µg/mL) en incubadora con humedad relativa del 100%, a temperatura de 37°C y en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> saturada de H<sub>2</sub>O.

## **Reducción de bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT).**

Se cultivaron las células HUVEC con los homogenados placentarios por un tiempo de entre 4 y 72 horas. El MTT (Sigma, St. Louis, MO) se añadió a los cultivos 4 h antes del término de cada experimento a una concentración final de 200 µg/ml. Después de este lapso, el medio se aspiró y las sales de formazán se solubilizaron con 250 µl (en pozos de 1 cm<sup>2</sup>) de isopropanol (Sigma, St. Louis, MO) ácido (0.1 N HCl en isopropanol). Después de 10 min se adicionaron 250 µl de amortiguador de fosfatos (PBS) (J. T. Baker, Xalostoc, México), este material se sometió a un análisis espectrofotométrico a 570 y 630 nm y la diferencia entre las dos densidades ópticas obtenidas ( $DO_{570 \text{ nm}} - DO_{630 \text{ nm}}$ ) se tomó como un valor directamente proporcional a la reducción del MTT. El PBS se preparó con 8 g de NaCl (J. T. Baker, Xalostoc, México), 0.2 g de KCl (J. T. Baker, Xalostoc, México), 2.16 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (J. T. Baker, Xalostoc, México) y 0.2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J. T. Baker, Xalostoc, México) para 1 litro.

Los ensayos de reducción de MTT se realizaron por duplicado. Para unificar los datos obtenidos, se transformaron en porcentajes de sus propios contrales.

## **Conteo celular por exclusión de azul de tripano.**

Después de la incubación por 8 horas a 37°C en una atmósfera controlada con 100% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub> con homogenado placentario (de sana o PE n=10 para cada caso) se aspiró el medio de cultivo, se añadieron 100 ml de tripsina 0.1% (pozos de 1 cm<sup>2</sup>). Al desprenderse el 100% de las células se añadieron 100 ml de azul de tripano (Sigma), se mezcló con micropipeta varias veces y se contó en la cámara de Neubauer. Para los experimentos de viabilidad se contaron 10 campos para cada pozo. Se obtuvieron los promedios y desviaciones estándar a partir de los duplicados.

## **Ensayo de adhesión**

Por este ensayo quisimos determinar si el homogenado placentario de pacientes con PE y sanas activa el endotelio y si hay diferencias en esta activación, la cual se manifiesta al aumentar la capacidad de células endoteliales de unirse a las U937 (Estrada 2003).

El ensayo de adhesión utilizado en este proyecto fue desarrollado en el laboratorio para medir la capacidad de las células HUVEC de establecer uniones firmes con las células de la línea U937. Este ensayo es heterólogo, pues se estimula el endotelio con diferentes factores y se evalúa el efecto que tiene en la activación midiendo de manera indirecta la cantidad de células que se le adhieren.

Marcaje con timidina tritiada. Con el fin de realizar la cuantificación de los ensayos de adhesión, es necesario marcar las células U937 con timidina tritiada, un isótopo radiactivo capaz de incorporarse al ADN. Al medir la radiación emitida por las células U937 es posible cuantificar indirectamente el porcentaje de éstas que se ha adherido a la monocapa endotelial al final del ensayo. Las células se cultivaron en medio RPMI (Gibco/BRL EUA) suplementado con 10% de SFB al que se le añadió  $1\mu$  Ci/mL de timidina tritiada (New England Nuclear), durante 24h. Posteriormente las células marcadas se lavaron 2 veces con PBS y resuspendieron en medio RPMI para ponerlas en contacto con las células endoteliales.

Se sembraron las células endoteliales en placas de 48 pozos ( $1\text{ cm}^2$  por pozo) y cuando llegaron a confluencia se trataron con diferentes concentraciones de TNF- $\alpha$  o 5 mg/mL de homogenado de placenta sana o preecláptica (n=10 para cada caso) durante 8 horas a 37 °C en una atmósfera controlada con 100% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se aspiró el medio de la monocapa de células endoteliales y se lavaron una vez con PBS suplementado con CaCl<sub>2</sub> (3mM) y MgCl<sub>2</sub> (5mM). Posteriormente las células endoteliales se pusieron en contacto con las U937 por 3 horas más para permitir la interacción con el endotelio. Después del tiempo establecido, la monocapa se lavó 3 veces

con una solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS) suplementado con CaCl<sub>2</sub> (3mM) y MgCl<sub>2</sub> (5mM). Posteriormente a cada pozo con la monocapa de células endoteliales y las U937 adheridas se le añadieron 500 µL de NaOH 0.2N con el fin de lisarlas e hidrolizar el ADN las células U937. Después de 48h esta solución alcalina se mezcló con 3mL de líquido de centelleo (7g/L PPO, 0.5 g/L POPOP, 65% Tolueno, 35% Triton x-100) y la radiactividad incorporada se cuantificó en un contador de emisiones β (Estrada 2003, Montes-Sánchez 2003).

Los ensayos de adhesión se realizaron 3 veces y cada uno de ellos por duplicado. Para unificar los datos obtenidos, se transformaron en porcentajes de sus propios contrales.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico fue realizado con ayuda de los programas Minitab y SPSS. Para los resultados con distribución normal, se aplicó la prueba de *two sample t test*, cuando la distribución de los resultados no fue normal se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para su comparación. Los resultados fueron presentados en forma de gráficas temporales cuando se mostró la tendencia en el tiempo o en forma de Box plot cuando se compararon grupos. Se estableció un intervalo de confianza de 99% por lo que una  $p < 0.01$  fue considerada como estadísticamente significativa.

---



# RESULTADOS

---

## Datos clínicos

Se estudiaron 10 casos de pacientes con enfermedad hipertensiva del embarazo, 2 de los cuales fueron tratados con aspirina a baja dosis, y 10 casos de pacientes sanas. Los resultados epidemiológicos fueron obtenidos de los expedientes clínicos. Se registraron las edades maternas, el diagnóstico de ingreso, las semanas de gestación, la paridad, la tensión arterial (TA) máxima registrada, los niveles de proteína, si tenía o no oligohidramnios, el tiempo de evolución desde su diagnóstico hasta la resolución (nacimiento), si ameritó manejo y de qué tipo y si hubo o no trabajo de parto. De los fetos se registró si hubo sufrimiento fetal, los pesos y el Apgar.

La edad promedio para las pacientes sanas fue de 28.3 años, y para las preeclámpticas de 29.9 años, sin diferencia estadísticamente significativa. La edad gestacional fue de 35.5 semanas para las preeclámpticas y 39 semanas de gestación para las sanas ( $p < 0.05$ ). No hubo diferencia para la paridad, que varió de 1 a 4 embarazos en cada grupo, el 40% de las pacientes de cada grupo era primigesta, el promedio de paridad fue de  $2.8 \pm 1.35$  para las pacientes sanas y de  $1.8 \pm 0.78$  para las pacientes con PE. La tensión arterial fue mucho más elevada en el grupo de pacientes con PE, se presentaron cifras de 109 vs 144 para la diastólica y de 73 vs 98 para la sistólica en sanas y preeclámpticas respectivamente ( $p < 0.05$ ). Ninguna paciente sana presentó proteinuria y de las enfermas, las dos que llevaron manejo con aspirina tampoco. El tiempo de evolución desde el diagnóstico hasta la resolución del embarazo varió entre 12 horas y hasta 3 semanas. Para el grupo de pacientes preeclámpticas los manejos administrados fueron alfa metil dopa (AMD) 250 mg a 1 g cada 6 h, hidralazina (HDZ) 30 a 100 mg cada 6 h y ácido acetil salicílico (ASA) 100 mg cada 24 h. Se presentó oligohidramnios en el 40% de las pacientes con PE y en ninguna sana. El peso placentario solo fue registrado en los dos casos que llevaron mayor tiempo de seguimiento y en ambos casos fue bajo (420 g).

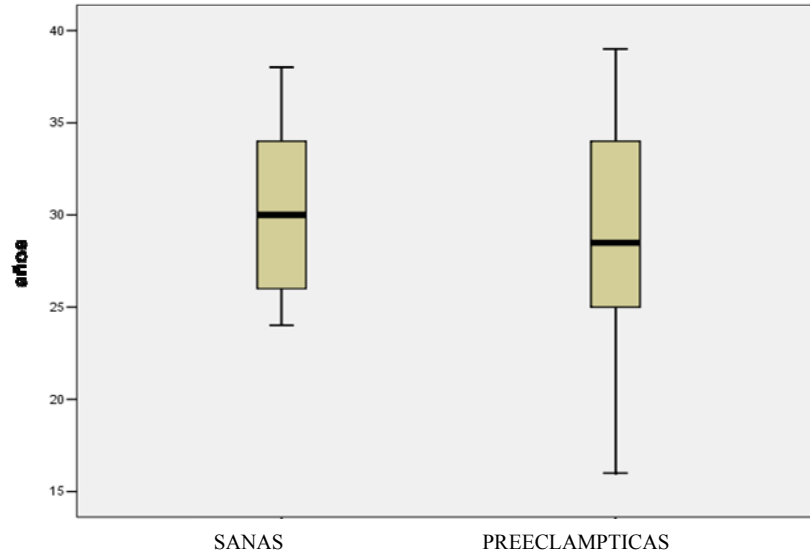
En cuanto a los fetos, el 50% de los hijos de madres con PE presentó sufrimiento fetal y ninguno de los hijos de pacientes sanas ( $p < 0.05$ ). El peso fetal fue de 3048.5 g para las sanas y 2258 g para las preeclámpticas ( $p < 0.05$ ). El 30% de los hijos de pacientes con PE presentó Apgar bajo (menor de 7) ( $p < 0.05$ ) y solo el 10% de los hijos de pacientes sanas.

Caso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Edad	26	32	34	24	38	34	27	32	28	24
Diagnóstico	Préclamo	Préclamo	Episodio preclámico de moderado	Pre-eclampsia crónica p/éctica	Pre-eclampsia crónica p/éctica	Préclamo	Préclamo	Préclamo (no formalizado)	Préclamo	Préclamo
Semanas de gestación	40	37	40	40	39	37	40	36.6	38.3	39.1
Paridad	G1	G4 C2 A1	G2 P2	G1	G1	G4 A0 C2	G1	G4 C3 A1	G3 C2	G3 C2
TA	100/90	100/70	100/90	100/70	100/70	120/70	100/90	100/70	100/70	100/80
Proteinuria	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Trabajo de parto	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Oligohidramnios	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Suficiente fetal	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Peso recién nacido (gramos)	3425	2650	2425	3858	3225	3400	2750	2700	3150	3400
Apgar	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9

Tabla 1.1 Datos clínicos de las pacientes sanas. En total se estudiaron 10 casos, los datos fueron obtenidos de los expedientes clínicos. TA tensión arterial

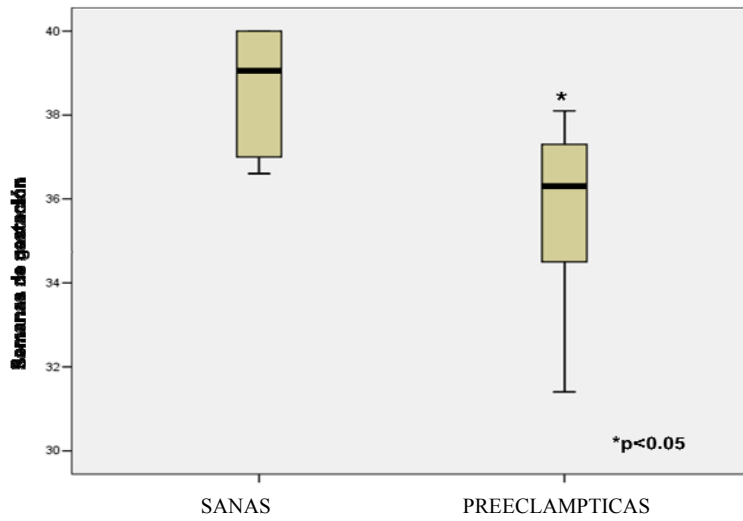
Caso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Edad	16	30	26	34	27	35	26	18	39	32
Diagnóstico	Pre-eclampsia	Pre-eclampsia	Pre-eclampsia severa, gemelar doble	Pre-eclampsia Síndrome nefrótico, trastorno bipolar	Pre-eclampsia severa con anemia	Pre-eclampsia severa con anemia	Hipotensión, placenta previa HAS	HAS gestacional	HAS gestacional	HAS gestacional
Semanas de gestación	37.5	37-38	35-36	34.5	34.2	31-32	36	36.6	38.1	36.6
Paridad	G1	G3 P2 C1	G2 C1	G3 P2	G2 P1	G1	G1	G3 C1	G2 P1	G1
TA	130/90	140/90	160/105	140/180	150/180	160/110	130/90	130/90	160/110	140/100
Proteinuria	>30mg/dL	30mg/dL	150mg/dL	>30mg/dL	>30mg/dL	>30mg/dL	300mg/dL	18mg/dL	18mg/dL	No
Tiempo de evolución (horas)	120	24	60	24	12	14	12	24	336 (2 sem. anac)	304 (3 sem. anac)
Manejo médico	No	AMD 1g/6h, HDZ 50mg/6h	AMD 1g/6h, HDZ 100mg/6h	AMD 1g/6h, HDZ 50mg/6h	AMD 1g/6h, HDZ 100mg/6h	AMD 1g/6h, HDZ 100mg/6h	No	No	ASA 100mg/24h	ASA 100mg/24h, HDZ
Trabajo de parto	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	No
Peso placentario (gramos)	-	-	-	-	-	-	-	-	420	420
Oligohidramnios	Si	No	Moderado	No	No	No	No	No	Si	Si
Suficiente fetal	Si	No	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No
Peso recién nacido (gramos)	2150	2300	2200/430	1390	2020	1460	2390	2370	2700	3000
Apgar	8/9	8/9	8/8, 9/9	4/9	8/8	7/9	9/9	5/9	8/9	9/10

Tabla 2.1 Datos clínicos de las pacientes con preeclampsia. En total se estudiaron 10 casos, los datos fueron obtenidos de los expedientes clínicos. TA tensión arterial, HAS hipertensión arterial sistémica, AMD: alfametildopa, HDZ hidralazina, ASA ácido acetil salicílico



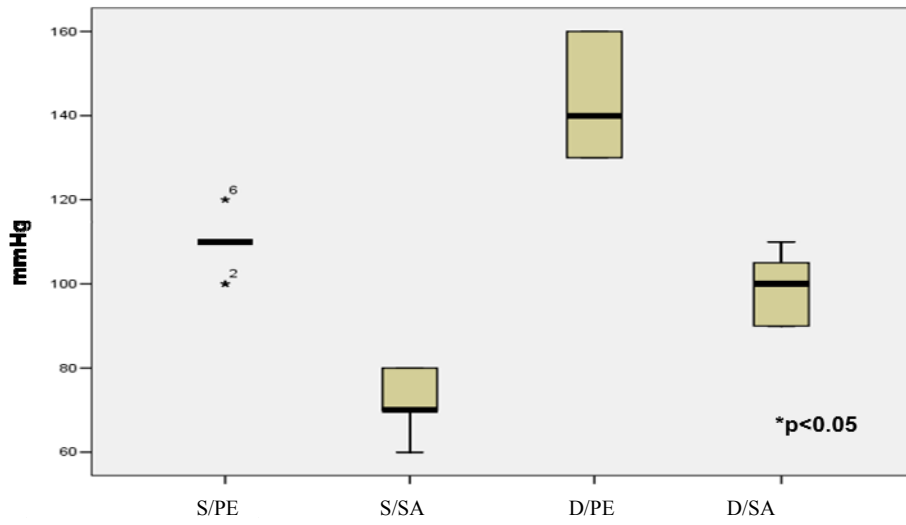
	MINIMO	MAXIMO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
SANAS	16	39	28,3	7,43
PREECLAMPTICAS	24	38	29,9	4,77

Fig. 1.7 Edad materna (n=10)



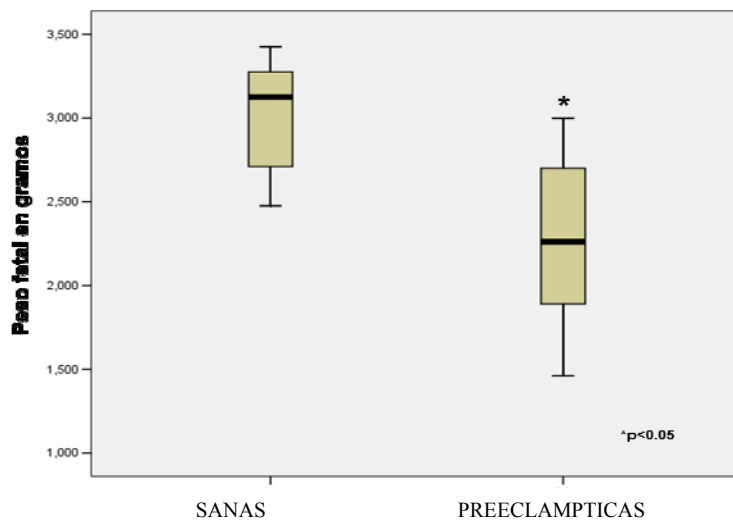
	MINIMO	MAXIMO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
SANAS	36,6	40	38,6	1,3
PREECLAMPTICAS	31,4	38,1	35,6	1,9

Fig. 2.7 Edad gestacional (n=10)



	MINIMO	MAXIMO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
SANAS TA S	60	80	73	6,7
SANAS TA D	100	120	109	5,6
PE TAS	90	110	98,5	8,1
PE TAD	130	160	144	12,6

Fig. 3.7 Tensión arterial sistólica y diastólica (n=10)  
TA tensión arterial, S sistólica, D diastólica



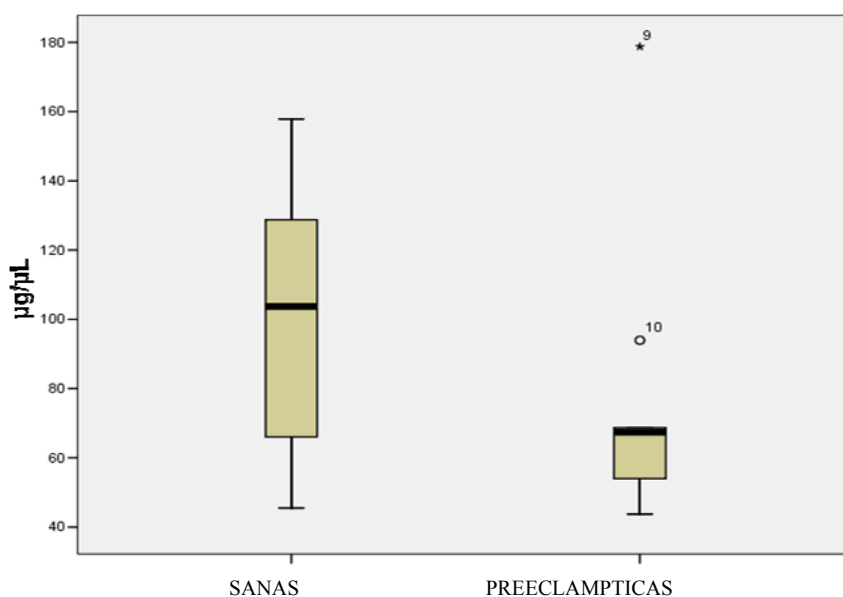
	MINIMO	MAXIMO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
SANAS	2475	3425	3048.5	328.7
PREECLAMPTICAS	1460	3000	2258	485.3

Fig. 4.7 Peso fetal al nacer (n=10)

## Caracterización de los homogenados placentarios

### Cuantificación proteica

La cantidad de proteína para cada homogenado placentario se midió con el reactivo comercial de Bradford. La cantidad de muestra utilizada para este ensayo fue de 30  $\mu\text{L}$ . El ensayo se realizó por duplicado. Los resultados se muestran en la fig. 5.7. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas las poblaciones no se comportaron de manera normal, ya que en los casos PE9 y PE10 (manejadas con aspirina) se encontraron mayores niveles de proteínas con respecto a las demás pacientes, por otro lado, la distribución de los niveles de proteínas en las pacientes sanas es más homogénea que en las enfermas, y las pacientes con PE tendieron a tener niveles más bajos de proteínas, a excepción de las pacientes tratadas con ASA.



	MINIMO	MAXIMO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
SANAS	45,55	157,9	101,41	37,9
PREECLAMPTICAS	43,81	178,75	74,9	39,2

Fig 5.7 Niveles de proteínas en los extractos placentarios cuantificados con el método de Bradford (n=10)

## Patrones de bandeado proteico

Después de la cuantificación proteica se corrieron geles de acrilamida que fueron teñidos con plata con el fin de comparar los patrones de bandeado proteico (Fig. 6.6).

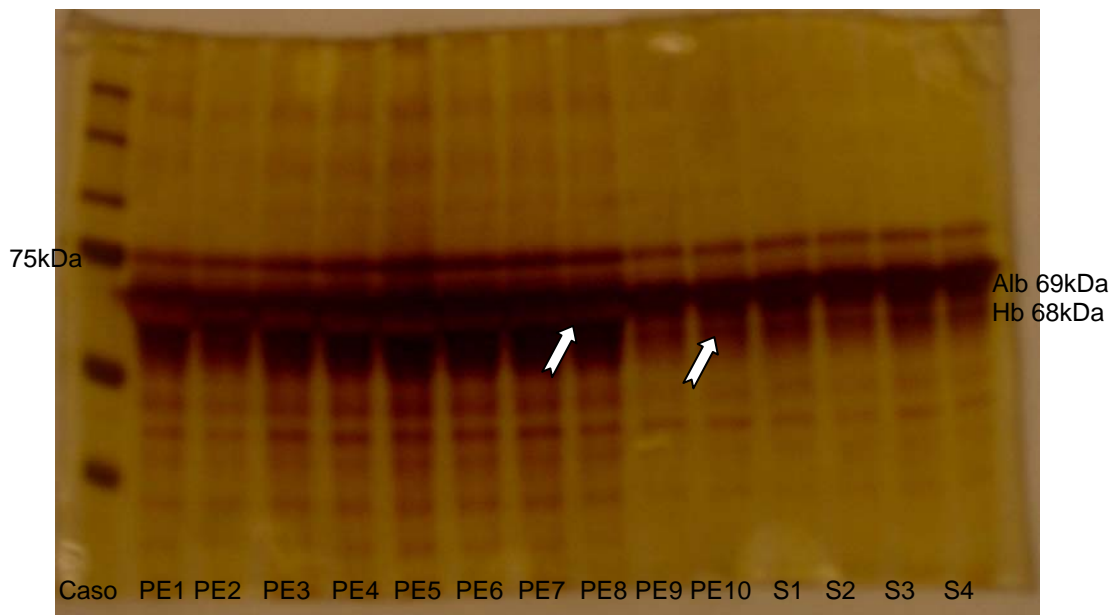


Fig. 6.7 Patrones de bandeado proteico. Tinción de plata de los 10 homogenados placentarios provenientes de pacientes con preeclampsia (PE) y 4 provenientes de pacientes sanas (S). PE9 y PE10 fueron tratadas con aspirina a dosis de 100 mg / día. Las principales diferencias se señalan con las flechas.

Se pueden observar claramente 2 grupos con diferentes patrones proteicos. Al primer grupo pertenecen los primeros ocho casos de homogenados de pacientes con PE y al segundo los casos de pacientes sanas y los casos de pacientes con enfermedad hipertensiva del embarazo tratadas con ASA (pacientes PE9 y PE10). Las diferencias se observan en las bandas que están por debajo del peso molecular que corresponde a la albumina.

## Composición de los homogenados placentarios

Se estudiaron 10 citocinas diferentes, 3 principalmente proinflamatorias de respuesta Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), 3 de respuesta clásica Th2 (IL-4, IL-6, IL-10), y 4 principalmente proinflamatorias reguladoras (IL-1  $\alpha$  y  $\beta$ , IL-8, IL-12). La cuantificación se determinó a partir de una muestra de 50  $\mu$ L de homogenado placentario con el sistema Bio-Plex de BioRad (InPer). La cantidad de citocinas se normalizó con respecto a los niveles de proteína de cada uno de los homogenados con el fin de eliminar las variaciones en la cantidad de proteína total de un mismo volumen. En la tabla 3.7 se muestran los resultados de los homogenados de pacientes sanas y en la tabla 4.7 los de pacientes con PE.

Muestra	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IFN- $\gamma$	TNF $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-12	IL 1 $\alpha$
S1	<0.2	<0.22	3.01	24.33	0.37	9.43	14.3	2.1	0.55	251.6
S2	0.35	<0.22	1.9	43.16	0.27	51.18	21.8	11.1	1.11	508.2
S3	<0.2	<0.22	0.66	36.94	0.08	31.85	12.7	2.26	0.96	238.1
S4	0.02	<0.22	0.43	42.11	0.05	10.97	8.5	0.81	0.96	115.4
S5	0.14	<0.22	1.95	33.37	0.215	29.81	15.6	3.8	0.89	456.5
S6	0.08	<0.22	1.47	71.13	0.05	44.05	26.4	4.9	0.82	252.4
S7	<0.2	<0.22	0.22	34.32	0.04	2.23	14.6	1.45	0.82	131.2
S8	0.14	<0.22	0.615	58.1	0.09	24.72	10.2	1.07	1.11	171.7
S9	0.42	0.29	2.77	227.14	0.12	60.35	11.7	15.8	0.96	82.5
S10	0.49	<0.22	1.76	71.66	0.19	23.71	12.8	8.3	0.96	131.3
promedio	0.23	DND*	1.4	61.1	0.14	26.20	14.86	5.159	0.89	233.8

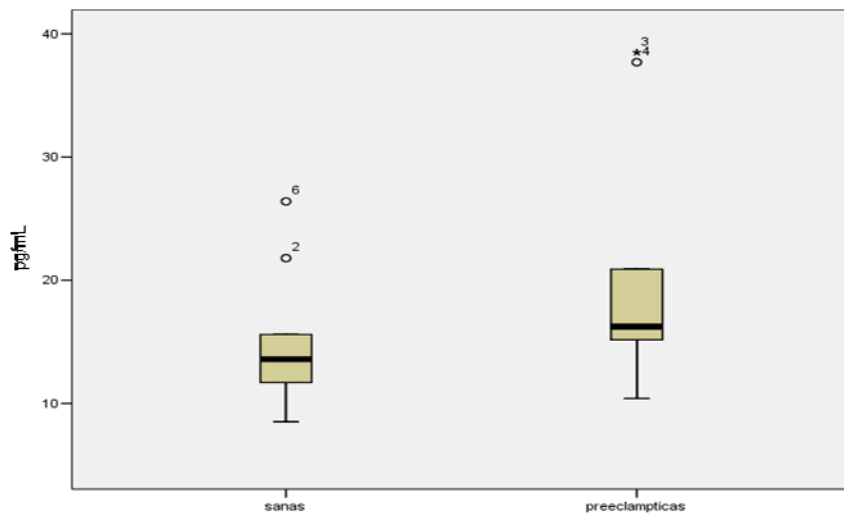
Tabla 3.7 Niveles de citocinas en los homogenados placentarios de pacientes sanas en pg/mL. Todas las citocinas se encontraban presentes, solo para la IL-4 se encontraron por debajo del nivel de detección (DND).

	IL-2	IL-4	IL6	IL-8	IL-10	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-12	IL 1 $\alpha$
PE1	<0.12	<0.19	2.6	24.43	<0.8	0	17.26	1.28	<0.81	27.2
PE2	<0.12	<0.19	1.13	13.49	<0.8	0	15.17	0.66	<0.81	13.24
PE3	<0.12	<0.19	1.58	11	<0.8	0	38.5	1.47	<0.81	35.2
PE4	<0.12	<0.19	2.12	13.53	<0.8	0	37.7	0.49	<0.81	6.8
PE5	0.05	<0.19	2.96	39.35	0.22	0	10.4	0.75	0.82	45.6
PE6	<0.12	<0.19	2.06	16.56	<0.8	0.26	16.1	2.52	<0.81	4.9
PE7	<0.12	<0.19	4.8	24.75	0.22	0	20.9	0.49	0.82	15.6
PE8	<0.12	<0.19	0.93	15	<0.8	0	16.08	0.105	<0.81	13.24
PE9	0.35	0.29	1.16	201.26	0.318	53.22	16.4	8.2	0.96	177.6

<b>PE10</b>	<0.12	<0.19	1.1	21.6	0.22	15.56	13.4	2.27	0.82	12.9
<b>promedio</b>	0.2	DND	2.044	38.097	DND	13.808	20.18	1.8235	0.855	35.22

Tabla 4.7 Niveles de citocinas en los homogenados placentarios de pacientes con PE. Todas las citocinas estudiadas fueron detectadas, solo para las IL-4 y la IL-10 se encontraron por debajo del nivel de detección (DND).

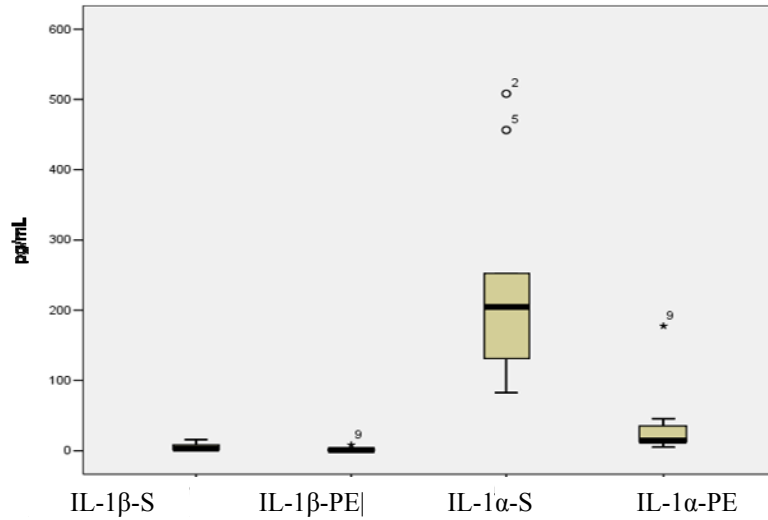
Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para IL8, siendo mayor su concentración en sanas (casi el doble), el IFN- $\gamma$  con niveles mas altos en homogenados de pacientes sanas con respecto a los de pacientes con PE sin embargo, en 7 de los 10 casos de homogenados de PE ni siquiera fue detectada la presencia de esta citocina. Los niveles de IL-10 también se encontraron más elevados en homogenados de pacientes sanas, aunque cabe mencionar que ni siquiera fueron detectables en el grupo con PE. Finalmente los niveles de IL-1 tanto  $\alpha$  como  $\beta$  se encontraron elevados casi al 500% en homogenados de pacientes sanas con respecto a los de pacientes con PE.



	MINIMO	MAXIMO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
<b>SANAS</b>	8.5	26.4	14.8	5.4
<b>PREECLÁMPICAS</b>	10.4	38.5	20.1	9.8

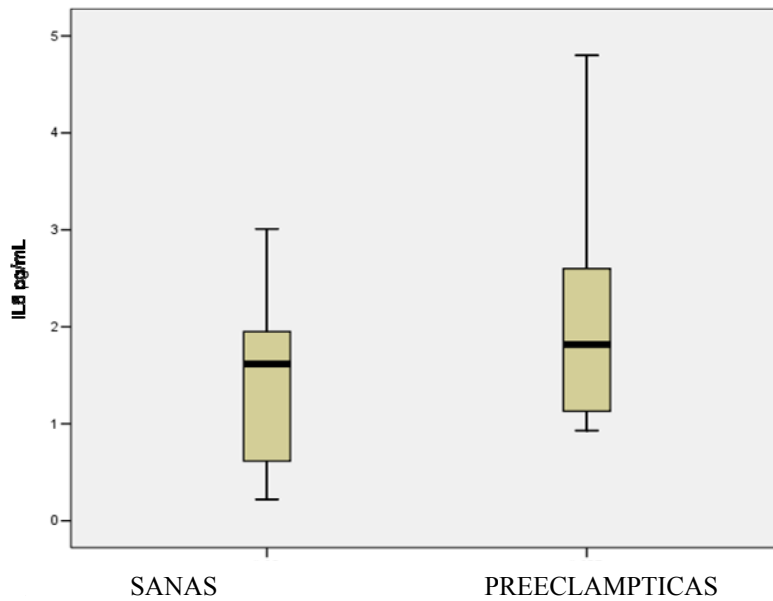
Fig. 7.7 Niveles de TNF- $\alpha$  pg/mL pacientes sanas vs PE. Se analizaron los niveles de 10 homogenados placentarios provenientes de pacientes con preeclampsia (PE) y 10 provenientes de pacientes sanas con el equipo Bio-Plex de Bio-Rad.





	MINIMO	MAXIMO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
IL-1β-S	.81	15.8	5.1	5
IL-1β-PE	0.11	8.2	1.8	2.3
IL-1α-S	82.5	508.2	233.8	144.2
IL-1αPE	4.9	177.6	35.2	51.6*

Fig. 8.7 Niveles de IL-1  $\alpha$  y  $\beta$  pg/mL pacientes sanas vs PE. Se analizaron los niveles de 10 homogenados placentarios provenientes de pacientes con preeclampsia (PE) y 10 provenientes de pacientes sanas con el equipo Bio-Plex de Bio-Rad. \* Estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ).



	MINIMO	MAXIMO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
SANAS	0.22	3.0	1.4	0.9
PREECLAMPTICAS	0.93	4.8	2.0	1.1

Fig. 9.7 Niveles de IL-6 pg/mL pacientes sanas vs PE. Se analizaron los niveles de 10 homogenados placentarios provenientes de pacientes con preeclampsia (PE) y 10 provenientes de pacientes sanas con el equipo Bio-Plex de Bio-Rad.

## Citotoxicidad celular

Se cultivaron las HUVECs con homogenado placentario de pacientes sanas y PE (5 mg/mL) y se observó la morfología celular a las 24, 48, 72 y 168 h (7 días). Las células modificaron radicalmente su morfología a partir de las 72 horas de exposición a homogenado de pacientes con PE (fig. 10.7). Se observó que las células se alargaron y detuvieron su duplicación, mostrándose falta de confluencia en el cultivo. La citotoxicidad celular fue estimada por medio del conteo celular por exclusión con el colorante azul de tripano que se introduce en las células cuyas membranas han sido dañadas, lo cual es signo de muerte celular. La tabla 5.7 muestra los resultados después de la incubación de las células HUVEC con homogenados placentarios de pacientes sanas (n=10, 5 mg/mL), o preeclámplicas (n=10, 5 mg/mL) durante 8 horas. No hubo diferencias estadísticamente significativas ni variaciones importantes en el número de células vivas después del cultivo por 8 h con homogenados placentarios ni al compararlos con el grupo control o al comparar los grupos de sanas contra PE.

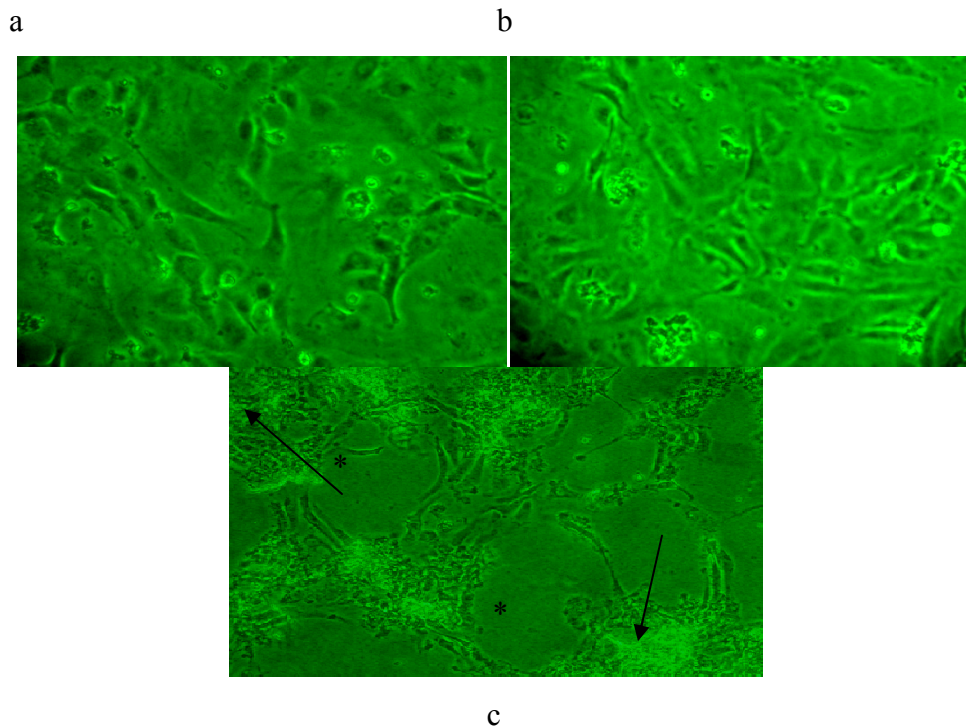


Fig. 10.7 Morfología de las células HUVEC (a) posterior al cultivo sin homogenado placentario durante 72 h, (b) posterior al cultivo con homogenado de paciente sana (10 mg/mL) durante 72 h y (c) posterior al cultivo con homogenado de paciente con PE (10 mg/mL) durante 72 h. Obsérvese la falta de confluencia de las células expuestas al homogenado de placenta con PE( \* ) y el acúmulo de detritus (flecha).

	HUVEC número de células x 10 <sup>3</sup>
Control	21.32±2.8
+homogenado sana	19.22±2.2
+homogenado PE	21.89±2.6

Tabla 5.7 Conteo celular por exclusión con azul de tripano. Después de la exposición durante 8 h sin (control) o con homogenados de pacientes sanas (S) (n=10) o preeclámpticas (PE) (n=10) se contó el número de células vivas por exclusión con azul de tripano con la cámara de Neubauer.

## Reducción de MTT

Para determinar si la exposición a homogenados placentarios genera estrés oxidativo en las células HUVEC, se realizaron experimentos con el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio (MTT). La reducción de esta sal de tetrazolio produce formazán que se precipita y forma cristales de tal forma que ya no es soluble en el medio. Con la posterior solubilización de los cristales con isopropanol ácido es posible cuantificar la cantidad del MTT que se reduce y así determinar indirectamente la actividad respiratoria de las células. El MTT es una molécula que puede aceptar electrones de alto potencial redox, como los provenientes de las deshidrogenasas mitocondriales (Slater 1963) o del radical superóxido ( $O_2^-$ ) (Burdon 1990). La reducción de esta sal de tetrazolio produce formazán que se utiliza comúnmente como una medida de actividad respiratoria -y consecuentemente de viabilidad celular- (Denizot 1986; Carmichael 1987; Vistica 1991). En este proceso el anillo de tetrazolio se rompe por acción de las deshidrogenasas de mitocondrias activas (Mosmann 1983) y admite los electrones provenientes del  $O_2^-$  que se produce colateralmente en la transferencia mitocondrial de electrones (Halliwell 1989; Gardner 1990). El formazán que se produce precipita y forma cristales de tal forma que ya no es soluble en el medio. Con la posterior solubilización de los cristales con isopropanol ácido es posible cuantificar la cantidad del MTT que se reduce e indirectamente la actividad respiratoria de las células.

En una primera aproximación se determinó la reducción de MTT después de incubar las HUVEC a intervalos de entre 4 y 72 h. La figura 11.7 muestra la curva de reducción de MTT después de la incubación a 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 y 72 h. Obsérvese que a las 12 horas tanto los cultivos con homogenado de paciente sana como los cultivos con homogenado de paciente con PE presentan aumento en la reducción de MTT con respecto al control sin homogenado (143 vs 187%), sin embargo, la diferencia más significativa entre ambos cultivos se dio a las 8 horas con un aumento del 53% en la reducción de MTT de cultivo con homogenado de paciente con PE con respecto al cultivo con homogenado de paciente sana. Por este motivo, los ensayos posteriores se llevaron a cabo incubando 8 h a las HUVEC con los diferentes homogenados placentarios.

La figura 12.7 muestra los resultados obtenidos después de la incubación por 8 horas con homogenado placentario de pacientes sanas o preeclámpticas, se consideró como 100% la reducción del grupo control, incubado sin ningún homogenado y a partir de ésta se calculó la reducción de MTT en los otros grupos.

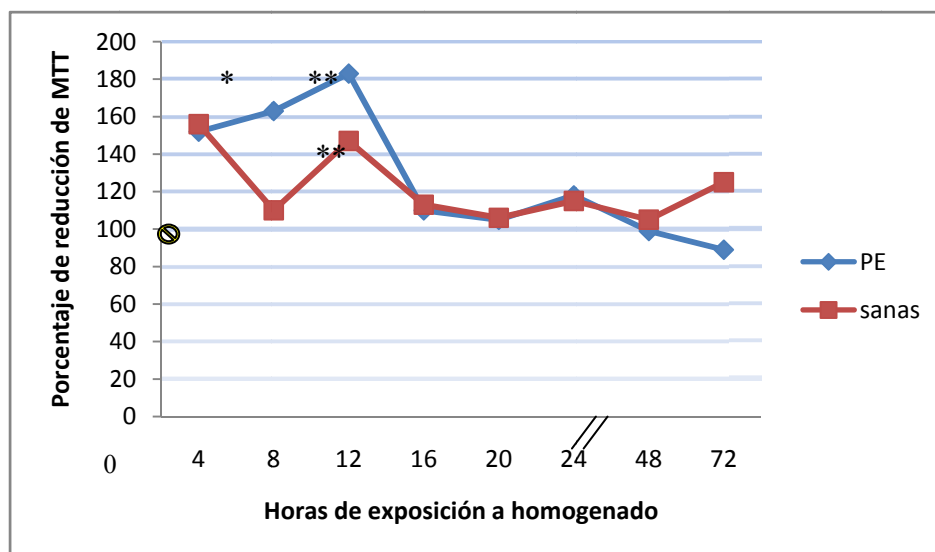
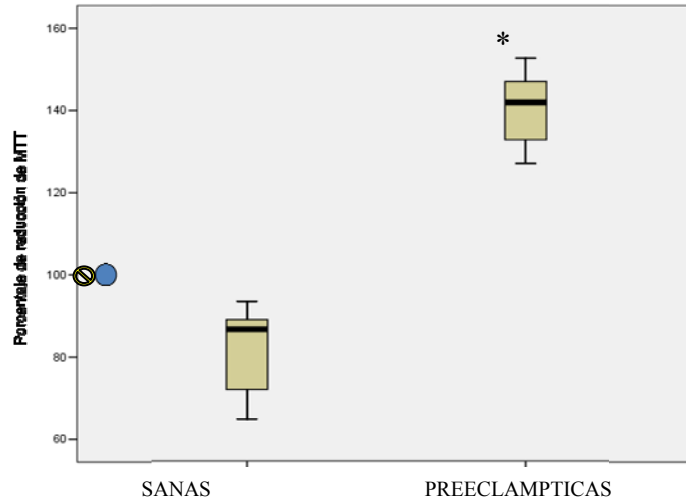



Fig. 11.6 Curva temporal de la reducción de MTT. Porcentaje de reducción de MTT.  $\odot$  representa al grupo control en el que se consideró que 100% de reducción corresponde al grupo sin homogenado placentario. Se incubaron las células HUVEC durante 4 a 72 h con los diferentes homogenados placentarios de pacientes con preeclampsia (PE) (n=5) y provenientes de pacientes sanas (S) (n=4) a dosis de 5 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado. Posteriormente, se determinó la reducción de MTT al estimar por espectrofotometría la cantidad de sales de formazan formadas. \* p<0.05 estadísticamente significativo sanas vs PE, \*\* p<0.05 estadísticamente significativo control vs PE.



	MINIMO	MAXIMO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
SANAS	64.7	93.4	81.8	10.3
PREECLAMPTICAS	127	152.7	140.5	9.3

Fig. 12.7 Reducción de MTT. Porcentaje de reducción de MTT  Representa al grupo control en el que se consideró que 100% de reducción corresponde al grupo sin homogenado placentario. Se incubaron las células HUVEC durante 8 h con los diferentes homogenados placentarios de pacientes con preeclampsia (PE) (n=10) y provenientes de pacientes sanas (S) (n=10) a dosis de 5 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado. Posteriormente, se determinó la reducción de MTT al estimar por espectrofotometría la cantidad de sales de formazan formadas. \*estadísticamente significativo p<0.05.

Obsérvese que en las células incubadas con homogenado de pacientes sanas la reducción de MTT es incluso levemente menor a la basal, sin tener una diferencia estadísticamente significativa. Por el contrario, la reducción en el grupo incubado con homogenado proveniente de pacientes con PE aumentó considerablemente, un 40% con respecto a la basal y casi un 60% con respecto al grupo de pacientes sanas, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa al comparar ambos grupos. Estos resultados sugieren la presencia de factores en el extracto placentario de pacientes con PE que aceleran el metabolismo oxidativo celular, lo que resulta en aumento de la reducción de MTT.

## Ensayos de adhesión

El incremento en la adhesión de células heterólogas al endotelio es un parámetro que permite evaluar la activación endotelial como respuesta a la exposición a diversos factores solubles derivados de la placenta o citocinas pro inflamatorias. El TNF- $\alpha$  es una citocina que actúa en el proceso de inflamación activando el endotelio vascular para que exprese

moléculas de adhesión, los ensayos de adhesión permiten determinar cuantitativamente esta activación al estimar el porcentaje de células adherentes unidas al endotelio. Como células adherentes se emplearon las U937 marcadas con timidina tritiada. Al medir la radiactividad incorporada se estimó indirectamente el porcentaje de células adheridas al endotelio. Los datos se normalizaron siempre con respecto al grupo control que corresponde a la radiactividad incorporada por 250,000 células U937 sin ningún homegenado.

En la figura 13.7 se muestra como aumentó la adhesión de células U937 al endotelio después de exponerlo a  $\text{TNF}\alpha$  (0.1ng/mL), y a homogenado de placenta de paciente con PE pero no así al exponerlo al homogenado de paciente sana ni al cultivarlo sin ningún tipo de homogenado.

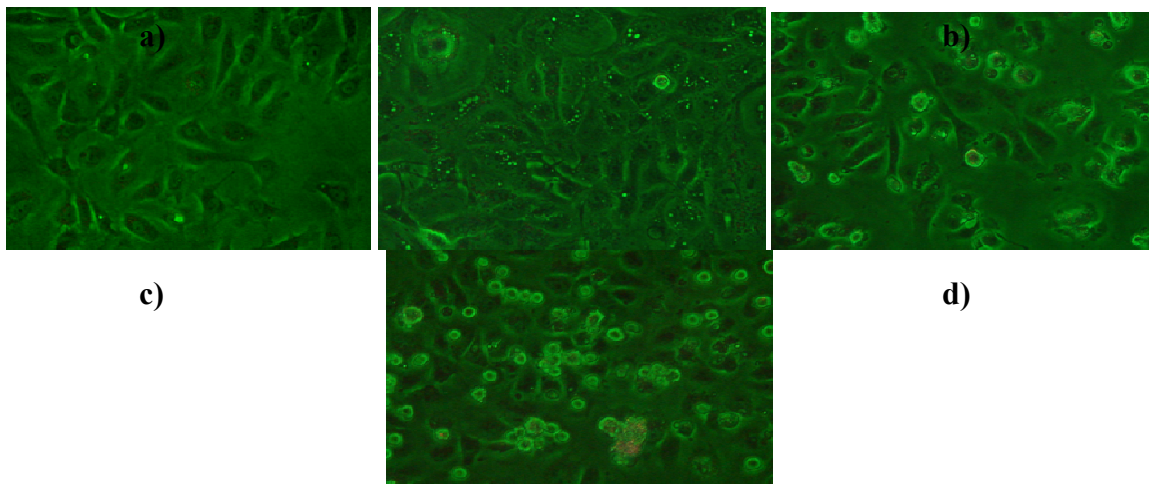
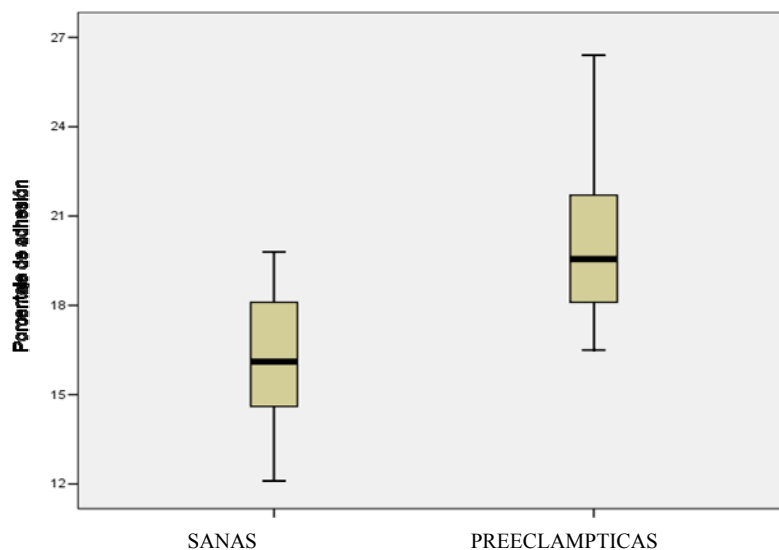


Fig. 13.6 Adhesión de células U937 a cultivos de células HUVEC. Después de la exposición a (a) control, (b) homogenado de paciente sana 5mg/mL, (c) homogenado de paciente con PE 5mg/mL, y (d)  $\text{TNF}\alpha$  0.1ng/mL por 8 horas. Posteriormente se aspiró el medio y se lavaron con PBS. Finalmente se cultivaron por 3 horas más en presencia de células U937, se aspiró y lavó 3 veces con PBS y se observó la adhesión.

La figura 14.7 muestra el resultado de la cuantificación de la adhesión (n=10, ensayos por duplicado) para cada caso (placenta sana o PE). La adhesión de U937 al endotelio en el grupo control fue de 9.6%, y al endotelio expuesto a  $\text{TNF}$  0.1 ng/mL fue de 38.4%. La adhesión en el grupo cultivado con homogenado placentario fue de 20.1%, mucho más elevada que para el grupo control.



	MINIMO	MAXIMO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
<b>SANAS</b>	12.1	19.8	16.1	2.3
<b>PREECLAMPTICAS</b>	16.1	26.4	20.1	2.9

Fig. 14. 7 Ensayo de adhesión de células U937 al endotelio estimulado con homogenado placentario de paciente sana 5 mg/mL (n=10, ensayos por duplicado) o preeclamptica 5 mg/mL (n=10, ensayos por duplicado). La adhesión de U937 al endotelio en el grupo control fue de 9.6%, y al endotelio expuesto a TNF 0.1 ng/mL fue de 38.4%.

Al comparar los 2 grupos no se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.04$ ) sin embargo, la adhesión en el grupo expuesto a homogenados de placentas con PE fue mayor en todos los casos, lo que se había observado previamente al fotografiar los endotelios expuestos a los diferentes homogenados. Estos resultados sugieren la presencia de factores capaces de activar la adhesión endotelial en extractos placentarios de pacientes con PE.

En la tabla 6.6 se muestra un resumen de los resultados obtenidos de los ensayos de citotoxicidad, reducción de MTT y adhesión de U937.

Variable	Promedio sanas	Promedio PE	$p<0.01$
<b>Citotoxicidad</b>	<b>19.22±2.2</b>	<b>21.89±2.6</b>	<b>No</b>
<b>Reducción de MTT</b>	<b>140.5±9.3</b>	<b>81.3±10.3</b>	<b>Sí</b>
<b>Adhesión heteróloga</b>	<b>16.1±2.3</b>	<b>20.1±2.9</b>	<b>No</b>

Tabla 6.7 Resumen de los resultados obtenidos de los ensayos.

# Discusión

---

## Resultados clínicos

Aunque se ha descrito que el embarazo en los extremos de la edad reproductiva (adolescentes o mayores de 40 años) es factor de riesgo para el desarrollo de PE (Dekker 2001), los datos clínicos analizados no mostraron diferencias en cuanto a la edad materna en pacientes sanas versus preeclámpticas (28.3 +/-7.4, 29.9 +/- 4.7 años). A pesar de que la primiparidad también ha sido descrita como factor de riesgo (Sibai 2003, Vatten 2004, Haut 2000), en nuestro grupos no hubo tampoco diferencias estadísticamente significativas en la paridad, 2.8 +/- 1.35 embarazos para las pacientes sanas y de 1.8 +/- 0.78 embarazos para las pacientes con PE. Esta falta de congruencia con lo antes reportado puede deberse al pequeño número de pacientes estudiadas (n=10 para sanas y n=10 para pacientes con PE).

La tensión arterial siempre fue más elevada en el grupo de pacientes con PE, como era lo esperado por definición (144/98 +/-10 vs 109/73 +/-5 mmHg,  $p<0.05$ ). La proteinuria se presentó en el 80% de los casos de pacientes con enfermedad hipertensiva del embarazo (las otras dos por lo tanto solo tenían hipertensión del embarazo y nunca desarrollaron PE) y en ninguna paciente sana.

Es bien sabido que las complicaciones de la preeclampsia son responsables de hasta el 25% de las muertes perinatales (Karchmer 2006). En nuestro grupo no se presentaron muertes fetales pero sí morbilidad en los hijos de pacientes con toxemia. En el grupo de pacientes sanas solo 1 producto fue prematuro limítrofe (de 36.6 semanas), pero en el grupo de las pacientes con PE el 50% de los productos fueron prematuros y el 20% prematuros limítrofes (de 36.6 semanas), la prematurez y muy probablemente la restricción en el crecimiento intrauterino (RCIU) frecuentemente reportada en la PE se asociaron con el bajo peso al nacer de los productos obtenidos de madres con preeclampsia (2258+/-485 g vs 3048+/-327 g en sanas) y muy probablemente con el Apgar bajo (1 niño con Apgar menor de 7 a los 5 minutos de los hijos de pacientes sanas y 3 con Apgar menor de 7 en los hijos de pacientes con PE) aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas para este último parámetro. Solo el 20% de los hijos de mujeres con PE presentaba sufrimiento fetal



antes de nacer y ninguno de los hijos de pacientes sanas. Los elevados niveles de cortisol a los que están expuestos los hijos de mujeres con alteraciones placentarias favorecen la madurez pulmonar y reducen el riesgo de presentar Apgar bajo al nacer (Gagnon 1999) a pesar de la prematurez.

Ninguna paciente sana presentó oligohidramnios, pero sí se reportó en el 40% de las pacientes con PE. El oligohidramnios y la RCIU reflejan una mala función placentaria y frecuentemente se asocia con preeclampsia.

## **Caracterización de los homogenados placentarios**

### **Cuantificación proteica**

Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles proteicos de pacientes sanas y pacientes con PE (101.4 +/- 37.9 vs 74.4 +/- 39.2 µg/µL respectivamente), sí se presentó un tercer grupo en el que los niveles proteicos más elevados y corresponde al de pacientes que estaba recibiendo ASA (2 pacientes). Por un lado estas pacientes fueron seguidas por mayor tiempo (2 y 3 semanas, cuando la moda de los datos fue de 24 horas y el máximo de 5 días para todas las demás pacientes), este mayor tiempo de evolución de la enfermedad seguramente permite que se desencadenen mecanismos de defensa que favorecen la protección del endotelio (y la madre). Esta respuesta se ve reflejada en este aumento de la cuantificación proteica y de alguna manera podríamos suponer que la elevación de proteínas corresponde a la producción de elementos de protección. Sin embargo solo se pudieron estudiar 2 casos manejados con aspirina por lo que los resultados solo son anecdóticos y sería necesario investigar con un mayor número de pacientes para poder hacer alguna conclusión.

### **Patrones de bandeo proteico**

Los patrones de bandeo proteico (Fig. 6.7) muestran claramente 2 grupos: el de las pacientes sanas con un patrón relativamente estable y el de las pacientes con PE también relativamente constante pero diferente al de las pacientes sanas. Merecen especial atención, las pacientes manejadas con ASA a dosis de 100 mg diarios ya que su patrón de bandeo se comporta igual al de las pacientes sanas. Sería muy aventurado hacer conclusiones con

respecto a esta variación, sobre todo porque nunca antes ningún grupo había estudiado los niveles y características proteicas de homogenados placentarios de pacientes con PE manejadas con ASA, sin embargo, estas pacientes fueron las que “toleraron” la enfermedad por un mayor tiempo (2 y 3 semanas) sin desarrollar PE y lograron la resolución de sus embarazos a término sin mayores complicaciones para ellas o sus productos, probablemente en esa gran mezcla proteica del homogenado placentario, están incluidas algunas sustancias que frenaron el daño sistémico de las mujeres y que eran inducidas (o reprimidas) por la administración de ASA.

Actualmente muchas investigaciones se han enfocado en el uso de aspirina durante el embarazo para prevenir el desarrollo de PE (CLASP, BLASP, ERASME), pero aún no se han mostrado resultados contundentes que permitan administrar el ácido acetil salicílico a todas las pacientes embarazadas para prevenir la aparición de enfermedades hipertensivas del embarazo, sin embargo si se recomienda administrarlo en mujeres con alto riesgo de desarrollar la enfermedad (Ruano R. 2006).

Autor	Año	Grupo experimental	Grupo control	Incidencia de PE experimental vs control
Wallenburg	1986	23	23	9.5 vs 52%
Schiff	1989	34	31	11.8 vs 35.5% *
Benigni	1989	17	16	0 vs 17.6%
McParland	1990	36	42	12.5 vs 25%*
Sibai	1993	1485	1500	4.6 vs 6.3%*
Hauth	1993	302	302	1.7 vs 5.6%*
CLASP	1994	4679	4685	10.3 vs 21.4%
BLASP	1998	1822	1825	2.2 vs 2.5%
Yu CK	2003	276	284	18 vs 19%
Ebrashy	2006	74	64	35 vs 62%*

Tabla 1.8 Metanálisis de la Administración de Aspirina e Hipertensión Gestacional (\*p<0.05)

En la tabla 1.8 se analizaron algunos de los resultados obtenidos hasta la fecha de diversos estudios de administración de ASA durante el embarazo. Se aprecia el efecto de la aspirina administrada a dosis de entre 60 y 300 mg/día en la incidencia de hipertensión gestacional valorado por 10 diferentes autores. En todos ellos es manifiesta la menor incidencia de hipertensión gestacional en el grupo tratado con ASA respecto al placebo; pero solo 5 de ellos tiene significancia estadística. En nuestro pequeño grupo de pacientes tratadas con ASA no se desarrolló tampoco PE, sin embargo, a pesar de observar que el patrón de las bandas proteicas es muy similar al obtenido para los homogenados de pacientes sanas, una muestra tan limitada, amerita un análisis mucho más profundo, que deberá iniciar aumentando el número de casos estudiados.

### **Composición de los homogenados placentarios**

El análisis de la composición de citocinas realizado con el sistema Bio-Plex de Bio-Rad mostró diferencias solo para algunas de las citocinas estudiadas. Se estudiaron 10 citocinas diferentes, 3 principalmente proinflamatorias de respuesta tipo Th1 (IL2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), 3 de respuesta Th2 (IL-4, IL-6, IL-10), y 4 principalmente proinflamatorias reguladoras (IL-1  $\alpha$  y  $\beta$ , IL-8, IL-12). Lo esperado era que los homogenados de pacientes sanas tuvieran una mayor concentración de citocinas tipo Th2, ya que es la respuesta inmune que prevalece durante el embarazo, y que los homogenados de pacientes con PE tuvieran mayor cantidad de citocinas proinflamatorias y de tipo Th1. Sin embargo no fue así. Únicamente los niveles de IL-1  $\alpha$  y  $\beta$  se encontraron mucho más elevados en los homogenados de pacientes sanas, pero ni los niveles de IL6 (que se esperaban más elevados en homogenados de pacientes sanas) ni los de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (que se creían más elevados en homogenados de pacientes con PE) presentaron diferencias. Existen muy pocos reportes de los niveles normales de citocinas en suero en pacientes sanos y menos estudios aún en suero materno. En el 2005 se reportó que los niveles sericos de IL6 en embarazadas se encontraban más elevados que en mujeres no embarazadas (Rodriguez 2005). La detección de TNF- $\alpha$  es complicada debido a su corta vida media y a la posible interferencia de sus receptores

solubles. Podrían ser decepcionantes las conclusiones hechas a partir de los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$ . Sus receptores solubles podrían ser mejores indicadores de su actividad, sin embargo los resultados no estudian ni los niveles séricos ni los receptores solubles. No podemos pensar que los niveles de citocinas séricas corresponden con los niveles de citocinas a nivel placentario, de hecho deberíamos más bien suponer que el trofoblasto es un órgano genéticamente independiente de la madre. De ser así no tiene por qué producir forzosamente niveles de citocinas proporcionalmente iguales a los del sistema materno, y probablemente establece su propia respuesta inflamatoria que a su vez desencadena una respuesta inflamatoria diferente y compensatoria en la madre. Hacen falta más estudios para profundizar el conocimiento del comportamiento de las citocinas en el embarazo tanto a nivel placentario como materno, no solo de mujeres con preeclampsia sino también de mujeres sanas.

### **Citotoxicidad celular**

Después de la incubación del endotelio con homogenado placentario a dosis altas (10 mg/mL) y por tiempo más de 48 horas se observó detención del crecimiento celular y degeneración del cultivo (fig. 10.7). De acuerdo con la evolución natural de la PE severa (Sibai 2005), lo esperado era que después de 48 h de exposición a homogenado placentario se observaran cambios morfológicos en las células, sugestivos de daño endotelial, los cambios fueron muy evidentes a las 72 h, pero es probable que el daño funcional haya aparecido mucho antes de que fuera evidente al microscopio. Anteriormente en nuestro laboratorio se había reportado que la reducción de MTT estaba disminuida después de la incubación con homogenado placentario a las 72 horas (Monroy 1996), pero los hallazgos actuales apoyan la teoría de que las células a las 72 horas de exposición ya se encuentran muy dañadas como para poder determinar aún su actividad respiratoria.

Con el fin de determinar si a las ocho horas de exposición se presentaban ya efectos de citotoxicidad (8 h de incubación permiten detectar los cambios en la reducción de MTT), se realizó conteo celular por exclusión. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el conteo celular, lo cual implica que después de 8 h de incubación, las células no han sufrido aún muerte y por lo tanto, todos los resultados encontrados para los demás ensayos (reducción de MTT, adhesión) no pueden explicarse por alteraciones en el

número de células, sino más bien son reflejo de la respuesta celular a la exposición a homogenado. Estudios posteriores deberán determinar las horas de exposición necesarias para empezar a ver citotoxicidad secundaria a la exposición a homogenado, que deben ser mayores de 8 pero mucho menores de 72 h.

## **Reducción de MTT**

Los peróxidos lípidos se encuentran aumentados incluso en embarazadas normales, lo que sugiere que el embarazo normal produce cierto grado de estrés oxidativo.

En los primeros experimentos que se realizaron se comparó la reducción del MTT de las células que se trataron con el homogenado placentario de pacientes con PE y de homogenado de pacientes sanas, con una exposición de 4h al homogenado, no se observó ninguna diferencia entre sanas y PE, por lo que inferimos que 4 horas es un tiempo muy corto para observar una respuesta endotelial a la exposición. A las 8 y 12h el valor de absorbencia que corresponde a la reducción del MTT es más elevado en las células tratadas con homogenado de pacientes con PE. A las 8 h de exposición se observa la mayor diferencia en la respuesta de las células entre uno y otro grupo. La reducción disminuida a las 8 horas para el grupo incubado con homogenado de paciente sana podría corresponder a una respuesta protectora previo al estrés oxidativo que permitiría proteger el embarazo de los efectos nocivos de la oxidación. Posteriormente la reducción de MTT se mantiene más o menos estable en el grupo tratado con homogenado de pacientes sanas, pero en el grupo tratado con homogenado de placentas con PE la reducción disminuye progresivamente probablemente porque la respuesta de las células llega a un máximo y posteriormente comienza su degeneración. Clínicamente una paciente con preeclampsia severa presenta una evolución rápida hacia la gravedad, y puede observarse que mucho antes de doce horas el cuadro evoluciona a eclampsia con las secuelas fatales que esto implica. En estos estudios *in vitro* se observa también una respuesta rápida de deterioro celular.

Al realizar el ensayo con los 10 homogenados de pacientes sanas y PE durante 8 horas, se encontró que la reducción de MTT está disminuida con respecto a la reducción basal en el grupo expuesto a homogenado de pacientes sanas, podríamos pensar que esto refleja el estado antioxidante propio de la embarazada sana, sin embargo, la reducción aumentó para

el grupo incubado con homogenado de placenta toxémica, hasta un 50% con respecto a la basal y hasta 60% con respecto al grupo de homogenado de embarazada sana. Este aumento podría ser secundario al estrés oxidativo, que podría estar mediado por el aumento del TNF- $\alpha$  sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de esta citocina en los homogenados placentarios, así que este efecto podría ser secundario a una mezcla de factores que no incluyen solamente a las citocinas, sino a una combinación de éstas y más aún a cambios –radicales o sutiles- en los niveles de muchas otras sustancias encargadas del tono y la respuesta endotelial, como la angiotensina, la enzima convertidora de la angiotensina, la acetilcolina, el adenosin difosfato, el adenosin trifosfato, la bradiquinina, el complejo cAMP/cGMP, la enzima convertidora de endotelio, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio, el óxido nítrico, el anión superóxido, y las prostaglandinas H e I así como el TXA<sub>2</sub>. También podría reflejar lesión mitocondrial como primer efecto detectable de daño por esta citocina lo que corroboraría los reportes previos de daño mitocondrial en pacientes con PE que sin embargo, no son secundarios únicamente al TNF- $\alpha$ .

### **Ensayos de adhesión**

Aunque no se caracterizó por completo la composición de los homogenados placentarios, sabemos que no solo están compuestos por una mezcla especial de citocinas, sino que seguramente en ellos se encuentra una gran mezcla proteica y lipídica –entre muchos otros- que refleja la interacción molecular de la placenta con el matroambiente y el feto, supusimos así que si el endotelio de pacientes toxémicas se encuentra enfermo –y por lo tanto activado- sería posible que el homogenado placentario de pacientes con PE activara el endotelio y este sería una aproximación al modelo *in vivo*. Los niveles de TNF utilizados para los ensayos son mucho mayores que los niveles encontrados *in vivo*, sin embargo, solo así se puede provocar una respuesta clara de adhesión. Lo que significa que esta citocina potencia su efecto en presencia de otras como el IFN y de ahí que su efecto *in vivo* se presente con niveles mucho menores. Los ensayos de adhesión a las 8 h no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la adhesión con homogenado sano o toxémico, sin embargo, si hay una tendencia clara al aumento en la adhesión posterior a la exposición a homogenado de PE con respecto al homogenado sano. Probablemente a las

8h, estamos viendo el principio de la respuesta de activación endotelial, pero serán necesarios estudios posteriores para determinar si con mayor tiempo de exposición aumenta también la adhesión.

La preeclampsia, más allá de una hipertensión inducida por el embarazo, es un síndrome secundario a interacciones que provienen de una perfusión placentaria disminuida y de la alteración en la función endotelial materna. La contribución materna con factores que anteceden al embarazo, influenciados por las adaptaciones metabólicas usuales puede hacer que el cuadro y su estudio *in vitro* sean muy complejos. El endotelio y otros blancos de los efectos de estas interacciones son más sensibles a las grandes modificaciones del embarazo, ya sea por activación de la cascada inflamatoria normal del embarazo, por cambios en la respuesta al estrés oxidativo, o por falta de factores protectores.

# Conclusiones

---

La composición de los homogenados no mostró diferencias importantes en la cantidad de proteínas ni en la composición de citocinas pero sí demostró diferencias importantes en el patrón de bandeo proteico.

El patrón de bandeo proteico en los casos tratados con ASA a baja dosis corresponde con el patrón encontrado para homogenados de pacientes sanas, lo cual que nos haría pensar que la aspirina frena algún proceso molecular de la PE o acelera la producción de algún factor protector, aunque los casos estudiados no representan a ninguna población y deben tomarse como resultados observacionales.

No hubo aumento en la citotoxicidad en los cultivos expuestos a ninguno de los 2 tipos de homogenados placentarios.

La reducción de MTT aumentó cuando se cultivaron las HUVEC con homogenado de pacientes preeclámpticas, lo cual puede reflejar un aumento en el estrés oxidativo celular y corresponde con lo descrito en la literatura.

El aumento de la adhesión en el grupo cultivado con homogenado de placenta preeclámptica no fue estadísticamente significativo, sin embargo, sí se observó una tendencia mayor de adhesión al cultivar el endotelio con homogenado de placenta toxémica, lo cual refleja un aumento en la activación endotelial, aunque probablemente se necesitan más horas de cultivo para poder ver diferencias estadísticamente significativas.

Dada la alta prevalencia de la enfermedad, es necesario realizar estudios que permitan profundizar en la fisiopatología de la toxemia sobre todo con un enfoque que permitiera en un futuro, un diagnóstico temprano con el fin de frenar la evolución y prevenir así la alta morbimortalidad materno infantil de la que es causante. Aunque seguramente para cada paciente existe un factor o factores diferentes que permiten el desarrollo de la enfermedad y esto hace muy complejo generalizar los casos, al igual que para nuestro pequeño grupo de pacientes es difícil generalizar los resultados y más aún, atreverse a decir que los resultados son el reflejo de un comportamiento universal de la enfermedad.



# Bibliografía

---

1. Ahogas RA, M. B., Sibai BM. (1991). "Enhanced endothelium-derived relaxing factor activity in pregnant spontaneously hypertensive rats." *Am J Obstet Gynecol* 165: 801-7.
2. Alexander al, V. F. H. E. e. (1991). "Vasoconstriction Induced by Soluble Factors Derived From Human Placenta." *Proc West Pharmacol Soc.* 34: 183-87.
3. Alexander, B. T. (2007). "Prenatal Influences and Endothelial Dysfunction: A Link Between Reduced Placental Perfusion and Preeclampsia." *Hypertension* 49(4): 775-776.
4. Anumba Anderson, C. M. L., Faye; Zhang, Hai-Ying; Pavlish, Kristin; Benoit, Joseph N. (2005). "Characterization of changes in leptin and leptin receptors in a rat model of preeclampsia." *Am J Obs Gyn* 193(1): 267-272.
5. Aoki K, K. S., Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, et al. (1995). "Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage." *Lancet* 345: 1340-2.
6. Arbogast BW, L. S., Merrick RD, Olive KE, Taylor RN. (1994). "Hypothesis: which plasma factors bring about disturbance of endothelial fuction in pre-eclampsia? ." *Lancet* 343: 340-1.
7. Arechavaleta\_Velasco F, H. G. C. e. a. (2000). "Evidence of Endotelial Citototxic Compounds in Placental Extracts From Preeclamptic Women." *J Soc Gynecol Investig* 7: 114-17.
8. Arkwright PD, R. T., Dwek RA, Redman CWG. (1993). "Preeclampsia is associated with an increase in trophoblast glycogen contet and gycogen synthase activity, similar to that found in hydatidiform." *J Clin invest* 91: 2744-53.
9. Arngrimsson R, B. S., Geirsson RT, Bjornsson H, Walker JJ, Snaedal G. (1990). "Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population." *Br J Obstet Gynaecol* 97: 762-9.
10. Arngrimsson R, C. J., Geirsson RT, Brennecke S, Cooper DW. (1994). "Is genetic susceptibility for pre-eclampsia and eclampsia associated with implantation failure and fetal demise? ." *Lancet* 343: 1643-4.
11. Aust SD, K. W. (1990). "Transition metals in oxidative stress: an overview. In: Davies KJA, editor. *Oxidative damage and repair: chemical, biological and medical aspects.* ." Oxford (United Kingdom): Pergamon Press.: 802-7.
12. Baker PN, B. P. F., Symonds EM, (1991). "Platelet angiotensin II binding sites in normotensive and hypertensive women." *Br J Obstet Gynaecol* 98: 436-40.
13. Bardeguet AD, M. R., Frieri M, Verma UL, Tejani N. (1991). "Cellular immunity in preeclampsia: alterations in T-lymphocyte subpopulations during early pregnancy." *C Obstet Gynecol* 77: 859-62.
14. Barton JR, H. A., O' Connor WN, Nissen SE, Greene JW. (1991). "Endomyocardial ultrastructural findings preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 165: 389-91.
15. Becker, B. (1993). "Towards the physiological function of uric acid." *Free Radic Biol Med* 14: 615-31.
16. Benyo, D. F. S., Alexander; Redman, Christopher W. G; Sims, Cynthia; Conrad, Kirk P (2001). "Expression of Inflammatory Cytokines in Placentas from Women with Preeclampsia." *J Clin End Met* 86(6): 2505-2512.
17. Boyd PA, L. R., Redman C. (1987). "Preeclampsia and trisomy 13: a possible association." *Lancet* 2: 397-9.
18. Brieri CHRISTIAN; ROSE CARL; KEDRA WALLACE; MARTIN JAMES; GRANGER JOEY; BENNETT WILLIAM (2006) "Progesterone prevents tumor necrosis factor-induced increases in blood pressure and thromboxane in a rat model of preeclampsia" *Am J Obstet Gynecol* 193 (S6): 70-75
19. Brown MA, T. E., Zammit VC, Cario GM, CarloN MA. (1995). "Nitric oxide excretion in normal and hypertensive pregnancies." *Hypertens Pregnan* 14: 319-26.
20. Burrow A., G; Wolff, K; Nisell, H. (2001). "Contribution of endogenous endothelin-1 to basal vascular tone during normal pregnancy and preeclampsia." *Am J Obs Gyn* 193(1): 234-240.
21. Burrows TD, K. A., Loke YW. (1996). "Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin or fibronectin." *Hum Reprod* 8: 475-84.
22. Burrows TD, K. A., Loke YW. (1994). "Expression of adhesion molecules by endovascular trophoblast and decidual endothelial cells: implications for vascular invasion during implantation." *Placenta* 15: 21-33.
23. Carosella ED, D. J., Kirszenbaum M. (1996). "HLA-G revisited." *Immunol Today* 17: 407-9.
24. Cester N, M. L., Benedetti G, Cugini AM, Rabini RA, Tranquilli AL, et al. (1988). "Pregnancy-induced hypertension: observations on chemical-physical properties of syncytiotrophoblast plasma membranes from human placenta." *Clin Exp Hypertens [B] Hypertens Pregn* 7: 57-66.
25. Chappell LC, S. P., Briley AL, et al. (1999). "Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial." *Lancet* 354: 810-16.
26. Cheeseman KH, S. T. (1993). "An introduction to free radical biochemistry." *Br Med Bull* 49: 481-93.
27. Chen G, W. R., Wang SH, Zheng HZ, Walker JJ, McKillop JH. ; (1996). "Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene polymorphism and expression in preeclampsia " *Clin Exp Immunol* 104: 154-9.
28. Chesley LC, A. J., Cosgrove RA. (1968). "The familial factor in toxemia of pregnancy." *Obstet Gynecol* 32: 303-11.
29. Chua S, W. T., Sargent Redman C. (1991). "Trophobalst deportation in pre-eclamptic pregnancy ." *Am J Obstet Gynecol* 98: 973-9.
30. Chumbley S, W. T., Sargent Redman C. (1990). "Trophobalst deportation in pre-eclamptic pregnancy ." *Am J Obstet Gynecol* 98: 973-9.
31. Chumbley G, K. A., Robertson K, Holmes N, Loke YW. (1994). "Resistace of HLA-G and HAL-A2 transfectants to lysis by decidual NK cells." *Cell Immunol* 155: 312-22.
32. Conrad KP, B. D. (1997). "Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia." *Am J Reprod Biol* 37: 240-9.
33. Conrad KP, J. G., Kruszyna R, Rochntitryp P, Chavez JE, et al. (1986). "Indentification of

- increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats." *FASEB J* 7: 566-71.
34. Cooper DW, B. S., Wilton AN. (1993). "Genetics of preeclampsia." *Hypertens Pregn* 12: 1-23.
  35. Cox BE, W. R., Rosenfeld CR. (1996). "Angiotensin II receptor characteristics and subtype expression in uterine arteries and myometrium during pregnancy." *J Clin Endocrinol Metab* 81: 49-58.
  36. Cross (1996). "Trophoblast function in normal and preeclamptic pregnancy." *Fetal Matern* 8 57-66.
  37. Cunningham JM, G. I. (1994). "Cytokines, nitric oxide and insulin secreting cells " *Growth Regul* 4: 173-80.
  38. Davidge ST, H. C., Brayden RN, Capeless EC, McLaughlin MK. (1992). "Sera antioxidant activity in uncomplicated and preeclamptic pregnancies " *Obstet Gynecol* 79: 897-901.
  39. Davidge ST, S. C., Roberts JM. (1996). "Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in womwn with preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 174: 1008-13.
  40. Dekker GA, d. V. J., Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BME, Jakobs C, et al. (1995). "Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia." *U Am J Obstet Gynecol* 173: 1042-8.
  41. Dekker GA, K. A. (1991). "Oxygen free radicals in preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 164: 273.
  42. Deniz G, C. S., Brew R, Johnson PM. (1994). "Phenotypic and fuctional cellular differences between human CD3 (-) decidual and peripheral blood leukocytes." *J Immunol* 152: 4266-61.
  43. Ding Z, R. J., Sinosich M, Saunders DM, Gallery EDM. (1994). "Secrfetion of vasoactive substances by cultured hunam villous cytotrophobalsts." *Hypertens Pregnancy* 13: 352-7.
  44. Divers MJ, B. J., Miller D, Lilford RJ. (1995). "Beta 1 integrins in third trimestrer human placentae: no differential expression in pathological pregmancies." *Placenta* 16: 245-60.
  45. Dong, M. H., JING; WANG, ZHENGPING; XIE, XING; WANG, HANZHI (2005). "Placental imbalance of Th1- and Th2-type cytokines in preeclampsia." *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 84(8): 788-793.
  46. Eis ALW, B. D., Pollock JS, Myatt L. (1995). "Immunohistochemical locatization of endothelial nitric oxide synthase in human villous extravillous trophoblast populations and expression during syncytiotrophoblast formation in vitro." *Placenta* 16: 113-26.
  47. Elu MC (2004) "Mortalidad maternal: una tragedia evitable" *Perinatol Reprod Hum* 18(1):44-52
  48. Endresen MJ, T. E., Lorentzen B, Henriksen T. (1992). "Icreased lypolytic activiti and high ratio of free to albumin in sera from women with preeclampsia leads to triglyceride accumulation in cultured endothelial cells." *Am J Obstet Gynecol* 167: 440-7.
  49. Endresen MJ, T. E., Lorentzen B, Henriksen T. (1993). "Icreaeed lipolytic activity of sera from pre-eclamptic womwn due to the presence of a lysophospholipase." *Scand J Clin Lab Invest* 53: 733-9.
  50. Endresen MJ, T. E., Heimli H, Lorenzent B, Henriksen T. (1994). "Effects of free acids found increased in the women who develop pre-eclampsia on the ability of endothelial cells to produce prostacyclin, cGMP and inhibit platelet aggregation." *Scand J Clin Lab Invest* 54: 549-57.
  51. Endresen MJ, T. E., Lorentzen B, Henriksen T. (1995). "Sera of preeclamptic women are not cytotoxic to endothelial cells in culture." *Am J Obstet Gynecol* 172: 196-201.
  52. Esplin MS, F. M., Fraser A, et al. (2001). "Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia." *N Engl J Med* 344: 867-72.
  53. Esterbauer H, W. G., Puhl H. (1993). " Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis." *Br Med Bull* 49: 566-76.
  54. Fay TN, G. J. (1991). "Human endometrial peptides: a review of their potencial role in implantation and placentation." *Hum Reprod* 6: 1311-26.
  55. FIC- Coomarasamy A, B. D., Song F, Taylor R, Khan KS. (2003). "Individualising use of aspirin to prevent pre-eclampsia: framework for clinical decision making " *IBJOG* 110: 882-88.
  56. Firedman SA, W. D., Vallance P, Nussey SS, Whitley GS. (1995). "Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia." *Lancet* 342: 242-3.
  57. Friedl Gerald DJ, R. W., Murray R, Mayo G, FitzGerald GA. (1989). "Thromboxane A2 synthesis in pregnancy-induced hypertesion." *Lancet* 335: 751-4.
  58. Fitz Gerald DJ, R. W., Murray R, Mayo G, FitzGerald GA. (1990). "Thromboxane A2 synthesis in pregnancy-induced hypertesion." *Lancet* 335: 751-4.
  59. Friedman SA, d. G. C., Taylor RN, Golditch BD, Roberts JM. (1994). " Plasme cellular fibronectin as a measure of endothelial involvement in preeclampsia and intrauterine growth retardation." *Am J Obstet Gynecol* 170: 838-41.
  60. Friedman SA, L. S., Ahokas RA, Nova A, Sibai BM. (1995). "Preeclampsia and related disorders: clinical aspects and relevance of endothelin nitric oxide." *Clin Perinatol* 22: 343-55.
  61. Friedman SA, L. S., Schiff E. (1999). "Expectant management of severe preeclampsia remote from term " *Clin Obstet Gynecol* 42: 470-78.
  62. Friedman SA, S. E., Emeis JJ, Decker GA, Sibai BM. (1995). "Biochemical corrobation of endothelial involvement in severe preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 172: 2002-3.
  63. Furchgott RF, Z. J. (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* 299(373-376).
  64. Furui T, K. O., Tanaka M, Mizutani S, Ozawa T, Tomoda Y. (1994). "Decrease in cytochrome c oxidase and cytochrome oxidase subunit I messenger RNA levels in preeclampsia pregnancies." *Obstet Gynecol* 84: 283-8.
  65. Gant NF, D. G., Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. (1973). "A study of angiotensin-II pressor reponse throughout primigravid pregnancy." *J Clin invest* 52: 2682-9.
  66. Garzetti GG, T. A., Cugini AM, Mazzanti L, Cester N, Romanini C. (1993). "Altered lipid composition, increased lipid peroxidation, and altered fluidity of the membrane as evidence of platelet damage in preeclampsia " *Obstet Gynecol* 81: 337-40.
  67. Ghabour MS, E. A., Brockman DE, Pollock JS, Myat L. (1995). "Immunohistochemical characteritaton of placental nitrc oxide synthase

- expression in preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 173: 687-94.
68. Giudice, L. (1994). "Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine." *Fertil Steril* 61: 1-17.
  69. Greer IA, L. F., Perera T, Boswell F, Macara LM. (1994). "Increased concentrations of cytokines, interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction?" *Obstet Gynecol* 84: 937-40.
  70. Greer IA, L. R., Hodson BA, Dawes J, Kilpatrick DC, Liston WA. E (1991). "Endothelin, elastase, and endothelial dysfunction in preeclampsia." *Lancet* 337 558.
  71. Goodwin GA, V. J. (1983). "Inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase." *Br Med Bull* 39: 265-70.
  72. Gragner, L. (1999). "Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine." *Fertil Steril* 61: 1-17.
  73. Gragner LC, C. C., Bale L, et al. (2000). "Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation." *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2359-66.
  74. Guzman, A. M. (1996). "Detección de citotoxicidad endotelial en homogenado placentario de pacientes preeclámpicas." Tesis de Especialidad Clínica, Facultad de Medicina UNAM
  75. Haddad B, D. S., Goffinet F, Paniel BJ, Cabrol D, Siba BM. (2002). "Maternal and perinatal outcomes during expectant management of 239 severe preeclamptic women between 24 and 33 weeks' gestation." *Am J Obstet Gynecol* 190: 1590-95.
  76. Haig (1993). "Genetic conflicts in human pregnancy." *Q Rev Biol* 68: 495-532.
  77. Halligan A, B. J., Sheppard B, Darling M, Waalshe J. (1994). "Haemostatic, fibrinolytic and endothelial variables in normal and pre-eclamptic." *Br J Obstet Gynaecol* 101: 488-92.
  78. Halliwell B, G. J., Cross CE. (1992). "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?" *J Lab Clin Med* 119: 598-620.
  79. Heyl, W. M. H., Stefan MD; Reister, Frank MD; Gehlen, Johanna PhD; Mittermayer, Christian MD; Rath, Werner MD (1999). "The role of soluble adhesion molecules in evaluating endothelial cell activation in preeclampsia." *Am J Obs Gyn* 180(1): 68.72.
  80. Higgs GA, V. J. (1983). "Inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase." *Br Med Bull* 39: 265-70.
  81. Hofmann GE, G. I., Schatz F, Heller D, Deligdisch L. (1994). "Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator and the plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in early human implantation sites." *Am J Obstet Gynecol* 170: 671-6.
  82. Hubel CA, R. J., Taylor RN, Musci TJ, Rogers GM, McLaughlin MK. (1989). "Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 161: 1025-34.
  83. Hubel, R. J. (1999). "Is Oxidative Stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia?." *Lancet* 354: 788-9.
  84. Jaffe R, D. A., Abramowicz JS. (1995). "Color Doppler imaging of the uteroplacental circulation in the first trimester: value in predicting pregnancy failure or complication." *Am J Roentgenol* 164: 1255-58.
  85. Jain SK, W. R. (1995). "Relationship between elevated lipid peroxides, vitamin E deficiency and hypertension in preeclampsia." *Mol Cell Biochem* 151: 33-8.
  86. Jones JI, C. D. (1995). "Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions." *Endocr Rev* 16: 3-34.
  87. Jones JI, G. A., Busby WH, Wright G, Clemmons DR. (1993). "Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha (5) beta1 integrin by means of its arg-glyasp sequence." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10553-7.
  88. Juriscova A, C. R., MacLusky NJ, Mills GB, Librach CL. (1996). "HLA-G Expression during preimplantation human embryo development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 161-5.
  89. Kanbour-Shakir A, Z. X., Rouleau A, Armstrong DT, Kunz HW, Macpherson TA, et al. (1990). "Gene imprinting and major histocompatibility complex class I antigen expression in the rat placenta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 444-8.
  90. Katusic ZS, V. P. (1991). "Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone." *Semin Perinatol* 15: 30-3.
  91. Khong TY., D. W. F., Robertson WB, Brosens I. (1986). "Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by preeclampsia and by small-for-gestational age infants." *Br J Obstet Gynaecol* 93: 1049-59.
  92. King A, B. N., Wooding P, Carter NP, Loke YW. (1991). "CD3 leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56+ population." *Dev Immunol* 1: 169-90.
  93. Klein A, B. J., Sheppard B, Darling M, Waalshe J. (1994). "Haemostatic, fibrinolytic and endothelial variables in normal and pre-eclamptic." *Br J Obstet Gynaecol* 101: 488-92.
  94. Kloner RA, P. K., Whittaker P. (1989). "Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion, resolved and unresolved issues." *Circulation* 80: 115-27.
  95. Knock GA, S. M., McCarthy A, Elder MG, Polak JM, Wharton J. (1994). "Angiotensin II (AT-1) vascular binding sites in human placentae from normal-term, preeclamptic and growth retarded pregnancies." *J Pharmacol Exp Ther* 271: 1007-15.
  96. Kugiyama K, S. T., Misumi I, Sugiyama S, Ohgushi M, Ogawa H, et al. (1993). "Transferable lipids in oxidized low-density lipoprotein stimulate plasminogen activator inhibitor-1 and inhibit tissue-type plasminogen activator release from endothelial cells." *Circ Res* 73: 335-43.
  97. Kuhn R, L. J., Rennick D. (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." *Cell* 75: 263-74.
  98. Kupferminc MJ, P. A., Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML. ; (1994). "Tumor necrosis factor-alpha is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 170: 1752-7.

99. Kupferminc MJ, P. A., Aderka D, Wallach D, Peyser MR, Lessing JB, et al. (1995). "Soluble tumor necrosis factor receptors in maternal plasma and second-trimester amniotic fluid." *Am J Obstet Gynecol* 173: 900-5.
100. Labarrete, C. (1988). "Acute atherosclerosis: A histopathological hallmark of immune aggression?" *Placenta* 9: 95-108.
101. Ljunggren HG, K. K. (1990). "In search of the 'missing self' MHC molecules and NK cell recognition." *Immunol Today* 11: 237-44.
102. Lockwood CJ, P. J. (1990). "Increased plasma levels of EDI (+)cellular fibronectin precede the clinical signs of preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 162: 358-62.
103. Loke YW, K. A. (1995). "Clinical implications of defective implantation " Human implantation: cell biology and immunology. New York: Cambridge University Press.: 224-36.
104. Loke YW, K. A. (1995). "Trophoblast interaction with extracellular matrix " Human implantation: cell biology and immunology. New York: Cambridge University Press.: 151-79.
105. Loke YW, K. A. (1997). "Immunology of human placental implantation: clinical implications of our current understanding." *Mol Med Today* Apr: 153-9.
106. Lorentzen B, E. M., Clausen T, Henriksen T. (1994). "Fasting serum free fatty acids and triglycerides are increased before 20 weeks of gestation in women who later develop preeclampsia." *Hypertens Pregnancy* 13: 103-9.
107. Lyall F, G. I., Boswell F, Macara LM, Walker JJ. (1994). " The cell adhesion molecule, VCAM-1, is selectively elevated in serum in pre-eclampsia: does this indicate the mechanism of leukocyte activation?" *Br J Obstet Gynaecol* 101: 485-7.
108. Lyall F, Y. A., Greer IA. (1995). "Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 173: 714-8.
109. Many A, H. C., Roberts JM. (1996). "Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia " *Am J Obstet Gynecol* 174: 288-91.
110. McMaster MT, L. C., Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, DeMars R, et al. (1995). "Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts " *J Immunol* 154: 3771-8.
111. Meagher EA, F. G. (1993). "Disordered eicosanoid formation in pregnancy-induced hypertension." *Circulation* 88: 1324-33.
112. Meekins JW, M. P., West DC, McFadyen IR, Johnson PM. (1994). "Endothelial cell activation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and the development of pre-eclampsia." *Clin Exp Immunol* 98: 110-4.
113. Meekins JW, P. R., Hanssens M, van Assche A, McFadyen IR (1994). "Immunohistochemical detection of lipoprotein (a) in the wall of placental bed spiral arteries in normal and severe pre-eclamptic pregnancies " *Placenta* 15: 511-24.
114. Meekins JW, P. R., Hanssens M, McFadyen IR, van Assche A. (1994). "A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies." *Br J Obstet Gynaecol* 101: 669-74.
115. Mikhail MS, A. A., Garfinkel D, Palan PR, Basu J, Romney SL. (1994). "Preeclampsia and antioxidant nutrients: decreased plasma levels of reduced ascorbic acid, alpha-tocopherol, and beta-carotene in women with preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 171: 150-7.
116. Misuhashi LA, H. J., Douglas GC. (1994). "Binding of insulin-like growth factor I to human trophoblast cells during differentiation in vitro." *Placenta* 15: 641-51.
117. Moll UM, L. B. (1990). "Proteolytic activity of first trimester human placenta: localization of interstitial collagenase in villous and extravillous trophoblast." *Histochemistry* 94: 555-60.
118. Morris NH, S. S., Learmont JG, Poston I, Ramsey B, Pearson JD, et al. (1995). "Nitric oxide synthase activities in placental tissue from normotensive, preeclamptic and growth retarded pregnancies." *Br J Obstet Gynaecol* 102(711-4).
119. Morris, Y. A., Greer IA. (1996). "Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 173: 714-8.
120. Mosmann TR, C. H., Bond MW. (1993). "Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins " *J Immunol* 136: 2348-57.
121. Mosmann TR, M. K. (1991). "The role of IL-10 in cross-regulation of Th1 and Th2 responses " *Immunol Today* 12: A49-53.
122. Mukaddam Daher S, M. J., Gutkowska BJ, Nuwayhid BS, Quiller EW JR. (1994). "Effects of prostaglandin inhibition on the renal function curve during ovine pregnancy." *Am J Obstet Gynecol* 171: 599-607.
123. Myatt L, B. A., Langdon G, Brockman DE. (1992). "Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal- placental circulation." *Am J Obstet Gynecol* 166: 224-30.
124. Myatt L, B. D., Langdon G, Pollock SJ. (1993). "Constitutive calcium-dependent isoform of nitric oxide synthase in the human placental villous vascular tree." *Placenta* 14: 373-83.
125. Myatt L, B. D., Eis AL, Pollock SJ. (1993). "Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta." *Placenta* 14: 487-95.
126. Myers, J. M., Gary; Macleod, Maureen; Baker, Philip (2005). "In Preeclampsia, the Circulating Factors Capable of Altering In Vitro Endothelial Function Precede Clinical Disease." *Hypertension* 45(2): 258-263.
127. Naicker, T. K., SHAUN M.; MOODLEY, JAGIDESIA; PIJNENBORG, ROBERT (2003). "Quantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia." *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 82(8): 722-729.
128. Outila RDA, T.-M. C., Spinnato JA, Peevy K, Giattina K, Hoff C. (1994). "Short communication: an HLA-haplotype associated with preeclampsia and intrauterine growth retardation " *Am J Reprod Immunol* 31: 177-9.
129. Pascoal IF, U. i. (1996). "Effect of pregnancy on mechanisms of relaxation in human omental microvessels." *Hypertension* 28: 183-7.
130. Phan SH, G. D., Varani J, Ryan US, Ward PA. (1989). "Xanthine oxidase activity in rat pulmonary artery endothelial cells and its modulation by activated neutrophils." *Am J Pathol* 134: 1201-11.
131. Pijnenborg (1996). "The placental bed. Hypertens Pregnancy " 15: 7-23.
132. Pijnenborg R, A. J., Davey DA, et al. (1991). "Placental bed spiral arteries in the hypertensive

- disorders of pregnancy." *Br J Obstet Gynaecol* 98: 648-55.
133. Pijnenborg R, L.-C., Vercruyssen L, Van Assche FA. (1996). "Attachment and differentiation in vitro of trophoblast from normal and preeclamptic human placentas." *Am J Obstet Gynecol* 175: 30-6.
  134. Polyzos NP, Mauri D, Tsappi M, Tzioras S, Kamposioras K, Cortinovis I et al. "Combined vitamin C and E supplementation during pregnancy for preeclampsia prevention: a systematic review" *Obstet Gynecol Survey* 2007;62:202-6.
  135. Powers, R. W. P. E., Rhobert W. PhD; Majors, Alana K. PhD; Ojimba, Jacqueline I. MS; Ness, Roberta B. PhD; Crombleholme, William R. MD; Roberts, James M. MD (1998). "Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation." *Am J Obs Gyn* 179(6): 1605-1611.
  136. Pregnancy, W. g. r. o. h. b. p. i. and (2000). "Report of the National High Blood Pressure Education Program." *Am J Obstet Gynecol* 183: S1-22.
  137. Pridjian JE, S. F., Green IA, Sattar N. (2002). "Microvascular dysfunction: a link between preeclampsia and maternal coronary heart disease." *BJOG* 110: 1029-31.
  138. Program, R. o. t. N. H. B. P. E. (2000). "Working group report on high blood pressure in pregnancy." *Am J Obstet Gynecol* 183: S1-22.
  139. Ramsay B, d. B. A., Campbell S, Moncada S, Martin JG. (1994). "A nitric oxide donor improves uterine artery diastolic blood flow in normal early pregnancy and women at high risk of preeclampsia." *Eur J Clin Invest* 24: 76-78.
  140. Ramsay JE, S. F., Green IA, Sattar N. (2003). "Microvascular dysfunction: a link between preeclampsia and maternal coronary heart disease." *BJOG* 110: 1029-31.
  141. Rappaport VJ, H. G., Kim Yap H, Jordan SC. (1990). "Anti-vascular endothelial cell antibodies in severe preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 162: 138-46.
  142. Rebelo I, C.-G. F., Pereira-Leite L, Quintanilha A. (1996). "Comparative study of lactoferrin and other markers of inflammatory stress between preeclamptic and normal pregnancies." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 64: 167-73.
  143. Redman, C. (1991). "Immunology of preeclampsia." *Semin Perinatol*. 15: 257-62.
  144. Roberts JM, L. K. (2003). "Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia." *Placenta* 23: 359-72.
  145. Robillard PY, H. T., Alexander GR, Keenan A, de Caunes F, Papiernik E. (1993). "Paternity patterns and risk of preeclampsia in the last pregnancy in multiparae." *PJ Reprod Immunol* 24: 1-12.
  146. Saltar N Gaw A, P. C., . (1996). "Potential pathogenic roles of aberrant lipoprotein and fatty acid metabolism in preeclampsia." *Br J Obstet Gynaecol* 103: 614-20.
  147. Sargent, I. (1993). "Maternal and fetal immune responses during pregnancy." *Exp Clin Immunogenet* 10: 85-102.
  148. Sargent IL, G. S., Sacks GP, Kumar S, Redman CW. (1996). "Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia." *J Reprod Immunol* 59: 153-60.
  149. Sargent IL, J. M., Chua S, Readman CWG. (1994). "Clinical experience: isolating trophoblasts from maternal blood." *Ann N Y Acad Sci* 154: 154-61.
  150. Satio S, N. K., Morii T, Enomoto M, Narita N, Motoyoshi K, et al. (1993). "Cytokine production by CD16 CD56 bright natural killer cells in human pregnancy decidua." *Int Immunol* 5: 559-63.
  151. Schiff E, F. S., Baumann P, Sibai BM, Romero R. (1994). "Tumor necrosis factor-alpha in pregnancies associated with preeclampsia or small-for-gestational-age newborns." *T Am J Obstet Gynecol* 170: 1224-9.
  152. Seongho Ryu, Alisson Huppmann, Nirmala Sambangi, Peter Tacacs, Skott Kauma (2007). "Increased Leucocyte Adhesion to Vascular endothelium in Preeclampsia is Inhibited by Antioxidants." *Am J Obstet Gynecol* 196: 4-400.
  153. Serhal PF, C. I. (1989). "Oocyte donation in 61 patients." *Lancet* 1: 1185-7.
  154. Shanklin DR, S. B. (1989). "Ultrastructural aspects of preeclampsia. I. Placental bed and uterine boundary vessels." *Am J Obstet Gynecol* 161: 735-41.
  155. Shanklin DR, S. B. (1990). "Ultrastructural aspects of preeclampsia. II. Mitochondrial changes." *Am J Obstet Gynecol*: 943-53.
  156. Shorter SC, S. P., Ferry BL, Clover LM, Sargent IL, Redman CWG. (1993). "Antigenic heterogeneity of human cytotrophoblast and evidence for transient expression of MHC class I antigens distinct from HLA-G." *Placenta* 14: 571-82.
  157. Sibai, B. (2005). "Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia." *Obstet Gynecol* 102: 181-92.
  158. Silver RM, S. B., McGregor JA. (1993). "Interleukin-6 levels in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancies: preeclampsia, small-for-gestational-age fetus, and premature labor." *Am J Obstet Gynecol* 169: 1101-5.
  159. Skomsvoll LA, O. M., Von Dadelzen P. (2000). "Fortnightly review: management of hypertension in pregnancy." *BMJ* 318: 1332-36.
  160. Smarason AK, S. I., Starkey PM, Redman CWG. (1993). "The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and preeclamptic women on the growth of endothelial cells in vitro." *Br J Obstet Gynaecol* 100: 943-9.
  161. Stark, J. (1993). "Pre-eclampsia and cytokine induced oxidative stress." *Br J Obstet Gynaecol* 1100: 105-9.
  162. Stark M, J. S., Johansen K, Blake L, Shaw R. (1995). "Tumour necrosis factor." *Lancet* 345: 648-9.
  163. Starkey, P. (1993). "The decidua and factors controlling placentation in: Redman CCWG, Sargent LL, Starkey PM, editors. *The human placenta*." Oxford (United Kingdom): Blackwell Scientific Publications.: 362-413.
  164. Taylor RN, V. M., Teng NH, Roberts JM. (1990). "Women with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies." *J Clin Endocrinol Metab* 71: 1675-7.
  165. Tenhola, S. R., EERO; HALONEN, PIRJO; VANNINEN, ESKO; VOUTILAINEN, RAIMO (2006). "Maternal Preeclampsia Predicts Elevated Blood Pressure in 12-Year-Old Children: Evaluation by Ambulatory Blood Pressure Monitoring." *Ped Res* 59(2): 320-324.
  166. Thornton JC, O. J. (1991). "Pre-eclampsia: discordance among identical twins." *BMJ* 303: 1241-2.

167. Tierney P, M. J. (2003). "Corticosteroids for HELLP syndrome in pregnancy." *Cochrane Database Syst Rev* 4: CD002076.
168. Toohey JS, M. M., Yaziri ND, Yousefi S, de Veciana M, Lien J. (1994). "Longitudinal plasma ICAM-1 & IFN-alpha in pre-eclampsia." *Hypertens Preg* 13: 319.
169. Torbergsen T, O. P., Mathiesen E, Borud O. Preeclampsia: a mitochondrial disease? (1989). "Preeclampsia: a mitochondrial disease?" *Acta Obstet Gynecol Scand* 68: 145-8.
170. Trupin LS, S. L., Eskenazi B. (1996). "Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas." *Epidemiology* 7: 240-4.
171. Uotila JT, K. A., Rorarius M, Tuimala RJ, Metsa-Ketela T. (1994). "The total peroxy radical-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and preeclamptic parturients." *Free Radic Biol Med* 16: 581-90.
172. Uotila JT, T. R., Aarnio TM. (1993). "Findings on lipid peroxidation and antioxidant function in hypertensive complications of pregnancy." *Br J Obstet Gynaecol* 100: 270-6.
173. Vanhoutte, P. (1991). "Serotonergic antagonists and vascular disease." *Cardiovasc Drugs Ther* 4: 7-12.
174. Varani J, G. I., Schuger L, Gibbs DF, Bromberg J, Johnson KJ, et al. (1989). "Endothelial cell killing by neutrophils: synergistic interaction of oxygen products and proteases." *Am J Pathol* 351: 435-8.
175. Varner, M. (1991). "Autoimmune disorders and pregnancy." *Semin Perinatol* 15: 238-50.
176. Vince GS, S. P., Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CWG. (1995). "Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia." *Br J Obstet Gynaecol* 102: 20-5.
177. Vural, P. Y., N.; Demirkan, A.; Cigerli, E.; Akgul, C.; Ozbek, U.; Canbaz, M. (2006). "Interleukin-10 (-1082) and tumor necrosis factor [alpha] (-308) gene polymorphisms and preeclampsia: PP-1060." *FEBS* 273S(1): 360-361.
178. Wakatsuki, A. M. I., NOBUO MD; OKATANI, YUJI MD; SHINOHARA, KOICHI MD; FUKAYA, TAKAO MD (2000). "Lipoprotein Particles in Preeclampsia: Susceptibility to Oxidative Modification." *Obstet Gynecol* 96(1): 55-59.
179. Walsh, S. (1994). "Lipid peroxidation in pregnancy." *Hypertens Preg* 13: 1-31.
180. Wang Y, W. S., Guo J, Zhang J. (1991). "The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood." *Am J Obstet Gynecol* 165: 1695-700.
181. Wang Y, W. S., Guo J, Zhang J. (1991). "Maternal levels of prostacyclin, thromboxane, vitamin E and lipid peroxides throughout normal pregnancy." *Am J Obstet Gynecol* 165: 1690-4.
182. Wang Y, W. S., Parnell R, Han J. (1994). "Placental production of nitric oxide and endothelin in normal and preeclamptic pregnancies." *Hypertens Preg* 13: 171-18.
183. Ward K, H. A., Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, et al. (1991). "A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia." *Nat Genet.* 4: 59-61.
184. Wash, P. (1994). "Mechanisms of endothelial cell killing by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or products of activated neutrophils." *Am J Med* 91: 89S-94S.
185. Wegmann (1988). "Maternal T cells promote placental growth and prevent spontaneous abortion." *Immunol Lett* 17: 297-302.
186. Wegmann TG, L. H., Guilbert L, Mosmann TR; (1993). "Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?" *Immunol Today* 15: 353-6.
187. Wilcken B, L. K., Hammond J, Kamath R, Leonard JV. (1993). "Pregnancy and fetal long-chain 3-hydroxyacyl coenzyme: a dehydrogenase deficiency." *Lancet* 341: 407-8.
188. Wolf M, K. E., Sandler L, Ecker JL, Roberts J, Thadhani R. (2001). "Obesity and preeclampsia: the potential role of inflammation." *Obstet Gynecol* 98: 757-60.
189. Wolfberg AJ, L.-P. A., Peller AJ, Lieberman ES (2004). "Association of rheumatic disease with preeclampsia." *Obstet Gynecol* 103: 1190-93.
190. Woodworth SH, L. X., Lei ZM, Rao CV, Yussman MA, Spinnato JA II, et al. (1994). "Eicosanoid biosynthetic enzymes in placental and decidual tissues from preeclamptic pregnancies: increased expression of thromboxane- A<sub>2</sub> synthase gene." *J Clin Endocrinol Metab* 78(): 1225-31.
191. Yang X, C. B., Sciacca RR, Cannon PJ. (1994). "Inhibition of inducible nitric oxide synthase in macrophages by oxidized low-density lipoproteins." *Circ Res* 74: 318-28.
192. Yoshizumi M, P. M., Burnett JC Jr, Lee MET. (1993). "Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life." *Circ Res* 73: 205-9.
193. Zeeman GG, D. G. (1992). "Pathogenesis of preeclampsia: a hypothesis." *Clin Obstet Gynecol* 35: 317-37.