



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Instituto Mexicano del Seguro Social

Centro Médico Nacional siglo XXI

Maestría en Ciencias Médicas

EXPRESIÓN DE TREM1 EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA
SISTÉMICA DE PACIENTES CON PREECLAMPSIA SEVERA,
EMBARAZOS NORMALES Y NO EMBARAZADAS

TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA:

DR. MIGUEL CORRES MOLINA

TUTOR

DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO

INVESTIGADORES ASOCIADOS

DRA. LOURDES A ARRIAGA PIZANO

DR. MIGUEL ANGEL VILLASIS KEEVER

RESPONSABLE DE LA SEDE

DR. FABIO SALAMANCA GÓMEZ

MÉXICO, D.F.

AGOSTO

2012



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.

-
Dr. MIGUEL CORRES MOLINA
Especialista en Ginecología Oncológica
Estudiante de Maestría en Ciencias Médicas
Sede Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS

-
DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO
Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica
Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional S. XXI. IMSS

-
DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ
Responsable de la Sede
Centro Médico Nacional Siglo XXI

I. INDICE

I. INDICE.....	3
II. AGRADECIMIENTOS	4
III. DEDICATORIA	5
IV. RESUMEN	6
V. MARCO TEÓRICO	9
VII. JUSTIFICACIÓN	17
VIII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
IX. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	20
X. OBJETIVOS	21
XI. HIPÓTESIS	22
XII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
XIII. CÁLCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA	35
XIV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
XV. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	37
XVI. RESULTADOS	40
XVII. DISCUSIÓN	47
XVIII. CONCLUSIONES	50
ANEXOS.....	51
XX. REFERENCIAS	61

II. AGRADECIMIENTOS

A mi mamá quien ha motivado mi crecimiento profesional y a quien debo uno más de mis frutos.

A mi familia quien siempre me ha apoyado de manera incondicional.

A todos y cada uno de los profesores que han dejado una huella en mi formación profesional.

Dr. Isibisi gracias por acompañarme desde el inicio de mi formación profesional hasta el día de hoy, sus consejos y enseñanzas son invaluable.

Un agradecimiento especial a la Dra. Arriaga quién me oriento a lo largo de la maestría y a quien debo la idea y desarrollo de este trabajo.

Dr. Ismael Mancilla quien debo su valiosa ayuda.

Al personal del Juárez por su apoyo para la elaboración del presente trabajo.

III. DEDICATORIA

A las mujeres que exponen su vida en cada embarazo para permitir el inicio de una nueva.

IV. RESUMEN

Título.

Expresión de TREM1 en la respuesta inflamatoria sistémica de pacientes con preeclampsia severa, embarazos normales y no embarazadas.

Marco teórico

La preeclampsia es la enfermedad hipertensiva asociada al embarazo más frecuente. Sus complicaciones se encuentran dentro de las tres primeras causas de muerte materna y de parto pretérmino inducido. La preeclampsia es de aparición súbita y no necesariamente secuencial, lo cual dificulta en extremo el diagnóstico oportuno y manejo, además de propiciar que se sumen complicaciones. Hasta el momento se desconoce la causa, aunque se ha detectado que tanto la imposibilidad de generar la placentación adecuada como una activación anormal del sistema inmunológico materno están involucrados. De hecho se ha propuesto que la preeclampsia es la exacerbación anormal del estado proinflamatorio que se propone ocurre durante el embarazo normoevolutivo.

Así, los niveles de algunas moléculas proinflamatorias como IL-6, procalcitonina y ácido úrico se han tratado de asociar tanto con el diagnóstico temprano como pronóstico de preeclampsia, sin embargo hasta el momento no se cuenta con herramientas efectivas para el seguimiento de pacientes con preeclampsia. TREM1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 1) amplifica la respuesta inflamatoria, al aumentar la expresión de algunos receptores tipo Toll (TLRs) en monocitos y macrófagos. Se ha reportado que TREM1 se encuentra incrementado, ya sea en su forma de superficie o soluble, ante eventos proinflamatorios infecciosos y no infecciosos.

Objetivo general

Caracterizar la expresión de TREM-1 de superficie, así como de IL-6, IL-10 y TNF- α en pacientes con preeclampsia, embarazos normoevolutivos y mujeres no embarazadas.

Objetivos particulares

- Determinar y comparar la expresión de TREM-1 en monocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo en pacientes con preeclampsia y embarazos normoevolutivos, así como en mujeres no embarazadas.
- Cuantificar y comparar la concentración sérica de IL1b, IL-6, IL-10, IL-8, IL-12 y TNF- α de pacientes con preeclampsia y embarazos normoevolutivos mayores a 34 semanas y mujeres no embarazadas.

Material y métodos:

Se trató de un estudio observacional transversal analítico comparativo de muestras sanguíneas de mujeres con preeclampsia severa, embarazadas normales y no embarazadas. Se obtuvieron por venopunción 5 ml de sangre periférica y se determinó la expresión de TREM1 en la superficie de monocitos y se cuantificó en plasma la concentración de IL1b, IL-6, IL-10, IL-8, IL-12 y TNF- α .

El análisis estadístico inferencial se realizó mediante pruebas no paramétricas dada la distribución no normal de los resultados. Se compararon medianas mediante Kruskal Wallis para comparaciones entre grupos y Mann Whithney para comparación entre dos grupos.

Resultados:

Se incluyeron 33 mujeres, 10 no embarazadas, 15 embarazadas normales y 8 con preeclampsia severa. La expresión de TREM1 en embarazadas normales

fue homogénea en comparación con las mujeres no embarazadas y preeclampsia. La concentración de todas las citocinas estudiadas fue mayor en el grupo de preeclampsia severa comparada con los otros grupos. Así mismo se observó una correlación positiva entre los niveles de TREM1 y las concentraciones de citocinas, siendo en el grupo de preeclampsia mayor que en los otros dos grupos.

Conclusiones

La expresión de TREM1 en monocitos es mayor en mujeres con preeclampsia que en embarazadas normotensas.

Los niveles de TREM1 se asocian a niveles de sobreexpresión de citocinas inflamatorias, aun más que en pacientes no embarazadas.

La relación de TREM1 y la expresión de citocinas en embarazadas normotensas es diferente a embarazadas con preeclampsia y no embarazadas.

V. MARCO TEÓRICO

De las enfermedades hipertensivas asociadas al embarazo, que incluyen a la hipertensión gestacional, hipertensión crónica, preeclampsia sobreagregada a hipertensión crónica, la preeclampsia es la más frecuente, ya que complica a entre el 7 al 10% de las mujeres gestantes [1]. Esta enfermedad multisistémica (también conocida como síndrome preeclampsia/eclampsia) se distingue de los otros trastornos hipertensivos del embarazo, por presentar elevación de la tensión arterial y proteinuria, manifiestas a partir de la vigésima semana de edad gestacional (SEG). Estos signos suelen desaparecer al interrumpirse el embarazo o en el puerperio mediato (hasta dos semanas postparto) (2, 3).

De acuerdo a la gravedad del cuadro clínico y compromiso de los diferentes sistemas maternos, esta enfermedad se clasifica en leve (con hipertensión y/o proteinuria) o severa (con hipertensión y/o proteinuria y algún dato de disfunción renal, hepática o neurológica) (2). La hipertensión o elevación de la presión arterial en el embarazo se define como presión arterial sistólica mayor a 140 mmHg o diastólica mayor a 90 mmHg (anexo 3). La proteinuria se define como: excreción urinaria de 0.3 g o más de proteína en colección de 24 horas; lo que correlaciona con concentraciones de 30 mg/dL ó la marca correspondiente a (+) de una tira reactiva en pacientes sin evidencia de infección de vías urinarias. El índice urinario de proteína/creatinina menor a 30 mg/mmol es un punto de corte para descartar proteinuria y se sugiere su uso como equivalente a una colección de orina de 24 horas (4, 5 ,6). Aún cuando la proteinuria es un dato útil para la clasificación de la preeclampsia, sus niveles no se relacionan directamente con el curso de la enfermedad (7).

La preeclampsia es un importante problema de salud reproductiva a nivel mundial que complica entre 3 a 14% de los embarazos. Tres cuartas parte de los casos suelen corresponder a preeclampsia leve a moderada y el 25% restante a casos de preeclampsia grave (8). La tasa de mortalidad oscila del 10 al 15% y es independiente si se trata de países en vías de desarrollo o industrializados(9). En México, en el período de 1995-1997, la preeclampsia constituyó la principal causa de mortalidad materna, causando 31.9% de las muertes maternas (3). Adicionalmente, la preeclampsia es la principal causa de parto pretérmino inducido, lo que se impacta directamente en aumento de la morbi-mortalidad neonatal(10).

Se desconoce la causa directa de la preeclampsia y se propone que dentro de la fisiopatología de este síndrome puede haber factores genéticos e inmunológicos que desequilibran la biología materno-fetal. Se ha propuesto que uno de los eventos claves en el desarrollo de la preeclampsia es la placentación defectuosa (11). Se hipotetiza que esta placentación deficiente se desarrolla por dos factores: 1) la incapacidad de los trofoblastos para migrar y reestructurar a las arterias espirales y 2) la disminución en la tolerancia materna frente a los antígenos fetales (menor expresión de antígenos HLA-G en trofoblastos), que pueden inhibir su capacidad migratoria, o incluso destruir a los trofoblastos (12,13, 14). La placentación defectuosa deriva en hipoperfusión placentaria, que trae en consecuencia restricción en el crecimiento fetal y liberación a la circulación sistémica de mediadores de respuesta a hipoxia, como los agentes vasoconstrictores como mecanismo compensador. Dado que en el tercio final del embarazo es cuando realmente se incrementa el gasto placentario, se

propone que se agudiza este estado que desencadena la activación endotelial asociada a la aparición del cuadro clínico de la preeclampsia (15).

También se ha propuesto que la activación endotelial crónica favorece el desarrollo de preeclampsia. De allí que las mujeres con hipertensión esencial, diabetes o síndrome metabólico desarrollen preeclampsia con mayor frecuencia (16, 17). Moléculas asociadas a vasoconstricción y activación endotelial como angiotensina II y bradicinina se expresan más en pacientes con preeclampsia y también en estas pacientes se ha detectado que incrementos en la expresión del receptor tipo 1 a bradicinina, potencia el efecto vasoconstrictor sistémico de la angiotensina II (18). En estudios *ex vivo*, los miocitos derivados de vasculatura de mujeres sin preeclampsia expuestos a suero de mujeres con preeclampsia, muestran menor capacidad de relajación ante bradicinina (18). En modelos de ratón, se ha sugerido que la presencia de autoanticuerpos agonistas para los receptores de angiotensina II puede generar un cuadro tipo preeclampsia (19).

Otro factor relacionado con la activación endotelial, es el estrés oxidativo (20), este se asocia con el incremento en el gasto placentario al final del embarazo (21,22). En las pacientes con preeclampsia severa los niveles plasmáticos de hidroperóxidos lipídicos son mayores que en embarazadas normotensas. Estos lípidos oxidados, se relacionan con daño endotelial y activación del mismo, al elevar los niveles séricos de la molécula de adhesión al endotelio vascular 1 (VCAM-1) (22). Las células endoteliales activadas son capaces de producir IL-6 (23), que al ser reconocida por neutrófilos, induce la generación de especies reactivas de oxígeno que perpetúan la activación de las células endoteliales (24). Se propone también que la activación endotelial se relaciona directamente

con la concentración sérica elevada de IL-6, TNF α y especies reactivas del ácido tiobarbitúrico, todas las cuales se elevan en pacientes con preeclampsia (25-27).

Múltiples enfermedades multisistémicas como lupus eritematosos sistémico, psoriasis, asma, artritis reumatoide, diabetes y síndrome metabólico, se relacionan con elevación de citocinas proinflamatorias (28-31). En el caso de las entidades obstétricas, se han reportado incrementos locales y/o sistémicos de IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-8 y TNF α que se asocian con parto pretérmino (32), ruptura prematura de membranas (33) abortos recurrentes (34) y preeclampsia (35). En preeclampsia, comparado con embarazos normoevolutivos, se incrementan los niveles séricos de IL-1, IL-6 e IL-8 en el tercer trimestre del embarazo (36). La fuente de estas citocinas pueden ser células de estirpe inmunológica, endotelial o epitelial. Se han reportado que interferón gamma (IFN γ) puede ser producido por células de la decidua (37). En ratón, la sobre expresión de IFN γ y su receptor tipo 2 puede polarizar el perfil de citocinas hacia uno de tipo Th1 (38). Este perfil tipo Th1, caracterizado por la presencia de citocinas como IL-2, IL-6, IL-12, IL-1 β , IL-8 y TNF α además del IFN γ resulta desfavorable para el embarazo (39). La infección con *Leishmania sp*, que induce respuesta Th1 en modelos de ratones BalbC, con incrementos en la concentración sérica de IFN γ , TNF y disminución de IL-10, aumenta la tasa de reabsorción fetal y aborto, (40). En mujeres embarazadas se ha detectado disminución en las concentraciones séricas de IL-4 (citocina con actividad antiinflamatoria) en mujeres con preeclampsia respecto a embarazadas sin patología (41).

Sin embargo, aunque de inicio se pensó que esta activación de la respuesta inflamatoria era exclusiva de las mujeres con preeclampsia, se han encontrado

múltiples evidencias que en comparación del estado sin embarazo, durante la gestación, las mujeres presentan datos compatibles con un estado sistémico proinflamatorio. En el tercer trimestre de la gestación, los linfocitos y monocitos circulantes de mujeres embarazadas, presentan marcadores de activación en mayor proporción que mujeres no embarazadas (42). En comparación también con mujeres no embarazadas, los monocitos de mujeres embarazadas sobreexpresan la molécula conocida como Tim-3 (T cell Ig and mucin domain) que favorece la respuesta inflamatoria, necesaria, aparentemente, para proteger a la madre de infecciones (43). Por otro lado, se sabe que la expresión de IFN γ en el endometrio es indispensable para que ocurra la implantación y permanencia del embarazo (44). De la misma manera, parece que el incremento de citocinas como TNF α , IL-6 e IL-8 son necesarias para el trabajo de parto (35,36). Con estas y otras evidencias es que se ha sugerido que el embarazo normal desencadena un estado inflamatorio sistémico (45), que en el caso de preeclampsia es exacerbado (46,47), pudiéndose manifestar con concentraciones mayores de citocinas proinflamatorias y/o activación de células NK ante la presencia del producto de la concepción (48).

Por ello se piensa que los marcadores relacionados con inflamación podrían servir para el diagnóstico y/o seguimiento de la preeclampsia. Por análisis proteómicos, se encontró que el componente C4 beta, del sistema de complemento se eleva significativamente en el suero de pacientes con preeclampsia, probablemente por la respuesta del sistema inmune materno a debris placentario, producido exacerbadamente en la preeclampsia.

En embarazos con preeclampsia, citocinas como IL-10, IL-8 y el receptor soluble de IL4 están significativamente más elevados respecto a embarazadas normotensas (49).

Sin embargo, hasta el momento no se han podido establecer como metodologías útiles en la clínica, en parte, por la vida media y estabilidad de estos mediadores. Una alternativa en la búsqueda de biomarcadores son moléculas con mayor estabilidad en su expresión, como son las moléculas asociadas a activación de células inflamatorias. Tal es el caso de TREM1 que se expresa en células como monocitos y neutrófilos.

TREM1 es un receptor que suele expresarse en la superficie de monocitos y neutrófilos activados; el lipopolisacárido (LPS), componente habitual de bacterias, es uno de los estímulos más estudiados que inducen la expresión de esta molécula en la superficie de monocitos (50). Existe una forma soluble del receptor que, o se forma por medio del RNA mensajero de TREM-1 que al pasar por splicing alternativo o es la misma isoforma de membrana que se escinde, y da lugar a una proteína de 30kDa que conserva la región extracelular de TREM-1 de superficie, pero sin el dominio transmembranal (sTREM-1) (51). Se ha propuesto que la forma soluble sirva para inhibir la señalización inducida por el receptor de superficie al secuestrar al ligando de este receptor (52).

La activación de TREM-1 incrementa en monocitos la producción del factor de TNF- α , IL-1 β e IL-8; y en polimorfonucleares, la fagocitosis y el estallido respiratorio, así como disminuye la producción de IL-10 (53). Esta activación de TREM1 se hace utilizando anticuerpos anti-TREM1 ante el desconocimiento del ligando de este receptor, aunque se propone que debe estar relacionado con

moléculas asociadas con la activación de la respuesta inmune innata, como las proteínas de choque térmico 60 (heat shock protein, HSP60) y 70 (51).

Estudios realizados por nuestro laboratorio y otros grupos, tanto en humanos como en ratones, asocian la elevación de TREM-1 y de sTREM-1 con estados inflamatorios sistémicos, tanto asociados a infecciones como la sepsis (54) o no infecciosos como la pancreatitis (55,56), la enfermedad intestinal inflamatoria o la gota (57,58,59).

TREM-1, tanto en su forma de membrana y soluble, se ha mostrado como predictor de supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón (RR= 2.72, IC95% 1.33-5.57, $p=0.006$) (60). También en su forma soluble se ha estudiado como marcador pronóstico en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad, identificándose como un factor pronóstico independiente de supervivencia (OR = 0.74, IC95% 0.064-0.083). Mientras que en procesos no infecciosos se ha encontrado que la forma soluble se encuentra incrementada en comparación con sujetos sanos, como en los pacientes con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (61).

En cuanto a embarazo, existe un antecedente en el que se estudiaron moléculas relacionadas con inflamación en un modelo de predicción de parto pretérmino. sTREM1 sérico se encontró elevado en pacientes con antecedente de parto pretérmino, aunque los análisis multivariados no resultaron estadísticamente significativo (62).

Ahora bien, si la preeclampsia es efectivamente un estado inflamatorio sistémico mayor al que ocurre durante la gestación, es factible que TREM-1, se encuentre elevado en pacientes con preeclampsia respecto a embarazadas normotensas, aún antes de la presentación clínica del síndrome. Ya que es de

esperarse que la elevación del TREM1 de membrana anteceda la producción exacerbada de citocinas que también se asocia con preeclampsia.

VII. JUSTIFICACIÓN

La preeclampsia una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad materno-infantil aun en países desarrollados y/o con las unidades de atención mejor equipadas (3). Varias son las causas que dificultan el control y seguimiento de las pacientes con preeclampsia: el desconocimiento de la etiología precisa, lo súbito de la aparición del cuadro clínico y la posibilidad de presentar formas severas de la enfermedad sin antecedente patológico alguno (las pacientes pueden debutar con preeclampsia severa o eclampsia sin haber presentado preeclampsia leve). En este contexto, se han buscado varios biomarcadores que permitan identificar los embarazos que se complicaran con preeclampsia o bien con valor pronóstico en las pacientes con preeclampsia.

Se propone que la preeclampsia se asocia con estados inflamatorios sistémicos. En estos estados se ha reportado que los leucocitos sistémicos se encuentran activados, por lo que en su superficie se expresan diferencialmente moléculas como receptores a quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento o co-estimuladoras, las cuales facilitan la migración, fagocitosis, citotoxicidad y/o secreción de citocinas. Así, la capacidad inflamatoria de monocitos, se asocia con incrementos en la expresión TREM-1 en su superficie. Es factible que en la preeclampsia, esta molécula se encuentre elevada respecto a embarazos normoevolutivos y que incluso se relacione con el pronóstico, si es que su expresión se relaciona con mayor respuesta inflamatoria en las pacientes. Como un primer paso para determinar el valor como biomarcador, nos proponemos establecer los niveles de expresión de TREM1 en la superficie de monocitos de mujeres en el tercer trimestre del embarazo, que padezcan preeclampsia o cursen con embarazo normoevolutivo, así mismo se incluirá un

grupo de mujeres no embarazadas. Al mismo tiempo, en un acercamiento al papel que TREM1 juega en la fisiopatología de la preeclampsia estableceremos si su presencia correlaciona con las concentraciones séricas de varias citocinas inflamatorias que ya se han reportado elevadas en preeclampsia.

VIII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La preeclampsia es una de las principales complicaciones del embarazo, ya que es la primera causa de muerte materna en México y segunda a nivel mundial. Se considera en la actualidad que en el embarazo existe un estado inflamatorio (35, 36, 42, 43, 44, 45) y que durante la preeclampsia este estado se incrementa (46, 47) .

En procesos inflamatorios sistémicos, infecciosos y no infecciosos, el TREM-1 tanto en su forma soluble como de membrana se encuentra activado y, como consecuencia, la concentración sérica de interleucinas proinflamatorias se encuentra aumentada y la concentración de las antiinflamatorias disminuida (54, 55, 56).

Aún cuando se ha determinado que las interleucinas TNF- α e IL6 se encuentran elevadas en la preeclampsia, hasta el momento no se han realizado estudios donde se haya descrito el comportamiento de TREM-1. Por lo que el conocer si TREM-1 y las interleucinas relacionadas están asociadas al evento inflamatorio de la preeclampsia apoyaría la hipótesis fisiopatológica inflamatoria de la preeclampsia y permitirá saber si TREM1 puede ser propuesto como un marcador diagnóstico/pronóstico de la enfermedad.

IX. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuál es la expresión de TREM-1 en monocitos y neutrófilos de pacientes con preeclampsia severa, embarazos normoevolutivos y mujeres no embarazadas?
2. ¿Cuáles son las concentraciones séricas de IL1 β , IL-6, IL-10, IL-8, IL-12 y TNF- α en pacientes con preeclampsia severa, embarazos normoevolutivos y mujeres no embarazadas?
3. ¿Existe diferencia en la expresión de TREM1 en monocitos y neutrófilos de pacientes con preeclampsia severa y embarazos normoevolutivos?

X. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la expresión de TREM-1 así como de IL1 β , IL-6, IL-10, IL-8, IL-12 y TNF- α en pacientes con preeclampsia, embarazos normoevolutivos y mujeres no embarazadas.

Objetivos específicos

1. Determinar la expresión de TREM-1 en la superficie de monocitos y neutrófilos de sangre periférica mediante citometría de flujo en pacientes con preeclampsia severa, embarazos normoevolutivos, y mujeres no embarazadas.
2. Determinar la concentración sérica de IL1 β , IL-6, IL-10, IL-8, IL-12 y TNF- α de pacientes con preeclampsia severa y embarazos normoevolutivos.
3. Comparar los valores de TREM1 e interleucinas entre las mujeres con preeclampsia severa y embarazos normoevolutivos.

XI. HIPÓTESIS

- 1) La expresión de TREM-1 en monocitos y neutrófilos de mujeres con preeclampsia severa será mayor que en embarazadas normales y mayor que en las mujeres no embarazadas.
- 2) Con respecto a las concentraciones séricas de interleucinas, las pacientes con preeclampsia severa:
 - a) IL1 β , IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α estarán aumentadas en comparación con las embarazadas normales y no embarazadas
 - b) IL-10 se encontrará disminuida en comparación con las embarazadas normales y no embarazadas.

XII. MATERIAL Y MÉTODOS

IX.1 Diseño

Estudio observacional, transversal, comparativo y prolectivo.

IX.2 Lugar de realización del estudio

- 1) Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) de la UMAE Hospital de Especialidades, del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).
- 2) Hospital Juárez de México. Servicio de Ginecología y Obstetricia.

IX.3 Período

Comprende de febrero del 2009 a febrero del 2011

Población de estudio

Mujeres de edad reproductiva que acudieron a recibir atención obstétrica al Hospital Juárez de México, familiares y personal del hospital no embarazadas dentro del mismo grupo de edad.

IX.4.1 Criterios de selección

Mujeres con preeclampsia

Inclusión

1. Mujeres de entre 18 y 35 años
2. Embarazo de más de 34 semanas de gestación, de acuerdo con la fecha del inicio de la última menstruación corroborada con ultrasonido del primer o segundo trimestre.
3. Con diagnóstico de preeclampsia severa siguiendo los criterios del lineamiento técnico de la Secretaria de Salud (4) en concordancia con el

Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy (2).

- a. Presión arterial sistólica mayor a 140 o diastólica mayor a 90 en dos tomas separadas al menos 6 horas entre sí.
 - b. Proteinuria de al menos 0.3 g en una colección de orina de 24 horas ó índice proteína/creatinina en orina mayor a 30mg/mmol.
4. Con uno o más de los siguientes:
- a. Creatinina sérica > a 1.2 mg/dl
 - b. Trombocitopenia $\leq 150\ 000\ \text{cel}/\text{mm}^3$
 - c. Incremento de la deshidrogenasa láctica $\geq 600\ \text{UI}$
 - d. Elevación al doble de los valores de TGO/AST o TGP/ALT
 - e. Cefalea, alteraciones visuales o auditivas
 - f. Epigastralgia
 - g. Oliguria $\leq 500\ \text{ml}$ en 24 hrs
 - h. Edema agudo de pulmón
 - i. Dolor en hipocondrio derecho
 - j. Restricción del crecimiento
 - k. Oligohidramnios
5. Que acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.

Exclusión

1. Mujeres con antecedentes de diabetes, lupus eritematoso sistémico o hipertensión arterial.

2. Infección clínica en el momento del estudio o quince días previos. Se realizará un cuestionario clínico (anexo I) y determinación de leucocitos en la biometría hemática, descartando aquellas pacientes con cuenta mayor a 15,000.
3. Embarazo múltiple.
4. Pacientes en trabajo de parto.
5. Muestras de pacientes que se clasifiquen con hipertensión crónica, esto es hipertensión 12 semanas posteriores a la terminación del embarazo.

Eliminación

1. Pacientes cuyas muestras no puedan procesarse en las siguientes 8 horas posteriores a la toma.

Mujeres con embarazo normal

Inclusión:

1. Mujeres de entre 18 y 35 años.
2. Embarazo de más de 34 semanas de gestación, de acuerdo con la fecha del inicio de la última menstruación corroborada con ultrasonido del primer o segundo trimestre.
3. Con embarazo normoevolutivo definido por el servicio de Ginecología del hospital.
4. Que acepten participar en el estudio, con la firma de carta de consentimiento informado.

Exclusión

1. Mujeres con antecedentes de diabetes, lupus eritematoso sistémico o hipertensión arterial.
2. Infección clínica en el momento del estudio o quince días previos. Se realizará un cuestionario clínico (anexo I) y determinación de leucocitos en la biometría hemática, descartando aquellas pacientes con cuenta mayor a 15,000.
3. Pacientes en trabajo de parto.
4. Embarazo múltiple.
5. Muestras de pacientes que desarrollen preeclampsia posterior a la toma de la muestra hasta 6 semanas posteriores a la terminación del embarazo.

Eliminación

1. Pacientes cuyas muestras no puedan procesarse en las siguientes 8 horas posteriores a la toma.

No embarazadas

Inclusión

1. Mujeres entre 18 y 35 años de edad
2. Con prueba de embarazo negativa.
3. Que acepten participar en el estudio, con la firma de carta de consentimiento informado.

Exclusión

1. Mujeres con antecedentes de diabetes, lupus eritematoso sistémico o hipertensión arterial.

2. Infección clínica en el momento del estudio o quince días previos. Se realizará un cuestionario clínico (anexo I) y determinación de leucocitos en la biometría hemática, descartando aquellas pacientes con cuenta mayor a 15,000.

Eliminación

1. Pacientes cuyas muestras no puedan procesarse en las siguientes 8 horas posteriores a la toma.

IX 5.4 Definición de las variables

Variable independiente

Grupos de estudio:

Mujeres con preeclampsia: hipertensión y proteinuria de acuerdo a las definiciones del lineamiento técnico de salud en concordancia con Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy (2)

Embarazos normoevolutivos: Mujeres con embarazo no complicado que sean referidas a la unidad hospitalaria y que sea corroborada la evolución del embarazo por el servicio de ginecología y que se encuentre en control prenatal.

Mujeres no embarazadas: Mujeres que se descarte embarazo y que no tengan antecedente de enfermedad crónica o infección sistémica durante o previo a la toma de muestra

Escala de medición

Cualitativa, nominal.

Unidad de medición

Embarazo normal, preeclampsia y no embarazadas

Variable dependiente

1. Niveles de TREM-1

Identificación, mediante citometría de flujo del receptor TREM-1 en la superficie de monocitos de sangre periférica [39]

Escala de medición

Cuantitativa, continua.

Unidad de medición

Intensidad media de fluorescencia

2. IL1 β , IL-6, IL-10, IL-8, IL-12 y TNF- α

Identificación de las moléculas en suero de la muestra mediante citometria de flujo (48)

Escala de medición

Cuantitativa, continua.

Unidad de medición

Picogramos por mililitro (pg/mL).

Variables demográficas

1. Edad.

El número de años cumplidos, referidos por el paciente desde su nacimiento a la fecha de la terminación del evento obstétrico.

Escala de Medición:

Cuantitativa, continua

Unidad de medición

Años.

Otras Variables

Edad gestacional

Semanas de embarazo calculadas a partir de la fecha reportada por la paciente como de inicio de última menstruación corroborada con ultrasonido del primer o segundo trimestre (63)

Escala de Medición:

Cuantitativa, continua.

Unidad de medición

Semanas.

2. Antecedentes obstétricos

El número de embarazos previos al actual y si estos terminaron en parto, cesárea o aborto. Se reportará el total de partos, cesáreas, abortos de lapaciente previos al evento obstétrico actual.

Escala de Medición:

Cuantitativa, discreta.

Unidad de medición

Número de partos, cesáreas, abortos.

IX.5.2 Metodología

IX.5.1 Técnica de muestreo

Las pacientes fueron seleccionados mediante muestreo no probabilístico de casos consecutivos.

Selección de las participantes:

I. Pacientes con preeclampsia

A partir de la autorización del estudio, se revisaron los censos diarios de los servicios de hospitalización de ginecología, tococirugía (labor) y terapia intensiva.

Se revisaron los expedientes y se corroboró que tuvieran los criterios de inclusión.

Se corroboró la edad gestacional mediante el cálculo en semanas a partir del inicio de la fecha de la última menstruación, así como con el reporte de los estudios de ultrasonido que fueron realizados durante el primer o segundo trimestre.

Se explicó el estudio ampliamente a cada participante, se llenó y firmó el consentimiento informado.

II. Pacientes con embarazos normales:

Las pacientes enviadas a la unidad para finalizar el control prenatal, fueron valoradas por un ginecólogo quien al revisar clínicamente a la paciente, la nota de envío y los exámenes de laboratorio determinó que se trataba de un embarazo normoevolutivo.

Se revisaron los expedientes para corroborar que tuvieran los criterios de inclusión y se invitó a la paciente a participar en el estudio. Se llenó y firmó el consentimiento informado.

III. Mujeres no embarazadas:

Las pacientes no embarazadas se obtuvieron por invitación directa a personal de salud de la unidad donde se recolectaron a las pacientes embarazadas.

Se corroboró que cumplieran los criterios de inclusión y se llenó el formato de recolección de datos, así como la carta de consentimiento informado.

Muestras sanguíneas

- a. Se tomó una muestra sanguínea de 5 cc de una vena periférica y se colocó en un tubo con anticoagulante EDTA; el tubo se colocó en un equipo diseñado para traslado.
- b. Las muestras se trasladaron inmediatamente a la UIMIQ para su procesamiento. Las muestras fueron centrifugadas para obtener el plasma y posteriormente almacenadas en congelación.
- c. Para la determinación de la expresión de TREM-1 en monocitos se realizó citometría de flujo. Para el resto de las moléculas se realizó cuantificación mediante CBA con citómetro de flujo (48).

IX 5.7 Procesamiento de las muestras.

Para la determinación de TREM-1 en superficie de monocitos:

Se tomaron 5 mL de sangre total en tubos de poliestireno con EDTA como anticoagulante. Se procesaron 50 uL de esta sangre para su análisis por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales o controles isotipo acoplados a fluorocromos que se incuban durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se agregó un mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS a 1x) y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min. Las células se resuspendieron y analizaron utilizando un citómetro de flujo FACSAria, (Becton Dickinson, Rutherford, NJ) que tiene instalado el software FACSDiva 6.0. La expresión relativa de TREM-1 se reportó como intensidad media de fluorescencia para cada muestra.

Interleucinas

Mediante centrifugación, se separó el plasma de la muestra sanguínea colectada e inmediatamente se congeló, separado en alícuotas de 200 uL hasta su utilización para la cuantificación de IL1 β , IL-6, IL-10, IL-8, IL-12 y TNF- α , mediante el sistema de arreglo de perlas (CBA, por *Cytometric Bead Array*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema funciona de forma similar al sistema de “sandwich” del ELISA, con la diferencia de que los anticuerpos de captura se encuentran fijados a perlas, sobre las que se asocia la citocina correspondiente y posteriormente se agrega el anticuerpo de detección acoplado a fluorescencia de 650 nm. A mayor cantidad de moléculas asociadas de la citocina, mayor la intensidad media de fluorescencia, que se compara a una curva estándar para calcular la cantidad de citocina. Al utilizar

anticuerpos con diferente especificidad asociados a perlas con diferentes capacidades de emisión de fluorescencia a 520 nm de longitud se pueden cuantificar varias citocinas utilizando volúmenes mínimos (50 uL) de la misma. El sistema utilizado reporta límites mínimos de detección (sensibilidad) de: 3.6 pg/mL para IL-8, 7.2 pg/mL para IL-1 β , 2.5 pg/mL para IL-6, 3.3 pg/mL para IL-10, 3.7 pg/mL para TNF α y 1.9 pg/mL para IL-12p70.

XIII. CÁLCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA

No existe en la literatura publicaciones donde se compare la expresión de TREM1 en pacientes con preeclampsia, sin embargo en un trabajo del grupo de investigadores de nuestra unidad se comparó la expresión de TREM1 en pacientes con respuesta inflamatoria sistémica sin evidencia de infección. Se encontró una diferencia de aproximadamente 15 en el promedio del porcentaje de expresión de TREM 1 entre los pacientes con y sin SIRS (53).

Inicialmente se calculó con los datos previamente descritos un tamaño de muestra de 33 para cada uno de los grupos.

Con los resultados del presente trabajo se recalculó el tamaño de muestra utilizando formulario de programa STATA, tomando en cuenta los valores de IMF de TREM1 de los grupos de pacientes con preeclampsia y embarazos normoevolutivos, obteniendo una n de 15 para cada grupo.

XIV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis descriptivo se realizó de acuerdo con la escala de medición de las variables; para las cualitativas frecuencias simples y porcentajes. Para las cuantitativas dada la distribución no normal (se realizó prueba de normalidad de Kolmogorov- Smirnov) se describen la mediana, rangos.

Análisis inferencial: de acuerdo con la distribución de las variables, se compararon las medianas con la prueba no paramétrica U de Mann- Whitney para muestras independientes. Se consideraron los valores de $p < 0.05$, a dos colas, como significativos.

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 15 para todos los análisis. Y STATA para cálculo del poder de las diferencias.

XV. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Riesgo de la investigación

El estudio consistió en aportar una muestra de 3 ml de sangre periférica, lo que de acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud se considera una investigación de Riesgo Mínimo, tomando como base el apartado IV específicamente en el artículo 44 y 45 en relación con el artículo 17 del mismo reglamento donde se establece que la extracción de sangre con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses.

Contribuciones y beneficios del estudio para los participantes y la sociedad en su conjunto

En este caso la paciente no obtuvo ningún beneficio directo por su participación en el estudio, sin embargo el presente trabajo ayudará al mejor entendimiento de la preeclampsia en relación al papel que juega el sistema inmune así como la posible adición de marcadores tempranos. Lo anterior lleva a un beneficio a la sociedad en general y en particular a las mujeres que en algún momento puedan llegar a tener la enfermedad.

Confidencialidad

El nombre y el expediente de la paciente no se incluyeron en ninguno de los apartados de presentación de resultados. Ambos datos se utilizaran sólo para control interno y tendrán acceso a ellos sólo el investigador responsable.

Condiciones en las cuales se solicita el consentimiento

La invitación a participar en el estudio se hizo de forma verbal por tratarse de un estudio con riesgo mínimo además se firmó carta de consentimiento informado (artículo 23, reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud). Una vez que se tuvo el diagnóstico en el caso de pacientes con preeclampsia. Se explicó los detalles de la investigación así como se respondieron las dudas al respecto. En el caso de pacientes con embarazos normales se solicitó su participación en la consulta externa prenatal. Las pacientes no embarazadas fueron invitadas de los familiares de

las pacientes con preeclampsia y de mujeres sanas estudiantes o trabajadoras del hospital. En todos los casos tanto la explicación como la entrega del consentimiento informado fueron por el Dr. Miguel Corres Molina.

El guión utilizado fue el siguiente:

Pacientes con preeclampsia

Buenos días, _____, me llamo Miguel Corres soy médico ginecólogo y me encuentro en este hospital realizando una investigación sobre preeclampsia, que es la enfermedad que le diagnosticaron a usted. Quiero invitarla a participar en un estudio que busca saber si una sustancia en la sangre se encuentra en diferente cantidad en las pacientes con la enfermedad que usted tiene y en mujeres con embarazos normales y no embarazadas, lo cual en un futuro pueda usarse para hacer el diagnóstico de forma temprana. Su participación consistirá en permitirme sacar una muestra de sangre de una de sus venas. Más o menos la que cabe en una cuchara de café. Su participación en este momento no tendrá beneficio para usted, pero ayudará a conocer mejor la enfermedad. Las molestias que tendrá por participar son las relacionadas con el piquete el cual haré con mucho cuidado para que sean mínimas y básicamente es dolor y en algunas ocasiones puede quedar un moretón en el lugar donde se saca la sangre. El participar o no en esta investigación no cambiará de ninguna manera la forma en la que sus doctores trataran su enfermedad, por lo que no hay problema si usted no acepta.

Pacientes con embarazos normales

Buenos días, _____, me llamo Miguel Corres soy médico ginecólogo y me encuentro en este hospital realizando una investigación sobre preeclampsia, que es una enfermedad que se presenta en las mujeres con embarazadas donde se sube la presión y aparecen proteínas en la orina. Quiero invitarla a participar en un estudio que busca saber si una sustancia en la sangre se encuentra en diferente cantidad en las pacientes con esa enfermedad, no embarazadas y en mujeres con embarazos normales como el de usted, lo cual en un futuro pueda usarse para hacer el diagnóstico de forma temprana. Su participación consistirá en permitirme sacar una muestra de sangre de una de sus venas. Más o menos la que cabe en una cuchara de café. Su participación en este momento no tendrá beneficio para usted, pero

ayudará a conocer mejor la enfermedad. Las molestias que tendrá por participar son las relacionadas con el piquete el cual haré con mucho cuidado para que sean mínimas y básicamente es dolor y en algunas ocasiones puede quedar un moretón en el lugar donde se saca la sangre. El participar o no en esta investigación no cambiará de ninguna manera la forma en la que sus doctores trataran su embarazo, por lo que no hay problema si usted no acepta.

Pacientes no embarazadas

Buenos días, _____, me llamo Miguel Corres soy médico ginecólogo y me encuentro en este hospital realizando una investigación sobre preeclampsia, que es una enfermedad que se presenta en las mujeres embarazadas donde se sube la presión y aparecen proteínas en la orina. Quiero invitarla a participar en un estudio que busca saber si una sustancia en la sangre se encuentra en diferente cantidad en las pacientes con esa enfermedad, embarazadas normales y en mujeres no embarazadas, lo cual en un futuro pueda usarse para hacer el diagnóstico de forma temprana. Su participación consistirá en permitirme sacar una muestra de sangre de una de sus venas. Más o menos la que cabe en una cuchara de café. Su participación en este momento no tendrá beneficio para usted, pero ayudará a conocer mejor la enfermedad. Las molestias que tendrá por participar son las relacionadas con el piquete el cual haré con mucho cuidado para que sean mínimas y básicamente es dolor y en algunas ocasiones puede quedar un moretón en el lugar donde se saca la sangre. El participar o no en esta investigación no cambiará de ninguna manera la forma en la que usted pueda llegar a recibir atención en esta unidad médica, por lo que no hay problema si usted no acepta.

Forma de selección de los participantes:

La forma de selección de las pacientes se encuentra descrita en el apartado de metodología.

*

XVI. RESULTADOS

Se recolectaron muestras sanguíneas del 1 de noviembre del 2009 al 31 de agosto de 2010, se incluyeron un total de 33 mujeres, las cuales correspondieron a 10 no embarazadas, 15 embarazadas normales y 8 con preeclampsia severa. Para el análisis de interleucinas se eliminaron 2 muestras de embarazadas normales y 2 de mujeres con preeclampsia ya que por problemas técnicos no pudieron ser procesadas.

Debido a problemas de insumo (reactivo) y logística para la recolección de muestras y su traslado se detuvo la recolección.

Los límites de edad fueron de 18 a 33 años. Para el grupo de no embarazadas, el intervalo abarcó de 21 a 24 mientras que para el grupo de embarazadas sanas el intervalo fue de 18 a 31 años; para ambos grupos la mediana fue de 24 años. Para el grupo de mujeres con preeclampsia severa, la mediana fue de 26 años con intervalo de 18 a 33 años. Dado que los grupos no presentaron distribución normal se utilizaron pruebas no paramétricas para su comparación siendo no significativas las diferencias en edad entre las participantes (Tabla 1). En cuanto a las mujeres embarazadas, la mediana de semanas de gestación para el grupo de embarazadas sanas fue de 36 con intervalo de 34 a 39 semanas y el de las mujeres con preeclampsia severa de 39 semanas con un intervalo de 35 a 41 semanas, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

La proporción de mujeres primigestas tampoco fue estadísticamente diferente entre los grupos de embarazadas sanas en comparación con las mujeres con preeclampsia severa. Como se esperaba al ser la tensión arterial un criterio diagnóstico de preeclampsia, la tensión arterial media fue estadísticamente

significativa entre los grupos de embarazadas sanas en comparación con las mujeres con preeclampsia severa, siendo 86 y 111, respectivamente.

Tabla 1. CARACTERISTICAS DE LAS MUJERES PARTICIPANTES

	No embarazadas (n=10)	Embarazadas (n=15)	Preeclampsia (n=8)	p
Edad (años)	24 (21-24)	24 (18-31)	26 (18-33)	0.97 $\text{\textcircled{S}}$
Semanas de gestación	NA	36 (34-39)	39 (35-41)	0.24 $\text{\textcircled{Y}}$
Tensión Arterial Media (mm/Hg)	NA	86 (83-93)	111 (105-136)	< 0.001 $\text{\textcircled{Y}}$
Primigestas (frecuencia)	NA	4	4	0.2 $\text{\textcircled{£}}$

$\text{\textcircled{S}}$ Kruskal Wallis, $\text{\textcircled{Y}}$ Mann-Whitney, $\text{\textcircled{£}}$ X^2

Debido a la logística de reclutamiento, solo a las pacientes con preeclampsia se les pudo realizar a su ingreso química sanguínea de doce elementos (incluyendo creatinina y enzimas hepáticas) y biometría hemática diferencial.

Sólo una paciente presentó trombocitopenia grado 1 (120 mil plaquetas), el resto se encontraron en límites normales.

Tabla 2. Variaciones analíticas de Mujeres con Preeclampsia Severa

Paciente	Plaquetas	Creatinina	ALT	AST
1	274	0.9	14	30
2	285	0.7	26	19
3	121	0.45	16	19
4	140	0.67	19	14
5	151	0.88	12	20
6	175	.68	11	15
7	190	.62	17	30
8	199	.72	13	20

En todos los grupos analizados, la proporción de monocitos y neutrófilos se mantuvo dentro de límites normales.

En cuanto a la expresión relativa de TREM1 en monocitos (evidenciada por la intensidad media de fluorescencia o IMF), no se encontró significancia al comparar los tres grupos con la prueba de Kruskal Wallis ($p= 0.56$). Al comparar entre grupos sólo se encontró diferencia significativa entre el grupo de preeclampsia y embarazadas normales (Tabla 3 y Figura 1), con un poder calculado de 0.59.

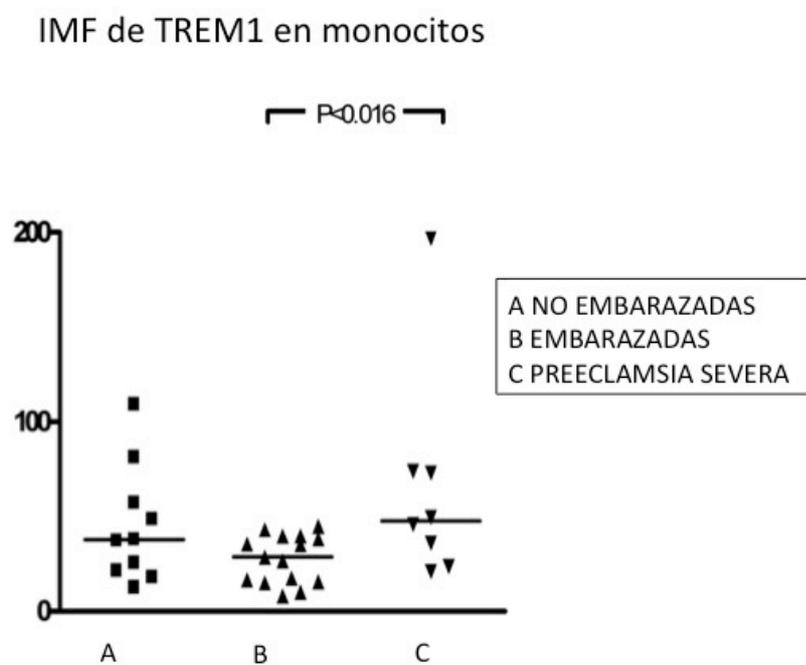
En el grupo de mujeres no embarazadas la mediana de TREM1 fue de 37.7 con un rango de 12.66 a 109.

En cuanto a la IMF de TREM1 en los neutrófilos, no existió diferencia estadística en ninguna de las comparaciones.

Tabla 3. Intensidad Media Fluorescencia (IMF) de TREM1 en monocitos

	Mujeres Sanas	Embarazadas n=15	Preeclampsia n=8	p
TREM 1 en neutrofilos	31.49 (9.76- 148.06)	25.74 (6.78- 37.91)	37.76 (10.81- 112.15)	0.53*
TREM1 en Monocitos (IMF)	37.7 (12.66 – 109)	28.55 (8.12-45)	47.88 (20.86-197)	0.017*
<p>* U Mann-Whitney entre el grupo de embarazadas sanas y preeclampsia</p> <p>No hubo diferencias entre las sanas y embarazadas o sanas y preeclampsia</p>				

FIGURA 1



Utilizando un sistema de cuantificación de citocinas basado en la captura del analito en perlas fluorescentes, se cuantificaron las citocinas $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$, $IL-10$ e $IL-12$ en el plasma correspondiente a mujeres de todos los grupos analizados. Todas las citocinas, tanto las de conocida actividad proinflamatoria (como $IL-1b$, $TNF-a$ e $IL-6$), como de quimiocinas ($IL-8$) e incluso la citocina

anti-inflamatoria IL-10, fueron significativamente mayores en el grupo de mujeres con preeclampsia respecto a las embarazadas sanas y no embarazadas. (Tabla 4)

Al realizar UMW entre los grupos para contrastar los valores de interleucinas, se encontró significancia en todas ellas entre el grupo de preeclampsia con embarazo normoevolutivo y no embarazadas. Los valores de interleucinas entre el grupo de mujeres no embarazadas y embarazadas sanas no tuvo diferencias significativas.

Tabla 4. Concentración sérica de citocinas en los grupos analizados

	Mujeres no embarazadas n= 8	Embarazo normoevolutivo n= 13	Preeclampsia n= 6	p (KWT)
IL 10	2.3 (2.3-509)	2.30 (2.3-4.1)	942 (2.3-2062)	0.006
IL-12p70	2.1 (0.9-607.1)	0.9 (0.9-4)	1182.55 (4-2300)	0.001
IL-1b	6.2 (6.2-526.6)	6.2	1076 (6.2-2340.2)	0.0001
IL-6	6.25 (1.5-136.5)	1.5 (1.5-15.4)	963.7 (77.5-1930.6)	0.001
IL-8	2.6 (2.6-488)	3.7 (2.6-5.4)	1016 (8.6-2000)	0.002
TNF- α	2.7 (2.7-592)	2.7 (2.7-3.9)	1265 (3.9-2762)	0.0001

Los valores de citocinas corresponden a pg/mL.

XVII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron tres grupos de mujeres: embarazadas con preeclampsia severa, embarazadas normotensas y mujeres no embarazadas sin patología evidente (evaluadas clínicamente), cuyas características demográficas son muy homogéneas. La edad promedio fue la misma en embarazadas sanas y no embarazadas (24 años) y ligeramente mayor en mujeres con preeclampsia (26 años) sin diferencia estadísticamente significativa. Todas las mujeres incluídas en el estudio fueron mujeres en edad reproductiva con límites de edad de entre 18 y 33 años. Por lo tanto las variaciones hormonales esperadas entre los grupos están asociadas al estado de embarazo, y/ o la preeclampsia y no a la edad de las pacientes. Las embarazadas, tanto con preeclampsia como normotensas se encontraban dentro del tercer trimestre de embarazo, sin evidencia de trabajo de parto, y el único signo significativamente diferente entre las mujeres embarazadas sanas y con preeclampsia fueron los valores de tensión arterial, lo cual era de esperarse, dado que este es uno de los criterios diagnósticos para preeclampsia (4).

Aún con preeclampsia severa, ninguna de estas mujeres presentó elevación de las enzimas hepáticas, ni alteraciones mayores en la biometría hemática, que pudieran alertar sobre el desarrollo de formas más graves de la enfermedad hipertensiva, como el síndrome de HELLP (1).

En pacientes con preeclampsia se han encontrado elevadas las moléculas de activación endotelial como: el receptor 1 y 2 para el factor de crecimiento vascular-endotelial, que se propone desvía la señalización intracelular y favorece la respuesta ante agentes vasopresores como la angiotensina; por otro lado, el receptor de bradicinina, al sobreexpresarse, se heterodimeriza con los receptores a angiotensina II y potencia su efecto (17).

La endotelina 1 es otra de las moléculas asociadas con activación endotelial que se encuentra incrementada en preeclampsia respecto a embarazos normoevolutivos. Recientemente se encontró que estos niveles incrementados de endotelina 1 correlacionan positivamente con los niveles séricos de las citocinas inflamatorias IL-2 e IFN γ (66).

Además de analitos solubles, también se han explorado moléculas en la superficie celular como biomarcadores. La sobreexpresión de CD63 en plaquetas es mayor en muestras de mujeres con preeclampsia que con embarazos normoevolutivos (67). Otras de las moléculas de superficie estudiadas, como E-cadherina, endotelina 1 y V-CAM (68), entre otras, se derivan de analizar células endoteliales in vitro y aunque colaboran en descifrar la fisiopatología de esta compleja enfermedad, no pueden ser utilizados en el seguimiento de las pacientes por la inaccesibilidad de

la muestra requerida. Otros estudios están enfocados a estudiar la frecuencia leucocitos circulantes. Con incrementos de las células NK circulantes y tendencia a la disminución de células T CD4 con aparente capacidad reguladora, en preeclampsia, pero sin que la diferencia pueda ser utilizada como factor diagnóstico/pronóstico (69). En el presente trabajo, con el fin de determinar si TREM1 de membrana podría ser un candidato como biomarcador, determinamos la expresión de TREM 1 en monocitos y neutrófilos. Como se muestra en la tabla 3 de la sección de resultados, la expresión relativa de TREM1 está significativamente incrementada en mujeres con preeclampsia severa respecto a mujeres con embarazos normoevolutivos. Este incremento no se observó en el caso de neutrófilos, tal como se ha observado en otros casos de inflamación y/o activación sistémica, donde los cambios más dramáticos en la expresión de TREM1 se observan en monocitos, primordialmente (70).

Como se había reportado previamente, las citocinas circulantes se encuentran elevadas en las mujeres con preeclampsia severa respecto a mujeres embarazadas sin preeclampsia y no embarazadas. Interesantemente, lo mismo las citocinas inflamatorias o con conocida actividad quimiotáctica como IL-12, IL1- β , TNF α , IL-6 e IL-8, así como la citocina anti-inflamatoria IL-10 se encuentran elevadas. Probablemente la activación endotelial puede ser la responsable de la elevación de citocinas inflamatorias y como mecanismo regulador o asociado al estrés oxidativo resultante, se puede favorecer la liberación de IL-10. La elevación de todas las interleucinas relacionadas con inflamación, tanto las pro, como las antiinflamatorias y otras reguladoras puede deberse al momento de la enfermedad en que se tomó la muestra, pues todos los casos habían debutado clínicamente en el momento de ingreso al estudio. La elevación de todas las interleucinas ocurre al inicio de la respuesta inflamatoria sistémica quizá como una forma de autolimitar la respuesta inflamatoria. Así mismo al instalarse la respuesta inflamatoria puede aparecer agotamiento de algunas de ellas y elevación de otras por secreción de otras células como el endotelio que participa en la respuesta inmunológica. En casos donde hay involucro renal puede haber disminución del aclaramiento de algunas interleucinas, tal es el caso del TNF α . Observaciones similares de disparo de interleucinas se han descrito en enfermedades autoinmunes lo que se interpreta como desregulación con umbral bajo a inflamación (28, 29, 30). Lo anterior apoya observaciones de otros autores que han encontrado alteraciones inflamatorias en las pacientes con preeclampsia que semejan cuadros tipo SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) (35, 42), así como de otros en que se correlaciona moléculas de comunicación intracelular con activación de leucocitos en preeclampsia(71).

Dado que la expresión de TREM1 en monocitos se relaciona con la producción de citocinas, es factible que estas células sean las productoras como se ha reportado previamente para la producción de IL-12 en mujeres con preeclampsia (72).

Aun con la muestra pequeña y con una β de 0.59, las diferencias en la expresión de interleucinas y de TREM1 en el grupo de mujeres con preeclampsia comparado con las embarazadas sanas alcanzan significancia estadística, lo cual sugiere que al incrementar la n estas diferencias se hagan aun más claras. También se observa aunque sin encontrar significancia estadística, que los valores de TREM1 son más elevados en los grupos de preeclampsia severa y mujeres sin embarazo y que comparten entre sí la heterogeneidad de sus valores. Lo anterior sugiere una falta de adaptación del sistema inmune materno en la preeclampsia, haciéndose la expresión más parecida a la de mujeres no embarazadas. El punto anterior pudiera hacerse más evidente al incrementar el número de casos en los grupos analizados, atribuyendo en este momento un error tipo II la ausencia de significancia estadística.

Ahora que para saber si los niveles de TREM1 pueden predecir niveles disparados de interleucinas en suero y sus posibles aplicaciones en clínica (uso como marcador) deberán realizarse otros trabajos con mayor número de casos que incluyan pacientes en todos los espectros de la enfermedad y mediciones en diferentes momentos del embarazo. Aun con las limitantes del presente estudio, sugerimos que es factible que TREM 1 dado su comportamiento en los embarazos normales puede ser un marcador, aunque en este momento sólo pueda ser considerado como un candidato.

XVIII. CONCLUSIONES

La expresión de TREM1 en monocitos es mayor en mujeres con preeclampsia severa que en normotensas.

Las concentraciones de interleucinas inflamatorias se encuentran elevadas en las mujeres con preeclampsia severa en comparación con las normotensas.

La expresión de TREM1 en mujeres con embarazo normal son homogéneas en comparación con las no embarazadas y preeclampsia.

XIX. ANEXOS

Anexo 1. Hoja de registro

□

No. Registro interno: _____
Protocolo Preeclampsia / TREM-1.
Registro: _____

Nombre: _____ Edad: _____ años Filiación _____

Tiempo de gestación: _____

FUM: _____

Diagnóstico: _____ Enfermedades previas: _____

Antecedentes Ginecobstétricos: G: _____ P: _____ C: _____ A: _____

Ultrasonido 1er trimestre _____ Ultrasonido 2º trimestre _____

Sistólica ingreso _____ Diastólica ingreso _____ Sistólica 6 hrs _____ Diastólica 6 hrs _____

Proteinuria en 24 hrs _____ Labstix orina: _____ Índice Pr/Cr _____

Leucocitos _____.

Antecedente 15 días previos de procesos infecciosos 15 días previos:

Respiratorios: _____ Vaginales _____ Urinarios _____ Gastrointestinales _____

Laboratorios:

Creatinina _____ Plaquetas _____ DHL _____ AST _____ ALT _____ DHL _____

Datos clínicos:

Cefalea () alteraciones visuales () alteraciones auditivas () Epigastralgia ()

Oliguria \leq 500 ml en 24 hrs ()

Complicaciones maternas:

Edema agudo de pulmón () HELLP () Muerte ()

Complicaciones fetales:

Restricción del crecimiento () Oligohidramnios () Obito ()

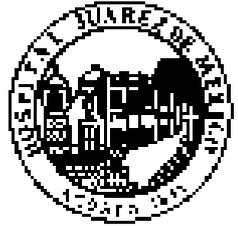
Final obstétrico

Parto () Cesárea () Peso producto _____ Apgar 5 minutos _____ Ingreso UCIN _____

Tiempo entre diagnóstico y termino de embarazo _____ horas.

12 semanas posterior a evento obstétrico

TA sistólica _____ Diastolica _____



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

1. Nombre del estudio

EXPRESIÓN DE TREM1 EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA DE PACIENTES CON PREECLAMPSIA SEVERA, EMBARAZOS NORMALES Y NO EMBARAZADAS

2. Propósito del estudio

La estamos invitando a participar en un estudio que se llevará a cabo en las unidad de investigación de este hospital en conjunto con la unidad de investigación médica en inmunología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional perteneciente el IMSS.

La preeclampsia es una enfermedad que se presenta en mujeres embarazadas donde se sube la presión y aparecen proteínas en la orina. Es una enfermedad delicada tanto para la mama como para el bebe. Desafortunadamente hasta la fecha la única cura es suspender el embarazo lo cual en ocasiones no es bueno para el bebe. La mayoría de las veces la enfermedad se presenta ya avanzada por lo que poco se puede hacer para ayudar a los bebes que nacen antes de tiempo. Sabemos que en la enfermedad de la preeclampsia ocurren cambios en la sangre que pudieran hacer que los doctores sepan que mujeres van a tener la enfermedad con tiempo para prepara un mejor ambiente para que nazca el bebe. TREM1 es una sustancia que esta en la sangre y pudiera servir para detectar la enfermedad de manera temprana. Para lo anterior primero tenemos que conocer si TREM1 se encuentra en cantidades diferentes en pacientes embarazadas con preeclampsia, embarazadas normales y no embarazadas. Nosotros pensamos que en mujeres embarazadas con preeclampsia se encuentra en mayores cantidades, pero necesitamos medirlo para comprobarlo. Usted ha sido invitada a participar en este estudio ya que tiene alguna de las características mencionadas, por lo que pensamos que pudiera ser un buen candidato para participar en este proyecto.

Al igual que usted, otras mujeres de este hospital pacientes embarazadas y no embarazadas, y personal trabajador serán invitadas a participar. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

3. Procedimientos

Si usted acepta, su participación consistirá en permitirnos tomar mediante un piquete una muestra de sangre de alguna de las venas de sus brazos. La cantidad que necesitamos es la que cabe en una cucharada cafetera (3

mililitros). Esta muestra será enviada a un laboratorio especial para buscar y medir la sustancia que estamos estudiando. Nos tardaremos aproximadamente 5 minutos en tomarle la muestra de sangre. Los estudios de laboratorio que le realizaremos incluyen: la medición de TREM1 que es la sustancia que estamos investigando y la cantidad de leucocitos, que son células que aumentan en caso de infecciones en su sangre. Los resultados de sus estudios de laboratorio **NO** le serán entregados.

b) Se le realizarán algunas preguntas acerca de sus antecedentes de salud y en su caso de sus embarazos previos, algunos datos los obtendremos del expediente si es que usted cuenta con él, esta información será totalmente confidencial, por lo que será conservada de forma tal que usted no podrá ser identificada. Pudiera ser que dentro de las preguntas en el cuestionario o durante la entrevista, alguna de estas preguntas le hiciera sentir incómoda, usted tiene todo el derecho de no responder a cualquiera pregunta que le incomode.

Posibles riesgos y molestias. *Es necesario detallar las molestias o riesgos potenciales asociados con los procedimientos programados.*

Las molestias principales son el dolor del piquete, sin embargo lo haremos personal capacitado y con experiencia para que sea mínimo. Puede ser en algunos casos que después del piquete quede un morete, el cual en un par de días desaparece lo cual no tiene consecuencias a largo plazo.

4. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio

No recibirá un pago por su participación en este estudio, ni este estudio implica gasto alguno para usted.

No recibirá ningún beneficio directo al participar en este estudio.

Si bien los beneficios directos para usted no existen, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento de la preeclampsia; los resultados de este estudio brindarán información importante para el mejor manejo de personas con esa enfermedad

5. Participación o retiro.:

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por este hospital, se le ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del Hospital Juárez. Es decir, que si usted no desea participar en el estudio, su decisión, no afectará su relación con el Hospital Juárez y su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede pedirnos que no utilicemos la información de la muestra de sangre que le hayamos tomado. Para los fines de esta investigación sólo utilizaremos la información que usted nos ha brindado desde el momento en que acepto participar hasta el momento en el cual nos haga saber que ya no dese participar.

6. Privacidad y confidencialidad.

La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla/o (como su nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial y por separado al igual que sus respuestas a los cuestionarios y los resultados de sus pruebas clínicas, para garantizar su privacidad.

El equipo de investigadores, sus médicos del hospital y las personas que estén involucradas en el cuidado de su salud sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos que usted así lo desee. Sólo proporcionaremos su información si fuera necesario para proteger sus derechos o su bienestar (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia), o si lo requiere la ley.

Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, por ejemplo, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos.

Personal de contacto para dudas y aclaraciones sobre el estudio

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 9:00 a 16:00 hrs, de lunes a viernes con el Dr. Armando Isibasi Araujo, que es el investigador responsable del estudio, a los teléfonos: 56276900, extensión 21476, en la Unidad de Investigación en Inmunoquímica ubicada en el primer piso del hospital de especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Así mismo puede contactar al Dr. Miguel Corres Molina en el Hospital Juárez en el mismo horario, de Lunes a viernes al teléfono

7. Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación.

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los Tel. 56276900 ext 21216, de 9 a 16:00 hrs.; o si así lo prefiere al correo electrónico: conise@cis.gob.mx. La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

Declaración de consentimiento informado

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Nombre del Participante

Firma del Participante

Fecha

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

Firma del encargado de obtener el CI

Fecha

Firma de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre del Testigo 1
con participante

Parentesco

Firma del Testigo

Fecha

Nombre del Testigo 2
con participante

Parentesco

Firma del Testigo

Fecha

Anexo III

El procedimiento para la medición de la presión arterial sistémica :

1. En condiciones ideales la persona debe abstenerse de fumar, tomar café o hacer ejercicio, al menos 30 minutos antes de la medición, así mismo deben considerarse las variaciones debidas al dolor y/o ansiedad. Establezca una plática cordial y rompa el estado de ansiedad que generalmente tiene el enfermo al llegar al consultorio.
2. Debe estar sentada de manera confortable y con un buen soporte para la espalda, su brazo descubierto, semiflexionado y apoyado en una mesa que permita al brazo mantenerse a la altura del corazón. Palpe los pulsos e identifique su amplitud e intensidad.
3. Es recomendable además, que en toda evaluación inicial se tome también la presión en ambos brazos en posición supina y de pie.
4. Tomar al menos dos mediciones separadas de 1-2 minutos en ambos brazos y hacer una adicional si hubo una diferencia sustancial entre las dos primeras 5 minutos después. Si se encuentran valores elevados se recomienda medir también en ambas extremidades inferiores.
5. Utilizar un brazalete estándar (12-13 cms de ancho y 35 cms de largo): En el caso de obesas (> 35 cms de circunferencia del brazo), utilizar brazalete de 20 cm de ancho y 40 cm de largo. La cámara de aire debe cubrir al menos el 80% de la circunferencia del brazo. En personas muy delgadas o adolescentes se recomienda brazalete de 12 X 18 cms
6. Usar la fase I y V de los ruidos de Korotkoff para identificar las presiones sistólica y diastólica respectivamente. No ejerza presión con el estetoscopio sobre la arteria y no coloque la campana del estetoscopio

por debajo del brazalete. Un pulso amplio o presión diastólica muy baja (<40 mm Hg) con sistólica normal o alta, debe hacerle sospechar insuficiencia aórtica o estado hiperdinámico.

7. Medir la presión arterial en ambos brazos durante la primera visita y tomar el valor más alto como referencia. Diferencias de más de 15 mm Hg entre brazos sugiere la posibilidad de obstrucciones o malformaciones
8. Medir la presión 1 y 5 minutos después de asumir la posición de pie en sujetos que se sospeche hipotensión ortostática.
9. Determinar la frecuencia cardíaca, 30 seg después de la segunda medición en la posición sentado.

Anexo IV

Clasificación utilizada en México para la enfermedad hipertensiva asociada al embarazo.

De acuerdo con el lineamiento técnico publicado por la secretaria de salud de México (1) y en concordancia con organismos internacionales (2) los criterios para el diagnóstico de las anteriores entidades son:

Preeclampsia leve: Se presenta después de la semana 20 de gestación, durante el parto, o en las primeras 6 semanas después de éste. Presión sistólica \geq a 140 mm Hg o presión diastólica \geq 90 mmHg. Proteinuria \geq 300 mg/orina de 24 hrs ó 30 mg en una tira reactiva lo cual equivale a (+).

Preeclampsia severa: Se presenta después de la semana 20 de gestación, durante el parto, o en las primeras 6 semanas después de éste. Presión sistólica \geq a 160 mm Hg o presión diastólica \geq 110 mm Hg. Proteinuria \geq 2 gramos en orina de 24 hrs o su equivalente en tira reactiva.

O si se presenta alguno de los siguientes independiente de la presión arterial

Creatinina sérica $>$ a 1.2 mg/dl

Trombocitopenia \leq 150 000 cel/mm³

Incremento de la deshidrogenasa láctica \geq 600 UI

Elevación al doble de los valores de TGO/AST o TGP/ALT

Cefalea, alteraciones visuales o auditivas

Epigastralgia

Oliguria \leq 500 ml en 24 hrs

Edema agudo de pulmón
Dolor en hipocondrio derecho
Restricción del crecimiento
Oligohidramnios

Eclampsia: Preeclampsia más convulsiones sin otra causa. Se presenta después de la semana 20 de gestación, durante el parto o en las primeras 6 semanas después de éste.

Síndrome de HELLP (acrónimo del inglés: Hemolysis, Elevated liver enzymes, Low platels): Los criterios para establecer el síndrome de HELLP son, plaquetas $< 100\ 000/\text{mm}^3$, TGO/AST $\geq 70\ \text{U/L}$, DHL $\geq 600\ \text{U/L}$, bilirrunina total $\geq 1.2\ \text{mg/dl}$. Se presenta después de la semana 20 de gestación, durante el parto, o en las primeras 6 semanas después de éste.

Hipertensión crónica: Se diagnóstica cuando existe hipertensión arterial $\geq 140/90\ \text{mm Hg}$ antes de la semana 20 de gestación o si persiste después de doce semanas posteriores al parto.

Hipertensión gestacional: Presencia de hipertensión arterial $\geq a\ 140/90\ \text{mm Hg}$ después de la semana 20 de gestación y se mantiene hasta las doce semanas después del parto. Ausencia de proteinuria. Presencia o no de cefalea, acufenos y fosfenos. Después de la semana 12 de la interrupción del embarazo se revalorará la presencia de hipertensión, si continúa, se reclasifica como hipertensión crónica: es un diagnóstico retrospectivo.

XX. REFERENCIAS

1. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005 Feb 26;**365**(9461):785-99.
2. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000 Jul;**183**(1):S1-S22.
3. Zuñiga E, Zubieta B. Cuadernos de Salud Reproductiva. 2000. p. 67-7.
4. Martín Rosas, Gustavo Pastelin, Gilberto Vargas-Alarcon, Jesús Martínez-Reding, Catalina Lomelí, Celso Mendoza-González et al. Guías Clínicas para la detección, prevención, diagnóstico y tratamiento de hipertensión arterial sistémica en México, Archivos de Cardiología de México 2008; 78 (Supl. 2): 5-57.
5. Cote, A., Brown, M., Lam, E., von Dadelszen, P., Firoz, T., Liston, R., y otros. (2008). Diagnostic accuracy of urinary spot protein:creatinine ratio for proteinuria in hypertensive pregnant women: systematic review. *BMJ* , 336, 1003.
6. Papanna, R., Mann, L., Kouides, R., & Glantz, J. (2008). Protein/creatinine ratio in preeclampsia: a systematic review. *Obstet Gynecol* , 112 (1), 135-44
7. Shakila Thangaratnam, et al. Estimation of proteinuria as a predictor of complications of pre-eclampsia: a systematic review *BMC Medicine* 2009, **7**:10
8. Sibai BM. Magnesium sulfate prophylaxis in preeclampsia: lessons learned from recent trials. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004;**190**(6):1520–1526
9. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*. 2006;**367**(9516):1066–1074
10. Ananth CV, Vintzileos AM. Medically indicated preterm birth: recognizing the importance of the problem. *Clin Perinatol* 2008 Mar;**35**(1):53-67, viii.
11. Fisher, S.J., 2004. The placental problem: linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 53.
12. Goldman-Wohl DS et al. Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2000 Jan;**6**(1):88-95
13. Irving JA, Lala PK. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res* 1995;**217** (2): 419-27
14. Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, et al. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994 Dec;**15**(8):819-35.
15. R.W. Redline. Placental Pathology: A systematic approach with clinical correlations. *Placenta* 29, Supplement A, Trophoblast Research, Vol. 22 (2008) S86eS91

16. Lykke JA, Langhoff-Roos J, Sibai BM, Funai EF, Triche EW, Paidas MJ. Hypertensive pregnancy disorders and subsequent cardiovascular morbidity and type 2 diabetes mellitus in the mother. *Hypertension*. 2009;53:944-51
17. AbdAlla S et al. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*. 2001 Sep;7(9):1003-9
18. Hayman R et al. The preliminary characterization of vasoactive circulating factor(s) in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 May;184(6):1196-203
19. Zhou CC et al. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce preeclampsia in pregnant mice. *Nat Med*. 2008 Aug;14(8):855-62. Jul 27
20. Craici I et al. Preeclampsia and future cardiovascular risk: formal risk factor or failed stress test?. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2008 Aug;2(4):249-59
21. Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999 Dec;222(3):222-35
22. LaMarca, et al Pathophysiology of hypertension in response to placental ischemia during pregnancy: a central role for endothelin? *Gend Med*. 2008;5 Suppl A:S133-8
23. Chen Q et al A role for interleukin-6 in spreading endothelial cell activation after phagocytosis of necrotic trophoblastic material: implications for the pathogenesis of pre-eclampsia. *J Pathol*. 2009 Jan;217(1):122-30.
24. Clark P et al. The neutrophil and preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998;16(1):57-64.
25. Bernardi Fet al. Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008 Dec;34(6):948-51
26. Chen G et al, Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene polymorphism and expression in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*. 1996 Apr;104(1):154-9
27. Llorba E. et al A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy. *Free Radic Biol Med*. 2004 Aug 15;37(4):557-70
28. Urbonaviciute V et al. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1 nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med*. 2008 Dec 22;205(13):3007-18. Epub 2008 Dec 8
29. Schett G. Osteoimmunology in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):210. Epub 2009 Jan 30
30. Osborn O et al. Insights into the roles of the inflammatory mediators IL-1, IL-18 and PGE2 in obesity and insulin resistance. *Swiss Med Wkly*. 2008 Nov 15;138(45-46):665-73
31. Li H et al. Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice. *Metabolism*. 2008 Dec;57(12):1704-10
32. Sata F et al. Proinflammatory cytokine polymorphisms and the risk of preterm birth and low birthweight in a Japanese population. *Mol Hum Reprod*. 2009 Feb;15(2):121-30
33. Kumar D et al. Proinflammatory cytokines found in amniotic fluid induce collagen remodeling, apoptosis, and biophysical weakening of cultured human fetal membranes. *Biol Reprod*. 2006 Jan;74(1):29-3
34. Hefler LA et al. A polymorphism of the interleukin-1beta gene and idiopathic recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 2001 Aug;76(2):377-9

35. Brewster JA et al. Gestational effects on host inflammatory response in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008 Sep;140(1):21-6
36. Jonsson Y . Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol.* 2006 Jun;70(1-2):83-91
37. Wilczyński JR et al Cytokine secretion by decidual lymphocytes in transient hypertension of pregnancy and pre-eclampsia. *Mediators Inflamm.* 2002 Apr;11(2):105-11
38. Banerjee S et al Placental expression of interferon-gamma (IFN-gamma) and its receptor IFN-gamma R2 fail to switch from early hypoxic to late normotensive development in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Feb;90(2):944-52
39. Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2003 Aug;59(2):161-73
40. Krishnan L, Guilbert LJ, Wegmann TG, Belosevic M, Mosmann TR J *T helper 1 response against Leishmania major in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells.* *Immunol.* 1996 Jan 15;156(2):653-62
41. Arriaga-Pizano L et al The predominant Th1 cytokine profile in maternal plasma of preeclamptic women is not reflected in the choriondecidual and fetal compartments. *J Soc Gynecol Investig.* 2005 Jul;12(5):335-42
42. Sacks GP ET AL Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Jul;179(1):80-6
43. Zhao J et al Human pregnancy up-regulates Tim-3 in innate immune cells for systemic immunity. *J Immunol.* 2009 May 15;182(10):6618-24
44. Murphy SP et al. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol Reprod.* 2009 May;80(5):848-59.
45. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online.* 2006 Nov; 13(5):680-6
46. Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol.* 2004 Nov;24(6):565-70
47. Borzychowski AM et al Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006 Oct;11(5):309-16. Epub 2006 Jul 7
48. Sargent IL et al NK cells and human pregnancy--an inflammatory view. *Trends Immunol.* 2006 Sep;27(9):399-404
49. Kolla V, Jenö P, Moes S, Lapaire O, Hoesli I, Hahn S. *Quantitative proteomic (iTRAQ) analysis of 1st trimester maternal plasma samples in pregnancies at risk for preeclampsia.* *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:305964
50. Knapp S, Gibot S, de Vos A, Versteeg HH, Colonna M, van der Poll T. Cutting edge: expression patterns of surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in human endotoxemia.
51. Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Béné MC, Cravoisy A, Levy B, Faure GC, Bollaert PE. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. 2004 Jul; 141(1):9-15.
52. Schmausser B, Endrich S, Beier D, Moran AP, Burek CJ, Rosenwald A, Rieckmann P, Müller-Hermelink HK, Eck M. Triggering receptor expressed on

- myeloid cells-a (TREM-1) expression on gastric epithelium: implication for a role of TREM-1 in Helicobacter Pylori infection. 2008 apr; 152(1):88-94.
53. Ferat-Osorio E, Esquivel-Callejas N, Wong-Baeza I, Aduana-Vicente R, Arriaga-Pizano L, Sánchez-Fernández P, Torres-González R, López-Macías C, Isibasi A. The increased expression of TREM-1 on monocytes is associated with infectious and noninfectious inflammatory processes. *J Surg Res* 2008; 150(1):110-7
54. Adib-Conguy M, Monchi M, Goulenok C, Laurent I, Thuong M, Cavaillon JM, Adrie C. Increased plasma levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 and procalcitonin after cardiac surgery and cardiac arrest without infection. 2007 oct; 28(4): 406-10.
55. Schenk M, Bouchon A, Seibold F, Mueller C. TREM-1--expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases 2007 oct;117(1):3097-106
56. Akahoshi T, Murakami Y, Kitasato H. *Recent advances in crystal-induced acute inflammation*. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19(2):146-50
57. Wong-Baeza I, González-Roldán N, Ferat-Osorio E, Esquivel-Callejas N, Aduna-Vicente R, Arriaga-Pizano L, Astudillo-de la Vega H, Villasis-Keever MA, Torres-González R, Estrada-García I, López-Macías C, Isibasi A. *Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) is regulated post-transcriptionally and its ligand is present in the sera of some septic patients*. 2006 Sep; 145(3):448-55.
58. González-Roldán N, Ferat-Osorio E, Aduna-Vicente R, Wong-Baeza I, Esquivel-Callejas N, Astudillo-de la Vega H, Sánchez-Fernández P, Arriaga-Pizano L, Villasis-Keever MA, López-Macías C, Isibasi A. *Expression of triggering receptor on myeloid cell 1 and histocompatibility complex molecules in sepsis and major abdominal surgery*. *World J Gastroenterol* 2006;12 (29):4767.
59. Ho CC, Liao WY, Wang CY, Lu YH, Huang HY, Chen HY, Chan WK, Chen HW, Yang PC. *TREM-1 expression in tumor-associated macrophages and clinical outcome in lung cancer*. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(7):763-70
60. Tejera A, Santolaria F, Diez ML, Alemán-Valls MR, González-Reimers E, Martínez-Riera A, Milena-Abril A. Prognosis of community acquired pneumonia (CAP): value of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) and other mediators of the inflammatory response. *Cytokine* 2007;38(3):117-23
61. Radsak MP, Taube C, Haselmayer P, Tenzer S, Salih HR, Wiewrodt R, Buhl R, Schild H. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 is released in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Dev Immunol* 2007;2007:52040
62. Vogel I, Goepfert AR, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, Curry AH, Cliver S, Andrews WW *Early second-trimester inflammatory markers and short cervical length and the risk of recurrent preterm birth*. *J Reprod Immunol* 2007;75(2):133-40
63. Hadlock FP, Deter RL, Harrist RB, Park SK. Computer assisted analysis of fetal age in the third trimester using multiple fetal growth parameters. *J Clin Ultrasound* 1983;11:313-6
64. Hoshimoto K, Ohta N, Ohkura T, Inaba N. Changes in plasma soluble CD26 and CD30 during pregnancy: markers of Th1/Th2 balance? *Gynecol Obstet Invest*. 2000;50(4):260-3
65. Poston L. et al. .Endothelial dysfunction in pre-eclampsia. *Pharmacol Rep*. 2006;58 Suppl:69-74

66. Sharma D, Singh A, Trivedi SS, Bhattacharjee J. Role of endothelin and inflammatory cytokines in pre-eclampsia - A pilot North Indian study. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Apr;65(4):428-32
67. Janes SL, Goodall AH. Flow cytometric detection of circulating activated platelets and platelet hyper-responsiveness in pre-eclampsia and pregnancy. *Clin Sci (Lond)*. 1994 Jun;86(6):731-9
68. Groten T, Kreienberg R, Fialka I, Huber L, Wedlich D. Altered subcellular distribution of cadherin-5 in endothelial cells caused by the serum of pre-eclamptic patients. *Mol Hum Reprod*. 2000 Nov;6(11):1027-32
69. Cudihy D, Lee RV The pathophysiology of pre-eclampsia: current clinical concepts.. *J Obstet Gynaecol*. 2009 Oct;29(7):576-82
70. Colonna M. TREMs in the immune system and beyond *Nat Rev Immunol*. 2003 Jun;3(6):445-53..
71. Mellembakken JR, Aukrust P, Hestdal K, Ueland T, Abyholm T, Videm V. Chemokines and leukocyte activation in the fetal circulation during preeclampsia. *Hypertension*. 2001 Sep;38(3):394-8
72. Sakai M, Tsuda H, Tanebe K, Sasaki Y, Saito S. Interleukin-12 secretion by peripheral blood mononuclear cells is decreased in normal pregnant subjects and increased in preeclamptic patients.. *Am J Reprod Immunol*. 2002 Feb;47(2):91-7
73. Redman CWG, Sacks GP, IL Sargent. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 180: 499