

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ASPECTOS GENÉTICOS Y MOLECULARES DE LAS CÉLULAS NK
EN MUJERES CON PREECLAMPSIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M en C. ELLY NATTY SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES

MEXICO, D.F.

2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Abreviaturas

Act/Inh	Genes activadores/ inhibidores
ANG	Angiopoyetina
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
dNK	Células NK deciduales
DL	Dominio intracitoplásmico largo
DS	Dominio intracitoplásmico corto
DP	Dominio de pseudogenes
HELLP	Hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y trombocitopenia
HLA	Antígenos de histocompatibilidad
IC	Intervalo de confianza
ILT	Transcritos de tipo inmunoglobulina
ITAM	Motivos de activación basados en tirosinas
ITIM	Motivos de inhibición basados en tirosinas
KIR	Receptores de tipo inmunoglobulina de células NK
LCR	Complejo de receptores de leucocitos
NCR	Receptores citotóxicos de células NK
NK	Células asesinas naturales: " <i>Natural Killer</i> "
pb	pares de bases
pc	valor de <i>p</i> corregido
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PCR-SSP	Reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos de secuencia específica
PE	Preeclampsia
PLGF	Factor de crecimiento placentario
PM	Peso molecular
pNK	Células NK periféricas
RM	Razón de momios
RPMI	Medio de cultivo "Roswell Park Memorial Institute"
VA	Vellosidades de anclaje
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR	Receptor para VEGF

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a:

- Mi tutor Dr. Marco A. Cerbón. Su compromiso con este trabajo de investigación, su entereza, pero sobre todo su calidad humana fueron fundamentales en el desarrollo de este proyecto y en mi formación académica.
- A la Dra. Adriana Mendoza, a la M en C. Sonia N, y a todos los miembros del Laboratorio 206, Edif. F. Facultad de Química, UNAM, sin mencionar nombres específicos para no omitir a nadie. Sus comentarios y ayuda en el laboratorio fueron fundamentales para la elaboración de este proyecto.
- Los miembros de mi comité tutorial, Dr. Enrique Ortega Soto y Dr. Julio Granados Arriola. Su asesoría y disposición a orientarme fueron determinantes para mi formación y el desarrollo de esta tesis.
- Los miembros del jurado de mi examen de grado, Dr. Rolando Hernández, Dr. Ofir Picazo, Dr. Gilberto Vargas y Dra. Cristina Fernández, por el valioso tiempo y empeño que comprometieron para la lectura de esta tesis y por todas las sugerencias para mejorarla.
- Al Dr. Carlos Moran y al Dr. Fernando Romero Arauz del Hospital de Ginecología y Obstetricia número 4 "Luis Castelazo Ayala" del IMSS, por su siempre gentil disposición a ayudarnos con la realización de este proyecto. Así como a todo su equipo de trabajo, médicos adscritos al piso de enfermedades hipertensivas, a los médicos residentes, enfermeras y todos los que sin sus acertados diagnósticos y ayuda no hubiera sido posible este trabajo.
- A todas las mujeres que aceptaron amablemente participar y donar un poco de su sangre con el anhelo de que algún día otras mujeres no sufran preeclampsia.
- A Evelyn Rivera, por su ayuda con el Citómetro. A Nona y Manuel del Laboratorio del Dr. Gilberto Vargas; y a la Dra. Norma Salgado del Hospital de PEMEX, por todas las veces que me prestaron la placa de calentamiento para el termociclador.
- A la UNAM, al Posgrado en Ciencias Biomédicas y a la Facultad de Química, por la valiosa oportunidad de formarme bajo sus altos valores y calidad académica.
- Al CONACyT, por el apoyo otorgado durante mis estudios a través de la beca de Apoyos Integrales para la Formación de Doctores en Ciencias, registro CVU 44575 y por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto, registros 8030038 y 46759-Q. A la UNAM, por el apoyo financiero para la realización de este trabajo, PAPIIT IN219710-2 y PAIP 6190-08.

Dedicatorias

A mi familia especialmente a mis padres:

Mario (In memoriam), porque tu ejemplo de pasión por tu trabajo y honestidad frente a la vida guiarán siempre mis pasos.

Hilda, por todo el apoyo y paciencia que me tienes, por enseñarme el amor a las palabras y lo que se siente con ellas.

A mi otra familia:

Marco, por los electrones voladores. Yo no lo hubiera logrado mejor que el azar.

Elvia, por el apoyo y el pedacito de vida que nos ha tocado compartir.

Mauricio, por impulsarme a seguir y por “cumplir” el encargo que te dieron.

Sopa, Caro (Pixie), Lucio (Sr. Fredericksen), Moni (la niña), Paquí (☺), Vega, Nacho y Kari, porque con ustedes la ciencia, la poesía y la amistad se reparte en matraces, pipetas y cultivos celulares, se amplifica con reacciones de PCR y se desparrama en preparaciones microscópicas, en láminas y en transparencias, por hacer del trabajo de todos los días una experiencia lúdica.

“He intentado, no sé con qué fortuna, la redacción de cuentos directos. No me atrevo a afirmar que son sencillos, no hay en la tierra una sola página, una sola palabra que lo sea, ya que todas postulan el universo, cuyo más notorio atributo es la complejidad”.

El informe de Brodie. JL Borges

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	4
1. Introducción	5
2. Antecedentes	7
2.1 Preeclampsia	7
2.1.1 Definición e importancia clínica.....	7
2.1.2 Fisiopatología.....	9
2.1.3 Etiología de la preeclampsia: remodelación arterial uterina durante la formación de la placenta	10
2.2 La teoría inmunológica en la etiología de la preeclampsia	12
2.2.1 La importancia de las células NK en la gestación.....	12
2.2.2 Células NK deciduales: subtipo único.....	13
2.3 Receptores KIR	14
2.3.1 Características de los receptores KIR.....	14
2.3.2 Ligandos para receptores KIR: moléculas de histocompatibilidad (HLA)	16
2.3.3 Interacciones KIR-HLA y su implicación en preeclampsia	18
3. Justificación	20
4. Hipótesis	21
5. Objetivos	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos particulares	22
6. Material y Métodos	23
6.1 Población de estudio y muestras biológicas	23
6.2 Aislamiento de leucocitos deciduales y Citometría de Flujo	23
6.3 Tipificación de genes para los receptores KIR	25
6.4 Análisis estadístico	26
7. Resultados	27
7.1 Leucocitos deciduales	27
7.2 Tipificación de genes para los receptores KIR	29

8. Discusión	34
9. Conclusiones	38
10. Perspectivas	39
11. Referencias	40
Anexo 1.....	48
Características clínicas de los grupos de estudio	
Anexo 2.....	49
Publicación: “Persistence of decidual NK cells and KIR genotypes in healthy pregnant women and with preeclampsia: a case-control study in the third trimester of gestation”	
Anexo 3.....	50
Artículo de Revisión: “Estado actual de la Preeclampsia en México: de lo epidemiológico a sus mecanismos moleculares”	
Anexo 4.....	51
Artículo de Revisión: “Immune-endocrine interactions during Preeclampsia”	

Resumen

La interacción entre leucocitos deciduales y células del trofoblasto en las etapas tempranas de la gestación, es un elemento clave para la remodelación adecuada de las arterias uterinas, la perfusión de la placenta y el éxito del embarazo. La preeclampsia (PE), una complicación multisistémica de gran importancia en salud pública a nivel mundial y de etiología desconocida, que se manifiesta con datos clínicos como hipertensión arterial, compromiso multisistémico y/o proteinuria después de la semana número 20 de la gestación, se caracteriza por una remodelación deficiente de las arterias uterinas.

Para tratar de explicar la etiología de la PE, una de las hipótesis involucra factores de tipo inmunológico y establece que las células asesinas naturales ("Natural Killer" NK) de la decidua materna dirigen gran parte del proceso de remodelación arterial en la decidua. Las células NK al inicio de la gestación representan la mayor población de leucocitos deciduales, sin embargo se ha estudiado poco su presencia y participación en la PE al final del embarazo. La funcionalidad de estas células depende de la interacción entre sus receptores de membrana y los ligandos que pueda reconocer en otras células y/o en el trofoblasto. Los receptores de tipo inmunoglobulina de las células NK (KIR), son una familia con una gran complejidad genética, debido al número y arreglos de los genes que la conforman; se han clasificado en dos grupos: los receptores activadores y los inhibidores. Un estudio de asociación genética realizado en población caucásica sugiere que los *KIR* inhibidores pueden estar asociados a la enfermedad.

El objetivo de este estudio fue analizar la presencia de células NK al final del embarazo y compararlas con las encontradas en mujeres con PE, así mismo conocer el genotipo de *KIR* que pudiera predisponer a la población mexicana a desarrollar PE.

Los resultados encontrados indican que las células NK que residen en la decidua al final del embarazo, comparten características con las del inicio de la

gestación y difieren de las células NK circulantes: las NK deciduales son CD3⁻ CD56⁺, CD16⁻ y CD9⁺, mientras que las NK periféricas son CD3⁻ CD56⁺, CD16^{-/+} y CD9⁻. No se encontraron diferencias en el porcentaje de células NK, cuando se compararon ambos grupos.

El predominio de genes activadores en las mujeres control (Act/Inh=0.6-1.1), indica que pueden conferirles un papel protector; sin embargo, los genotipos inhibidores no parecen ser factores totalmente determinantes para la predisposición a la PE (control, 68.6% vs. PE, 54.4%; $p=0.05$).

La presencia de células NK al final de la gestación, sugiere que podrían tener un papel importante durante todo el embarazo. La falta de un predominio de genes activadores o un balance inhibitor podría participar en la predisposición a PE.

Abstract

Interactions between decidual leucocytes and the extravillous cytotrophoblast are essential events in normal spiral artery remodeling during pregnancy. Alterations in these processes have been associated with preeclampsia (PE), a pregnancy multisystem disorder of unknown etiology characterized by hypertension and/or proteinuria. During the first trimester of gestation NK cells are the most abundant lymphocyte population in the decidua (dNK). However, term dNK cells and their participation in PE have been scarcely studied and are not completely understood.

The aim of this work was to determine the proportion and phenotype of dNK cells at the end of pregnancy, in preeclamptic and healthy pregnant women. The functionality of NK cells depends on their receptors; one of the most important families is the immunoglobulin-like receptors (KIR) family. The *KIR* genotype of both groups was analyzed in order to determine the predisposing immunogenetic factors reported before in a Caucasian population.

The results indicate that dNK cells persist throughout pregnancy; this is shown by the fact that this population expresses the same cell surface markers (CD3, CD56⁺, CD16⁻ and CD9⁺) as dNK cells in early gestation. No differences in the percentage of dNK cells were found between PE and control groups.

Although the individual analysis of *KIR* genes did not show any differences in the frequency of inhibitory receptors between both groups, when the ratio of activating to inhibitory genes was compared, the overall gene balance was activating (Act/Inh=0.6-1.1) in the control group (control, 68.6 % vs. PE, 54.4%; $p=0.05$).

In this study, the persistence of dNK throughout pregnancy was demonstrated, suggesting that this subset of leucocytes may play a role at the end of pregnancy. The overall results indicate that a lack of predominance of *KIR* activating genes could lead to PE.

1. Introducción

El embarazo es uno de los eventos fisiológicos más complejo en los seres humanos; desde su nivel molecular, con la interacción entre células maternas y células del trofoblasto para la correcta implantación y formación de la placenta, hasta el tisular para su mantenimiento y término exitoso, con la comunicación entre órganos y sistemas para la adecuada formación y nutrición del feto, sin comprometer el funcionamiento de éstos en la madre. Sin embargo, a pesar de su alto grado de organización, no está exento de complicaciones que pueden poner en riesgo tanto la vida y salud de la madre como la del producto, afectando así el proceso reproductivo.

Dentro de las complicaciones más severas que pueden presentarse está la preeclampsia (PE), un trastorno multisistémico de etiología desconocida que constituye uno de los principales problemas de salud materna a nivel mundial, debido a su alto índice de morbilidad y mortalidad en diversos países incluido México. Los signos y síntomas clínicos que pueden desarrollar las mujeres con PE son heterogéneos y con diferentes grados de severidad, lo que complica su diagnóstico y tratamiento efectivo [Sibai *et al.* 2005].

Para tratar de explicar la etiología de la PE, se han propuesto varias hipótesis y todas ellas toman en cuenta tanto factores maternos como fetales, ya sea genéticos, angiogénicos e inmunológicos, durante la formación de la placenta. Basados en la teoría de reconocimiento de lo propio y lo no propio del sistema inmunológico, propuesto en 1960 por Burnet y Medawar, el embarazo se considera una “paradoja inmunológica”; el embrión debiera ser rechazado como en el caso de un trasplante alogénico [Medawar 1956]. A partir de este concepto, se han desarrollado otras ideas que indican que el embarazo no es un caso sencillo de aceptación o rechazo de un injerto y que el sistema inmune uterino materno juega un papel predominante, no sólo en la aceptación del feto sino también durante toda la gestación, por lo que cualquier alteración en sus funciones puede contribuir al desarrollo de PE [Moffet A & Loke W 2004].

Diversos estudios indican que el principal componente del sistema inmune uterino materno, durante la implantación y formación de la placenta, lo

constituyen células Natural Killer (NK), que sorprendentemente son poco citotóxicas y participan activamente en el proceso de remodelación vascular uterina [Jacob *et al.* 2006; Le Bouteiller & Tabiasco 2006]. Por otra parte, los análisis genéticos indican que los receptores de tipo inmunoglobulina de las células NK (KIR) en combinación con ciertos alotipos de los antígenos de histocompatibilidad (HLA) en el trofoblasto, podrían participar en la susceptibilidad a PE [Hiby *et al.* 2004].

Actualmente la PE representa un reto para la investigación biomédica, por lo tanto, comprender su etiología así como los mecanismos genéticos y moleculares que modulan el ambiente uterino durante el embarazo, es sin duda primordial para entender este problema grave de salud pública.

2. Antecedentes

2.1 Preeclampsia

2.1.1 Definición e importancia clínica

El término PE hace referencia a un síndrome multisistémico del embarazo que no es fácil definir, debido a que su etiología no está completamente dilucidada y a la falta de un marcador bioquímico adecuado para establecer su diagnóstico. Todas las definiciones que se le han dado hasta el momento, atienden a las características clínicas que se observan en las pacientes; sin embargo, hay que tomar en cuenta que dichas características suelen ser variables y con diferentes grados de severidad. El común denominador es que se trata de un trastorno hipertensivo, único del embarazo, que puede estar acompañado de proteinuria y que se presenta comúnmente a partir de la semana número 20 de la gestación [Sibai 2005; Young *et al.* 2010; Steegers *et al.* 2010].

Dependiendo de los datos de hipertensión, proteinuria y compromiso multisistémico, su clasificación clínica incluye una forma leve y una severa [ACOG 2002; Tuffnell 2006; SSA 2007] (Tabla 1), sin embargo también puede presentarse una forma atípica si no se manifiesta alguno de los signos antes mencionados, se reporta que en un 20% de las mujeres que presentan PE atípica no hay datos de proteinuria o bien estos son mínimos, lo que complica aún más el diagnóstico [Sibai 2008].

Tabla 1. Criterios de clasificación y diagnóstico (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2010).

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

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

** Recolección de orina de 24 hrs.

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

• Se requiere uno o más de los criterios enlistados.

La PE es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y perinatal a nivel mundial, se presenta en un 3 al 5% de todos los embarazos [Young *et al.* 2010] y en países en vías de desarrollo constituye la principal causa de muerte materna (> 25%) [Khan *et al.* 2006; Chandiramani & Shennan 2008]. En el mundo mueren anualmente 50,000 mujeres por PE [Lain & Roberts 2002], la Organización Mundial de la Salud reporta que cada 7 minutos muere una mujer por esta causa [Von Dadalszen & Magee 2008]. En México, de acuerdo a la Secretaria de Salud, la PE representa hasta un 34% del total de las muertes maternas, por lo que constituye la principal causa de muerte asociada a complicaciones del embarazo [SSA 2007].

Diversos estudios clínicos y epidemiológicos, han asociado varios factores de riesgo para que una mujer pueda padecer PE; entre ellos destacan: primigravidez, historia personal o familiar de PE, primi-paternidad, obesidad, embarazo a edades tempranas o tardías, hipertensión crónica y enfermedad

renal, entre otras. Además, el haber padecido PE también se considera un fuerte factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares subsecuentes, tanto para la madre como para el producto [Sibai *et al.* 2005].

Dentro de las principales complicaciones en esta enfermedad están, la eclampsia (<1%) definida como el desarrollo de crisis convulsivas en pacientes con signos y síntomas de PE, el síndrome de HELLP (hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y trombocitopenia, 10-20%), la coagulación intravascular diseminada (10%), el edema agudo pulmonar cardiogénico (2-5%), la insuficiencia renal aguda (1-5%), la insuficiencia hepática (<1%), la insuficiencia cardíaca y el edema cerebral [Barton & Sibai 2008].

En la actualidad y a pesar de la gran cantidad de investigación que se ha hecho al respecto, el único tratamiento efectivo es la interrupción oportuna del embarazo.

2.1.2 Fisiopatología

La PE es probablemente una de las enfermedades más complejas del embarazo, con manifestaciones en todos los aparatos y sistemas del binomio feto-materno, en los que se observan datos clínicos y de laboratorio heterogéneos. Su patogénesis está caracterizada por hipoperfusión tisular generalizada, aumento en las resistencias vasculares periféricas, daño endotelial, cambios metabólicos, consumo plaquetario, aumento en la respuesta inflamatoria, activación del sistema de coagulación y una respuesta vascular anormal placentaria [Sibai *et al.* 2005; Dekker & Robillard 2005; Young *et al.* 2010].

Los análisis histopatológicos de órganos como hígado y corazón, muestran zonas de infarto y necrosis; en el riñón, la glomérulo-endoteliosis, término que describe los cambios estructurales que sufre el glomérulo, tales como vacuolización, distensión, pérdida del espacio capilar y de la superficie de filtración, es una de las características que pueden detectarse [Stillman & Karumanchi 2007].

Aparentemente, la placenta tiene un papel fundamental en su patogénesis,

en gran parte debido a que los signos y síntomas clínicos desaparecen una vez que se interrumpe el embarazo [Kopcow & Karumanchi 2007], pero además a que la PE se caracteriza por un desarrollo deficiente de este órgano, algunas veces con zonas de aterosclerosis, depósitos de fibrina y áreas con necrosis [Salafia *et al.* 1998].

2.1.3 Etiología de la preeclampsia: remodelación arterial uterina durante la formación de la placenta

La placenta es el órgano del que depende en gran medida el éxito del embarazo, por lo tanto los eventos moleculares iniciales que permiten su formación son objeto de interés para comprender la etiología de la PE. Una vez que se lleva a cabo la fecundación, las células embrionarias comienzan un proceso activo de diferenciación y proliferación. Las células de la capa externa del blastocisto, también llamadas células de trofoblasto, darán lugar a la placenta. Aproximadamente una semana después de la implantación embrionaria, la placenta está compuesta por una capa de mesodermo extraembrionario y dos poblaciones celulares de trofoblasto: el citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto [Burton *et al.* 2006].

El desarrollo posterior de la placenta involucra una serie de cambios en el trofoblasto que permiten su invasión al útero materno (Figura 1); las vellosidades primarias se forman gracias a la formación de puentes entre el sincitiotrofoblasto con células del citotrofoblasto, cuando se llenan de células mesenquimales forman las vellosidades secundarias. Al principio de la tercera semana de desarrollo, las células mesenquimales de las vellosidades secundarias se transforman en células hemangiogénicas (vellosidades terciarias). Estas estructuras son un punto angular para el desarrollo de la vasculatura de la placenta, proceso que se lleva a cabo por vasculogénesis (formación *de-novo* de pequeños vasos a partir de células pluripotentes mesenquimales), angiogénesis (formación de nuevos vasos a partir de pre-existentes) y neo-vasculogénesis (remodelación de las arterias pre-existentes) [Huppertz & Peeters 2005; Kopcow & Karumanchi 2007].

En la remodelación arterial uterina, las células del citotrofoblasto extraveloso (llamadas así por su localización), migran hacia el estroma endometrial hasta rodear las arterias espirales, para finalmente penetrar en las arterias hasta el primer tercio del miometrio (trofoblasto invasor) y reemplazar la capa endotelial de estos vasos sanguíneos (trofoblasto endovascular), convirtiendo así arterias de bajo calibre y alta resistencia en arterias de alto calibre y baja resistencia. Este proceso es indispensable para la perfusión adecuada de la placenta, sobre todo durante el tercer trimestre del embarazo cuando la demanda de nutrientes al feto se incrementa considerablemente [Zhou *et al.* 1997b; Knobil & Neill's 2006; Pijnenborg *et al.* 2006].

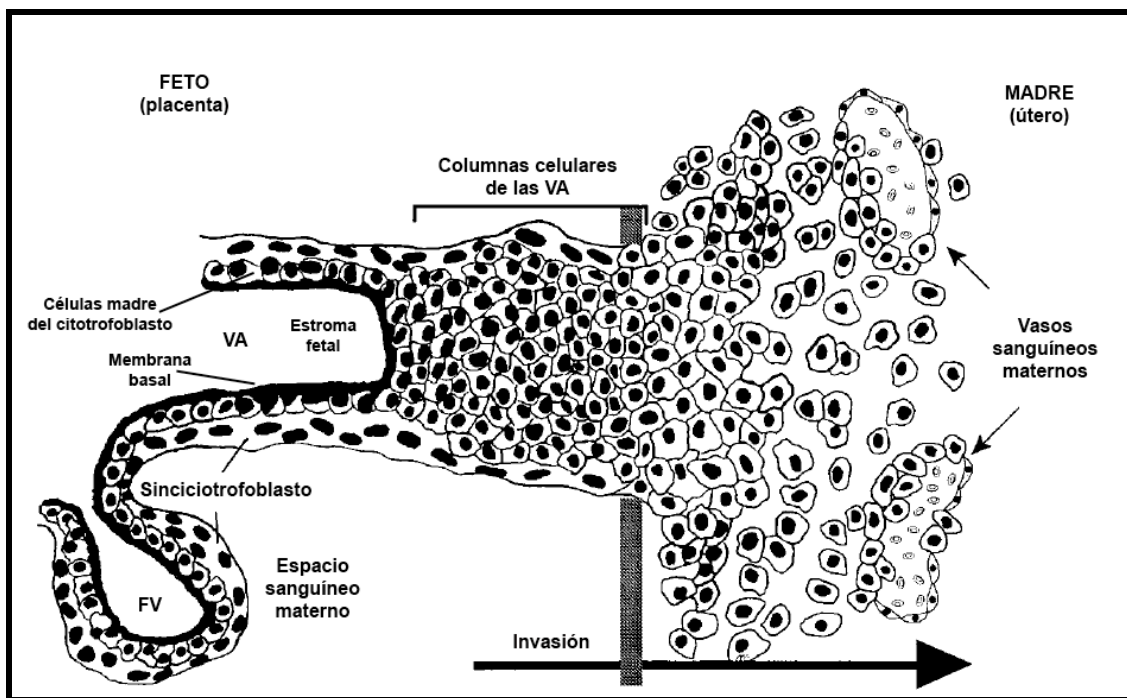


Figura 1. Diagrama de una vellosidad coriónica en la interface materno-fetal. Durante las primeras semanas de la gestación, las células del trofoblasto se diferencian y migran hacia la decidua materna. El citotrofoblasto en las vellosidades de anclaje (VA), forma columnas celulares, invade el intersticio y la primera porción del miometrio hasta alcanzar la vasculatura materna, de tal manera que ancla la placenta y facilita la perfusión. La región arterial endometrial y miometrial son modificadas progresivamente, por lo que los diámetros arteriales se vuelven mayores. Modificada de Zhou *et al.* 1997b.

Los factores angiogénicos son indispensables para el desarrollo normal de la placenta, principalmente en procesos como proliferación, vascularización y migración de las células del trofoblasto hacia la región materna; los patrones de expresión de algunos con funciones fundamentales como VEGF (factor de crecimiento vascular), sus receptores VEGFR-1 (Flt1) y VEGFR-2, angiopoyetina (ANG) y el PLGF (factor de crecimiento placentario), se han descrito ampliamente durante toda la gestación [Clark *et al.* 1996; Kopcow & Karumanchi 2007]. El VEGF se ha encontrado expresado en células del citotrofoblasto [Clark *et al.* 1996], células de Hofbauer (macrófagos placentarios) [Cooper *et al.* 1995], y células NK [Li *et al.* 2001; Lash *et al.* 2006], durante las etapas tempranas de la formación placentaria.

La expresión de los factores angiogénicos y sus receptores, está perfectamente orquestada y la liberación de moléculas inhibitoras y estimuladoras como son citocinas, quimiocinas y hormonas, promueven un balance por el cual el proceso de formación de la placenta puede llevarse a cabo [Kopcow & Karumanchi 2007]. En este sentido, la capacidad funcional de la placenta está ligada a la diferenciación del trofoblasto y a su capacidad de invadir el útero materno. La hipoperfusión placentaria observada en la PE, puede explicarse gracias a la deficiente invasión endovascular del trofoblasto y la remodelación inadecuada de las arterias espirales de la decidua y el miometrio, como lo demuestran los estudios realizados por Zhou y cols. (1993 y 1997a), lo que genera hipoperfusión placentaria, isquemia, estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria exacerbada, que paulatinamente llevan a los signos y síntomas clínicos observados en las pacientes [Redman *et al.* 1999; Davison 2004].

2.2 La teoría inmunológica de la preeclampsia

2.2.1 Importancia de las células NK en la gestación

La respuesta inmune materna durante el embarazo, ha sido un gran reto de estudio para los inmunólogos y los especialistas de la reproducción, pues desde

el punto de vista estricto, el feto es un agente extraño a la madre que debería ser rechazado por el sistema inmune [Medawar 1956; Moffet & Loke 2004]. Las respuestas encontradas para resolver este paradigma involucran mecanismos biológicos que ocurren en la interfase materno-fetal, en donde tanto las células del trofoblasto como las de la decidua contribuyen a la implantación embrionaria y a la formación de la placenta.

Durante la formación de la placenta, las células de la decidua (capa endometrial funcional durante la gestación) entran en contacto estrecho con las células del trofoblasto, especialmente cuando se lleva a cabo el proceso de invasión y remodelación arterial, el sistema inmune uterino materno, es por lo tanto un elemento clave para entender este proceso. En la etapa de implantación embrionaria, se observa que las células NK constituyen el mayor porcentaje de los leucocitos presentes en la decidua (hasta el 70%) [Bulmer *et al.* 1991; Moffet-King 1991]; a pesar de que algunos autores indican que esta población celular desaparece al final del embarazo [Bulmer *et al.* 1991; Moffet-King 2002], otros han identificado y aislado células NK a partir de tejido decidual de mujeres con embarazos a término [Abadía-Molina *et al.* 1996, 1997; Sindram-Trujillo *et al.* 2004; Poehlmann *et al.* 2006; Williams *et al.* 2009a,b].

Aunque las funciones precisas de las células NK deciduales (dNK) aún no son completamente conocidas, Hanna Jacob y cols. demostraron recientemente, mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, que participan en la remodelación de las arterias espirales uterinas, al promover la angiogénesis en los sitios de implantación del embrión. En contacto con células del trofoblasto, estas células son capaces de secretar factores angiogénicos (VEGF y PLGF) y factores quimiotácticos (IL-8, IP-10, y Eotaxina-1) necesarios para la migración del trofoblasto hacia la decidua [Hanna *et al.* 2006].

Estudios más recientes proponen que la participación de las células dNK en la remodelación arterial uterina, puede ocurrir incluso antes de su interacción con células del trofoblasto, mediante la inducción de apoptosis del músculo liso vascular y a través de la inducción de la degradación de la matriz extracelular [Smith *et al.* 2009].

2.2.2 Células NK deciduales: subtipo único

Las células NK se identificaron inicialmente por Kiessling y cols. (1975), como células citotóxicas efectoras del sistema inmune innato, con capacidad de lisar a sus células blanco sin necesidad de contacto previo. Actualmente, se conoce ampliamente su participación en la respuesta contra células tumorales y contra células infectadas por virus; sin embargo, esta caracterización inicial que dio origen a su nombre, dejó de lado por mucho tiempo las funciones no citotóxicas de las células NK y que involucran funciones fisiológicas que van más allá de su participación como células citotóxicas.

Las células NK representan hasta el 10% de los linfocitos de sangre periférica, se encuentran en varios tejidos incluyendo la decidua [Vivier 2006] y se caracterizan por la expresión de los marcadores de superficie CD56, CD16 y por la ausencia de receptores para antígeno (de allí su clasificación como parte del sistema inmune innato). Pueden ser subdivididas en dos poblaciones basadas en la densidad del marcador CD56 (brigth-fuerte o dim-medio). Del 90% al 95% de las células NK circulantes (pNK) pertenecen al fenotipo CD56^{dim} CD16⁺ y son altamente citotóxicas; mientras que el resto son CD56^{bright} CD16⁻, que contienen menos gránulos citotóxicos y son muy eficientes en la secreción de citocinas, especialmente IFN- γ [Cooper 2001; Di Santo 2008; Poli *et al.* 2009].

En la decidua se han caracterizado células NK principalmente en la gestación temprana, que son CD56^{bright} CD16⁻, muy eficientes en la secreción de citocinas y poco citotóxicas a pesar de contar con un alto contenido de gránulos citotóxicos en su citoplasma [Croy *et al.* 2003; Bulmer & Lash 2005; Hanna *et al.* 2006]. La baja citotoxicidad de estas células se atribuye al efecto inhibitor que ejercen moléculas de histocompatibilidad (HLA-G) expresadas en el trofoblasto [Poehlmann *et al.* 2006]; sin embargo, Kopcow y cols. (2005) sugieren que esta característica se debe a que las células NK de la decidua no forman sinapsis activadoras maduras, ni polarizan los centros organizadores de microtúbulos con los gránulos citotóxicos hacia esas sinapsis.

Los ensayos con microarreglos genéticos, en donde se comparan los genes expresados de células NK obtenidas de sangre periférica (pNK) contra células NK obtenidas a partir de tejido decidual (dNK), demuestran que hay genes que se expresan exclusivamente en las células dNK, como son los que codifican para los marcadores de membrana CD9, CD151, CD53, integrina $\alpha 4\beta 7$ y algunos otros relacionados con angiogénesis están sobre-expresados (VGF, PLGF); lo que sugiere fuertemente que las células dNK son una subpoblación con características y funciones diferentes a las sub-poblaciones de células pNK [Koopman *et al.* 2006].

2.3 Receptores KIR

2.3.1 Características de los receptores KIR

Las funciones de las células NK, ya sean citotóxicas o no, están reguladas por un balance entre señales inhibitoras y activadoras a través de un repertorio de receptores con una gran complejidad genética [Bashirova *et al.* 2006]. Aunque ni los ligandos ni el modo directo de acción de muchos de éstos es conocido, se acepta que las células normales están protegidas de la citotoxicidad de las células NK, cuando expresan un ligando apropiado para el receptor inhibitor de éstas. Generalmente ese ligando pertenece a moléculas HLA clase I (teoría de reconocimiento a través de “falta de lo propio”) [Ljunggren & Karre 1990].

Los receptores de las células NK pertenecen a distintas familias estructurales: de tipo Inmunoglobulina (KIR), heterodiméricos de lectina tipo C (CD94/NKG), transcritos del tipo inmunoglobulina (ILT) y receptores citotóxicos de células NK (NCR). Estos últimos sólo contienen receptores activadores (NKp46, NKp44 y NKp30) cuyos ligandos no están completamente estudiados, y son los receptores que están más involucrados con la citotoxicidad de las células NK [Moretta *et al.* 1996].

Los receptores KIR son 14 proteínas diferentes, que se nombran con base

en sus características estructurales; los que tienen dos dominios extracelulares son llamados 2D, los que cuentan con tres dominios extracelulares son llamados 3D. Funcionalmente, se dividen en receptores inhibidores o activadores, dependiendo de su dominio intra-citoplásmico; los que tienen un dominio intra-citoplásmico largo (L) transducen señales inhibitorias a través de inmuno-receptores con motivos de inhibición basados en tirosinas (ITIM), en tanto que los que cuentan con un dominio intra-citoplásmico corto (S), transducen señales de activación gracias a que se asocian a la proteína adaptadora DAP-12, la cual contiene inmuno-receptores con motivos activadores basados en tirosinas (ITAM) [Carrington & Norman 2003; Bashirova *et al.* 2006].

La familia de receptores KIR es la que cuenta con mayor diversidad genética (por lo tanto le confiere una capacidad de reconocimiento muy amplia a las células NK), se encuentra localizada en el cromosoma 19q 13.4, dentro del complejo de receptores de leucocitos (LCR) y cuenta con 14 genes y 2 pseudogenes, que muestran frecuencias diferentes dependiendo de la población analizada [Gonzalez-Galarza *et al.* 2011]. Basados en estudios poblacionales, el orden de los genes *KIR* a lo largo del cromosoma ha determinado principalmente dos haplotipos distintos:

-Haplotipo A. Contiene un solo gen activador: *2DS4*

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

Los genes *KIR* están arreglados en tandem y cuentan con una característica importante y es que el contenido de genes varía entre haplotipos, ya que la variación en el locus *KIR* es una combinación del polimorfismo alélico con el número y tipos de genes presentes en un haplotipo dado. Los genes *2DL4*, *3DP1*, *3DL2* y *3DL3* y los pseudogenes *2DP1* y *3DP1* están presentes en ambos haplotipos y se piensa que son indispensables en la generación de diversidad de todos los haplotipos determinados hasta el momento (Figura 2) [Trowsdale *et al.* 2001; Carrington & Norman 2003; Moretta & Moretta 2004; Bashirova *et al.* 2006].

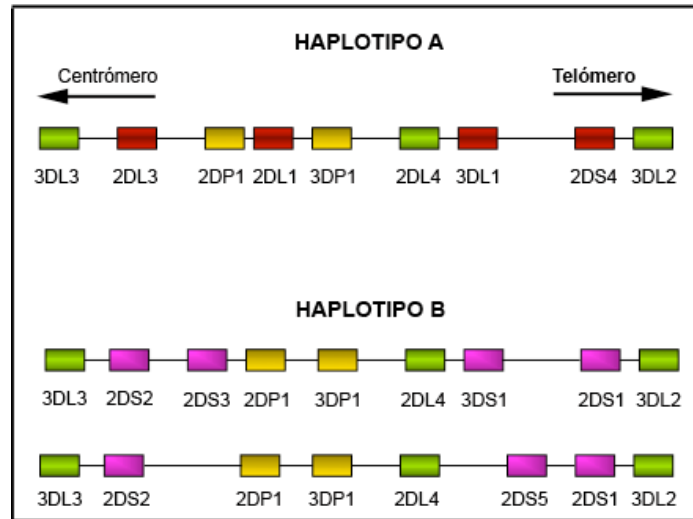


Figura 2. Arreglo característico de los dos principales haplotipos de los genes para receptores KIR. El haplotipo A, contiene sólo un gen activador, *KIR2DS4*. El haplotipo B contiene diferentes combinaciones de genes activadores. En verde se muestran los genes que pertenecen a ambos haplotipos; en amarillo los pseudogenes (presentes en ambos haplotipos); en rojo se muestran los genes inhibidores (*KIR2DS4* está en rojo porque es el único gen activador del haplotipo A) y en rosa los genes de tipo activador.

2.3.2 Ligandos para receptores KIR: moléculas de histocompatibilidad (HLA)

Los principales ligandos conocidos para los receptores KIR son moléculas de HLA clase I (Tabla 2), que se encuentran codificados en la región del genoma conocida como Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), localizada en el brazo corto del cromosoma 6(p21.3), sus productos se expresan como caracteres autosómicos codominantes y se heredan en forma mendeliana. La región del sistema HLA comprende 6 *loci* que codifican para proteínas estructuralmente homólogas y están clasificadas como clase I, clase II y clase III, de acuerdo a las propiedades de sus productos génicos, los cuales difieren en su estructura química, su distribución tisular y su función [Janeway *et al.* 2001].

Los antígenos clase I, se encuentran en la región más telómerica del MHC, que cuenta con aproximadamente 19 genes relacionados entre sí. Las moléculas HLA-I clásicas son HLA-A, -B, -C y las no clásicas son HLA-E, -F, -G. Las moléculas HLA-I clásicas son glicoproteínas que se expresan en la membrana de todas las células corporales, excepto en las neuronas y es difícil

detectarlas en eritrocitos; las moléculas no clásicas se distribuyen de manera específica, por ejemplo, el HLA-G se expresa principalmente en subpoblaciones del trofoblasto, el HLA-E en eosinófilos e hígado fetal y el HLA-F sólo se encuentra en hígado fetal [Apps *et al.* 2002; Tiercy 2002].

Tanto las moléculas HLA clásicas como las no clásicas están conformadas por una cadena pesada α , que es una glicoproteína polimórfica (se han descrito hasta la fecha más de 300 alelos), transmembranal de 45 kDa, codificada en la región HLA clase I, y una cadena ligera β , que es una glicoproteína monomórfica de 12 kDa (β 2-microglobulina) codificada por un gen del cromosoma 15. La cadena pesada α consta de tres dominios externos (α 1, α 2 y α 3), los dominios α 1 y α 2, contienen los residuos polimórficos y conforman el sitio de unión al antígeno, el dominio α 3 es muy conservado. Las moléculas clase I no clásicas, HLA-E, -F y -G, tienen un polimorfismo más limitado que las moléculas clase I clásicas [Tiercy 2002].

La nomenclatura del sistema HLA, está determinada por los talleres Internacionales de Histocompatibilidad [Marsh 2010], pero en muchos casos se utiliza la nomenclatura de acuerdo a la tipificación serológica, todos los alelos que codifican para determinantes antígenos comunes pueden agruparse, para el HLA-B se han distinguido dos grandes grupos HLA-Bw4 y HLA-Bw6. Para el HLA-C, todos los alelos que pertenecen al HLA-C1, codifican para una lisina en la posición 80 de la cadena α y todos los que codifican para una asparagina en la misma posición, pertenecen al HLA-C2. Ejemplos de alelos pertenecientes al grupo 1 son *Cw01, Cw03, Cw07, Cw08* y para el grupo 2, *Cw02, Cw05, Cw06, Cw07*, entre otros [Colonna *et al.* 1993; Boyton *et al.* 2006].

En general los receptores KIR2D reconocen moléculas codificadas por alelos del HLA-C, en tanto que los receptores KIR3D reconocen moléculas codificadas por alelos del HLA-A y HLA-B; el análisis realizado a los cristales de KIR2DL2 en interacción con HLA-Cw3 y de KIR2DL1 con HLA-Cw4, muestra que los receptores KIR se unen a su ligando en las cadenas α 1 y α 2 de la porción carboxilo terminal de la proteína (D1 con α 1 y D2 con α 2) [Den Lu & Mariuzza 2006].

Debido a la gran variedad de combinaciones que se alcanzan con la interacción de receptores y ligandos altamente polimórficos, este sistema ha sido adoptado en muchas ocasiones para realizar estudios de asociación genética con diversas enfermedades como infecciones, cáncer, enfermedades autoinmunes, VIH, entre otras, por lo que su utilidad clínica continúa en aumento [Khakoo & Carrington 2006]. En el trofoblasto se ha detectado la expresión de HLA-E, HLA-G y HLA-C (este último es el único HLA altamente polimórfico expresado en tejido trofoblástico), todos ellos con capacidad de modular la función de las células dNK [Le Boutellier & Sargent 1998]. Por ejemplo, la interacción de KIR 2DL4 con HLA-G en las células dNK, induce la liberación de IFN- γ [Goodridge & Lathbury *et al.* 2009], aunque no se ha encontrado asociación entre polimorfismos del gen *2DL4* con la susceptibilidad a PE [Witt *et al.* 2009].

Tabla 2. Ligandos para receptores KIR [Kulkarni *et al.* 2008]

Receptor	Función	Ligando
2DL1 y 2DS1	L, inhibidor, S, activador	HLA-C grupo 2 (Lys 80)*
2DL2/3 y 2DS2	L, inhibidor, S, activador	HLA-C grupo 1 (Asn 80)*
3DL1/3DS1	L, inhibidor, S, activador	HLA-B, Bw4
3DL2	Inhibidor	HLA-A
2DL4	Inhibidor	HLA-G
2DS4	Activador	HLA-C, grupo 1 (Cw04)

* De acuerdo a la posición 80 en la cadena α -hélice del HLA-C, pueden distinguirse dos alotipos. Todos los alelos que codifiquen para una lisina en la posición 80 pertenecen al grupo 1. Todos los alelos que codifican para una asparagina pertenecen al grupo 2.

2.3.3 Interacciones KIR-HLA y su implicación en la preeclampsia

Un estudio realizado en población caucásica, que comparó el genotipo de receptores KIR en mujeres con embarazos normales y en mujeres con PE, encontró que la combinación del genotipo AA (inhibidor), específicamente la presencia del gen *2DL1* en las mujeres con PE, en combinación con el *HLA-C2* en sus bebés, aumentaba la prevalencia de PE hasta en un 50%. Ya que esta interacción es considerada una fuerte señal inhibidora [Varla-Leftherioti 2004], se

considera que es la inhibición y no la activación de las células NK la que predispone a la PE, de tal manera que las células no podrían participar en la remodelación arterial uterina al estar inhibidas y proponen que, por el contrario, la presencia de receptores activadores podría ser protectora para la enfermedad [Hiby *et al.* 2004].

La respuesta inmune en la decidua materna en pacientes con PE depende en gran medida de la capacidad de reconocimiento de las células NK, de sus receptores KIR, de sus genotipos y de los ligandos en el trofoblasto que puedan reconocerse en el ambiente uterino durante las etapas críticas de la remodelación arterial uterina [Hanna & Mandelboim 2007].

3. Justificación

La presencia de células NK al final del embarazo, el aumento o disminución de esta población celular en la decidua de mujeres con PE, ha sido un tema controversial y poco claro, por lo que determinar la presencia de estas células en la decidua de mujeres con PE y compararla con las encontradas en mujeres con embarazos normo-evolutivos es necesario para entender la posible participación de las células NK en la patogénesis de la PE.

Si bien, su participación se ha inferido mediante estudios de asociación genética en donde están involucrados los receptores KIR, hasta el momento sólo se ha realizado un estudio en población caucásica, enfocado a conocer los genotipos de receptores KIR de mayor frecuencia en mujeres con PE, así como su relación con el ligando HLA-C. Debido a la complejidad inherente de los genes *KIR*, a la diversidad poblacional que presentan y a las características genéticas particulares de la población mexicana, es de gran importancia conocer los genotipos *KIR* asociados al desarrollo de PE en nuestra población.

4. Hipótesis

Las células NK tienen una participación fundamental en la remodelación de las arterias espirales uterinas durante el embarazo, por lo que las células NK estarán presentes desde el inicio hasta el final de la gestación y tendrán un fenotipo similar a las de la gestación temprana.

Por otro lado, la actividad de las NK depende del balance entre la expresión de sus receptores activadores e inhibidores, por lo que si están asociados a la PE, existirá un desbalance entre estos genes en las pacientes con PE.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Analizar la existencia de células NK en la decidua durante el tercer trimestre del embarazo y determinar el genotipo de los *KIR* en pacientes con PE.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar y caracterizar la presencia de células dNK al final del embarazo en mujeres con embarazos normo-evolutivos y comparar sus marcadores de membrana con las células dNK obtenidas de embarazos de mujeres con PE.
2. Tipificar y evaluar la frecuencia los genes para los KIR en mujeres con embarazos normo-evolutivos y en mujeres con PE.

6. Materiales y Métodos

6.1 Población de estudio y muestras biológicas

El presente trabajo se realizó mediante un diseño de estudio observacional, prospectivo, de casos y controles. El grupo de casos (PE) se conformó con pacientes del Hospital de Ginecología y Obstetricia número 4 del IMSS, "Luis Castelazo Ayala", que se diagnosticaron con PE bajo los criterios definidos en la Tabla 1, sección de antecedentes. El grupo control estuvo formado por mujeres con embarazos normo-evolutivos de término.

Para estimar la frecuencia y los genotipos de *KIR*, se utilizó material genético (DNA) de 86 mujeres incluidas en el grupo control y 90 pacientes con PE. Para el análisis de poblaciones leucocitarias en la decidua, se utilizó tejido decidual de 10 mujeres del grupo control y 9 pacientes con PE.

Se registraron las características clínicas de cada grupo de estudio y se tomaron las muestras biológicas adecuadas (Anexo 1).

Se utilizaron los siguientes criterios de exclusión en ambos grupos:

- a) Pacientes con enfermedad sistémica crónica como lupus eritematoso sistémico, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, glomerulonefritis, epilepsia, diabetes, hipertensión arterial sistémica crónica; así como padecimientos hematológicos como: púrpura trombocitopenia idiopática, púrpura trombocitopenia trombótica.

El comité de ética del Hospital aprobó la realización de este estudio. Todas las pacientes aceptaron participar firmando la Hoja de Consentimiento pertinente.

6.2 Aislamiento de leucocitos deciduales y Citometría de Flujo

Durante la cirugía cesárea se obtuvieron fragmentos compactos de tejido decidual, se lavaron exhaustivamente (al menos tres veces) con PBS 1X y pH 7.45, estéril (PBS), para evitar su contaminación por células provenientes de sangre. Posteriormente, se digirieron mecánica y enzimáticamente; secciones de

aproximadamente 1 mm de tamaño, se colocaron en medio RPMI 1640 con 0.1% de colagenasa tipo IV y 0.2% de hialuronidasa tipo I-S (Sigma Chemical) y se incubaron por 1 h a 37⁰ C, con agitación suave.

La suspensión resultante se filtró con una malla de 70 μm (BD-Labware), se lavaron con medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y se separaron células mononucleares por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical), centrifugando a temperatura ambiente por 25 min y 600 g. Se colectaron las células de la interfase, se lavaron, contaron y resuspendieron en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 UI/ mL de penicilina, 100 UI/ mL de estreptomicina y 0.25 μg / mL de anfotericina B (Gibco BRL)

Se analizó por Citometría de Flujo, con tinción directa para marcaje simple o doble, utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales: CD3 (HIT3a-FITC) y CD16 (DJ130c-FITC) de Santa Cruz; CD56 (N-CAM, MEM 188-Phycoerythrin) y CD9 (OKT-FITC) de e-Bioscience. Para la tinción triple se usó adicionalmente el anticuerpo para CD3 marcado con PerCP (clona SK7) de la compañía BD.

Se colocaron 1×10^6 células por cada muestra, que se resuspendieron en 300 μL de solución PBS con Azida de sodio al 0.1% (PBS/Azida), se incubaron con 10 ó 20 μL del anticuerpo por 30 min a 4⁰ C, en la oscuridad. Después de dos lavados con PBS/Azida y un lavado con PBS, las células se fijaron con paraformaldehído al 1% por 20 min a 4⁰ C, en la oscuridad. Después de un lavado con PBS, las células fueron resuspendidas y analizadas en el Citómetro de Flujo FACSCalibur (BD).

Para poder diferenciar las características cualitativas entre marcadores de membrana de los leucocitos aislados de decidua, con respecto a células mononucleares de sangre periférica (PBMC), se analizó la población de células dobles positivas para CD56 y CD9. Con el fin de excluir del análisis a las células $\text{CD3}^+ \text{CD56}^+ \text{CD9}^+$ y usando una tinción triple, se separaron las células CD3^- para evaluar su tinción con los anticuerpos CD56 y CD9. Los datos se capturaron y analizados con el Software de BD Cell QuestTM.

El marcador CD3 se utilizó para la identificación de linfocitos T, el marcador CD56 y CD16 para la identificación de células NK (fenotipo $\text{CD3}^- / \text{CD56}^+ \text{CD16}^{+/-}$),

finalmente el marcador CD9 nos ayudó a diferenciar células pNK (CD3⁻/CD56⁺CD16^{+/-} y CD9⁻) de células dNK (CD3⁻/CD56⁺CD16^{+/-} y CD9⁺).

6.3 Tipificación de genes para los receptores KIR.

A partir de 2 µg de DNA obtenido a partir de las muestras de sangre periférica, con el método de extracción con sales, se determinaron por presencia o ausencia del gen los genotipos para receptores KIR, en ambos grupos de estudio, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, utilizando oligonucleótidos de secuencia específica (PCR-SSP).

Se utilizó el método estandarizado por la compañía Miltenyi Biotec, el cual permite la detección de los 15 genes KIR conocidos. Para los receptores inhibidores: *2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*; para los receptores activadores: *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5*, *3DS1*. Permite la detección de 2 pseudo-genes (*2DP1* y *3DP1*) y diferenciar los genes *2DL5A* del *2DL5B*.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2%. Una banda del tamaño de peso molecular esperado en el gel indicó su presencia y la banda en 400 pb se utilizó como control interno de expresión ya que debía estar presente en todos los carriles para validar un proceso adecuado de amplificación.

Los análisis de segregación muestran que los genes *KIR 2DL5A* y *2DL5B* son dos genes distintos pero altamente relacionados, incluso pueden pertenecer al mismo haplotipo. Han sido los últimos genes KIR identificados. Para el caso de gen *2DS4*, *2DS4del* agrupa todos los alelos que tienen una delección de 22pb y que por lo tanto dan lugar a una molécula truncada no funcional, *2DS4ins* indica todos los alelos que no tienen esta delección [Carrington *et al.* 2003].

La frecuencia génica de cada receptor KIR, se determinó mediante conteo directo. El arreglo de los distintos genotipos encontrados se realizó de acuerdo al número de genes presentes y se registró la frecuencia de cada genotipo para ambos grupos de estudio. Con el fin de limitar el número de genotipos asignados, se tomó en cuenta la presencia de los genes *2DS4ins* y *2DS4del* de manera indistinta.

6.4 Análisis estadístico

Las poblaciones celulares analizadas por Citometría de Flujo se compararon utilizando una prueba de *t*-student; en el caso de no tener un comportamiento normal, se utilizó una prueba no paramétrica (*U*-Mann). Todos los valores de *p* menores o iguales a 0.05 se considerados significativos.

Las frecuencias génicas y las frecuencias de los genotipos en ambos grupos de estudio, se compararon utilizando tablas de contingencia de 2x2 y el estadístico *F* de Fisher. Se realizaron correcciones por comparaciones múltiples con la prueba de Bonferroni y se obtuvo el valor de *p* corregida (*pc*). Los valores menores o iguales a 0.05 se consideraron significativos. En todas las comparaciones se calculó la razón de momios (RM) y se usó un intervalo de confianza (IC) del 95%. El cálculo del tamaño de muestra se realizó para diferencia de proporciones, utilizando un poder estadístico del 80%.

Todos los datos se obtuvieron con el programa *Prism 5* (GraphPad Software, Inc.) para *Windows*.

7. Resultados

7.1 Leucocitos deciduales y Citometría de Flujo

Con el fin de determinar y caracterizar la presencia de células dNK al final del embarazo y compararlas entre el grupo control y el de PE, en la Figura 3 se muestran los histogramas representativos de Citometría de Flujo, en donde se observa la expresión de marcadores característicos de las células NK; CD3⁻ (excluye linfocitos T), CD56⁺, CD16^{+/-} (marcadores clásicos de células NK) y CD9⁺ (propuesto como un marcador exclusivo de células dNK [Mselle *et al.* 2007]). En la Tabla 3 se indica la proporción obtenida para las distintas subpoblaciones leucocitarias en las diferentes muestras analizadas para ambos grupos de estudio.

La Fig. 3A, 3E, 3H y 3L indica los controles negativos para la tinción. Para los leucocitos aislados de decidua, la Fig. 3B muestra los marcadores de membrana clásicos para células NK, CD56⁺ CD3⁻; la Fig. 3C, los marcadores CD56⁺CD16⁺ y CD56⁺CD16⁻; la Fig. 3I y 3J muestran el porcentaje obtenido para los mismos marcadores pero en células aisladas de sangre periférica (PBMC).

Cuando se analizó por tinción doble las células CD56⁺CD9⁺ (Fig. 3D y 3K), no se pudo concluir si pertenecían o no a células NK (dado que también deben ser CD3⁻); por lo que el análisis de tres colores fue de gran utilidad, ya que se seleccionaron aquellas células que fueron CD3⁻ y CD56⁺ (Fig. 3F, R1 y Fig. 3M, R2). De esta población celular se comparó la expresión del marcador CD9 y se observó que un 87% de las células obtenidas de tejido decidual, expresaban tanto el marcador CD56 como el CD9 (Fig. 3G), a diferencia de las PBMC en donde la mayoría (98%) fueron CD9⁻ (Fig. 3N).

Se obtuvieron porcentajes similares para ambos grupos de estudio, excepto cuando se analizó la tinción simple para células CD3⁺ (linfocitos T), en donde el grupo de mujeres con PE tiene una disminución estadísticamente significativa (controles, 54.15 ± 17.76% vs. PE, 30.95 ± 15.01%; $p < 0.05$, Tabla 3).

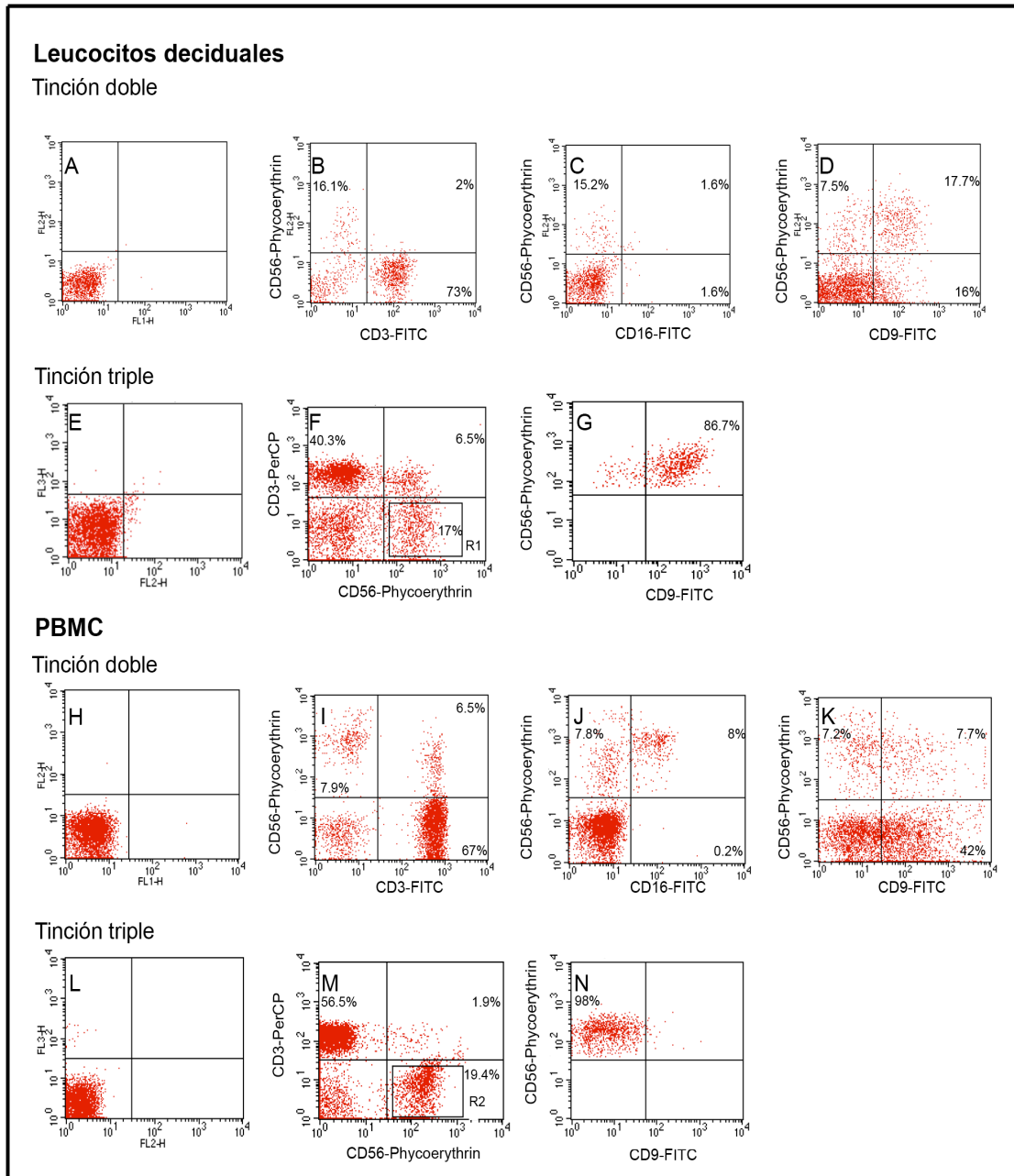


Figura 3. Histogramas representativos para la expresión de marcadores de células NK. A-D) Tinción doble para leucocitos deciduales; E-G) Tinción triple para leucocitos deciduales; H-K) Tinción doble para PBMC; L-M) Tinción triple para PBMC. A,E,H,L) Control negativo de tinción; B,I) Cuadrante superior izquierdo (UL): células CD56⁺ CD3⁻; C,J) UL: células CD56⁺ CD16⁻; Cuadrante superior derecho (UR): CD56⁺ CD16⁺; D,K) UR: CD56⁺ CD9⁺; F,M) R1 y R2, regiones para células CD3⁺; G,N) expresión de CD56⁺ CD9^{+/-}.

Tabla 3. Proporción de leucocitos deciduales en mujeres control y con preeclampsia (PE).

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

Los valores se presentan como %, +/- desviación estándar; ^a p<0.05

7.2 Tipificación de genes para *KIR*

La actividad de las células NK, depende en gran medida de las señales activadoras o inhibitoras que se manden al interior de la célula y por lo tanto de la variedad de receptores que se expresen en sus membranas, que puedan interactuar con los distintos ligandos en el ambiente uterino. Con el fin de conocer el repertorio genético de la familia de receptores *KIR* y comparar su frecuencia y distribución en las muestras de DNA de ambos grupos de estudio, se evaluó el contenido y variabilidad del locus *KIR* para cada paciente, los resultados de tipificación se observaron con geles de agarosa como el que se muestra en la Figura 4.

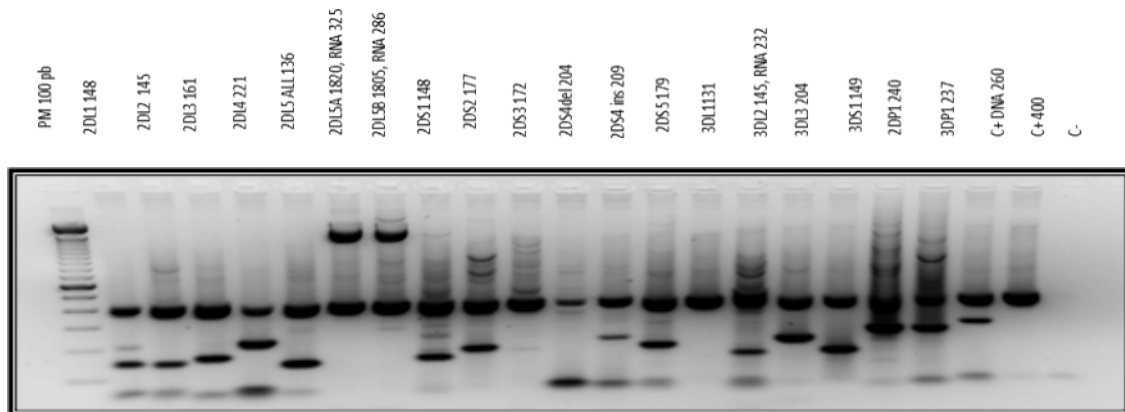


Figura 4. Gel representativo para los productos de PCR obtenidos de la tipificación a partir de DNA obtenido de muestras de sangre periférica. Una banda en el tamaño esperado indica la presencia del gen. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (PM), el penúltimo carril muestra el control positivo (C+) de amplificación en 400 pb, el último carril muestra el control negativo (C-).

La Tabla 4 muestra los valores obtenidos para las frecuencias génicas de *KIR* con los valores de *p* antes de la corrección estadística de Bonferroni. Los genes más teloméricos que delimitan el loci *KIR* (*2DL4* y *3DL3*), así como los dos pseudogenes (*2DP1* y *3DP1*) se detectaron en el 100% de las mujeres de ambos grupos. Los genes *3DL2*, *2DL1*, *3DL1* y *2DL3*, se encontraron entre un 90.7 y 98.9%, la frecuencia más baja se detectó para el gen *2DS3* (menos del 21%).

Las frecuencias para *KIR2DL2* (control, 61.6% vs. PE, 43.3%; $p=0.017$, $RM=0.47$, $IC\ 95\%=0.26$ a 0.86 ; $pc>0.05$, después de la corrección por comparaciones múltiples) y *2DL5 B* (control, 64.0% vs. PE, 48.9%; $p=0.049$, $RM=0.54$, $IC\ 95\%=0.23$ a 0.98 ; $pc>0.05$, después de la corrección estadística) a pesar de no ser menores significativamente en las mujeres con PE, son los únicos genes que tuvieron una *p* menor a 0.05 antes de la corrección estadística.

No se encontró asociación para los genes activadores (*2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4 del*, *2DS4 ins*, *2DS5* y *3DS1*) y la presencia de PE, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Tabla 4. Frecuencias para genes *KIR*

Gen <i>KIR</i>	Controles (n= 86)	PE (n= 90)	<i>p</i>
Inhibidores			
<i>2DL1</i>	96.5	98.9	0.360
<i>2DL2</i>	61.6	43.3	0.017 ^a
<i>2DL3</i>	94.2	95.6	0.743
<i>2DL4</i>	100.0	100.0	1.000
<i>2DL5 all</i>	61.6	47.8	0.071
<i>2DL5 A</i>	59.3	50.0	0.229
<i>2DL5 B</i>	64.0	48.9	0.049 ^b
<i>3DL1</i>	90.7	93.3	0.585
<i>3DL2</i>	97.7	95.6	0.683
<i>3DL3</i>	100.0	100.0	1.000
Activadores			
<i>2DS1</i>	58.1	47.8	0.178
<i>2DS2</i>	48.8	36.7	1.000
<i>2DS3</i>	20.9	18.9	0.851
<i>2DS4 del</i>	65.4	54.1	0.156
<i>2DS4 ins</i>	75.3	76.5	1.000
<i>2DS5</i>	53.3	43.3	0.287
<i>3DS1</i>	52.3	48.9	0.655
Pseudo genes			
<i>2DP1</i>	100.0	100.0	1.000
<i>3DP1</i>	100.0	100.0	1.000

Los valores se presentan como porcentajes.

Porcentaje de frecuencia. RM. Razón de momios. IC, Intervalo de confianza del 95%

^a $p<0.05$, $RM=0.47$, $IC\ 95\%=0.26$ a 0.86 ; $pc>0.05$

^b $p<0.05$, $RM=0.54$, $IC\ 95\%=0.23$ a 0.98 ; $pc>0.05$

Los valores de *p* fueron corregidos usando la corrección por Bonferroni para 19 comparaciones

En la Figura 5 se encuentran ordenados de mayor a menor complejidad en cuanto a contenido de genes, las 57 combinaciones diferentes encontradas para los genotipos de ambos grupos de estudio. En el genotipo asignado a cada muestra, se tomó en cuenta el número de genes KIR activadores e inhibidores, considerando para el haplotipo A, los genes KIR: *2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL5*, *2DS4* y *3DS1*. Para el haplotipo B: *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5* y *3DS1*. Los genes *2DL4*, *3DL2* y *3DL3*, así como los pseudogenes *2DP1* y *3DP1*, se consideraron como parte de ambos haplotipos. En las columnas de la derecha, se muestra la frecuencia relativa de los individuos que presentaron el genotipo determinado, los genotipos 48 a 57, que cuentan con el menor número de genes, contienen al menos un gen activador y seis o siete genes inhibidores. Los genotipos 23, 52 y 56 se detectaron con mayor frecuencia (10-15.6%), mientras que el resto de los genotipos se detectaron con baja frecuencia (0-8.3%) en ambas poblaciones de estudio.

Los genotipos 42 y 53, caracterizados por contener al gen *KIR2DL2*, fueron más frecuentes en el grupo control comparado con el de PE; sin embargo, esta diferencia no es significativa una vez que se aplica la corrección por Bonferroni para comparaciones múltiples. Lo mismo ocurre con el genotipo 52 (*KIR2DL2* negativo), que se encontró dos veces más frecuente en el grupo de PE que en el control, sin alcanzar significancia después de la corrección estadística.

Genotipo	KIR															Total (19)	S (7)	L (10)	Radio Act/Inh	Frecuencia (%) Control	Frecuencia (%) PE			
	2DL					2DS					3DL			3DS	2DP							3DP		
	1	2	3	4	5a	5A	5B	1	2	3	4del	4ins	5	1	2							3	1	1
1																			19	7	10	0.7	0.0	1.1
2																			18	6	10	0.6	3.6	2.2
3																			18	7	9	0.8	2.4	0.0
4																			18	6	10	0.6	1.2	0.0
5																			18	6	10	0.6	1.2	0.0
6																			17	5	10	0.5	8.3	6.7
7																			17	6	9	0.7	1.2	0.0
8																			17	5	10	0.5	1.2	0.0
9																			17	5	10	0.5	4.8	1.1
10																			17	6	9	0.7	1.2	0.0
11																			17	5	10	0.5	3.6	2.2
12																			17	5	10	0.5	1.2	0.0
13																			17	6	9	0.7	0.0	1.1
14																			17	6	9	0.7	1.2	0.0
15																			17	5	10	0.5	1.2	1.1
16																			16	4	10	0.4	2.4	2.2
17																			16	5	9	0.6	1.2	0.0
18																			16	5	9	0.6	2.4	5.6
19																			16	5	9	0.6	1.2	2.2
20																			16	4	10	0.4	2.4	1.1
21																			16	4	10	0.4	1.2	0.0
22																			16	5	9	0.6	0.0	1.1
23																			15	4	9	0.4	8.3	10.0
24																			15	5	8	0.6	0.0	1.1
25																			15	3	10	0.3	0.0	1.1
26																			15	4	9	0.4	0.0	1.1
27																			15	5	8	0.6	0.0	1.1
28																			15	4	9	0.4	1.2	0.0
29																			15	3	10	0.3	1.2	0.0
30																			15	3	10	0.3	0.0	1.1
31																			15	4	9	0.4	0.0	1.1
32																			15	4	9	0.4	1.2	0.0
33																			14	4	8	0.5	3.6	1.1
34																			14	4	8	0.5	1.2	0.0
35																			14	4	8	0.5	1.2	0.0
36																			13	4	7	0.6	0.0	2.2
37																			13	3	8	0.4	0.0	1.1
38																			13	4	7	0.6	0.0	1.1
39																			13	3	8	0.4	2.4	2.2
40																			13	4	7	0.6	0.0	1.1
41																			12	3	7	0.4	0.0	2.2
a 42																			12	3	7	0.4	7.1	0.0
43																			12	3	7	0.4	1.2	1.1
44																			12	3	7	0.4	0.0	1.1
45																			12	3	7	0.4	0.0	1.1
46																			12	3	7	0.4	1.2	0.0
47																			12	3	7	0.4	1.2	0.0
48																			11	2	7	0.3	1.2	0.0
49																			11	2	7	0.3	1.2	5.6
50																			11	2	7	0.3	1.2	1.1
51																			11	3	6	0.5	0.0	1.1
52																			10	2	6	0.3	8.3	15.6
b 53																			10	1	7	0.1	8.3	1.1
54																			10	2	6	0.3	0.0	1.1
55																			10	2	6	0.3	1.2	0.0
56																			9	1	6	0.2	7.1	13.3
57																			8	1	5	0.2	0.0	2.2

Figura 5. Genotipos encontrados en las muestras de las mujeres controles y con preeclampsia. Los cuadros oscuros indican la presencia del gen, los cuadros claros indican su ausencia. Los cuadros con tramas grises indican que se tomó la presencia de cualquiera de los dos genes para la asignación del genotipo. Las columnas de la derecha indican en número total de genes *KIR*, el número de genes activadores (S), el número de genes inhibidores (L), y el radio de genes Activadores/inhibidores. En las columnas de la derecha se muestra la frecuencia para cada genotipo. En la parte superior, los cuadros verdes indican los genes que están presentes en ambos haplotipos. Los cuadros rojos indican los genes que sólo pertenecen al haplotipo A y los cuadros rosas muestran los genes que pertenecen al haplotipo B. Los distintos genotipos encontrados, se encuentran ordenados de mayor a menor contenido de genes.

Los valores de p menores a 0.05 fueron corregidos para comparaciones múltiples.

^a $p=0.012$, $RM=0.067$, $IC\ 95\%=0.004$ a 1.204 ; $pc>0.05$

^b $p=0.03$, $RM=0.124$, $IC\ 95\%=0.015$ a 1.028 ; $pc>0.05$

Con el fin de proporcionar un análisis más sencillo de la Figura 5, dividimos en dos grandes grupos ambas poblaciones, dependiendo de la relación entre el número de genes activadores con respecto a los inhibidores (Act/Inh) presentes en cada muestra tipificada (Fig. 5), abarcando de 0.2 a 0.5 para el rango inhibidor y de 0.6 a 1.1 para el rango activador (Tabla 5). Con este análisis observamos que las mujeres que pertenecían al grupo de PE se encontraron principalmente en el rango inhibidor (45.5%) en comparación con el grupo control (31.3%). Por el contrario, en el rango activador, las mujeres control estuvieron en 68.6% en comparación con el grupo de PE que estuvo en un 54.4% solamente ($p=0.05$, $RM= 0.54$, $IC\ 95\%=0.29$ a 1.013).

Tabla 5. Balance entre genes activadores con respecto a los inhibidores

Rango Act/Inh	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)
	Controles (n= 86)	PE (n=90)
Activador: 0.6-1.1	68.6	54.4
Inhibidor: 0.2-0.5	31.3	45.5

$p=0.05$, $RM=0.54$, $IC\ 95\%=0.29$ a 1.013

8. Discusión

Las células NK de la decidua son uno de los elementos clave para la remodelación arterial uterina y el proceso de formación de la placenta [King 1998; Croy *et al.* 2003; Hiby *et al.* 2004; Hanna *et al.* 2006; Manaster & Mandelboim 2008]; por lo tanto, cualquier alteración en su proporción o en su funcionalidad podría contribuir al desarrollo de PE. Gran parte de la evidencia que se ha encontrado para entender la etiología de la PE, concuerda con el hecho de que la formación inadecuada de la placenta y la remodelación arterial uterina deficiente, en las etapas tempranas de la gestación, llevaría a la respuesta inflamatoria exacerbada y a las características clínicas que se observan al final del embarazo [Redman & Sargent 2003; Borzychowski *et al.* 2005].

A pesar de que algunos autores proponen que las células dNK están ausentes al final de embarazo, en el presente trabajo se detectaron en una proporción importante (cerca del 20%) tanto para las mujeres control como para las del grupo PE. El hallazgo fundamental de que las células NK constituyen la mayor proporción de los leucocitos de la decidua, en las primeras semanas de la gestación, es hasta el momento indiscutible [Bulmer *et al.* 1991; Vargas *et al.* 1993; Moffet 2002; Smith *et al.* 2009; Williams *et al.* 2009a; 2009b]. Sin embargo, su presencia en el tercer trimestre ha sido controversial ya que algunos investigadores reportaban una reducción importante en el número de células CD56⁺ al final del embarazo [Haller *et al.* 1993, Vargas *et al.* 1993; Moffet 2002], en tanto que otros han podido aislarlas y caracterizarlas [Abadía-Molina *et al.* 1996; 1997; Sindram-Trujillo *et al.* 2004; Poehlmann *et al.* 2006]. Más limitados y controversiales son los datos encontrados por otros autores, cuando se compara el porcentaje de leucocitos deciduales entre embarazos normales y aquellos complicados con PE; en algunos se reporta que las mujeres con PE tienen un aumento en poblaciones como linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) y células NK (CD56⁺) [Stallmach *et al.* 1999], y en otros se reporta una disminución en estas poblaciones [Rieger *et al.* 2009; Williams *et al.* 2009]. De acuerdo a las

muestras de decidua analizadas en el presente trabajo, nosotros no encontramos diferencias en cuanto a la cantidad de células marcadas con CD56⁺ y, además, a diferencia de lo que reporta el grupo de Wilczyński y cols. (2002 y 2003), no observamos que la subpoblación de células NK con funciones altamente citotóxicas –CD56⁺ CD16⁺ - se encuentre aumentada. Por el contrario, la población de células CD56⁺ CD16⁻ (células productoras de citocinas) fue mayoritaria, tal como se ha reportado al inicio de la gestación [Manaster & Mandelboim 2008].

De acuerdo con los datos existentes en la literatura, la composición precisa de los leucocitos de la decidua en mujeres con PE, ha sido difícil de evaluar. Los resultados de su estudio han arrojado diversos hallazgos debido a varios factores, principalmente: diferentes formas de obtención del tejido a analizar (biopsias de placenta o muestras de decidua materna) [Haller *et al.* 1995], variedad en las técnicas de análisis (citometría de flujo o inmunohistoquímica) [Bulmer *et al.* 1991; Sindram-Trujillo *et al.* 2004] y toma de muestras en edades gestacionales diferentes [Williams *et al.* 2009b]. Por otra parte, aunque se utilice el mismo método de análisis, como en el caso de la citometría de flujo, en este estudio y en el de Rieger y cols. (2009), cuantificamos la cantidad total de células separadas por gradiente de densidad, en tanto que otros contaron previamente los leucocitos CD45⁺ [Wilczyński *et al.* 2002; 2003].

Debido a que el fenotipo encontrado para las células NK deciduales, de ambos grupos evaluados, se comparó con el fenotipo de PBMC, proponemos que la decidua al final del embarazo conserva una población importante de células dNK, que comparte marcadores de membrana con las dNK del inicio de la gestación: CD56⁺ y CD16⁻, de acuerdo a las tinciones dobles realizadas. Además, cuando analizamos la tinción triple, en la región de células CD3⁻, observamos una población importante de células CD56⁺ y CD9⁺, a diferencia de las PBMC en donde esas células CD56⁺ son CD9⁻.

El marcador CD9, de acuerdo a los grupos de investigación de Koopman

(2003) y Mselle (2007) sólo se expresa en células dNK y no en pNK. En la placenta, se ha detectado en trofoblasto extraveloso dentro del primer trimestre de la gestación y no se observa en trofoblasto al final del embarazo [Hirano *et al.* 1999]. La importancia del CD9 en la gestación, se sugiere debido a que el ligando encontrado en el modelo murino, para este marcador es una glicoproteína específica del embarazo cuya concentración se incrementa en plasma, de manera exponencial conforme aumenta la edad gestacional [Waterhouse *et al.* 2002].

La función de las dNK al final del embarazo, es todavía un tema que requiere investigación, aunque estudios previos señalan que podrían participar en el desprendimiento de la placenta a través de la liberación de diversas citocinas [Abadía-Molina *et al.* 1997].

Otras poblaciones celulares, también requieren un mayor análisis; el hecho inesperado de observar gran cantidad de células CD3⁺, en las muestras deciduales estudiadas, que además disminuyen en las mujeres con PE, sugiere la participación de linfocitos T en esta patología, pues a diferencia de lo que ocurre con las células NK, éstas no predominan al inicio de la gestación [King *et al.* 1998].

La actividad y función de las células dNK, dependen en gran medida de la presencia de receptores de membrana que transducen señales de inhibición o activación para la célula. Para evaluar la capacidad de ejercer éstas señales, analizamos los genotipos y frecuencias de los genes para receptores KIR en mujeres con PE. A pesar de que existen pocos estudios sobre la frecuencia y distribución de esta familia genética en población mexicana, nuestros resultados concuerdan con ellos, en cuanto a la distribución y proporción de la mayoría de los genes *KIR* [Gutiérrez-Rodríguez *et al.* 2006; Contreras *et al.* 2007]. Las frecuencias encontradas entre las poblaciones de mujeres control y mujeres con PE, analizadas en el presente estudio, son muy similares para los genes *KIR 2DL3, 2DL1, 3DL1, 2DS3, 2DS4ins, 2DL5all, 2DL5A, 2DL5B, y 2DS5* (obviando los encontrados en el 100% de las muestras analizadas), y aunque

aparentemente difieren para el gen *2DL2*, que encontramos con mayor frecuencia en el grupo control, esta diferencia no alcanzó significancia estadística. En abortos espontáneos recurrentes, la disminución del gen *2DL2* se ha visto asociada en población argentina [Flores *et al.* 2007].

Los genotipos caracterizados en ambos grupos de estudio muestran gran variabilidad en cuanto a contenido génico del locus *KIR*, siendo el más complejo el que cuenta con 19 genes, y el menos complejo el que contiene sólo 8 genes. Se han descrito más de 300 genotipos diferentes en diversas poblaciones [Carrington 2003]. En general, los genes activadores son los que presentaron mayor variabilidad en el contenido génico, tal como se reporta para otras poblaciones e incluso el genotipo más sencillo cuenta con al menos un gen activador [Shilling 2002; Middleton & Gonzelez 2010].

En el estudio realizado por Hiby y cols. (2004), se observó que el genotipo inhibitor (AA) se encuentra con mayor frecuencia en mujeres con PE, y en específico cuando está presente el gen *KIR2DL1* y el bebé pertenece al grupo *HLA-C2*, aumenta la predisposición. Aunque estos datos sostienen que es la presencia de genes inhibidores lo que condiciona a la enfermedad, en otras poblaciones se han descrito resultados diferentes, como es el caso de la población japonesa en donde no se encontró dicha asociación [Saito 2006]. En este trabajo no encontramos diferencias significativas en los distintos genotipos tipificados; sin embargo, cuando los analizamos en el contexto de las dos categorías establecidas (rango inhibitor o activador), observamos que la mayoría de las mujeres control se encuentra distribuída en la categoría que contiene mayoritariamente genes de tipo activador y sugiere que estos genes pueden participar como factores de protección. Todo esto apoya la teoría de que la sobre-inhibición de las células NK puede tener un papel importante en la aparición y/o evolución de la enfermedad.

9. Conclusiones

El presente trabajo describe dos principales aspectos de las células NK que participan en la respuesta inmune de la decidua durante la gestación, al final del embarazo: su caracterización por marcadores de membrana y los genotipos de los cuales depende en gran medida la funcionalidad de sus receptores KIR. De ellos se desprenden las siguientes conclusiones.

Una proporción importante de los leucocitos encontrados en el tejido decidual de mujeres con embarazos de término, tanto para las mujeres con embarazos normo-evolutivos como para las mujeres con PE, son células con marcadores característicos de NK: CD3⁻ CD56⁺ y CD16⁻.

Las células NK que residen en la decidua al final del embarazo, comparten características con las del inicio de la gestación y difieren de las células NK circulantes: las dNK son CD3⁻ CD56⁺, CD16⁻ y CD9⁺, las pNK son CD3⁻ CD56⁺, CD16^{-/+} y CD9⁻.

El predominio de genes activadores en las mujeres control, sugiere que pueden conferirles un papel protector; sin embargo los genotipos inhibidores no parecen ser factores totalmente determinantes para la predisposición a la PE.

La presencia de células NK en tejido decidual de muestras del tercer trimestre del embarazo, sugieren que tiene un papel importante durante toda la gestación.

10. Perspectivas

La gran cantidad de resultados contrastantes, acerca de la presencia y funciones de las células NK al final del embarazo, así como su contribución a la PE, es sin duda un tema que requiere mayor investigación. Encontrar células NK en tejido decidual, trae consigo la necesidad de analizar no sólo la cantidad de células o de genes inhibidores o activadores para sus receptores, sino también su expresión y la funcionalidad de las células.

Estudios previos han reportado que en la PE se genera una fuerte reacción de tipo inflamatorio que no se observa en el embarazo normo-evolutivo, respuesta mediada por células NK [Borzychowsky *et al.* 2005]. Explorar la diferencia en la respuesta de tipo NK1 o NK2, su actividad citotóxica y el tipo de citocinas que secretan con diferentes estímulos, en las células dNK, es prácticamente obligatorio para conocer mejor su implicación en la PE.

Por otra parte, los genotipos encontrados no necesariamente reflejan la expresión de esos receptores, ya que se sabe incluso que pueden variar dependiendo de la edad gestacional [Sharkey *et al.* 2008]; por lo tanto el análisis de expresión al final del embarazo es sin duda importante, los factores genéticos (influencia de sus ligandos, HLA) y epigenéticos (metilación del DNA) que modulan su expresión son elementos a considerar en este tipo de estudios [Gardnier 2007].

En general, se sabe que los genes *KIR* se expresan en células NK, sin embargo en linfocitos T citotóxicos también se ha descrito su expresión [Tilburgs *et al.* 2009], la población de células CD3⁺ encontradas en la decidua de mujeres gestantes y su disminución en el grupo con PE, puede contribuir a la patología a través de sus receptores KIR, aspecto que requiere mayor evaluación.

11. Referencias

Abadía-Molina AC, Ruiz C, King A, Loke YW, Olivares EG, (1997). "Lymphocytes of human term decidua decrease cell adhesion to a plastic substrate", *Human Reproduction* **12**(11): 2393-2398.

Boyton RJ, Smith J, Ward R, Jones M, Ozerovitch L, Wilson R, Rose M, Trowsdale J, Altmann DM, (2006). "HLA-C and killer cell immunoglobulin-like receptor genes in idiopathic bronchiectasis", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **173**(3): 327-333.

ACOG Committee on Practice Bulletins-Obstetrics, (2002). "ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002", *Obstetrics and Gynecology* **99**(1): 159-167.

Apps R, Gardener L, Moffett A (2002). "A critical look at HLA-G", *Trends in immunology* **29**(7): 313-321.

Barton JR, Sibai BM, (2008). "Prediction and prevention of recurrent preeclampsia", *Obstetrics and Gynecology* **112**(2 Pt1): 359-372.

Bashirova A, Martin P, Mc Vicar W, Carrington M, (2006). "The killer immunoglobulin like receptor gene cluster: Tuning the genome for defense", *Annual Reviews in Genomics and Human Genetics* **7**: 277-300.

Borzychowski AM, Croy BA, Chan WL, Redman CW, Sargent IL, (2005). "Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and preeclampsia may be mediated by natural killer cells", *European Journal of Immunology* **35**(10): 3054-3063.

Bulmer J, Lash G, (2005). "Human uterine natural killer cells: a reappraisal", *Molecular Immunology* **42**(4): 511-521.

Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D, (1991). "Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies", *Human Reproduction* **6**(6): 791-798.

Burton JG, Kaufmann P, Huppertz B, (2006). "Anatomy and Genesis of the Placenta", in Knobil y Neill's (eds), *Physiology of Reproduction* (3rd Ed). Nueva York: Elsevier, pp.186-232.

Carrington M, Norman P, (2003). *The KIR Gene Cluster*. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US). NCBI.

Chandiramani M, Shennan A, (2008). "Hypertensive disorders of pregnancy: A UK based perspective", *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **20**(2): 96-101.

Clark DE, Smith SK, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, (1996). "Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy", *Human Reproduction* **11**(5): 1090-1098.

Colonna M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL (1993). "HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(24): 12000-12004.

Contreras G, Aláez C, Murguía A, García D, Flores H, Gorodezky C, (2007). "Distribution of the killer cell immunoglobulin-like receptors in Mexican Mestizos", *Tissue Antigens* **69**(Suppl 1): 125-129.

Cooper JC, Sharkey AM, McLaren J, Charnock-Jones DS, Smith SK, (1995). "Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry", *Journal of Reproduction and Fertility* **105**(2): 205-13.

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA, (2001). "The biology of human natural killer cell-subsets", *Trends in Immunology* **22**(11): 633-640.

Croy BA, Chantakru S, Esadeg S, Ashkar A, Qingxia W, (2002). "Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review)", *Journal of Reproductive Immunology* **57**(1-2): 151-168.

Croy BA, HE S, Esadeg Q, Wei D, McCartney, Zheng J, Borzychowski, Ashkar A, (2003). "Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modeling", *Reproduction* **126**(2): 149-160.

Davison JM, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad PK, Karumanchi AS, Quaggin S, Dechend R, Luft FC, (2004). "New aspects in the pathophysiology of preeclampsia", *Journal of the American Society of Nephrology* **15**(9): 2440-8.

Dekker GA, Robillard PY, (2005). "Preeclampsia: A couple's disease with maternal and fetal manifestations", *Current Pharmaceutical Design* **11**(6): 699-710.

Deng L, Mariuzza RA (2006). "Structural basis for recognition of MHC and MHC-like ligands by natural killer cell receptors", *Seminars in Immunology* **18**(3): 159-166.

Di Santo JP, (2008). "Functionally distinct NK-cell subsets: developmental origins and biological implications", *European Journal of Immunology* **38**(11): 2948-2951.

Flores AC, Marcos CY, Paladino N, Arruvito L, Williams F, Middleton D, Fainboim L, (2007). "KIR receptors and HLA-C in the maintenance of pregnancy", *Tissue Antigens*. **69**(Suppl 1): 112-113.

Gardnier MC, (2007). "Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why", *International Journal of Immunogenetics* **35**(1): 1-8.

Goodridge JP, Lathbury LJ, John E, Charles AK, Christiansen FT, Witt CS, (2009). "The genotype of the NK cell receptor, KIR2DL4, influences INFgamma secretion by decidual natural killer cells", *Molecular Human Reproduction* **15**(8): 489-497.

Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR, (2011). Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Research* **39**: D913-D919.

Gutiérrez-Rodríguez ME, Sandoval-Ramírez M, Díaz-Flores M, Marsh E, Valladares-Salgado A, Madrigal JA, Mejía Arangure M, García A, Huerta-Zepeda A, Ibarra-Cortés B, Ortega-Camarillo C, Cruz M, (2006). "KIR gene in ethnic and mestizo populations from Mexico", *Human Immunology* **67**(1-2): 85-93.

Haller H, Radillo O, Rukavina D, Tedesco F, Candussi G, Petrović O, Randić L, (1993). "An immunohistochemical study of leucocytes in human endometrium, first and third trimester basal decidua", *Journal of Reproductive Immunology* **23**(1): 41-49.

Haller H, Tedesco F, Rukavina D, Radillo O, Gudelj L, Beer AE, (1995). "Decidual-trophoblast interactions: decidual lymphoid cell populations in basal and parietal decidua", *Journal of Reproductive Immunology* **28**: 165-171.

Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yuykin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O, (2006). "Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface", *Nature Medicine* **12**(9): 1065-1074.

Hanna J, Mandelboim O, (2007). "When Killers become helpers. The real function of NK cells in vivo", *Trends in Immunology* **28**(5): 202-206.

Hiby ES, Walker JJ, O'Shaughnessy MO, Redman WG, Carrington JT, Moffet A, (2004). "Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of Preeclampsia and reproductive success", *Journal of Experimental Medicine*

200(8): 957-965.

Hirano T, Higuchi T, Ueda M, Inoue T, Kataoka N, Maeda M, Fujiwara H, Fujii S, (1999). "CD9 is expressed in extravillous trophoblast in association with integrin alpha3 and integrin alpha5", *Molecular Human Reproduction* **5(4)**: 162-167.

Huppertz B, Peeters L, (2005). "Vascular biology in implantation and placentation", *Angiogenesis* **8(2)**: 157-167.

Janeway AC, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, (2001). "The major histocompatibility complex", in *Immunobiology* (5th ed), Nueva York: Garland Science, capítulo 5.

Khakoo S, Carrington M, (2006). "KIR and disease: a model system or system of models?", *Immunological Reviews* **214**: 186-201.

Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PF, (2006). "WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review", *Lancet* **367(9516)**: 1066-74.

Kiessling R, Klein E, Wigzell H, (1975). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype", *European Journal of Immunology* **5(2)**: 112-117.

King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW, (1998). "Human uterine lymphocytes", *Human Reproduction Update* **4(5)**: 480-485.

Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL, (2003). "Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential", *Journal of Experimental Medicine* **198(8)**: 1202-1212.

Kopcow H, Allan D, Chen X, Rybalov B, Andzelm M, Ge B, Strominger J, (2005). "Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102(43)**: 15563-15568.

Kopcow D, Karumanchi A, (2007). "Angiogenic factors and natural killer (NK) cells in the pathogenesis of preeclampsia", *Journal of Reproductive Immunology* **76(1-2)**: 23-9.

Kulkarni S, Martin MP, Carrington M, (2008). "The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease", *Seminars in Immunology* **20(6)**: 343-352.

Lain KY, Roberts JM, (2002). "Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia", *JAMA: the journal of the American Medical Association* **287**(24): 3183-3186.

Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Seale RF, Robson SC, Bulmer JN, (2006). "Expression of angiogenic factors by uterine natural killer cells during early pregnancy", *Journal of Leukocyte Biology* **80**(3): 572-580.

Le Bouteiller P, Tabiasco J, (2006). "Killers become builders during pregnancy", *Nature Medicine* **12**(9): 991-992.

Le Boutellier P, Sargent I, (1998). "HLA class I molecules in the placenta: which ones, where and for? A workshop report", *Placenta* **21**(Suppl 1): S93-S96.

Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, Hiby S, Malik S, Day K, Licence D, Bowen JM, Gardner L, King A, Loke YW, Smith SK, (2001). "Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**(4): 1823-1834.

Ljunggren H, Karre K, (1990). "In search of the missing self MHC molecules and NK cell recognition", *Immunology Today* **11**(7): 237-244.

Manaster I, Mandelboim O, (2008). "The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa", *Placenta* **29**(Suppl A): S60-S66.

Marsh SG, for the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA system, (2011). "Nomenclature for factors of the HLA system, update December 2010", *Tissue Antigens* **77**(4): 362-363.

Medawar P, (1953). "Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates". In *Society for Experimental Biology*, New York: Academic Press, pp. 320-338.

Middleton D, Gonzelez F, (2010). "The extensive polymorphism of KIR genes", *Immunology* **129**(1): 8-19.

Moffet A, Loke WY, (2004). "The immunological paradox of pregnancy", *Placenta* **25**(1): 1-8.

Moffet-King A, (2002). "Natural Killer cells and pregnancy", *Nature Reviews in Immunology* **2**: 656-663.

Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari M, Moretta L, (1996). "Receptors for HLA-class I molecules in human natural killer cells", *Annual Reviews in Immunology* **14**: 619-648.

Moretta L, Moretta A, (2004). "Killer immunoglobulin-like receptors", *Current Opinion in Immunology* 16(5): 626-633.

Mselle F, Meadows SK, Eriksson M, Smith JM, Shen L, Wira CR, Sentam CL, (2007). "Unique characteristics of NK cells throughout the female reproductive tract", *Clinical Immunology* 124(1): 69-76.

Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M, (2006). "The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies", *Placenta* 27(9-10): 939-958.

Poehlmann TG, Schaumann A, Busch S, Fitzgerald JS, Aguerre-Girr M, Le-Bouteiller P, Schleussner E, Markert UR, (2006). "Inhibition of term decidual NK cell cytotoxicity by soluble HLA-G1", *American Journal of Reproductive Immunology* 56(5-6): 275-285.

Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J, (2009). "CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset", *Immunology* 126(4): 458-65.

Redman CW, Sacks GP, Sargent IL, (1999). "Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy", *American Journal of Obstetrics Gynecology* 180(2 Pt1): 499-506.

Redman CW, Sargent IL, (2003). "Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response—a review", *Placenta* 24(Suppl A): 21-27.

Rieger L, Segerer S, Bernar T, Kapp M, Majic M, Morr AK, Dietl J, Kämmerer U, (2009). "Specific subsets of immune cells in human decidua differ between normal pregnancy and preeclampsia- a prospective observational study", *Reproductive Biology and Endocrinology* 23: 132-142.

Saito S, Takeda Y, Sakai M, Nakabayahi M, Hayakawa S, (2006). "The incidence of pre-eclampsia among couples consisting of Japanese women", *Journal of Reproductive Immunology* 70(1-2): 93-98.

Salafia CM, Pezzullo JC, Ghidini A, Lopez-Zeno JA, Whittington SS, (1998). "Clinical correlations of patterns of placental pathology in preterm pre-eclampsia", *Placenta* 19(1): 67-72.

Sánchez-Rodríguez EN, Nava-Salazar S, Moran C, Romero-Arauz JF, Cerbón M, (2011). "The two leading hypothesis regarding the molecular mechanisms and etiology of preeclampsia, and the Mexican experience in the world context", *Revista de Investigación Clínica* 62(3): 252-260.

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

Sharkey AM, Gardner L, Hiby S, Farrell L, Apps R, Masters L, Goodridge J, Lathbury L, Stewart CA, Verma S, Moffett A, (2008). "Killer-Ig-like receptor expression in uterine NK cells is biased toward recognition of HLA-C and alters with gestational age", *Journal of Immunology* **181**(1): 39-46.

Shilling GH, Young N, Guethlein A, Cheng W, Gardnier M, Tyan D, Parham P, (2002). "Genetic control of human NK cell repertoire", *Journal of Immunology* **169**(1): 239-247.

Sibai BM, (2007). "Biomarker for hypertension-preeclampsia: are we close yet?", *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **197**(1): 1-3.

Sibai B, Dekker G, Kupferminc M, (2005). "Pre-eclampsia", *Lancet* **365**(9461): 785-799.

Sibai BM, Stella CL, (2008). "Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia", *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **200**(5): 481e1-7.

Sindram-Trujillo AP, Scherjon SA, van Hulst-van Miert PP, Kanhai HH, Roelen DL, Claas F, 2004. "Comparison of decidual leukocytes following spontaneous vaginal delivery and elective cesarean section in uncomplicated human term pregnancy", *Journal of Reproductive Immunology* **62**(1-2): 125-137.

Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL, (2009). "Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy", *American Journal of Pathology* **174**(5): 1959-1971.

Stallmach T, Hebisch G, Orban P, Lü X, (1999). "Aberrant positioning of trophoblast and lymphocytes in the feto-maternal interface with pre-eclampsia", *Virchows Archives* **434**(3): 207-211.

Stegers E, Dadelszen P, Duvekot J, Pijnenborg R, (2010). "Preeclampsia" *Lancet* **376**(9741): 631-644.

Stillman IE, Karumanchi SA, (2007). "The glomerular injury of preeclampsia", *Journal of the American Society of Nephrology* **18**(8): 2281-2284.

Tiercy JM, (2002). "Molecular Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation". *Transplant Immunology* **9**(2-4): 173-180.

Tilburgs T, van der Mast BJ, Nagtzaam NM, Roelen DL, Scherjon SA, Claas FH, (2009). "Expression of NK cell receptor on decidual T cells in human pregnancy", *Journal of Reproductive Immunology* **80**(1-2): 22-32.

Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart AC, Beck S, Wilson M, (2001). "The genomic context of Natural Killer receptor extended gene families", *Immunological Reviews* **181**: 20-38.

Tuffnell DJ, Shennan AH, Waugh JJ, Walker JJ, (2006). "The management of severe pre-eclampsia/eclampsia". Royal College of Obstetricians and Gynecologists, Guideline 10(A), London (UK). pp. 1-11.

Vargas ML, Santos JL, Ruiz C, Montes MJ, Alemán P, García-Tortosa C, García-Olivares E, (1993). "Comparison of the proportions of leukocytes in early and term decidua", *American Journal of Reproductive Immunology* **29**(3): 135-140.

Varla-Leftherioti M, (2004). "Role of a KIR/HLA-C allorecognition system in pregnancy", *Journal of Reproductive Immunology* **62**(1-2): 19-27.

Vivier E, (2006). "What is natural in natural killer cells?", *Immunology Letters* **107**(1): 1-7.

Von Dadalszen P, Magee L, (2008). "What matters in preeclampsia are the associated adverse outcomes: the view from Canada", *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **20**(2): 110-115.

Waterhouse R, Ha C, Devksler GS, (2002). "Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17", *Journal of Experimental Medicine* **195**(2): 277-282.

Wilczyński JR, Tchórzewski H, Banasik M, Głowacka E, Wieczorek A, Lewkowicz P, Malinowski A, Szpakowski M, Wilczyński J, (2003). "Lymphocyte subset distribution and cytokine secretion in third trimester decidua in normal pregnancy and preeclampsia", *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* **109**(1): 8-15.

Wilczyński JR, Tchórzewski H, Głowacka E, Banasik M, Lewkowicz P, Szpakowski M, Wilczyński J, (2002). "Cytokine secretion by decidual lymphocytes in transient hypertension of pregnancy and pre-eclampsia", *Mediators of Inflammation* **11**(2): 105-111.

Williams P, Bulmer J, F Roger, Innes B and Robson S, (2009a). "Altered decidual leucocyte in the placental bed in preeclampsia and fetal growth restriction: a comparison with late normal pregnancy", *Reproduction* **13**(81): 177-184.

Williams PJ, Searle RF, Robson SC, Innes BA, Bulmer JN, (2009b). "Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy", *Journal of Reproductive Immunology* **82**(1): 24-31.

Witt CS, Whiteway JM, Warren HS, Barden A, Rogers M, Martin A, Beilin L, Christiansen FT, (2009). "Alleles of the KIR2DL4 receptor and their lack of association with pre-eclampsia" *European Journal of Immunology* **32**(1): 18-29.

Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA, (2010). "Pathogenesis of Preeclampsia", *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **5**: 173-192.

Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ, (1993). "Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts", *Journal of Clinical Investigation* **91**(3): 950-60.

Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. (1997a). "Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome?", *Journal of Clinical Investigation* **99**(9): 2152-64.

Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH, (1997b). "Human cytotrophoblast adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?", *Journal of Clinical Investigation* **99**(9): 2139-2151.

ANEXO 1

Características clínicas de los grupos de estudio

	Genotipos			Tejido decidual		
	Controles (n=86)	PE (n=90)	<i>p</i>	Controles (n= 10)	PE (n=9)	<i>p</i>
Edad gestacional (semanas)	37.40 ± 3.35	34.13 ± 3.7	0.01	39.22 ± 1.27	35.17 ± 3.61	0.08
Presión sistólica (mm Hg)	114 ± 9.04	152.6 ± 18.24	<0.0001	114.4 ± 7.26	152.9 ± 21.38	0.0002
Presión diastólica (mm Hg)	73.35 ± 6.73	99.77 ± 12.2	<0.0001	71.11 ± 7.82	98.75 ± 11.26	<0.0001
Peso del producto (g)	2984 ± 597.1	2034 ± 895.5	<0.0001	3183 ± 364	2459 ± 1098	0.08
*Casos de PE severa (n)	0	72	NA	0	5	NA
**Casos de PE leve (n)	0	18	NA	0	3	NA

Medidas de Presión arterial y datos clínicos en ambos grupos de estudio, los datos de proteinuria se omitieron debido a los diferentes métodos utilizados para su cuantificación y reporte. Se tomó en cuenta, en todos los casos que se cumplieran las condiciones para establecer el diagnóstico de PE.

Todos los datos se presentan como la media ± desviación estándar

NA. No Aplica

ANEXO 2

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

Sánchez-Rodríguez et al. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011, 9:8
<http://www.rbej.com/content/9/1/8>



RESEARCH

Open Access

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

Ely N Sánchez-Rodríguez^{1*}, Sonia Nava-Salazar¹, C Adriana Mendoza-Rodríguez², Carlos Moran²,
Juan F Romero-Arauz², Enrique Ortega³, Julio Granados⁴, Alicia Cervantes-Peredo⁵, Marco Ceibón^{1*}

Abstract

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

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

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

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

Background

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

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

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

* Correspondence: elyn@yahoo.com; moribon@yahoo.com.mx
Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F., México
Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Sánchez-Rodríguez et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ANEXO 3

Artículo de Revisión: "Estado actual de la Preeclampsia en México: de lo epidemiológico a sus mecanismos moleculares"



ARTÍCULO DE REVISIÓN

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

INTRODUCCIÓN

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

RESUMEN

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

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

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

Se calcula que mueren anualmente en el mundo 50.000 mujeres por PE,³ la Organización Mundial de

Immune-Endocrine Alterations During Preeclampsia

E.N. Sánchez-Rodríguez¹, S. Nava-Salazar^{*1}, C.A. Mendoza-Rodríguez¹, F. Romero-Arauz², C. Morán² and M.A. Carbon¹

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

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

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

IMMUNOENDOCRINE ASPECTS OF THE ENDOMETRIUM

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

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

*Address correspondence to this author at the UNAM, Facultad de Química, Edificio F., Ciudad Universitaria S/N, México DF, CP 04510, Tel: 5255-56223820; Fax: 5255-56162010; E-mail: a_nava_06@yahoo.com.mx

RESEARCH

Open Access

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

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

Abstract

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

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

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

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

Background

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Methods

Patients and biological samples

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

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

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

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

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

Decidual leukocytes isolation and Flow cytometry

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

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

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

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

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

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

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

KIR genotyping

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

Statistics

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

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

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

Results

Flow cytometry of decidual leukocytes

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

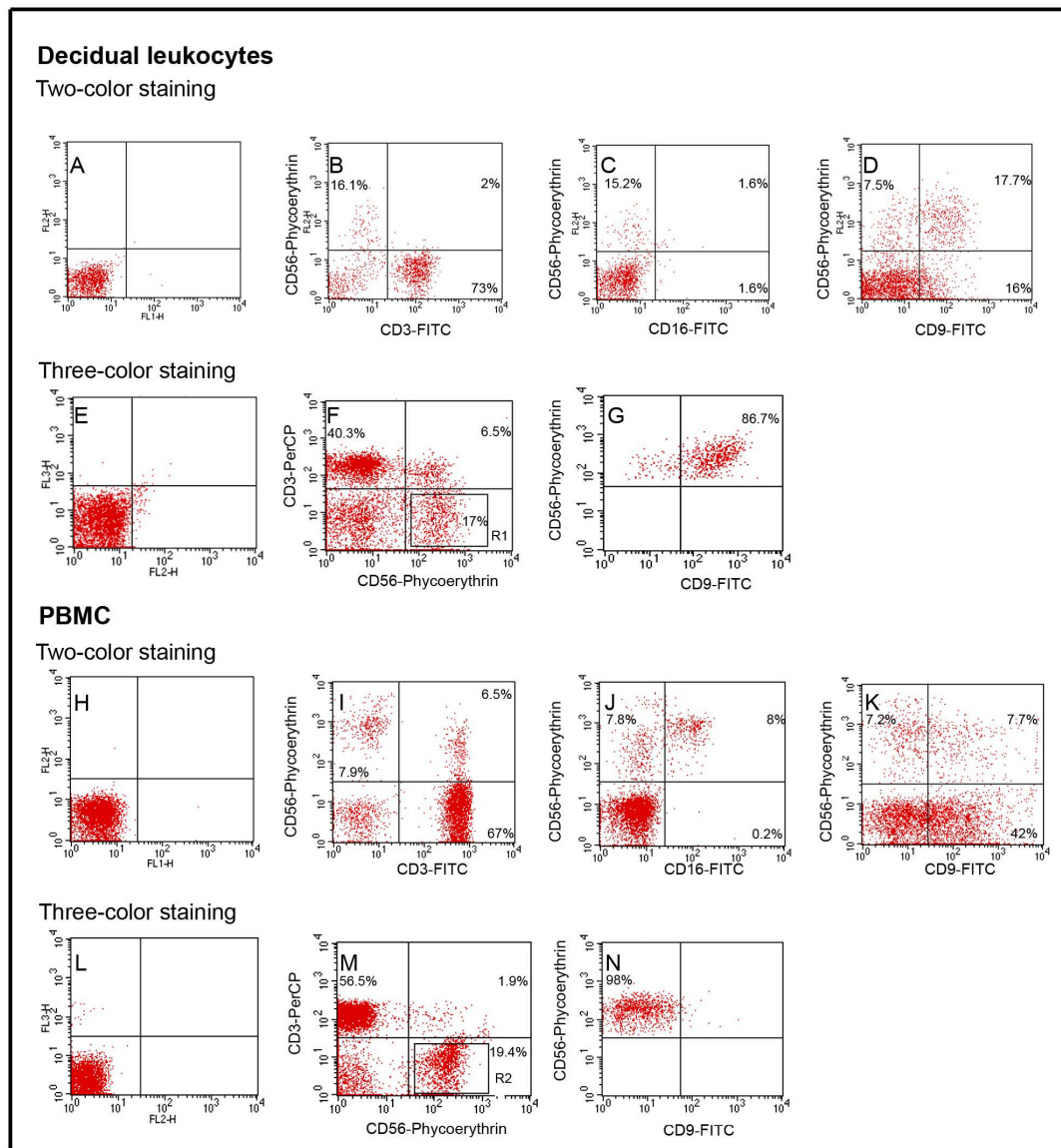


Figure 1 Flow cytometry analysis of decidual leukocytes. Comparison of typical subset-markers of NK cells (CD3⁻, CD56⁺, CD16⁺) and the non-typical dNK cells marker (CD9⁺). A-D) Representative FACS for two-color staining for decidual leukocytes. E-G) Representative FACS for three-color staining for decidual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

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

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

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

Table 1 Proportion of decidual leukocytes analyzed by Flow cytometry

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

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

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

^a p < 0.05.

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

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

KIR gene frequencies

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

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

KIR genotype profiles

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

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

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

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

Discussion

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

Table 2 Frequencies of KIR genes

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

Values are presented as percentage.

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

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

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

Genotype	KIR													Total (19)	% S	% L	Ratio Act/Inh	Frequency (%) Controls	Frequency (%) PE					
	2DL			2DS			3DL			3DS			2DP							3DP				
	1	2	3	5a1	5A	5B	1	2	3	4del	4ins	5	1	2	3	1	1	1						
1																			19	100	100	1.0	0.0	1.1
2																			18	86.7	100	0.9	3.8	2.2
3																			18	100	90	1.1	2.4	0.0
4																			18	86.7	100	0.9	1.2	0.0
5																			18	86.7	100	0.9	1.2	0.0
6																			17	71.4	100	0.7	8.3	6.7
7																			17	86.7	90	1.0	1.2	0.0
8																			17	71.4	100	0.7	1.2	0.0
9																			17	71.4	100	0.7	4.8	1.1
10																			17	86.7	90	1.0	1.2	0.0
11																			17	71.4	100	0.7	3.8	2.2
12																			17	71.4	100	0.7	1.2	0.0
13																			17	86.7	90	1.0	0.0	1.1
14																			17	86.7	90	1.0	1.2	0.0
15																			17	71.4	100	0.7	1.2	1.1
16																			16	57.1	100	0.6	2.4	2.2
17																			16	71.4	90	0.8	1.2	0.0
18																			16	71.4	90	0.8	2.4	5.6
19																			16	71.4	90	0.8	1.2	2.2
20																			16	57.1	100	0.6	2.4	1.1
21																			16	57.1	100	0.6	1.2	0.0
22																			16	71.4	90	0.8	0.0	1.1
23																			15	57.1	90	0.6	8.3	10.0
24																			15	71.4	80	0.9	0.0	1.1
25																			15	42.9	100	0.4	0.0	1.1
26																			15	57.1	90	0.6	0.0	1.1
27																			15	71.4	80	0.9	0.0	1.1
28																			15	57.1	90	0.6	1.2	0.0
29																			15	42.9	100	0.4	1.2	0.0
30																			15	42.9	100	0.4	0.0	1.1
31																			15	57.1	90	0.6	0.0	1.1
32																			15	57.1	90	0.6	1.2	0.0
33																			14	57.1	80	0.7	3.8	1.1
34																			14	57.1	80	0.7	1.2	0.0
35																			14	57.1	80	0.7	1.2	0.0
36																			13	57.1	70	0.8	0.0	2.2
37																			13	42.9	80	0.5	0.0	1.1
38																			13	57.1	70	0.8	0.0	1.1
39																			13	42.9	80	0.5	2.4	2.2
40																			13	57.1	70	0.8	0.0	1.1
41																			12	42.9	70	0.6	0.0	2.2
a 42																			12	42.9	70	0.6	7.1	0.0
43																			12	42.9	70	0.6	1.2	1.1
44																			12	42.9	70	0.6	0.0	1.1
45																			12	42.9	70	0.6	0.0	1.1
46																			12	42.9	70	0.6	1.2	0.0
47																			12	42.9	70	0.6	1.2	0.0
48																			11	28.6	70	0.4	1.2	0.0
49																			11	28.6	70	0.4	1.2	5.6
50																			11	28.6	70	0.4	1.2	1.1
51																			11	42.9	60	0.7	0.0	1.1
52																			10	28.6	60	0.5	8.3	15.6
b 53																			10	14.3	70	0.2	8.3	1.1
54																			10	28.6	60	0.5	0.0	1.1
55																			10	28.6	60	0.5	1.2	0.0
56																			9	14.3	60	0.2	1.2	13.3
57																			8	14.3	50	0.3	0.0	2.2

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

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

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

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

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

Table 3 Activating to inhibitory balance

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusion

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

List of abbreviations

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

Acknowledgements

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

Author details

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

Authors' contributions

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

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 9 September 2010 Accepted: 19 January 2011

Published: 19 January 2011

References

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

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

doi:10.1186/1477-7827-9-8

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

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

INTRODUCCIÓN

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

RESUMEN

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

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

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

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

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

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

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

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS DE LA PREECLAMPSIA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MECANISMOS MOLECULARES EN LA PREECLAMPSIA: DIVERSAS HIPÓTESIS DE SU ETIOLOGÍA

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

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

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

Adaptación inmunológica inadecuada

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

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

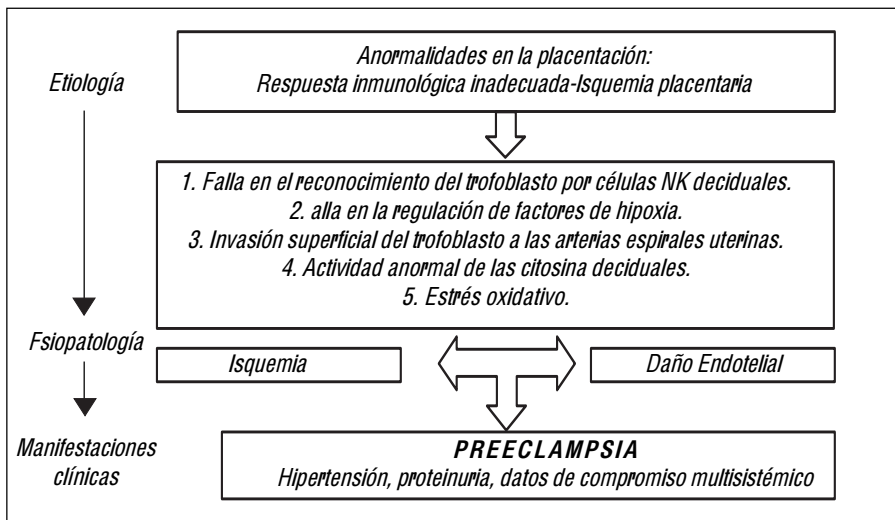


Figura 1. Etiología y fisiopatología de la PE. El reconocimiento inadecuado de las células del trofoblasto por parte de las células NK, así como la falla en la regulación de factores de hipoxia, provocan una invasión superficial del trofoblasto a las arterias espirales uterinas, una falta de remodelación,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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Hipótesis de isquemia placentaria

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

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

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

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

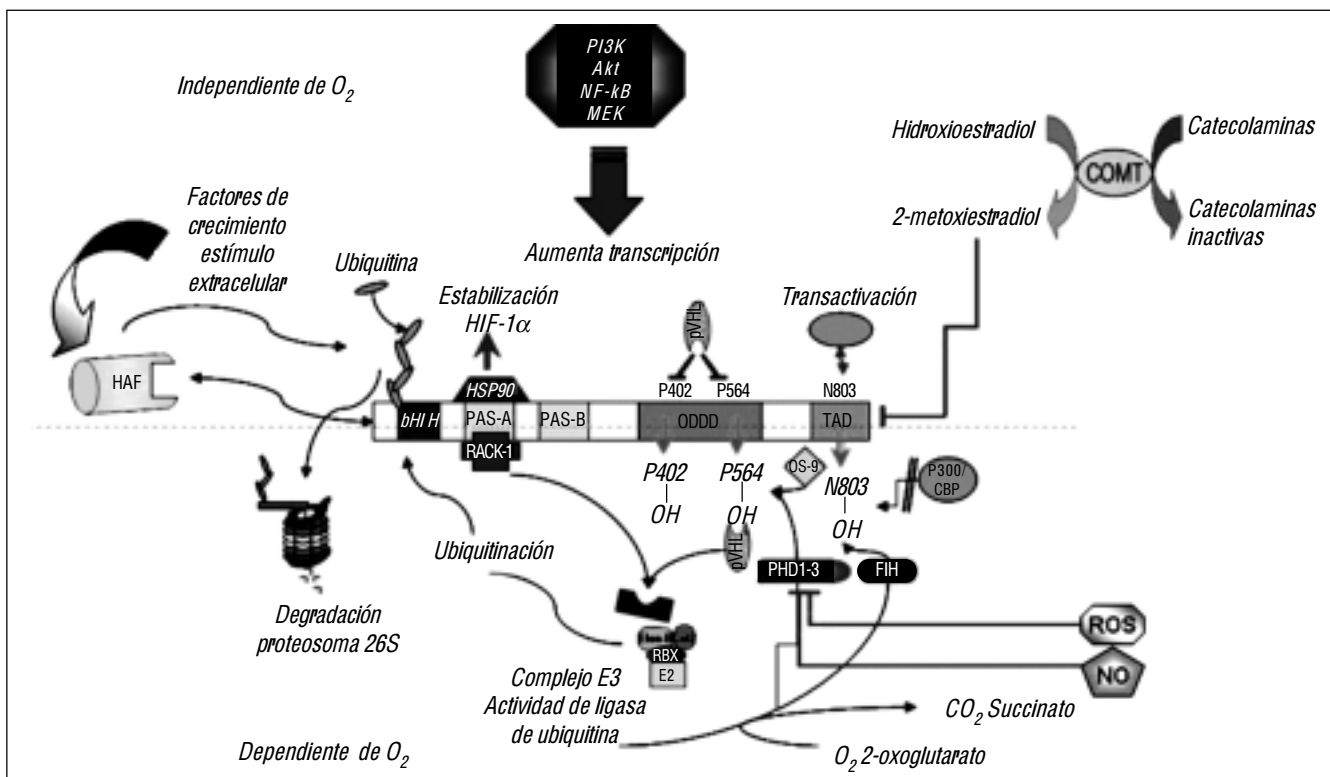


Figura 2. Vía que regulan HIF- α Dependiente de la concentración de O_2 , bajo condiciones de normoxia, la hidroxilación de dos residuos de prolina de HIF- α , mediada por OS-9, favorecen la unión con la pVHL. RACK1 facilita la unión de pVHL con la Elonguina C, lo cual forma parte del complejo E3 con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

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

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

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

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

Regulación de HIF- α dependiente de O_2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSIONES

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

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

AGRADECIMIENTOS.

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

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

REFERENCIAS

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

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

Reimpresos:

Dr. Marco Antonio Cerbón

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

Recibido el 5 de septiembre de 2009.

Aceptado el 2 de diciembre de 2009.

Immune-Endocrine Alterations During Preeclampsia

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

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

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

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

IMMUNOENDOCRINE ASPECTS OF THE ENDOMETRIUM

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

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

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

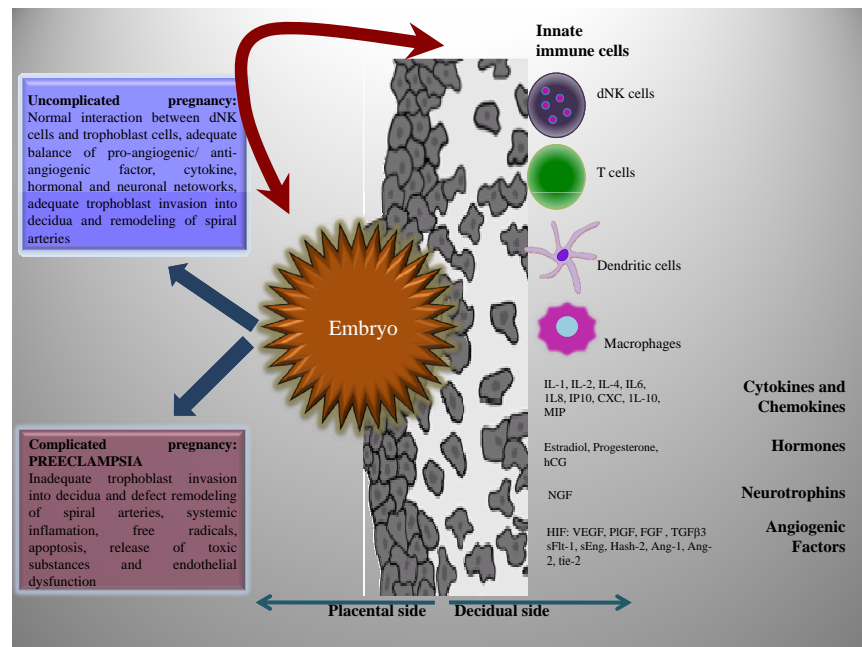


Fig. (1). Cross-talk between the embryo and the another involves the interaction between endocrine and immune systems.

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

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

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

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

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

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

1. Decidual NK Cells

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Angiogenic Factors

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PREECLAMPSIA

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

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

1. Immunological Factors in PE

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

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

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

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

2. Angiogenic Factors in PE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSION

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

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

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

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

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

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

Received: October 07, 2009

Revised: December 25, 2009

Accepted: January 16, 2010

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

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