

Estudio de la funcionalidad de las células NK en el embarazo

Jessica Salinas⁽¹⁾, Melitza Iglesias⁽¹⁾, Andrea Osorio⁽²⁾, Cecilia Sepúlveda⁽¹⁾, Karla Hidalgo⁽³⁾, Javier Puente⁽⁴⁾, Jorge Fernández⁽¹⁾, Alejandro Afani⁽¹⁾.

Resumen

En los últimos años, la participación del sistema inmune innato en el desarrollo de la pre-eclampsia ha sido el objetivo de numerosos estudios. Sin embargo, el rol de las células agresoras naturales (NK) en esta patología no ha sido totalmente aclarado. Las células NK, componentes del sistema inmune innato, poseen actividad citotóxica espontánea, y secretan citoquinas tales como interferón gamma (INF- γ) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α). En el presente estudio hemos analizado la actividad funcional y el inmunofenotipo de células NK obtenidas desde sangre periférica de pacientes con pre-eclampsia, mujeres sanas embarazadas y mujeres sanas no embarazadas. Se cuantificó la actividad citotóxica usando el ensayo de liberación de ⁵¹cromo. La producción de citoquinas en respuesta a activadores policlonales y el inmunofenotipo (CD3-CD16+CD56+) fueron determinados por citometría de flujo. Estos parámetros no evidenciaron diferencias significativas entre los grupos estudiados; sin embargo, en las pacientes con pre-eclampsia se observa una tendencia hacia una menor citotoxicidad y menor producción de TNF- α en células NK estimuladas in vitro, y una proporción aumentada del subtipo celular NK CD56-CD16+ en sangre periférica en relación con los otros dos grupos estudiados.

⁽¹⁾Sección de Inmunología, Departamento de Medicina, Hospital Clínico Universidad de Chile. Programa de Virología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Depto. de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

⁽²⁾Alumna de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

⁽³⁾Universidad de Santiago de Chile.

⁽⁴⁾Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Correspondencia a: Jessica Salinas L.
Santos Dumont 999, 5º Piso sector E
e-mail: jesalinas@redclinicauchile.cl

Financiamiento: Departamento de Investigación Científica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Proyecto DID SAL 15 (Universidad de Chile).

Summary

NK cells functionality during pregnancy.

During the last few years, the role of innate immune system in development of pre-eclampsia has been the focus of a number of studies. However, the role of natural killer (NK) cells in pregnancy and pre-eclampsia has not been totally clarified. NK cells, an important component of innate immune system, normally exhibit spontaneous cytolytic activity and secrete cytokines such as interferon gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). In current paper, we studied functional activity and immunophenotype of peripheral blood NK cells obtained from patients with pre-eclampsia, healthy pregnant women and non-pregnant healthy women. For this purpose, we quantified cytolytic activity using 51 chromium release assay. We determined cytokine production in response to polyclonal activators and cells immunophenotype (CD3-CD16+CD56+) by flow cytometry. We found no significant differences in these parameters among the three groups studied, however, in patients with pre-eclampsia, there is a tendency to a decreased cytotoxic activity and less production of TNF- α by NK cells in vitro as well as an increased proportion of the NK subset CD56-CD16+, in peripheral blood.

(Key words: pregnancy, pre-eclampsia, natural killer cells, cytokines).

Introducción

La preeclampsia (PE), principal causa de morbimortalidad perinatal en el mundo, es la hipertensión inducida por el embarazo, que se presenta habitualmente después de las 20 semanas de gestación^(1,2). En Chile, desde 1992, esta patología es una de las principales causas de mortalidad materna⁽³⁾.

Los factores etiológicos de este cuadro no han sido claramente definidos, pero se han planteado diversas hipótesis que apuntan hacia una etiología inmunológica. El sistema inmune puede dividirse, desde el punto de vista celular, en dos grandes ramas. El sistema inmune innato, compuesto por los leucocitos granulocitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos y células natural killer (NK) y se caracteriza por el reconocimiento inespecífico de antígenos extraños. El sistema inmune adaptativo o específico compuesto por linfocitos T helper ó

ayudadores, linfocitos T citotóxicos y linfocitos B, se caracteriza por el reconocimiento específico de los antígenos. En una gestación normal, el sistema inmune innato se encuentra con una mayor actividad basal, evidenciado por un aumento en el número de granulocitos y activación del sistema monocítico-macrofágico, caracterizado por un aumento de la fagocitosis, de la generación de radicales libres, de la adhesividad celular y de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, especialmente interleuquina 12 (IL-12)⁽⁴⁻⁷⁾.

Recientemente Sacks et al. postulan que la PE sería la consecuencia de una activación exagerada de la inmunidad innata. Esta sería inducida por algún producto placentario que activaría monocitos y granulocitos, con un aumento en la producción de IL-12 y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)⁴ aumentando por lo tanto los niveles plasmáticos de éstas citoquinas. Estas serían las causantes del daño endotelial, responsable del vasoespasmo generalizado observado en este cuadro. De hecho, diversos estudios demuestran la existencia de un estado similar al inflamatorio en la PE, con una exacerbación aún mayor de la respuesta inmune innata en relación al embarazo normal⁽²²⁾.

Las células NK, o agresoras naturales, pertenecen a la respuesta inmune innata y participan en la respuesta anti-tumoral y anti-viral⁸. Se caracterizan por su actividad citotóxica espontánea, por la secreción de diversas citoquinas y por su fenotipo característico: la expresión de los marcadores de superficie CD16 y CD56 y la ausencia de marcadores de los linfocitos B y T, como CD3, CD4 ó CD19. Existen además distintos subtipos de células citotóxicas: CD56+16+, de citotoxicidad media; CD56+CD16-, de citotoxicidad baja y CD56-CD16+, de alta citotoxicidad. En la PE, las células NK han sido poco estudiadas y con resultados contradictorios en cuanto a su

funcionalidad: en general presentan una menor citotoxicidad y un aumento en el número de células NK circulantes en relación a grupos controles no embarazadas⁽¹⁵⁻¹⁸⁾. Citoquinas como TNF- α junto con IL-12, se encuentran entre los principales factores de activación de las células (NK)⁸⁻¹⁰. Estos mediadores estimulan a su vez, la secreción de diversas citoquinas involucradas en la respuesta inmune, principalmente interferón gamma (INF- γ), TNF- α , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), e interleuquinas 5 y 10 (IL-5 e IL-10)^(10,11). A la fecha, los estudios en PE se han focalizado esencialmente en el análisis de citoquinas plasmáticas, existiendo muy pocos reportes de su producción a nivel intracelular en las células NK^(12-14,26).

En este contexto de hiperactividad del sistema inmune innato descrito para la PE, pensamos encontrar un aumento en las funciones citotóxicas y en la producción de citoquinas en las células NK circulantes. Analizamos por lo tanto el fenotipo (CD16/56), la citotoxicidad y la producción de citoquinas intracelulares (INF- γ y TNF- α) por células NK obtenidas de sangre periférica, en pacientes con PE y pacientes controles (embarazadas normales y pacientes sanas no embarazadas).

Materiales y métodos

Pacientes: Se realizó un estudio de casos y controles, aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Luego de la firma del consentimiento informado, se reclutaron 7 pacientes con pre-eclampsia, que cumplieron los criterios del Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos para el diagnóstico de esta enfermedad: presión arterial (PA) mayor ó igual a 140/90 mmHg en forma persistente y proteinuria mayor de 100 mg/dl en muestra aislada de orina, ó mayor de 300 mg/dl en orina de 24 horas⁽²⁾. Se

reclutaron pacientes con más de 20 semanas de gestación, excluyendo aquellas portadoras de una hipertensión crónica, enfermedades metabólicas y autoinmunes de base o cuadros infecciosos intercurrentes. Las controles fueron 12 pacientes embarazadas normales, y 7 mujeres no embarazadas sanas, en edades fértiles, no usuarias de tratamientos hormonales y en fase luteínica de su ciclo menstrual.

Muestras de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica de los grupos controles (embarazadas normales y no embarazadas sanas), se obtuvieron en ayunas (8 AM, 15 mL). En el caso de las pacientes con PE, las muestras se obtuvieron una vez confirmado el diagnóstico (entre las 8 y 14 horas, 15 mL). En todos los casos, la muestra se dividió en dos partes iguales: a) sangre completa, para el recuento de linfocitos y el análisis fenotípico y b) células mononucleares, obtenidas a partir de sangre completa por un método de separación por densidad, fracción que corresponde a linfocitos y monocitos sanguíneos, en las que se determinaron las citoquinas intracelulares y la citólisis mediada por células NK.

Determinación de Inmunofenotipo: Se determinó en las muestras de sangre completa, utilizando los siguientes pares de anticuerpos monoclonales: CD45/14, controles isotipo g1/g2, CD3/CD16-56 (Becton Dickinson®). El análisis del fenotipo se efectuó en un citómetro de flujo FACScan, Becton Dickinson, usando el software CellQuest, analizando dos colores. El recuento diferencial de leucocitos se realizó en un contador hematológico automatizado.

Obtención de Células sanguíneas mononucleares: Las muestras de sangre periférica fueron inmediatamente procesadas bajo flujo laminar, sometiénolas a un gradiente de densidad (Histopaque® 1077, Sigma Diagnostics®).

El anillo de células sanguíneas mononucleares (linfocitos y monocitos) obtenido, se resuspendió en medio de cultivo (RPMI - 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, inactivado por calor (45 min a 56 °C) + gentamicina 5 mg/ml + L-Glutamina 2 mM) y se fraccionó en dos partes iguales: una para estimulación ex - vivo y análisis de producción de citoquinas intracelulares y otra para el estudio de citólisis mediada por células NK.

Determinación de citoquinas intracelulares: La muestra de células mononucleares resuspendida en medio de cultivo, se separó en dos tubos: al primero se le agregó los agentes estimulantes PMA (Phorbol-12-Myristato-13-Acetoato, Sigma® Cat. P-8139) e ionomicina (Calbiochem® Cat. N.407952), en presencia de un inhibidor de transporte de proteínas: GolgiStop® (Becton Dickinson®, Cat N.54724/22), necesario para aumentar la señal de tinción intracelular. Se incubó la muestra por 4 horas en 5% CO₂, a 37°C. El segundo tubo usado como control fue sometido a las mismas condiciones de incubación, sin estimulación. A continuación se efectuó una primera marcación de superficie celular con CD56-PE, luego se permeabilizaron las células con Citofix/Citoperm Plus® (Becton Dickinson®, Cat N.54724/22), para posteriormente marcar las citoquinas intracelulares IFN- γ y TNF- α con anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ (FastImmune™ Anti-IFN- γ Humano-FITC, Becton Dickinson® Cat N. 340449), anti-TNF- α (FastImmune™ Anti-TNF- α Humano-FITC Becton Dickinson® Cat N. 340511), y el control de fluorescencia g1 (IgG1 (g1)- FITC, Becton Dickinson® Cat N. 349041). La lectura se efectuó por citómetro de flujo, utilizando el mismo programa Cell-Quest. Los resultados se expresan como porcentaje de células productoras de citoquinas. Como control de activación se usó CD69-FITC (Pharmingen®), tomando como valor positivo su expresión en más del 50% de las células.

Ensayo de citólisis: Se determina de acuerdo a métodos ya descritos⁽¹¹⁾, brevemente se utilizan como células efectoras, linfocitos sanguíneos periféricos y como células blanco, células K-562, altamente sensibles a las células NK humanas. Las células K-562 se marcan con cromato de sodio ⁵¹Cr (New England Nuclear, USA) y se incuban en placas de 96 pocillos con las células efectoras en diferentes relaciones efector: blanco. La radioactividad se determina en un contador Gamma-Packard y los resultados se expresan como promedios \pm DE del % de lisis específica.

Análisis estadístico: Para el análisis estadístico, se usó el test de Kruskal-Wallis, para variables no paramétricas, considerando una p significativa < 0,05.

Resultados

Características de las pacientes

Las edades promedio de los tres grupos de pacientes fueron comparables: 29,2 años (rango: 23-37 años) para las controles no embarazadas (CN), 29,3 años (rango: 23-33 años) para las embarazadas normales (EN) y 28,1 años (rango: 24 – 32 años) para pacientes con preeclampsia (PE).

En el grupo EN la edad gestacional promedio fue de 38+6 semanas, sus rangos de presión arterial variaron entre 110/70 y 130/80, ninguna presentaba proteinuria ni edema y ninguna se encontraba recibiendo fármacos. Las características del grupo de pacientes con PE se resumen en la Tabla 1.

Linfocitos

El recuento de linfocitos T totales CD3+, de los subtipos CD3+/CD4+ y CD3-/ CD56+16+, correspondiente a las células NK, no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de pacientes analizados (Tabla 2). Sin embargo, es posible apreciar una

Tabla N°1

Características clínicas de las siete pacientes pre-eclámpticas.

Paciente (N°)	Edad (Años +/- Desviación Standard)	Edad Gestacional (Semanas)	Presión Arterial	Proteinuria (mg/24 h)	Edema (extremidades inferiores)	Tratamiento
1	24	40	150/90	300	++	Hidralazina
2	24	40	145/105	300	++	No
3	30	36 ⁺⁵	150/100	442	+++	Sulfato de Mg
4	32	39	190/90	300	+	No
5	32	26	170/100	970	++	No
6	31	34	150/90	300	++	Metildopa
7	25	35	160/90	300	++	No
X	28,3 ± 3,8	35 ⁺⁵				

X = promedio.

tendencia a la baja en el subtipo CD3+/CD4+, correspondiente a las células T helper, de las pacientes pre-eclámpticas ($P < 0,1$). Los distintos subtipos de células citotóxicas (NK) (CD56+16+, de citotoxicidad media; CD56+CD16-, de citotoxicidad baja y CD56-CD16+, de alta citotoxicidad) tampoco presentaron diferencias significativas entre los tres grupos analizados (Figura 1). Sin embargo, las células de mayor actividad citotóxica, CD56-CD16+, representan un 17% del total de células NK en el grupo PE, comparado con 9% en EN y 6% en CN.

Citoquinas Intracelulares

Control de activación: Para el grupo EN, se logró una activación promedio del 53,8% de las células CD56+ (mediana=60%, rango=19,2-78,4%), para el grupo CN, el promedio fue de 58,5%, la mediana de 68,2%, con un rango entre 41,5 y 95,4%. Solo una paciente con PE alcanzó valores de activación sobre el 50%.

INF- γ : La síntesis de INF- γ basal y post estimulación por linfocitos totales y células CD56+, no presentó diferencias entre los tres grupos (Ta-

bla 3 y Figura 2). Una sola paciente del grupo PE presentó niveles basales de INF- γ aumentados.

TNF- α : La producción de TNF- α post estimulación, por los linfocitos totales, fue mayor en el grupo EN (35,8%, rango de 10,5 a 41,3%), y menor en el grupo PE (4,8%, rango de 0 a 34,6%), que las CN (12,5%, rango de 10,2 a

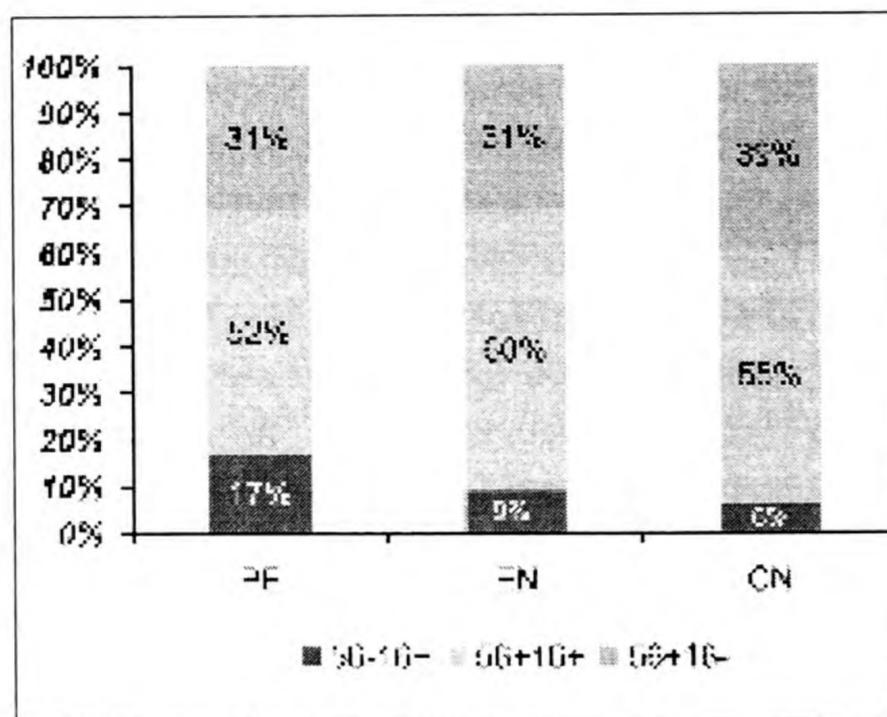


Figura 1: No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de pacientes, en los promedios de los distintos subtipos de células agresoras naturales CD56+CD16+ (fenotipo con actividad citotóxica media), CD56+CD16- (células con baja actividad citotóxica) y CD56-CD16+ (de mayor actividad citotóxica). Sin embargo, estas últimas representan un 17% de las células citotóxicas en el grupo PE, comparado con 9% en EN y 6% en CN.

Tabla 2

Linfocitos en sangre periférica

Tipo de célula	PE (n=7)	EN (n=11)	CN (n=6)	P
	Recuento linfocitos	Recuento linfocitos	Recuento linfocitos	
	Mediana (rangos)	Mediana (rangos)	Mediana (rangos)	
CD3+	2200 (1430-3000)	2330 (1400-2540)	1940 (1660-2700)	0.6751
CD3+/CD4+	595 (447-994)	1042 (429-1260)	971 (610-1152)	0.0661
CD3-/CD16+CD56+	374 (134-1123)	369 (215-831)	318 (165-657)	0.9495

n = número de pacientes en cada grupo.

Se expresa la mediana del recuento total de los subtipos celulares linfocitarios analizados: CD3+, linfocitos T totales; CD3+/CD4+, linfocitos T CD4+ helper ó "ayudadores"; CD3-/CD16+CD56+, células NK. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos.

18,8%), diferencia que fue estadísticamente significativa ($p < 0,0185$). Con respecto a las células CD56+ (Figura 2), observamos que todas las pacientes aumentaron su producción con respecto a la basal, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. Nuevamente pudimos observar que la misma paciente que tuvo un aumento basal en la producción de INF- γ , presentó niveles de TNF- α basales muy aumentados (Tabla 4).

Actividad Citolítica de células NK (ACNK)

La ACNK (% lisis específica \pm DE) en los tres grupos de pacientes no presenta diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,210$): PE = 39,9% \pm 25,3, EN = 61,4% \pm 24,3, CN = 56,6% \pm 27,3.

Discusión

Los resultados muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de pacientes, sin embargo hay una tendencia a una mayor proporción de células CD56-CD16+ (de alta capacidad citotóxica), pero con menor actividad citolítica y una menor síntesis de TNF- α , en la preeclampsia. En embarazadas normales se observó una

mayor producción de esta citoquina que en las no embarazadas.

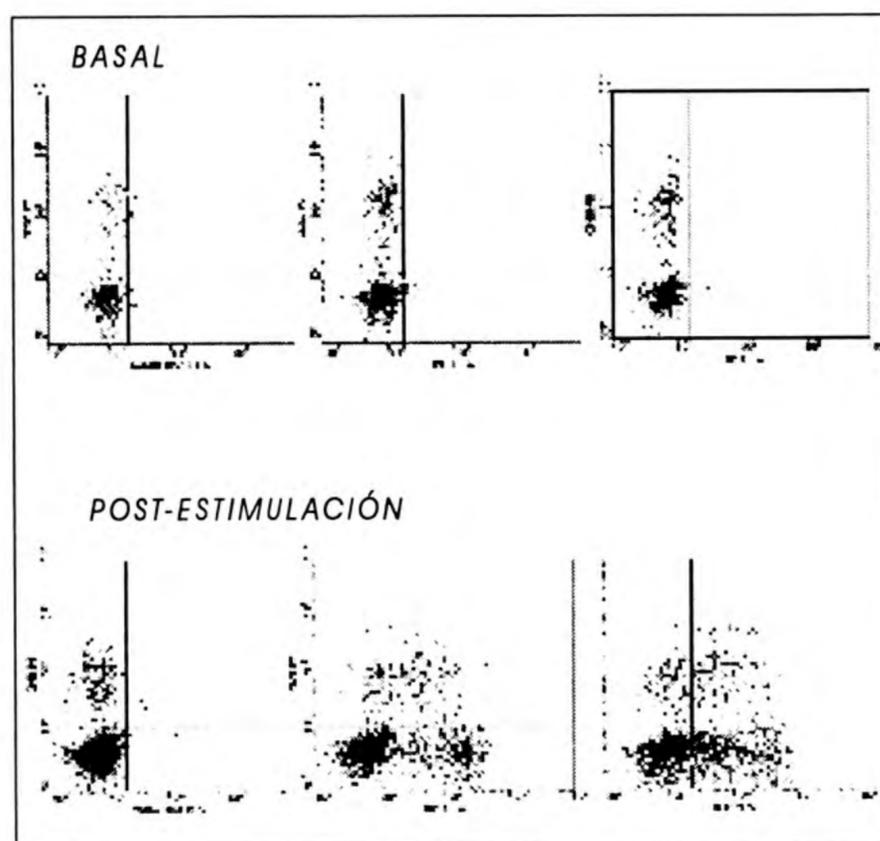


Figura 2: Ejemplo de síntesis de citoquinas medidas a nivel intracelular, antes y después de la estimulación con PMA y ionomicina. En la primera columna se observan los controles de fluorescencia. En la segunda columna, se observa como en condiciones basales, la producción de INF- γ es prácticamente nula, aumentando luego de la estimulación a un 28% en las células CD56+ (cuadrante superior derecho del gráfico de puntos). En la tercera columna, se observa como en condiciones basales, la producción de TNF- α es prácticamente nula, aumentando luego de la estimulación a un 45% en las células CD56+ (cuadrante superior derecho) y alcanzando un 55% en los linfocitos totales (cuadrantes superior e inferior derechos).

Tabla 3

Producción de IFN- γ por linfocitos totales y células CD56+.

Paciente	Linfocitos Basal	linfocitos totales Activado	Células Basal	CD56+ Activado
PE (n=6)	0% (0-23)	28% (5-51)	0% (0-24.9)	4.4% (2.9-81.4)
EN (n=11)	0% (0-0.38)	31% (0-47)	0% (0-1.9)	54.5% (28-87)
CN (n=5)	0% (0-0.5)	12,6% (7-34)	0% (0-1.5)	27.9% (25-51)

La producción de IFN-g por linfocitos totales y células CD56+ se expresa en mediana y rango. En todos los grupos la producción basal fue nula, en tanto que los mayores niveles de producción se observan en embarazadas normales, y los menores niveles en pre-eclámpticas. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 4

Producción de TNF- α por linfocitos totales y células CD56+.

Paciente	Linfocitos Basal	linfocitos totales Activado	Células Basal	CD56+ Activado
PE (n=6)	0% (0-25.7)	8.1% (0-34.6)	0% (0-26.7)	5.7% (1-36)
EN (n=11)	0% (0-0.02)	35% (0-47)	0% (0)	30.5% (11.8-49)
CN (n=5)	0% (0-0)	12,5% (0-18.8)	0% (0-0.36)	5.1% (5-14.1)

La producción de TNF- α por linfocitos totales y células CD56+ se expresa en mediana y rango. En todos los grupos la producción basal fue nula, en tanto que los mayores niveles de producción se observan en embarazadas normales, y los menores niveles en pre-eclámpticas. Estas diferencias solo fueron estadísticamente significativas para los linfocitos totales.

En la medida que avanza la gestación normal, aumenta la actividad de la respuesta inmune innata, reflejada en la mayor expresión de moléculas de adhesión, citoquinas intracelulares y respuesta oxidativa^(5,22,23). En la PE se ha

observado que esta respuesta se exagera, y además se estimula la respuesta inmune específica, en particular aumentan los LT CD4+ productores de IFN- γ y paralelamente disminuyen los LT CD4+ que expresan interleuquina (IL)-4. Este hecho se ha comprobado también al estimular in vitro a LT de pacientes con PE, los cuales aumentan su expresión intracelular tanto de INF- γ como de IL-2^(20,24,25). Esto ha llevado a postular que en la PE predomina una respuesta inmune de tipo Th1.

El rol de las células NK en la PE ha sido escasamente estudiado. Darmochwal-Kolarz et al⁽²⁶⁾ informan de un aumento en la expresión intracelular de IFN- γ en las células NK de pacientes con PE, y plantean la hipótesis de que estas células serían la principal fuente de esta citoquina, esencial en el desbalance de la respuesta inmune hacia Th1.

En el presente estudio, no observamos diferencias en la expresión de INF- γ por linfocitos totales ni células NK, por lo que no pudimos corroborar los resultados de los estudios previamente mencionados.

El aumento de TNF- α en sangre periférica, ya ha sido descrito durante el embarazo y PE, sin embargo no hay datos en la literatura acerca de su estudio a nivel intracelular, como una forma de explicar su origen. Este estudio confirma una mayor producción de esta citoquina por linfocitos de sangre periférica en el embarazo normal, pero no pudimos establecer que las células NK fueran una fuente relevante. De gran interés será analizar monocitos para determinar si ellos son los productores principales.

Tampoco evidenciamos un aumento basal en la expresión de TNF- α en ninguno de los grupos estudiados, a excepción de una paciente del grupo PE que presentó valores basales de 25,7%. Sin embargo se trata de una paciente obesa, y algunos estudios han demostrado

que esta citoquina es producida por los *monocitos* en sangre periférica en los pacientes obesos (basal y post estimulación con mitógenos), medida en el sobrenadante de cultivos, y también en sangre periférica⁽¹⁹⁾. No se ha descrito un aumento de su producción por las células NK en este tipo de pacientes, por lo que no podemos concluir si este resultado puntual se relaciona con la obesidad de la paciente ó con su cuadro de pre-eclampsia.

Por los elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias circulantes (TNF- α e IL-12) encontrados en la pre-eclampsia⁽¹²⁻¹⁴⁾, es esperable una estimulación general de la respuesta inmune, tanto específica como innata.

Logramos demostrar un incremento en el número de células CD56-CD16+, de mayor actividad citotóxica, en la pre-eclampsia, lo cual es concordante con la hipótesis de una hiperactividad de la inmunidad innata. Sin embargo, estas células presentan una tendencia hacia una menor actividad citolítica y no lograron niveles adecuados de estimulación, traducido en una baja producción de INF- γ y TNF- α . Creemos que estos hallazgos pueden enmarcarse en el contexto de un fenómeno de inactivación funcional: se ha demostrado que niveles elevados y sostenidos de citoquinas pro-inflamatorias, son capaces de provocar inactivación y muerte celular, especialmente en células NK⁽²¹⁾.

El número y la respuesta funcional de las células NK depende de numerosas variables como los niveles de los mediadores circulantes, la severidad del cuadro clínico, y los tratamientos farmacológicos. No podemos por lo tanto descartar que alguno de los fármacos utilizados para el tratamiento del síndrome hipertensivo, jugara algún rol en los resultados obtenidos.

Referencias

1. Valdés G, Oyarzún E. Síndromes hipertensivos del embarazo. En: Pérez Sánchez, ed. *Obstetricia*, editorial Mediterráneo, Santiago, 3ª edición, 1999; 594-621.
2. American College of Obstetricians and Gynecologists. Tech Bull nº 219. Hypertension in pregnancy. Washington, DC, 1996.
3. Donoso E, Poblete A, Villarroel L. Mortalidad Materna. Chile: 1990-1996. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 1998; 63: 290-97.
4. Sacks G, Sargent I, Redman C. An Innate View of Human Pregnancy. *Immunol Today*, 1999; 20: 114-18.
5. Sacks G, Studena K, Sargent I, Redman C. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol*, 1998; 179: 80-6.
6. Taylor R. Review: Immunobiology of Preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 1997; 37: 79-86.
7. Salafia C. The Normal Placenta. *Immune Anatomy and Function*. *Immunol Allergy Clin NA*, 1998; 18:271-90.
8. Janeway C, Travers P. Infection and innate immunity. En: *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 3ª edición, Garland Publishing, Nueva York, 1997; 9.
9. Seaman W. Natural killer cells and natural killer T cells. *Arthritis Rheum*, 2000; 43: 1204-17.
10. Fehniger T, Shah M, Turner M, Vandeusen J, Whitman S, Cooper M, et al. Differential Cytokine and Chemokine gene expression by Human NK Cells following activation with IL-18 or IL-15 in Combination with IL-12: Implications for the Innate Immune response. *J Immunol*, 1999; 162: 4511-20.
11. Puente J, Carvajal T, Parra S, Miranda D, Sepúlveda, C, Wolf ME, et al. In vitro studies of natural killer cell activity in septic shock patients. Response to a challenge with α -interferon and interleukin-2. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1993; 32: 271-75.
12. Hamai Y, Fujii T, Yamashita T, Nishina H, Kozuma S, Mikami Y, Taketani Y. Evidence for an elevation in serum interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha levels before the clinical manifestations of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 1997; 38: 89-93.

13. Núñez-González JR, Sanabria-Vera CJ, Romero-Adrian, T. Measurement of the serum concentrations of tumor necrosis factor alpha and its soluble receptors in normal and pre-eclamptic pregnant patients. *Invest Clin*, 2001; 42, 171-81.
14. Daniel Y, Kupfermanc M, Baram A, Jaffa A, Fait G, Wolman I, Lessing J. Plasma IL-12 is elevated in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 1998; 39: 376-80.
15. King A, Loke Y, Chaouat G. NK cells and Reproduction. *Immunol Today*, 1997; 18: 64-66.
16. Matthiesen L, Berg G, ernerudh J, Hakansson L. Lymphocyte subsets and mitogen stimulation of blood lymphocytes in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 1999; 41(3): 192-203.
17. Kaminski K, Wiktoe H, Oleszozuk H. Natural cytotoxicity of CD16+ lymphocytes in women with selected states of pregnancy pathology. *Ginekol Pol*, 1995; 66: 193-97.
18. Hill JA, Hsia S, Doran DM, BRYANS CI. Natural killer cell activity and antibody dependent cel mediated cytotoxicity in preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 1986; 9: 205-12.
19. Tanaka S, Isoda F, Ishihara Y, Kimura M, Yamakawa T. T lymphopaenia in relation to body mass index and TNF- α in human obesity: adequate weight reduction can be corrective. *Clinical Endocrinology*, 2001; 54: 347-54.
20. Saito S, Sakai M, Tanabe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1: Th2 cell ratio during normal human pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*, 1999; 117: 550-55.
21. Ross M, Caligiuri M. Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood* 1997; 89: 910-18.
22. Redman C, Sacks G, Sargent I. Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1999; 180: 499-506.
23. Luppi P, Haluszczak C, Betters D, Richard C, Trucco M, Deloia J. Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women. *J Leukoc Biol*, 2002; 72: 874-84.
24. Yoneyama Y, Susuki S, Sawa R, Yoneyama K, Power G, Araki T. Relation between adenosine and T-helper 1/T-helper 2 imbalance in women with preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 2002; 99: 641-46.
25. Rein D, Shöndorf T, Göhring U, Kurbacher C, Pinto I, Bredeenbach M, et al. Cytokine expression in peripheral blood lymphocytes indicates a switch to T helper cells in patients with preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 2002; 54: 133-42.
26. Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Leszczynska B, Oleszczuk J. The expressions of intracellular cytokines in the lymphocytes of preeclamptic patients. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48: 381-86

Agradecimientos: Los autores agradecen a los Servicios de Alto Riesgo Obstétrico de los hospitales José Joaquín Aguirre, San Juan de Dios y de Carabineros por su colaboración en esta investigación, y al Sr. Rodrigo Villegas de la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Chile, por su ayuda en el análisis estadístico.