

# EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NFkappaB p50 EN PLACENTAS DE MUJERES CON PREECLAMPSIA.

Pesce J.<sup>1</sup>, Pescio T.<sup>1</sup>, Pfeifer J.<sup>1</sup>, Parra-Cordero M.<sup>2</sup>, Bosco C.<sup>3</sup>

1. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

2. Servicio de Ginecología y Obstetricia- Monitoreo Fetal. Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

3. Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo. IBCM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

## Resumen

### Contacto

Cleofina Bosco Becerra.  
c.bosco@med.uchile.cl

Dirección: Independencia  
#1027. Laboratorio de  
Placenta y Desarrollo Fetal.  
ICBM. Facultad de Medicina.  
Universidad de Chile.

**Introducción:** NF-kB regula la señalización de citoquinas inflamatorias que llevan a apoptosis por estrés oxidativo. La preeclampsia es una patología del embarazo con hipertensión, proteinuria y edema en la madre, síntomas que desaparecen una vez expulsada la placenta. Dado que en preeclampsia este órgano presenta un estrés oxidativo con hipoxia y daño endotelial, nuestro propósito fue determinar la expresión inmunohistoquímica de NF-kB en placentas de término provenientes de mujeres con embarazos normales y con preeclampsia. **Metodología:** En cortes histológicos de placenta se aplicó el Anticuerpo Rabbit policlonal anti-human NF-kBp50, Santa Cruz-114, dilución 1:50. El grado de expresión antígeno-anticuerpo se cuantificó al microscopio óptico con método no paramétrico semicuantitativo estandarizado. La frecuencia de los resultados se expresó como porcentaje para cada categoría y se aplicó Pearson Chi cuadrado, con  $p < 0.05$ . **Resultados:** El factor NF-kB se encontró tanto en el citoplasma como en el núcleo de sinciotrofoblasto, capa muscular de las arterias, endotelio y miofibroblastos de las vellosidades coriónicas, sin diferencias significativas entre los grupos. **Conclusiones:** La presencia de NF-kB en el citoplasma de las diferentes células de las vellosidades coriónicas indica que el factor está unido a I $\kappa$ B y por tanto inactivo, sin embargo su presencia en el núcleo indican una actividad transcritora de genes relacionados con la inflamación y/o apoptosis. Al no encontrar diferencias significativas entre los grupos en estudio se concluye que la vía de señalización de NF-kBp50 no corresponde a la inducida por TNF $\alpha$  vía NF-kBp38.

*Financiado: Fondecyt 1090245*

*Palabras claves: preeclampsia, factor de transcripción NF-kB, placenta.*

# IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF THE TRANSCRIPTION FACTOR NFκB p50 IN PLACENTAS FROM WOMEN WITH PREECLAMPSIA.

Pesce J.<sup>1</sup>, Pescio T.<sup>1</sup>, Pfeifer J.<sup>1</sup>, Parra-Cordero M.<sup>2</sup>, Bosco C.<sup>3</sup>

1. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

2. Servicio de Ginecología y Obstetricia- Monitoreo Fetal. Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

3. Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo. IBCM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

## Abstract

### Contacto

Cleofina Bosco Becerra.  
c.bosco@med.uchile.cl

Dirección: Independencia  
#1027. Laboratorio de  
Placenta y Desarrollo Fetal.  
ICBM. Facultad de Medicina.  
Universidad de Chile.

**Introduction:** NF-κB regulates the signaling of inflammatory cytokines that leads to apoptosis by oxidative stress. Preeclampsia is a pregnancy pathology associated to hypertension, proteinuria and edema, symptomatology that ceases once the placenta is expelled. Since in under preeclampsia condition this organ shows oxidative stress associated to hypoxia and endothelial harm, our purpose was to determinate the immunohistochemical expression of NF-κB in term placentas from women with normal pregnancies and with preeclampsia. **Methodology:** Rabbit policlonal anti-human NF-κBp50 Antibody (Santa Cruz-114), 1:50 dilution was applied to histological placental tissue samples. Expression of NF-κB was quantified by optic microscopy and the differences were assessed using a non parametric semiquantitative standardized method. The frequency of the results was expressed as a percentage for each category and it was applied of Pearson Chi Square, with  $p < 0.05$ . **Results:** NF-κB was found in cytoplasm as well as in nucleous of cells from the syncytiotrophoblast, muscular layer of arteries, endothelium and myofibroblasts from chorionic villi, with no significant differences between both groups. **Conclusions:** The presence of NF-κBp50 in the cytoplasm of the different cell types of the chorionic villi indicates that the factor is united to IκB and therefore inactive. Nevertheless, its presence in the nucleus indicates a gene transcriber activity, related with inflammation and/or apoptosis. As no significant differences were observed between the study groups, this support the conclusion that the signaling pathway of NF-κBp50 does not correspond to the pathway induced by TNFα such it was demonstrated by NF-κBp38.

*Financed: Fondecyt 1090245*

*Key words: preeclampsia, NF-κB transcription factor, placenta.*

## Introducción

### Placenta

La placenta es un órgano transitorio encargado de mantener durante todo el período gestacional una homeostasis normal y un adecuado intercambio metabólico madre/feto. La placentación se inicia desde la implantación y está marcada por varios sucesos, los que incluyen la diferenciación del trofoblasto embrionario a citotrofoblasto (CTB), para que luego el CTB se diferencie a sinciotrofoblasto (STB). Este último tiene una gran actividad lítica, lo que permite la implantación y avance del blastocisto por el estroma endometrial. Otros procesos relevantes en las etapas siguientes de la placentación incluyen el crecimiento y arborización de las vellosidades coriónicas (VC).

La placenta está compuesta por dos zonas, una materna (decidua basal) y una fetal (corion frondoso). Esta última está formada por VC con diferentes características y funciones: vellosidades troncales, de intercambio o libres y vellosidades de anclaje. Las VC troncales constituyen aquellas vellosidades que contienen ramas arteriales y venosas provenientes desde y hacia el cordón umbilical. Las VC de anclaje corresponden a aquellas vellosidades troncales unidas a la decidua basal, y las VC de intercambio o libres, representan las últimas ramas de las VC troncales y contienen los capilares fetales que son los responsables del intercambio de metabolitos/catabolitos con la sangre materna. Éstas últimas son las que constituyen la barrera placentaria, barrera compuesta desde el exterior hacia el interior por: STB, CTB, estroma del tejido conectivo vellositario y endotelio del capilar fetal.

Entre la decidua basal y el corion frondoso se forma un espacio cerrado denominado cámara hemática, la cual se encuentra dividida por septos deciduales en lóbulos o cotiledones placentarios, los que están formados por dos o más VC troncales y sus respectivas ramificaciones de VC de intercambio. Es en esta cámara hemática donde desemboca y circula la sangre materna proveniente de las arterias espiraladas del endometrio para así realizar el intercambio de gases y nutrientes con la sangre fetal.

A partir de las 32 semanas de gestación aproximadamente, se observa un gran aumento de peso en

el feto, lo que se coincide con cambios estructurales que experimentan las VC libres, cambios que facilitan el intercambio metabólico. Esto consiste en un adelgazamiento de la barrera placentaria, a expensas de disminución del grosor del STB, la reagrupación de sus núcleos en nodos sinciciales, y la disminución del número de células del CTB. De esta forma se estructuran las zonas alfa de la barrera placentaria, zonas donde no hay presencia de CTB. Se ha postulado que la desaparición del CTB obedece a la activación de la apoptosis en este tipo celular, epitelio que hasta entonces se caracterizaba por su gran actividad mitótica para diferenciar a STB [1].

Respecto al CTB que formó parte de la barrera placentaria, cabe ahora destacar que a partir de la semana 12 de la gestación, período en que las VC troncales han crecido al punto de anclarse a la decidua basal, éstas células no diferencian a STB pasando en cambio a formar otro tipo celular denominado trofoblasto extravelositario (TEV). Estas células cambian de fenotipo epitelial a célula mesodérmica, con actividad migratoria y de secreción de matriz extracelular (MEC) en la decidua basal. Este TEV tiene gran capacidad mitótica y forma 2 líneas celulares: TEV invasivo y TEV secretor. El primero migra por el endometrio y remodela a las arterias espiraladas, reemplazando el endotelio y parte de la capa muscular, transformándolas así en vasos sanguíneos de baja resistencia y alta capacitancia. En cambio las células de TEV secretor avanzan por la decidua basal secretando MEC, lo que origina la membrana de Nitabuch, la que marca el fin de la placentación. Esta membrana previene una placentación excesiva en el miometrio. Si la reestructuración de las arterias espiraladas no se realiza en forma adecuada fallará un mayor aporte de flujo sanguíneo a cámara hemática y se producirá una disminución de la presión de O<sub>2</sub>. Lo anterior producirá una hipoxia en cámara hemática y se desencadenará un estrés oxidativo en la placenta y el desarrollo de una patología del embarazo como lo es la preeclampsia [2,3].

### Preeclampsia.

La preeclampsia es una complicación médica del embarazo asociada a hipertensión, una elevada proteinuria y edemas en las extremidades de la madre [4,5]. Su incidencia en la población va de un 6% a un

10% y ocurre durante el segundo y tercer trimestre del embarazo. La única solución para esta patología es la inducción del parto. Si esto no es posible debido a que el embarazo es muy temprano, se deben tomar medidas para controlar este síndrome y permitir que el feto alcance una mayor madurez. Estos pasos incluyen bajar la presión arterial, con descanso en cama o medicamentos y una constante observación médica.

La génesis de esta complicación es desconocida, aunque se postula que tiene relación con la placenta [6] en virtud que los síntomas desaparecen una vez expulsado el órgano.

La preeclampsia es más común en el primer embarazo y en las mujeres con hermanas o madres que la han presentado. El riesgo de sufrir preeclampsia es más alto si el embarazo es múltiple, si la madre es adolescente, obesa o si tiene más de 40 años. Otros factores de riesgo son que la madre tenga la presión alta, diabetes o que sufra de alguna enfermedad renal previa.

La disfunción endotelial descrita en la preeclampsia puede llegar a impedir que la placenta mantenga un adecuado intercambio metabólico en la barrera placentaria, lo que se traducirá en que el feto recibirá un menor aporte de metabolitos. Esto puede ocasionar un lactante de bajo peso al nacer, entre otros problemas. Aun así, la mayoría de las mujeres con preeclampsia dan a luz a bebés saludables.

#### **Factor de transcripción NF-kappaB (NF-kB).**

El NF-kB forma parte de una familia de factores de transcripción inducibles que participan en la respuesta inmune y en la respuesta inflamatoria. También está involucrado en la prevención de la apoptosis inducida en tratamientos con citoquinas.

Normalmente se encuentra en el citoplasma de las células en forma inactiva, formando un complejo con una proteína llamada inhibidor del NF-kB o I $\kappa$ B. Esta proteína al unirse a este factor produce un impedimento estérico que detiene la entrada del NF-kB al núcleo, impidiendo la transcripción de diversos genes.

El NFkappaB se ha definido como un factor de transcripción que al ubiquitinisarse es reconocido por

el complejo proteasa para su activación. Este factor tiene un dominio a través del cual forma homo o heterodímeros, de los cuales los más comunes son p50, p65, p52/p65, los que pasan a ser el sitio de unión de su inhibidor I $\kappa$ B, sitio que contiene las secuencias de localización nuclear y las secuencias de unión al ADN.

Resumiendo, la actividad del NFkappaB depende de su localización celular. Si esta en el citoplasma se encuentra formando un complejo trimérico con I $\kappa$ B, el que oculta sus secuencias de destino nuclear y es por tanto, transcripcionalmente inactivo. Cuando I $\kappa$ B se fosforila es ubiquitinilado, lo que permite su reconocimiento por el proteosoma que lo degrada, liberando el dímero del NFkappaB que se trasloca al núcleo donde activa a sus genes blanco [7].

Por último, se demostró recientemente [8] en placentas provenientes de mujeres con preeclampsia, que éstas presentaban un aumento de la expresión de genes relacionados con NFkappaB.

El propósito de este estudio fue determinar la expresión inmunohistoquímica del factor NFkappaB en placentas de término provenientes de mujeres con embarazo normal y mujeres con preeclampsia.

## **Materiales y Metodología**

### **Diseño del protocolo.**

Este estudio caso-control fue realizado de acuerdo al protocolo aprobado por el comité de ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile para los Proyectos Fondecyt N° 1050482 y 1090245, en el cual todas las mujeres dieron su consentimiento informado para participar en él. La edad gestacional se determinó por ecografía realizada entre la semana 22 y 25 de gestación.

- Criterios de inclusión del grupo control: embarazos entre 35-42 semanas de gestación y con una gestación normotensa.

- Criterios de exclusión serán anomalías fetales, tumor placentario, infección intrauterina, embarazo gemelar y patologías obstétricas

Las muestras fueron obtenidas de pacientes controladas en el servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Se

obtuvieron muestras de placentas provenientes de embarazos de término normales (grupo control) y de pacientes con preeclampsia. Las muestras fueron procesadas con métodos histológicos de rutina para observación con microscopio óptico. Se realizaron cortes de 5m de espesor y se realizó técnica para inmunohistoquímica con aplicación del anticuerpo Rabbit policlonal anti human NF-kappa B p50, marca Santa Cruz-114, en dilución 1:50, con incubación 1 hora a temperatura ambiente. Se usó DAB como cromógeno y los núcleos fueron contrastados con Hematoxilina de Harris.

El grado de la reacción antígeno/anticuerpo se cuantificó a través de un método no paramétrico semicuantitativo de acuerdo a la siguiente escala:

- Reacción intensa: +++;
- Reacción moderada: ++;
- Reacción tenue: +;
- Sin reacción: 0

Los resultados según la zona de tinción considerada se expresaron como porcentaje para cada categoría evaluada y se aplicó el Test de Pearson Chi cuadrado (software Stata 7.0) para realizar las comparaciones entre los grupos en estudio, con una significancia estadística de  $p < 0.05$ .

## Resultados

La expresión inmunohistoquímica del factor NF-kB p50 en muestras provenientes de placentas de mujeres que tuvieron embarazo normal (n=5) y de mujeres que tuvieron embarazo con preeclampsia (n=5) están expresados en las tablas N° 1, 2, 3, 4 y 5. Los resultados demostraron que el factor NF-kB estaba presente tanto en el citoplasma como en el núcleo del sinciotrofoblasto, al igual que en las células de la capa muscular de las arterias, el endotelio y en los miofibroblastos de las vellosidades coriónicas. No se encontraron diferencias significativas al comparar los resultados entre los grupos.

**Tabla 1.** Expresión inmunohistoquímica del factor NF-kB p50 en las células de la capa muscular de arterias y arteriolas de vellosidades coriónicas de intercambio

	+++	++	+	0	Total
<b>Control</b>	1 25.00	2 50.00	1 25.00	0 0.00	4 100.00
<b>Preeclampsia</b>	0 0.00	0 0.00	2 66.67	1 33.33	3 100.00
<b>Total</b>	1 14.29	2 28.57	3 42.86	1 14.29	7 100.00

Los resultados están expresados como % para cada categoría evaluada.  $p = 0.233$  entre placentas control y con preeclampsia a través del test de Pearson  $\chi^2$ .

**Tabla 2:** Expresión inmunohistoquímica del factor NF-kB p50 en los miofibroblastos de vellosidades coriónicas de intercambio

	++	+	0	Total
<b>Total</b>	1 20.00	3 60.00	1 20.00	5 100.00
<b>Preeclampsia</b>	1 33.33	0 0.00	2 66.67	3 100.00
<b>Total</b>	2 25.00	3 37.50	3 37.50	8 100.00

Los resultados están expresados como % para cada categoría evaluada.  $p = 0.221$  entre placentas control y con preeclampsia a través del test de Pearson  $\chi^2$ .

**Tabla 3: Expresión inmunohistoquímica del factor NF-kB p50 en el endotelio de vellosidades coriónicas de intercambio**

	++	+	0	Total
<b>Control</b>	1 20.00	3 60.00	1 20.00	5 100.00
<b>Preeclampsia</b>	0 0.00	2 40.00	3 60.00	5 100.00
<b>Total</b>	1 10.00	5 50.00	4 40.00	10 100.00

Los resultados están expresados como % para cada categoría evaluada.  $p = 0.333$  entre placentas control y con preeclampsia a través del test de Pearson  $\chi^2$

**Tabla 4: Expresión inmunohistoquímica del factor NF-kB p50 en los núcleos del sinciotrofoblasto de vellosidades coriónicas de intercambio**

	(+)	(-)	Total
<b>Control</b>	4 80.00	1 20.00	5 100.00
<b>Preeclampsia</b>	3 75.00	1 25.00	4 100.00
<b>Total</b>	7 77.78	2 22.22	9 100.00

Los resultados están expresados como % para cada categoría evaluada.  $p = 0.858$  entre placentas control y con preeclampsia a través del test de Pearson  $\chi^2$

**Tabla 5: Expresión inmunohistoquímica del factor NF-kB p50 en el citoplasma del sinciotrofoblasto de vellosidades coriónicas de intercambio**

	+++	++	+	0	Total
<b>Control</b>	3 60.00	1 20.00	1 20.00	0 0.00	5 100.00
<b>Preeclampsia</b>	1 20.00	1 20.00	2 40.00	1 20.00	5 100.00
<b>Total</b>	4 40.00	2 20.00	3 30.00	1 10.00	10 100.00

resultados están expresados como % para cada categoría evaluada.  $p = 0.506$  entre placentas control y con preeclampsia a través del test de Pearson  $\chi^2$

## Discusión

En este estudio comprobamos que el factor NF- $\kappa$ B se encontraba tanto en placentas del grupo control como del grupo con preeclampsia (PE). La reacción inmunohistoquímica fue positiva tanto en el citoplasma como en el núcleo del sinciotrofoblasto (Figuras N° 1 y 2). La presencia inmunohistoquímica de este factor en el citoplasma de esta capa epitelial no es un indicador de actividad de él, dado que podría ser que el factor aún estuviera unido a su inhibidor I $\kappa$ B, motivo por el cual observamos positividad en esta zona del sincicio. Sin embargo, su presencia positiva en los núcleos sinciciales es indicador que el factor está activamente transcribiendo genes [7].



Figura N° 1: Fotografía de vellosidad coriónica proveniente de placenta de mujer con embarazo normal y con el uso del Ac anti NF- $\kappa$ B (p50). Las flechas indican reacción positiva en el núcleo (flecha negra) y en el citoplasma (punta de flecha). Original X40



Figura N° 2: Fotografía de vellosidad coriónica proveniente de placenta mujer con PE y con el uso del Ac anti NF- $\kappa$ B (p50). Las flechas indican reacción positiva en el núcleo (flecha negra) y en el citoplasma (punta de flecha). Original X40

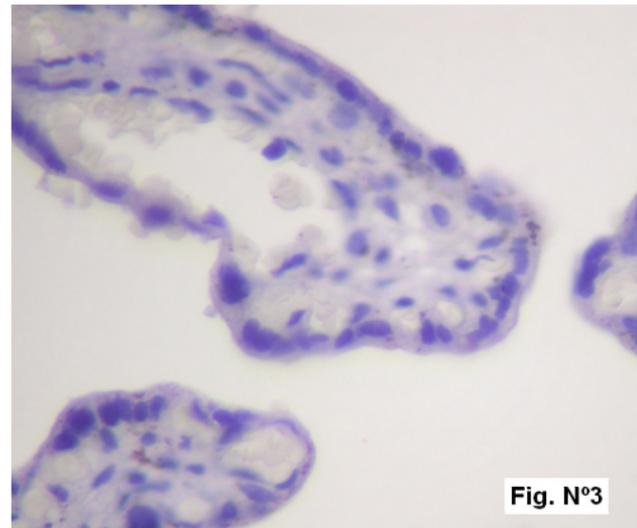


Figura N° 3: Fotografía de vellosidad coriónica proveniente de placenta mujer con PE. Control negativo en el que se ha omitido el Ac anti NF- $\kappa$ B (p50). Original X40

Por otro lado, el estudio demostró que las placentas de mujeres con PE no presentaron una reacción positiva y significativamente mayor en el núcleo del sincicio como se postulaba (Tabla N°4), encontrándose incluso que el p value tampoco mostró una tendencia

para este grupo en esta zona celular. Sin embargo, se observó una ligera tendencia en el grupo PE al comparar la expresión del factor en el citoplasma del sincicio (Tabla Nº 5). Podría especularse que el estrés oxidativo desarrollado en las placentas con PE podría estar activando algunas moléculas que impedirían en el sincicio la fosforilación de I $\kappa$ B y por tanto se estaría impidiendo la transcripción al núcleo de NF- $\kappa$ B p50.

Gutiérrez y Castillo [7] propusieron que una vez que NF- $\kappa$ B ingresa al núcleo, puede activar genes cuyos productos bloquean el paso de la señal apoptótica de la vía mediada por receptores (extrínseca), las que inactivarían a las caspasas, o también pueden activar genes anti-apoptóticos como el Bcl2 de la vía intrínseca, que impide la liberación del citocromo c de la mitocondria. Por otro lado, los autores Valen y col. [9] describieron en corazón, que una vez en el núcleo, NF- $\kappa$ B puede activar una vía pro-apoptótica o una vía anti-apoptótica dependiendo de la pre-condición de isquemia del tejido que constituye el órgano.

Cabe recordar que en la pre-eclampsia se produce una reperusión con isquemia para el tejido, esto como consecuencia que el TEV, encargado de remodelar las arterias espiraladas del endometrio materno para asegurar una buena oxigenación en la cámara hemática, falla en realizar esta remodelación, produciéndose una isquemia uteroplacentaria que conlleva al desarrollo de un estrés oxidativo en la placenta con el consecuente aumento de la apoptosis en el órgano, lo que desencadena finalmente esta patología del embarazo [4].

Por lo anterior, la vía de la apoptosis en el sinciotrofoblasto no sería exclusiva del NF- $\kappa$ B, ya que este factor interacciona con varios otros factores, los que finalmente determinan cual vía activar, la vía anti-apoptótica o la vía pro-apoptótica. De acuerdo a nuestros resultados podríamos postular que la activación de este factor en los casos de PE estaría indicando que I $\kappa$ B fue ubiquitinizado y degradado en el proteosoma lo que permitió la entrada de NF- $\kappa$ B al núcleo del sinciotrofoblasto, pero sin una actividad mayor a lo observado en las placentas normales [10].

Por otro lado, otros autores han demostrado que al término del embarazo la actividad del NF- $\kappa$ B se

encuentra aumentada en células amnióticas, células en las cuales la función de este factor es estimular la expresión de COX-2. Lo anterior contribuye al retiro funcional de la progesterona a través de una interacción con el receptor de esta hormona [11]. Esto explicaría que es normal que la actividad del NF- $\kappa$ B esté aumentada al final del embarazo, pero hacia otra vía, lo que se relacionaría con los resultados por nosotros encontrados en muestras de placentas de término.

Es importante destacar que Sunderland y col. [12] indujeron preeclampsia con las mismas características observadas en mujeres mediante la administración de TNF $\alpha$  a primates Papios (baboons) tanto embarazadas como no embarazadas, donde las últimas no desarrollaron la enfermedad. Lo anterior se relacionaría los trabajos de Benyo y col. [13] quienes demostraron que TNF $\alpha$  es el inductor del inicio de la apoptosis en el trofoblasto de las vellosidades coriónicas, pero falta dilucidar por la activación de cual vía el fenómeno avanza.

Cabe recordar que la preeclampsia está descrita en relación a un aumento del estrés oxidativo en la placenta [14] y por otro lado se sabe que el estrés oxidativo es una señal que activa a los factores de la familia del NF- $\kappa$ B [10,15]. Esto se ha demostrado dado que al administrar in vitro vitamina E (antioxidante) en vellosidades coriónicas, se ha logrado inhibir la vía del NF- $\kappa$ B p38 MAPK, previniendo la activación de NADPH oxidasas en la mitocondria, resultando así una baja en los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS), elementos relacionados con el estrés oxidativo [16]. Sobre la base de lo anterior, los autores concluyeron que NF- $\kappa$ B p38 sería el factor regulado por TNF $\alpha$ . Esto podría explicar nuestros resultados dado que estamos determinando otra familia del NF- $\kappa$ B (p50).

En virtud de que la preeclampsia se ha relacionado por un lado con el estrés oxidativo de la placenta y por el otro con la alteración del Doppler de arterias uterinas en estas mujeres [17], se ha intentado prevenir la aparición de esta patología en mujeres embarazadas con riesgo de PE mediante la administración de vitaminas C y E, pero los resultados no han sido positivos [18,19].

Se concluye que las muestras analizadas con el uso del Ac del NF- $\kappa$ B (p50) no mostró diferencias significativas entre el grupo control y grupo PE. Además, es posible que un aumento del número de muestras pueda dar resultados más significativos para aquellos casos en que se observó una tendencia, como lo fue el citoplasma del sincicio.

En virtud que Manna y col. [20], han descrito que Resveratrol inhibe la activación del NF- $\kappa$ B inducida por TNF, se podría proyectar una futura administración de este fármaco en la prevención del desarrollo de la preeclampsia.

#### Referencias

- Langman, Embriología Médica con Orientación a la clínica, cap 4 Ed. Panamericana (Chile) 10° Edición 2006.
- Bosco C. Alcohol and xenobiotics in placenta damage. In Preedy VR, Watson RR (eds). *Comprehensive Handbook of Alcohol Related Pathology*, Vol. 2. London: Elsevier Science; 2005: 921-35.
- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacey O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest*; 1997; 1;99(9):2139-51.
- Sibai BM. Hypertension. In: Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL, eds. *Obstetrics - Normal and Problem Pregnancies*. 5th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone; 2007: chap 33.
- Cunningham FG, Leveno KL, Bloom SL, et al. Hypertensive disorders in pregnancy. In: Cunningham FG, Leveno KL, Bloom SL, et al, eds. *Williams Obstetrics*. 22nd Ed. New York, NY; McGraw-Hill; 2005: chap 34.
- Redman C.W.C "Current Topic: preeclampsia and the placenta" (1991). *Placenta* 12: 301-308.
- Gutiérrez S, del Castillo E. El papel del factor de transcripción NF $\kappa$ B en la célula cardíaca. *Arch. Cardiol. Mexico*. 2005; 75: 363-370.
- Centlow M., Wingren C., Borrebaeck C., Brownstein M J., Hansson SR. Differential gene expression analysis of placentas with increased vasculature resistance and Preeclampsia using whole-genome microarrays. *J Pregnancy*. 2011; 472354-472362.
- Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2001; 38: 307-314.
- Hernández S, Rojas E (2005) El papel del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en la célula cardíaca. *Archivos de Cardiología de México* Vol. 75 Número 3/Julio-Septiembre pp363-370.
- Allport VC, Pieber D, Slater DM, Newton R, White JO, Bennett PR: Human labour is associated with nuclear factor- $\kappa$ B activity which mediates cyclo-oxygenase-2 expression and is involved with the functional progesterone withdrawal. *Mol Hum Reprod* 2001, 7:581-586 .
- Sunderland NS, Thomson SE, Heffernan SJ, Lim S, Thompson J, Ogle R, McKenzie P, Kirwan PJ, Makris A, Hennessy A. Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces a model of preeclampsia in pregnant baboons (*Papio hamadryas*). *Cytokine*. 2011 Nov;56(2):192-9.
- Benyo DF, Miles TM, Conrad KP: Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 May;82(5):1582-8.
- Bosco C, Buffet C, Díaz E, Rodrigo R, Morales P, Barja P, Terra R, Parra-Cordero M. VEGF in the muscular layer of placental blood vessels: immuno-expression in preeclampsia and intrauterine growth restriction and its association with the antioxidant status. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2010; 8: 87-95.
- Van den Berg R., Haenen G., van den Berg H., Bast A. Transcription factor NF- $\kappa$ B as a potential biomarker for oxidative stress. *Br. J. Nutrition*. 2001; 86: S121-S127.
- Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones D, Burton G. Nuclear factor NF $\kappa$ B, p38, and stress-activated protein kinase, mitogen-activated protein kinase signalling pathway regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress. *Am J Pathol*. 2007; 170: 1511-1520.
- Parra-Cordero M, Rodrigo R, Barja P, Bosco C, Rencoret G, Sepúlveda-Martinez A, Quezada S. Prediction of early and late pre-eclampsia from maternal characteristics, uterine artery Doppler and markers of vasculogenesis during the first trimester of pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012 Jul 17. doi: 10.1002/uog.12264.
- Conde-Agudelo A, Romero R, Kusanovic JP, Hassan SS. Supplementation with vitamins C and E during pregnancy for the prevention of preeclampsia and other adverse maternal and perinatal outcomes: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Jun;204(6):503.e1-12.

19. Rossi AC, Mullin PM. Prevention of pre-eclampsia with low-dose aspirin or vitamins C and E in women at high or low risk: a systematic review with meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011 Sep;158(1):9-16.
20. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6509-19.