

Determinación de las concentraciones séricas del factor de necrosis tumoral α y de sus receptores solubles en embarazadas normales y preeclámplicas.

José Rafael de Jesús Núñez-González¹, Charles Jonhson Sanabria-Vera^{2,4} y Tania Romero-Adrián^{1,3}.

¹Cátedra de Inmunología, ^{1,2}Escuela de Medicina, ³Postgrado de Inmunología. Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia, Maracaibo-Venezuela. ⁴Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital "Dr. Manuel Noriega Trigo", Instituto Venezolano de los Seguros Sociales -IVSS, San Francisco, Estado Zulia, Venezuela.

Palabras clave: Embarazo, preeclampsia, citocinas, TNF , sTNF -RI, sTNF -RII.

Resumen. Con el objeto de determinar las concentraciones séricas del factor de necrosis tumoral (TNF) y de sus receptores solubles I y II (sTNF -RI y RII), se diseñó un estudio clínico prospectivo multicéntrico en el cual se estudiaron 30 gestantes, 15 controles normales (grupo A) y 15 con diagnóstico de preeclampsia (PE) (grupo B), pareadas por edad cronológica y edad gestacional. Se recolectaron muestras de sangre sin anticoagulante y se determinó el TNF por análisis inmunoenzimático y los receptores solubles por análisis inmunoenzimático de sensibilidad amplificada. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student no pareada. Los valores de TNF fueron $7,07 \pm 1,63$ pg/mL ($X \pm EE$) en el grupo A y de $16,43 \pm 2,92$ pg/mL en el B ($p < 0,05$). El sTNF -RI alcanzó cifras de $2,69 \pm 0,17$ ng/mL y $5,18 \pm 0,54$ ng/mL en los grupos A y B respectivamente ($p < 0,001$) y el sTNF -RII se halló en niveles de $5,94 \pm 0,27$ pg/mL en las gestantes sanas y $9,02 \pm 0,66$ pg/mL en las pacientes con PE ($p < 0,001$). Se concluye que el TNF , el TNF -RI y el TNF -RII se elevan durante la PE. Se recomienda identificar factores de riesgo en PE que permitan la síntesis incrementada de TNF y sus receptores solubles y evaluar si disminuyendo las concentraciones de la citocina en el embarazo se altera la incidencia y severidad de la PE.

Serum measurements of TNF α and TNF α -soluble receptors in normal pregnancies and preeclampsia.

Invest Clín 2001; 42(3): 171-181.

Key words: Pregnancy, preeclampsia, citokynes, TNF , sTNF -P55, sTNF -P75.

Abstract. A multicentric prospective clinical study was designed with the purpose of measure tumor necrosis factor alpha (TNF) and tumor necrosis factor alpha-receptors p55 and p75 (sTNF -p55 and sTNF -p75) in normal pregnancy and preeclampsia (PE). Blood samples were collected without anticoagulant from 30 pregnant women, matched for cronological and gestational age, 15 healthy pregnant (group A) and 15 women with PE (group B). TNF was measured by enzyme linked immunosorbent assay and sTNF -p55 and sTNF -p75 were measured by amplified immunoenzymometric assay. The statistical analysis was carried out using the paired t Student test. The values of TNF were 7.07 ± 1.63 pg/mL ($X \pm SE$) in group A and 16.43 ± 2.92 in group B pg/mL ($p < 0.05$.); concentrations of sTNF -p55 were 2.69 ± 0.17 ng/mL and 5.18 ± 0.54 ng/mL in groups A and B respectively ($p < 0.001$); sTNF -p75 reached levels of 5.94 ± 0.27 ng/mL in healthy pregnant and 9.02 ± 0.66 ng/mL in patients with PE ($p < 0.001$). TNF , sTNF -p55 and sTNF -p75 were significantly higher in preeclamptic women than in normotensive controls. These findings indicate that the levels of TNF , el TNF -p55 and TNF -p75 were elevated in PE. Further research is needed to identify modifiable risk factors for the excessive synthesis and release of TNF in pregnancy, and to assess whether the lowering of TNF concentrations in pregnancy alters the incidence and severity of PE.

Recibido: 10-11-2000. Aceptado: 26-7-2001.

INTRODUCCIÓN

Durante el embarazo se produce un estado inmunológico especial, que se debe a un predominio del patrón linfocitario de producción de citocinas tipo Th2 (1,2), las cuales son capaces de suprimir la respuesta celular (3). Los mecanismos que median, actúan a nivel del lecho placentario condicionando inmunosu-

presión local, evitando así el rechazo del aloinjerto fetal.

La preeclampsia (PE) denominada enfermedad de las teorías, es un proceso patológico que se inicia con una defectuosa invasión trofoblástica. Meekins y col. (4) demostraron que esta invasión ocupa el 44% de los segmentos deciduales de las arterias espirales y el 18% de los segmentos miometriales, a diferencia del embarazo normal, en el cual

todos los segmentos deciduales y el 76% de los miometriales muestran la invasión. Los trastornos en la migración trofoblástica llevan a una placentación anormal, hipoperfusión placentaria, daño endotelial y aterosclerosis, factores que participan en el desarrollo de la PE (5).

La aparición común de la PE en las primigestas, su riesgo incrementado con una nueva pareja y reducido cuando la actividad sexual previa tiene mayor duración, sugieren un mecanismo inmunitario como posible responsable de las alteraciones en la placentación (6).

Esta enfermedad es una de las mayores causas de morbilidad materna y complica al 6-8% de los embarazos (7), y en ella se ha descrito un incremento de las citocinas del patrón linfocitario Th1 (8-11). Entre las citocinas que influyen en la fisiopatología de la PE se encuentran: el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), la Interleucina 1 (IL 1) y la Interleucina 6 (IL 6). El TNF α ha recibido el nombre de caquetina, por participar en el deterioro que acompaña a las enfermedades crónicas como el cáncer (12). A nivel del metabolismo lipídico, induce lipólisis de los adipocitos, síntesis de ácidos grasos hepáticos "de novo", deterioro de la cetogénesis y oxidación de los ácidos grasos hepáticos. El resultado es un incremento de la síntesis de triglicéridos hepáticos, además reduce la actividad de la lipasa lipoproteica, alterando la remoción de lipoproteínas ricas en triglicéridos de la circulación. Puede alterar el flujo de electrones a nivel mi-

tocondrial, liberándose radicales libres oxidados con subsecuente formación de peróxidos lipídicos inductores de la disfunción hepática en la PE (13).

Los niveles séricos del TNF α varían según la edad gestacional; describiéndose significativamente más altos en el segundo trimestre al relacionarlo con el primero y el tercero; sin diferir de los valores en mujeres no embarazadas (14-18). Su comportamiento es controversial en PE, mientras Kupferminc y col. (19) sostienen que se eleva en la misma, Schiff y col (20) no han encontrado diferencias con relación al grupo testigo.

Los receptores solubles del TNF (sTNF Rs) consisten en moléculas proteicas que son liberadas postactivación celular y se encuentran presentes en la orina, el plasma, líquido amniótico y en los sobrenadantes de los cultivos celulares estimulados (21). Se ha demostrado su presencia en pacientes con cáncer, insuficiencia renal crónica y síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto (22-24). Estos sTNF -Rs se unen al TNF α para antagonizar y controlar los efectos que produce la citocina al incrementar sus concentraciones. Con relación a la gestación se ha descrito que los sTNF -Rs muestran una evolución paralela al TNF α durante el embarazo (15, 25).

Las formas solubles p55 y p75 se han detectado elevadas en el segundo trimestre del embarazo en gestantes que posteriormente desarrollaron PE, por lo cual se estima

que pudieran servir como marcadores pronósticos de dicha entidad clínica (26).

Ante tal situación, se hizo necesario corroborar los niveles reales de TNF, tomando en consideración la medición de sus sTNF-Rs en pacientes embarazadas del tercer trimestre, normotensas y complicadas con PE.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se eligieron 30 embarazadas en un estudio analítico, prospectivo y transversal. Se conformaron dos grupos de 15 integrantes cada uno: en el grupo A se incluyeron gestantes del tercer trimestre normotensas sin complicaciones y en el grupo B gestantes con diagnóstico de PE pareadas según su edad gestacional. Para definir la PE, se utilizaron los criterios establecidos por Davey y MacGillivray (27). Las pacientes seleccionadas acudieron entre Enero y Marzo de 2000, a la sala de parto y a la consulta prenatal de la Maternidad "Dr. Armando Castillo Plaza" y del Hospital "Dr. Manuel Noriega Trigo", en Maracaibo, Venezuela.

Se excluyeron de este estudio todas las pacientes en trabajo de parto, con infección urinaria, con antecedentes de toxoplasmosis, infección HIV-SIDA, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide.

A las gestantes se le extrajeron 15 mL de sangre venosa periférica sin anticoagulante. Los sueros fueron obtenidos por centrifugación a 1000 g durante 10 minutos y se repartieron en alícuotas colocadas en

tubos plásticos, siendo almacenadas a -70°C hasta su análisis.

Además se realizó examen de orina completa (muestra recolectada al azar por métodos convencionales) con determinación cuantitativa de la proteinuria.

Para la determinación del TNF se utilizó un kit de análisis inmunoenzimático de doble anticuerpo (ELISA sándwich - Biosource International, California-USA) y con relación a la determinación de los sTNF-Rs, se utilizó un análisis inmunoenzimático de sensibilidad amplificada (EASIA - Biosource Europe S.A., Bélgica).

Los valores obtenidos se presentan como Media \pm error estándar ($X \pm EE$). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba "t" de Student no pareada y la prueba de correlación de Pearson, utilizando el programa GraphPad PRISMA versión 2.0, tomándose el 95% como índice de confiabilidad estadística ($p < 0,05$).

RESULTADOS

En la Tabla I se observa que el promedio de edad del grupo A fue $24,93 \pm 1,73$ años, mientras que en el grupo B fue $23,8 \pm 1,29$ años. Con relación a la edad gestacional, el grupo A tuvo un promedio de $34,71 \pm 1,08$ semanas, mientras que el grupo B alcanzó $36,07 \pm 0,82$ semanas. Eran primigestas, el 73,3% de los controles y el 60% de las PE.

Los valores de la presión sanguínea arterial sistólica y diastólica reportados para el grupo de embara-

TABLA I
CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS

Grupos	A	B
Edad (años)	24,93 ± 1,73*	23,8 ± 1,29
Edad Gestacional (semanas)	34,71 ± 1,08	36,07 ± 0,82
Presión Arterial Sistólica (mmHg)	103,0 ± 1,98	155,33 ± 5,82**
Presión Arterial Diastólica (mmHg)	67,33 ± 2,06	106,67 ± 2,70**
Proteinuria (g/L)	ND	1,90 ± 1,54*

ND: No detectable. *X ± EE. **p < 0,05 ***p < 0,001.

TABLA II
CONCENTRACIONES SÉRICAS DE TNF Y SUS RECEPTORES SOLUBLES
EN EMBARAZADAS NORMALES Y PREECLÁMPTICAS

Grupos	A	B
TNF (pg/mL)	7,07 ± 1,63*	16,43 ± 2,92**
sTNF -RI (ng/mL)	2,69 ± 0,17	5,18 ± 0,54***
sTNF -RII (ng/mL)	5,94 ± 0,27	9,02 ± 0,66***

*X ± EE. **p < 0,05. ***p < 0,001.

zadas normales fue en promedio 103/67.33 mm Hg mientras que en las pacientes con PE fueron de 155,33/106,67 mm Hg (p < 0,001). Las pacientes con PE presentaban proteinuria con un promedio de 1,90 ± 2,4 g/L, mientras que los controles no tenían niveles cuantificables (p < 0,05).

En la Tabla II se aprecian los valores séricos del TNF en el grupo A (7,07 ± 1,63 pg/mL), y los del grupo B fueron 16,43 ± 2,92 pg/mL (p < 0,05). El sTNF -RI alcanzó un nivel de 2,69 ± 0,17 ng/mL y 5,18 ± 0,54 ng/mL en el grupo A y B respectivamente (p < 0,001), mientras que las concentraciones de sTNF -RII fueron de 5,94 ± 0,27 ng/mL en las gestantes normales y 9,02 ± 0,66 ng/mL en PE (p < 0,001).

Al realizar la prueba de Pearson se evidenció asociación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de TNF, sTNF -RI, sTNF -RII y los valores de presión arterial sistólica y diastólica (Figs. 1, 2 y 3).

DISCUSIÓN

El TNF se ha considerado como una de las principales citocinas participantes en la inmunología de la gestación y en patologías relacionadas. Su concentración plasmática en el embarazo normal muestra importantes variaciones que dependen de la edad gestacional. Se ha descrito un aumento paralelo en el segundo trimestre, y luego una disminución, tanto de la citocina como de su receptor II (15). Las variacio-

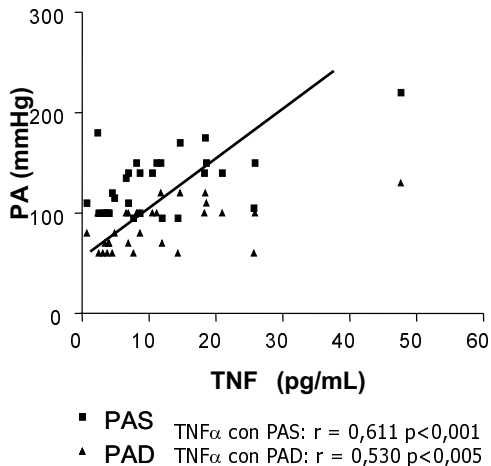


Fig. 1. Correlación entre TNF , PAS y PAD.

nes en sus concentraciones pueden ser factor regulador de la invasión del trofoblasto en los vasos sanguíneos de la decidua materna, para controlar el desarrollo placentario y en consecuencia promover la adaptación de la madre al aloinjerto fetal (19, 28).

Los reportes sobre niveles séricos de TNF en PE resultan contradictorios. En este estudio los valores son significativamente elevados con respecto a sus controles sanos, lo cual coincide con reportes anteriores (9, 19, 25, 29, 30) y resulta contrario a lo reportado por Schiff (20), quien encontró niveles similares al grupo testigo.

Existen estudios realizados en animales que han demostrado que el TNF en elevadas concentraciones puede ser nocivo para el embarazo, ya que al inyectarlo en ratas ocasionó daño placentario con pérdida fetal (31). Por otra parte, se detecta-

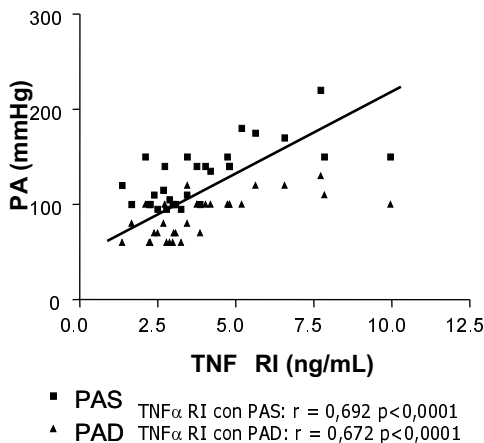


Fig. 2. Correlación entre TNF RI , PAS y PAD.

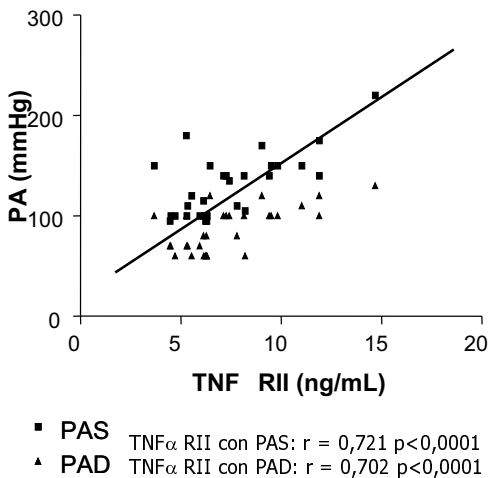


Fig. 3. Correlación entre TNF RII, PAS y PAD.

ron cifras elevadas en el líquido amniótico de gestantes con retardo del crecimiento fetal intrauterino (20, 32).

Visser (29) fue el primero en identificar que la actividad biológica del TNF podría estar involucrada en el desarrollo de la PE, sobre todo

en el daño endotelial característico, y en particular en el síndrome de HELLP. Dicha actividad se ha descrito elevada en el suero de embarazadas del primer trimestre que, más tarde desarrollaron PE.

La activación del sistema inmunitario por niveles elevados del TNF condiciona daño tisular, mediante la acción de proteasas, colagenasas o fosfolipasa A2, o a través de radicales de oxígeno, que llevan a alteraciones locales del flujo sanguíneo y obstrucción de los vasos (21,33,34). La citocina induce la actividad procoagulante, por estímulo de la liberación del factor tisular de células endoteliales y promueve la liberación de sustancias vasopresoras, como la endotelina 1 (35). Además, incrementa la adherencia de leucocitos circulantes a las células endoteliales humanas, entre otros efectos. (33). Todas estas alteraciones son compatibles con lo que sucede en la PE.

Se ha señalado que la elevación de esta citocina puede alterar la invasión trofoblástica de las arteriolas espirales maternas y llevar a una implantación defectuosa, y por consiguiente a la formación de una placenta isquémica e hipóxica (19). La tensión baja de oxígeno estimularía mayor producción del TNF, ocasionando así un círculo vicioso dañino para el producto de la concepción y por ende de la gestación (36).

Benyo y col. (37), sugieren que los efectos adversos sistémicos sobre el endotelio materno que median las manifestaciones de la PE, son consecuencia de una sobreproduc-

ción de citocinas proinflamatorias, entre ellas el TNF, producidas por la isquemia placentaria antes mencionada.

Austgulen y col (21) han demostrado, que sólo cantidades elevadas del TNF, liberadas en condiciones patológicas pueden incrementar la liberación de su forma soluble, estos resultados son coincidentes con el presente estudio.

En PE, el p55 (sTNF -RI) es considerado un marcador de liberación excesiva del TNF y regula su actividad. Se infiere que su elevación en suero está relacionada con alteración funcional del endotelio en esta enfermedad, siendo sus variaciones un signo de enfermedad sistémica (25).

Según Opsjøn y col las concentraciones en suero de p55 fueron más altas en PE que en el embarazo normal. Los hallazgos de esta investigación concuerdan con los antes mencionados, ya que los niveles del sTNF -RI, se encontraron elevados con significación estadística en PE con respecto al grupo control y similar conducta se apreció para el sTNF -RII.

Por otro lado, la correlación positiva con significación estadística entre los niveles de TNF, los sTNF Rs y las cifras de presión arterial sistólica y diastólica revela su participación sistémica en la entidad clínica en estudio. Este hallazgo no ha sido descrito con anterioridad y establece la participación del TNF en la fisiopatología del aumento de la presión sanguínea arterial en PE, quizás mediado por su efecto inesta-

bilizador sobre la enzima sintetasa del óxido nítrico (38), que finalmente determinaría la disminución de la producción del óxido nítrico y con ello la vasoconstricción arteriolar.

Se recomienda identificar los factores de riesgo en PE que alteran la síntesis de la citocina y de sus receptores solubles, a través de estudios longitudinales que incluyan revisión de antecedentes, clínica del paciente, así como la determinación de estas moléculas en mujeres con alto riesgo para la PE desde el inicio y hasta la culminación del embarazo.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a la División de Estudios para Graduados de la Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia, por la valiosa colaboración prestada para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LIN H., GUILBERT L., WEGMANN T., TUNTIPOPIPAT S., MOSMANN T.: Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993; 151(9): 4562-4573.
2. WEGMANN T., LIN H., GUILBERT L., MOSMANN T.: Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol today* 1993; 14(7):353-356.
3. MODLIN R., NUTMAN T.: Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Current Opinion in Immunology* 1993; 5:511-517.
4. MEEKINS J.W., PIJNENBORG R., HANSSSENS M., *et al.* A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101: 669-674.
5. BARTON J.R., HIETT A.K., O'CONNOR W.N., NISSEN S.E., GREENE J.W.: Endomyocardial ultrastructural findings in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 389-391.
6. NESS R., ROBERTS J.: Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:1365-1370.
7. IWATANI Y., WATANABE M.: The maternal immune system in health and disease. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 1998; 10:453-458.
8. ADAMSON S., EDWIN S., LAMARCHE S. MITCHELL M.: Actions of interleukin-4 on prostaglandin biosynthesis at the corion-decidual interface. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169(6): 1442-1447.
9. DUDLEY D.: Is pre-eclampsia a Th-1-type immune condition? *J Reprod Immunol.* 1997; 34:159-161.
10. MOSMANN T., SAD S.: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17(3):138-146.

11. STEINBORN A., VON GALL C., HILDENBRAND R., STUTTE H., KAUFMANN M.: Identification of placental cytokine-producing cells in term and preterm labor. *Obstet Gynecol.* 1998; 91(3): 329-335.
12. MOLINA R., ROMERO-ADRIAN T., RUIZ A.: Citocinas en la fisiopatología de la preeclampsia. *Gac Méd Caracas* 1999; 107(4): 505-516.
13. SATTAR N., GAW A., PACKARD Ch. J., GREER I.A.: Potential pathogenic roles of aberrant lipoprotein and fatty acid metabolism in preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996: 103: 614-620.
14. MOLINA R., ROMERO-ADRIAN T., RUIZ A., GONZALEZ E., ESTEVEZ J. y ATENCIO R.: Concentraciones séricas de factor de necrosis tumoral-alfa en el embarazo normal. *Rev Obstet Ginecol Venez* 1999; 59(3): 167-171.
15. BECKMAN I., VISSER W., STRUJIK P., VAN DOOREN M., GLAVIMANS J., WALLEMBURG H.: Circulating bioactive tumor necrosis factor- α , tumor necrosis factor- β receptors, fibronectin, and tumor necrosis factor- α inducible cell adhesion molecule VCAM-1 in uncomplicated pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:1247-1252.
16. KUPFERMINEC M., PEACEMAN A., WIGTON T., TAMURA R., REHNBERG K., SOCOL M.: Immunoreactive tumor necrosis factor- α is elevated in maternal plasma but undetected in amniotic fluid in the second trimester. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:976-979.
17. VINCE G., SHORTER S., STARKEY P., HUMPHREYS J., CLOVER L., WILKINS T., SARGENT I., REDMAN C.: Localization of tumor necrosis factor in cells at the maternal/fetal interface in human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1992; 88:174-180.
18. ZOLTI M., BEN-RAFAEL Z., MEIROM R., SHEMESH M., BIDER D., MASHIACH S., APTE R.: Cytokine involvement in oocytes and early embryos. *Fertility and Sterility* 1991; 56(2):265-272.
19. KUPFERMINEC M., PEACEMAN A., WIGTON T., TAMURA R., REHNBERG K., SOCOL M.: Tumor necrosis factor- α is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:1752-1759G.
20. SCHIFF E., FRIEDMAN S., BAUMANN P., SIBAI B., ROMERO R.: Tumor necrosis factor- α in pregnancies associated with preeclampsia or small-for-gestational-age newborns. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:1224-1229.
21. AUSTGULEN R., JOHNSEN H., KJØLLESDAL A., LIABAKK N., ESPEVIK T.: Soluble receptors for tumor necrosis factor: occurrence in association with normal delivery at term. *Obstet Gynecol* 1993; 82:343-347.

22. DESCAMPS-LATSCHA B., HERBELIN A., NGUYEN A.T., ROUX-LOMBARD P., ZINGRAFF J., MOYNOT A., VERGER C., DAHMANE D., DE GROOTE D., JUNGERS P., DAYER J.M.: Balance between IL-1, TNF and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis: relationship with activation markers of T-cells, B-cells and monocytes. *J Immunol* 1995; 154:882-892.
23. HERBELIN A., CHATENOUD L., ROUX-LOMBARD P., DE GROOTE A., LEGENDRE C., DAYER J.M., DESCAMPS-LATSCHA B., KREIS A., BACH J.F.: *In vivo* soluble tumor necrosis factor release in OKT3-treated patients. *Transplantation*. 1995; 59: 1470-1475.
24. SCHEURICH P., VELER U., KROENKE M., PFIZENMAIER K.: Quantification and characterization of high affinity membrane receptors for tumor necrosis factor on human leukemic cell lines. *Int J Cancer* 1986; 38:127-133.
25. OPSJØN S.L., NOVICK D., WATHEN N., COPE A., WALLACH D., ADERKA D.: Soluble tumor necrosis factor and soluble interleukin-6 receptor in fetal and maternal sera, coelomic and amniotic fluids in normal and preeclamptic pregnancies. *J Reprod Immunol* 1995; 29: 119-134.
26. WILLIAMS M.A., FARRAND A., MITTENDORF R., SORENSEN T.K., ZINGHEIM R.W., O'REILLY G.C., KING I.B., ZEBELMAN A., LUTHY D.: Maternal second trimester serum tumor necrosis factor-soluble receptor p55 (sTNF-p55) and subsequent risk of preeclampsia. *Am J Epidemiol* 1999; 149: 323-329.
27. DAVEY D.A., MacGILLIVRAY I.: The classification and definition of hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:892-898.
28. VINCE G., JOHNSON P.: Is there a Th2 bias in human pregnancy? *Journal of Reproductive Immunology* 1996; 32: 101-104.
29. VISSER W., BECKMAN I., BREMER H., LIM H., WALLENBURG W.: Bioactive tumor necrosis factor alpha in preeclamptic patients with and without the HELLP syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101: 1081-1082.
30. STARK J.M.: Pre-eclampsia and cytokine induced oxidative stress. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100:105-109.
31. SILEN M., FIRP A., MORGELLO S., LOWRY S., FRANCUS T.: Interleukin-1 and tumor necrosis factor cause placental injury in the rat. *Am J Pathol* 1989; 135:239-244.
32. HEYBORNE K.D., WITKINS S.S., MCGREGOR J.A.: Tumor necrosis factor alpha in midtrimester amniotic fluid is associated with impaired intrauterine fetal growth. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:920-925.

33. LE J., VILCEK J.: Biology of disease. Tumor necrosis factor e interleukin 1: Cytokines with múltiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987; 56:234-238.
34. WANG H., ZHANG M., SODA K., SAMA A., TRACEY K.J.: Fetuin protects the fetus from TNF. *Lancet* 1997; 350:861-862.
35. VEMULAPALLI S., CHIU P.J.S., RIVELLI M., FOSTER C.J., SYBERTZ E.J.: Modulation of circulating endothelin levels in hypertension and endotoxemia in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 18:895-902.
36. FAIRCHAILD D., MILES T., CONRAD K.: Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from de human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:1582-1588.
37. BENYO D.F., MILES T.M., CONRAD K.P.: Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from de the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:1582-1588.
38. DREXLER H.: Hypertension heart failure, and endothelial function. *Am J Cardiol* 1998; 82(10A):20S-22S.