

SULFATO DE MAGNESIO Y SU ACCIÓN ANTI-INFLAMATORIA EN EXPLANTES DE PLACENTA

Juvic Madeleyne Goncalves¹ , Ysabel Cristina Casart² , María Isabel Camejo³ .

^{1*} Profesor Agregado. Jefe del Departamento de Ciencias Morfológicas. Jefe de la Cátedra de Histología. Jefe (E) de la Cátedra de Hematología. Jefe (E) de la Cátedra de Anatomía y Embriología. Escuela de Bioanálisis. Cátedra de Histología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. ² Profesor Titular. Escuela de Nutrición y Dietética. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. ³ Profesor Titular. Departamento de Biología de Organismos. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. (Póstuma).

Recibido para publicación el 15 septiembre 2019. Aprobado para publicación el 15 octubre 2019.

RESUMEN:

Desde hace más de 60 años, el sulfato de magnesio ($MgSO_4$) es el fármaco de elección para el tratamiento de la preeclampsia en las salas de obstetricia. La etiología de la preeclampsia no ha sido establecida. Diferentes estudios, han demostrado que durante la preeclampsia se presenta una disfunción endotelial y un aumento de los medidores inflamatorios. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del $MgSO_4$ sobre la producción de citocinas en los explantes de placenta sanas del tercer trimestre en condiciones inflamatorias y de hipoxia. Los explantes fueron cultivados en presencia de $MgSO_4$ o Lipopolisacáridos (LPS), tanto en normoxia como hipoxia. Un grupo de explantes fueron tratados con $MgSO_4$ y transcurridas 24 horas se expusieron a LPS y viceversa. En normoxia, el $MgSO_4$ incrementa los niveles de TNF- α e IL-1 β , los mismos resultados se obtienen al incubar los explantes con $MgSO_4$ y luego con LPS observándose además un incremento de IL-10. Al exponer los explantes a LPS y luego a $MgSO_4$ aumentaron los niveles de IL-1 β . En hipoxia, el $MgSO_4$ promueve la liberación IL-1 β . En los explantes expuestos a LPS y luego a $MgSO_4$ aumentaron los niveles de IL-1 β . En conclusión, el $MgSO_4$ posee una acción anti-inflamatoria tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, al reducir los niveles de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y estimular la secreción de citocinas anti-inflamatorias (IL-10) en presencia de LPS en los cultivos de explantes.

Palabras claves: Sulfato de magnesio, explantes de placenta, citocinas, hipoxia.

MAGNESIUM SULPHATE AND ITS ANTI-INFLAMMATORY ACTION IN PLACENTA EXPLANTS

SUMMARY

For more than 60 years, magnesium sulfate ($MgSO_4$) is the drug of choice for the treatment of preeclampsia in obstetric wards. The etiology of preeclampsia has not been established. Different studies have shown that endothelial dysfunction and an increase in inflammatory meters occur during preeclampsia. The objective of the present work was to evaluate the effect of $MgSO_4$ on cytokine production in explants of healthy third trimester placenta under inflammatory and hypoxic conditions. The explants were cultured in the presence of $MgSO_4$ or Lipopolysaccharides (LPS), both in normoxia and hypoxia. A group of explants were treated with $MgSO_4$ and after 24 hours they were exposed to LPS and vice versa. In normoxia, $MgSO_4$ increases TNF- α and IL-1 β levels, the same results are obtained by incubating the explants with $MgSO_4$ and then with LPS, also observing an increase in IL-10. Exposing the explants to LPS and then to $MgSO_4$ increased IL-1 β levels. In hypoxia, $MgSO_4$ promotes IL-1 β release. In explants exposed to LPS and then $MgSO_4$, IL-1 β levels increased. In conclusion, $MgSO_4$ has an anti-inflammatory action both under normoxia and hypoxic conditions, by reducing the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and stimulating the secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-10) in the presence of LPS in explant cultures..

Key words: Magnesium sulfate, placental explants, cytokines, hypoxia.

Introducción

La preeclampsia es un trastorno multisistémico del embarazo que ocurre en la mujer después de la semana veinte de gestación, asociada a diversos factores de riesgos y caracterizado por presentar hipertensión, edema y la presencia de proteinuria (Tabla 1) (1-3). Se estima que esta enfermedad puede complicar entre el

2-8% de los embarazos, siendo este trastorno una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad de la madre y/o el feto (4-13).

Hasta la fecha la etiología de la preeclampsia no ha sido establecida, se han propuesto varias hipótesis que han tratado de explicar la génesis de la misma. Datos provenientes de diferentes estudios, han

Solicitar copia a: Juvic Madeleyne Goncalves (juvicm@gmail.com / juvic.goncalves@ucv.ve)

Tabla 1. Criterios clínicos y factores de riesgos asociados a la preeclampsia

CRITERIOS CLINICOS	
Hipertensión arterial:	
Presión sistólica	≥ 140 – 160 mm Hg
Que excedan los valores basales en 20 mm Hg (debidamente comprobado en al menos dos tomas, con 4 horas de intervalo entre cada una).	
Presión diastólica	≥ 90 – 110 mm Hg
Que exceda los valores basales en 20 mm Hg (debidamente comprobado en al menos dos tomas, con 4 horas de intervalo entre cada una)	
Proteinuria en 24 horas (Índice proteína / creatinina ≥ 0,3)	≥ 300 – 500 mg.
COMPLICACIONES CLINICAS	
Oliguria	Ausente / Presente
Edema agudo de Pulmón	Ausente / Presente
Trastornos cerebrales y/o visuales	Ausente / Presente
Convulsiones eclámpicas	Ausente / Presente
Dolor persistente y severo en el epigastrio derecho	Ausente / Presente
Rotura o deterioro de la función Hepática (Valores de transaminasas al dobles de sus valores normales)	Ausente / Presente
Evidencia clínica o de laboratorio de coagulación intravascular diseminada	Ausente / Presente
Trombocitopenia (Contaje de plaquetas ≥ 100.000 10 ⁹ /L)	Ausente / Presente
Hemólisis microangiopática	Ausente / Presente
FACTORES DE RIESGOS	
Núliparas	Embarazo múltiples
Haber padecido de preeclampsia en embarazos previos	Diabetes Pre y Gestacional
Hipertensión crónica	Trombofilia
Lupus eritematoso sistémico	Poseer más de 35 años de edad
Embarazos por reproducción asistida	Síndrome anti-fosfolípidos
Otros	

Adaptado de Pacheco, 2006; Proverbio *et al.*, 2009; Turner, 2010; ACOG Practice Bulletin, 2019.

demostrado que durante la preeclampsia se presenta una disfunción endotelial relacionada con la ausencia en la remodelación de las arteriolas espirales de la decidua al inicio del embarazo, lo que genera isquemia placentaria y la disminución del flujo útero feto-placentario. Adicionalmente, se ha observado una disfunción endotelial generalizada, por la pérdida del tono vascular con incremento de los tromboxanos en relación a prostacilinas, así como un aumento en la permeabilidad de los capilares renales, además de alteraciones en la expresión de los factores de la coagulación, vasoconstricción e isquemias secundarias acompañado de disfunción hepática. Igualmente, se han relacionado depósitos de complejos inmunes

(derivados del complemento: C3a, C4a, C5a) en las paredes de los vasos sanguíneos, como un factor quimioatractante para los neutrófilos y otros leucocitos al sitio de deposición de los mismos, promoviendo la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular permitiendo que los leucocitos puedan adherirse a la pared interna de los vasos, resultando en la retracción endotelial con aumento de la permeabilidad vascular ocasionando un edema general. Actualmente, se conoce como la invasión placentaria deficiente y la posterior liberación de factores anti-angiogénicos tales como: la tirosina quinasa-1 soluble similar a fms (sFlt-1) y endoglina soluble (sEng) en la circulación materna, causan disfunción endotelial generalizada que conduce

a una lesión multisistémica de los órganos vinculados con esta patología (4, 8, 9, 12, 15-21).

Durante el embarazo normal, los diferentes tipos de células en la interfase materno-fetal secretan diversos patrones de citocinas a lo largo de la gestación, siendo estas secreciones cruciales en el mantenimiento y desarrollo de un embarazo exitoso. Se ha descrito que durante el embarazo debe existir un balance entre las citocinas producidas por las células Th1/Th2. La Th1 agrupa las células T de ayuda que secretan IL-2 e IFN-γ (inmunidad mediada por células), mientras que las Th2 producen IL-4, IL-6 e IL-10 (inmunidad humoral). En un embarazo exitoso las citocinas producidas por las células Th2 deben predominar sobre la producción de las citocinas Th1. Sin embargo, en la preeclampsia este balance se rompe y las citocinas producidas por las Th1 son mayores que las Th2 (9, 22).

En obstetricia, el sulfato de magnesio ($MgSO_4$) se ha mantenido como el medicamento de elección desde 1920 en el tratamiento de las pacientes con preeclampsia y en la prevención de las convulsiones en pacientes que desarrollan cuadros de eclampsia (23, 24). Sin embargo, su empleo en esta área ha sido de forma empírica, debido a que hasta la fecha no se conoce con exactitud el mecanismo de acción por el cual el $MgSO_4$ actúa en el organismo (20, 25). Diversos estudios han vinculado la acción anti-inflamatoria del $MgSO_4$ con la reducción de la producción y secreción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatoria en la interfase materno-fetal. Además, la administración del sulfato de magnesio ha demostrado ser un potente supresor de la producción de mediadores inflamatorios tanto en la madre como en el feto, lo que ha permitido reducir el riesgo de nacimientos prematuros y sus complicaciones clínicas (26-28).

En el feto, se ha propuesto al sulfato de magnesio se comporta como un agente neuroprotector de la parálisis cerebral de neonatos a través de diferentes mecanismos, entre los que señalan: a) estabilización hemodinámica: se propone que el $MgSO_4$ es un estabilizador de la presión arterial, reduciendo la constrictión de las arterias cerebrales y restaurando la perfusión cerebral en el neonato prematuro; b) prevención de las lesiones excitatorias y fomento de la estabilidad neuronal: en la fase aguda de encefalopatías hipóxico-isquémica, el oxígeno se agota y el feto pasa a un metabolismo anaeróbico, generando acumulación intracelular de sodio, calcio, cloruro, agua y ácido láctico (edema citotóxico), lo que origina la liberación

de neurotransmisores excitatorios (glutamato) causando un aumento de calcio y sodio en las neuronas post-sinápticas, desestabilizando la membrana de la misma, en estos casos, se ha demostrado que el $MgSO_4$ estabiliza las membranas evitando el flujo de estos iones y actúa como un antagonista en los receptores de glutamato (NMDA), c) como agente antioxidante: debido a la acción antagonista que posee con el calcio, el magnesio promueve la inhibición de lipasas, proteasas, endonucleasas y fosfolipasas, las cuales en su forma activa ocasionan daño neuronal y cerebral irreversible en los fosfolípidos de membrana, con la formación de radicales libres. Y por último, d) se propone al $MgSO_4$ como agente anti-inflamatorio: ya que promueve la disminución de factores pro-inflamatorios (IL-1β, TNF-α) y productos secundarios de la activación de los mismos, que causan daño a nivel cerebral en los bebés prematuros (29-33). Por tales motivos, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del $MgSO_4$ en los cultivos de explantes de placenta bajo condiciones de hipoxia y en un ambiente pro-inflamatorio.

Materiales y métodos

Los explantes fueron obtenidos a partir de siete placas obtenidas por cesárea o parto natural provenientes de mujeres sin historial clínico o patologías asociadas al embarazo, de la sección de Ginecología-Obstetricia de la Sala de Partos del Hospital Universitario de Caracas, las cuales consintieron de forma voluntaria a participar en este estudio. Este contó con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad Simón Bolívar y del Hospital Universitario de Caracas, bajo las condiciones planteadas en esta investigación.

Los explantes fueron cultivados en placas del Tipo NUNCTM (Greiner Bio-one, N° 142475) colocando un solo explante por pozo, en un volumen de 1,5 mL del medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO BRL, N° 31800-014) suplementado de la siguiente manera: 10% de suero fetal bovino inactivado, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,1% de gentamicina; 1% de amfotericina B; 1% de L-glutamina; 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de piruvato de sodio, con recambios del mismo cada 24 horas. Estos fueron mantenidos en una incubadora marca Fisher Scientific a 37°C, en un ambiente húmedo en presencia de una mezcla de gases del 5% CO₂, 10% O₂ y balanceado con Nitrógeno.

Transcurridas las primeras veinticuatro (24) horas, tiempo necesario para la estabilización inicial de los

tejidos, estos fueron sometido a diferentes condiciones experimentales dividiendo los mismos en dos (2) grupos: el primero manteniendo los tejidos de explantes bajo la condición de normoxia: 5% CO₂; 10% O₂ y balanceado con Nitrógeno. Mientras que, un segundo grupo se colocó en una condición de hipoxia: 5% CO₂; 2-3% O₂ y balanceado con Nitrógeno, ambos grupos de tejidos de explantes se mantuvieron en estufas independientes a 37°C en cámara húmeda y estabilizados bajos estas condiciones por veinticuatro (24) horas. Posterior a las etapas de estabilización, se les realizó a todos los explantes un recambio del medio de cultivo y se sub-dividieron los mismos en los siguientes sub-grupos (manteniendo su condición de normoxia e hipoxia), un grupo de explantes se mantuvieron con medio basal, un segundo grupo se les adicionó junto al medio de cultivo suplementado una solución de sulfato de magnesio (Sigma-Aldrich, N° M2643) a una concentración de 2 mM y a otro grupo una solución de Lipopolisacáridos de *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma-Aldrich, N° L2880) (LPS) en una concentración de 2 µg/mL, posteriormente los cultivos expuestos inicialmente con sulfato de magnesio se adicionaron en su recambio del medio una solución de LPS más sulfato de magnesio y viceversa. Los sobrenadantes del medio de cultivo, se recolectaron diariamente y posteriormente se centrifugaron (3.500 rpm) durante quince minutos, con el fin de eliminar cualquier material celular que pudiera estar presente en el medio. Se almacenaron a -20 °C hasta su utilización posterior.

La integridad de los cultivos se determinó mediante la medición de la actividad enzimática del Lactato Deshidrogenasa (LDH) presente en los sobrenadantes del medio de cultivo obtenidos diariamente (Sigma-Aldrich, DG1340-K). Mientras que, la diferenciación celular, se evaluó por la capacidad de sintetizar y secretar la hormona Gonadotrofina Coriónica humana. La concentración de la Gonadotrofina Coriónica humana fracción beta (hCG-β) se determinó en los sobrenadantes del medio recolectado mediante ensayo inmunométrico de quimioluminiscencia en fase sólida (Equipo-Siemens Immulite 1000). Los resultados se reportaron en mUI/mg/proteínas (datos no mostrados) (34).

A partir de los sobrenadantes recolectados diariamente se determinaron las siguientes citocinas: Interleucina 1 beta (IL-1β), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α) e Interleucina 10 (IL-10). Los niveles de citocinas se midieron empleando un Kit comercial de micro-ELISA

ultrasensible (Thermo Scientific), específico para cada tipo de citocinas. Los resultados fueron expresados según las recomendaciones técnicas del kit a utilizar. Cada determinación se realizó por duplicado. Todos los resultados fueron analizados empleando el paquete de software SPSS versión 10.0 para Windows. Las comparaciones entre las diferentes condiciones se analizaron estadísticamente empleando la prueba de Mann-Whitney estableciendo como diferencia estadísticamente significativa a $p < 0.05$. Todos los datos se presentan como las medias ± desviación estándar. Las n representan el número de placas que fueron estudiadas durante cada fase.

Resultados

A continuación se muestra los resultados de los niveles de TNF-α, IL-10 e IL-1β medidos en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placas en condiciones de normoxia e hipoxia en las diferentes condiciones de cultivos descritas en materiales y métodos. La Figura 1, muestra las concentraciones del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α) expresados en

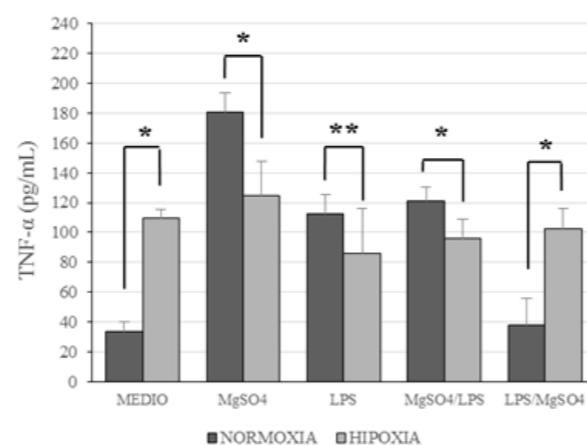


Figura 1. Niveles de TNF-α determinados en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placenta en condiciones de normoxia e hipoxia en diferentes medios de cultivos: basales (Medio), en presencia de MgSO₄ (2 mM), LPS (2 µg/mL), con LPS previa presencia de MgSO₄ (MgSO₄/LPS) y viceversa (LPS/MgSO₄).

Los datos fueron expresados como las medias ± las desviaciones estándar. La comparación estadística entre las condiciones de normoxia e hipoxia para cada tratamiento fue realizada empleando el método Mann-Whitney ($n=7$), * $p<0.01$ y ** $p<0.02$.

picogramo por mL (pg/mL). Los niveles de TNF-α se encontraron en menor concentración en la condición de normoxia para aquellos cultivos incubados en medio solo (* $p<0.01$), mientras que aquellos cultivos tratados con MgSO₄ mostraron niveles de TNF-α aumentados en comparación con los encontrados en la condición de hipoxia (* $p<0.01$). Por otro lado, se observó que los cultivos tratados con LPS, mostraron niveles de TNF-α similares entre ambas condiciones experimentales. El análisis estadístico demostró una diferencia estadísticamente significativa entre estas condiciones (** $p<0.02$). Los explantes tratados con MgSO₄ y posteriormente expuestos a LPS, mostraron niveles aumentados de TNF-α bajo condición de normoxia, arrojando diferencia estadísticamente significativa al compararlo con la condición de hipoxia (* $p<0.01$). Por otra parte, los cultivos expuestos previamente a LPS y luego tratados con MgSO₄, mostraron niveles inferiores de TNF-α bajo condición de normoxia, mostrando diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó con la condición de hipoxia (* $p<0.01$).

Los niveles de TNF-α entre los cultivos que se encontraban en condición de normoxia para las diferentes condiciones, mostraron diferencia estadísticamente significativa entre todas las comparaciones, a excepción de la comparación hecha entre los cultivos que solo contenía medio de cultivo y aquellos tratados con LPS y luego expuestos con MgSO₄. En los cultivos obtenidos bajo condiciones de hipoxia, se encontró que aquellas comparaciones que mostraron diferencia estadísticamente significativa fueron entre los cultivos que solo contenían medio de cultivo y aquellos cultivos tratados con LPS, con MgSO₄ y LPS y en los cultivos que presentaban LPS y los tratados inicialmente con LPS y luego expuestos con MgSO₄.

En la Figura 2, se muestra las concentraciones de interleucina tipo 10 (IL-10) expresadas en picogramo por mL (pg/mL), determinadas en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placenta en condiciones de normoxia e hipoxia para los diferentes medios de cultivos. Los niveles de IL-10 se encontraron en mayor concentración en la condición de hipoxia, siendo la diferencia estadísticamente significativa en los medios tratados con MgSO₄ (* $p<0.01$) y con LPS (* $p<0.01$). El aumento en los niveles de IL-10 encontrados en las condiciones de hipoxia se mantuvo en aquellos cultivos tratados con MgSO₄ y posteriormente con LPS, y viceversa, la diferencia fue estadísticamente

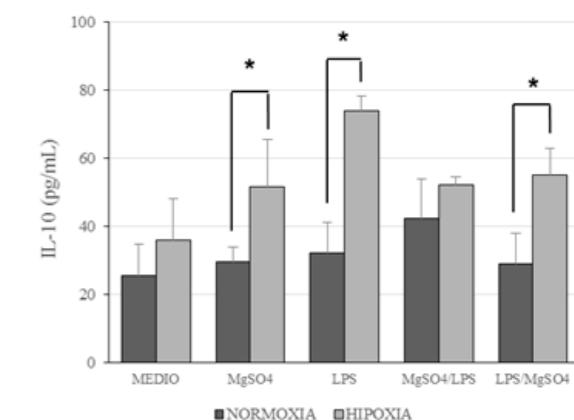


Figura 2. Niveles de IL-10 determinados en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placenta en condiciones de normoxia e hipoxia en diferentes medios de cultivos: basales (Medio), en presencia de MgSO₄ (2 mM), LPS (2 µg/mL), con LPS previa presencia de MgSO₄ (MgSO₄/LPS) y viceversa (LPS/MgSO₄). Los datos fueron expresados como las medias ± las desviaciones estándar. La comparación estadística entre las condiciones de normoxia e hipoxia para cada tratamiento fue realizada empleando el método Mann-Whitney ($n=7$), * $p<0.01$ y ** $p<0.02$.

significativa en aquellos cultivos tratados previamente con LPS y que posteriormente expuestos con MgSO₄ (* $p<0.01$).

Al realizar la comparación estadística entre los diferentes medios de cultivos obtenidos, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los medios comparados bajo condiciones de normoxia. Mientras, que en condición de hipoxia si se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó los cultivos que solo contenían medio de cultivo y los tratados con LPS, así como aquellos cultivos con que contenían LPS y los que fueron tratados con LPS y luego expuestos con MgSO₄.

En la Figura 3, se muestra las concentraciones de interleucina uno tipo beta (IL-1β) expresado en picogramo sobre mL (pg/mL), determinadas en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placenta en condiciones de normoxia e hipoxia para los diferentes medios de cultivos. Los niveles de IL-1β se encontraron en mayor concentración en la condición de normoxia, con una diferencia estadísticamente significativa en los cultivos que solo contenían medio de cultivo (** $p<0.02$), MgSO₄ (* $p<0.01$) y LPS (* $p<0.01$). Igualmente, se observó un incremento en

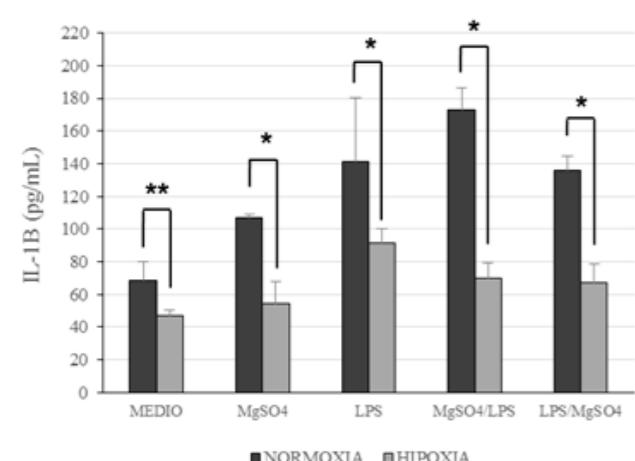


Figura 3. Niveles de IL-1 β determinados en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placenta en condiciones de normoxia e hipoxia en diferentes medios de cultivos: basales (Medio), en presencia de MgSO₄ (2 mM), LPS (2 μ g/mL), con LPS previa presencia de MgSO₄ (MgSO₄/LPS) y viceversa (LPS/MgSO₄). Los datos fueron expresados como las medias \pm las desviaciones estándar. La comparación estadística entre las condiciones de normoxia e hipoxia para cada tratamiento fue realizada empleando el método Mann-Whitney ($n=7$), * $p<0.01$ y ** $p<0.02$

aquellos cultivos que habían sido tratados con MgSO₄ y posteriormente LPS, y viceversa, mostrando en ambos casos diferencia estadísticamente significativa (* $p<0.01$).

Cuando se realizaron las comparaciones de los diferentes medios en condiciones de normoxia las únicas comparaciones que no mostraron diferencia estadísticamente significativa fueron aquellas que se realizaron al comparar los cultivos tratados con MgSO₄ y LPS y los cultivos tratados con LPS y los tratados con LPS inicialmente y posteriormente MgSO₄. Mientras que en condiciones de hipoxia, las comparaciones estadísticas que no mostraron diferencia significativa fueron aquellas donde se comparó los cultivos que solo contenían medio de cultivo y MgSO₄; así como los cultivos que solo contenían MgSO₄ y aquellos que tratados con MgSO₄ y posteriormente LPS.

Discusión

La determinación de citocinas pro y anti-inflamatorias en el desarrollo de la presente investigación, reveló como

la presencia de sulfato de magnesio en condiciones de normoxia incrementa la producción de TNF- α e IL-1 β en los cultivos de explantes de placenta del tercer trimestre de gestación, originando una respuesta inflamatoria localizada. Por otra parte, se evidenció una respuesta anti-inflamatoria del sulfato de magnesio en los cultivos de explantes de placenta previamente estimulados con LPS, al disminuir los niveles de TNF- α e IL-1 β , tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. Esto permite inferir que la presencia del sulfato de magnesio en condiciones normales no posee un efecto protector sobre el tejido placentario, efecto que si es evidente en condiciones de respuesta inflamatoria. Resultados similares fueron encontrados por Holcberg *et al.*, (2006) (35), utilizando técnicas de perfusión en placetas normales en presencia de sulfato de magnesio, demostraron que la placenta materna tiene capacidad de secretar TNF- α e IL-6, generando una acción inflamatoria local, lo cual puede ocasionar efectos adversos en la madre si persiste durante largos períodos de tiempo. Por lo que la utilización de dicho fármaco como tratamiento profiláctico no debe ser empleada en mujeres embarazadas del último trimestre en condiciones sanas.

En el presente estudio se demostró como el sulfato de magnesio incrementa los niveles de TNF- α e IL-1 β en condiciones de normoxia, sin embargo no se observó un efecto directo sobre la secreción de la IL-10, al no evidenciarse diferencias en la secreción de esta interleucina en los cultivos de explantes de placenta del tercer trimestre de gestación en condiciones de normoxia. La IL-10 posee un efecto anti-inflamatorio y una capacidad de inhibir la síntesis de citocinas pro-inflamatorias dadas por los linfocitos T y los macrófagos. Además, se ha descrito como la decidua, trofoblasto y membranas coriónicas son la principal fuente de producción de esta citocina, por lo que su síntesis y secreción en los tejidos placentarios parece estar vinculada a una activación endotelial en las vellosidades placentarias y no a daños del tejido placentario per se (36-39).

Estudios previos han señalado a la IL-10 como una citocina clave para el mantenimiento del embarazo (Hanna *et al.*, 2006) (40), así como un potente inhibidor de la acción del TNF- α e IL-1 en condiciones de hipoxia (Royle *et al.*, 2009) (41). Al analizar la presencia del sulfato de magnesio en condiciones de hipoxia, observamos un aumento en la secreción de IL-10 y TNF- α , sin afectar la producción de IL-1 β . Estudios

realizados por Peltier *et al.*, (2011) (42), demostraron una disminución en la acción anti-inflamatoria de la IL-10 en cultivos de explantes de placenta a baja presión de oxígeno. Estos hallazgos permiten vincular al sulfato de magnesio como un mediador clave en la liberación de IL-10 en condiciones de hipoxia, apoyando la hipótesis de que el sulfato de magnesio posee un efecto anti-inflamatorio al estimular la producción de IL-10 por parte de las células placentarias, la cual modula principalmente la liberación de la IL-1 β e TNF- α por parte del sistema inmune placentario, reduciendo los efectos adversos que pudieran estar presentándose a causa de la disfunción endotelial, como se ha descrito en algunas patologías como la preeclampsia (41, 43). Estudios previos realizados en cultivos de explantes de placenta del tercer trimestre proveniente de mujeres con preeclampsia, mostraron un incremento en la expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-10 en comparación con placetas provenientes de mujeres sanas, atribuyendo el aumento de TNF- α e IL-1 β al daño encontrado en las células endoteliales observados durante la preeclampsia (44).

La utilización de Lipopolisacáridos de *E. coli* (LPS) en los cultivos de explantes de placenta del tercer trimestre de gestación en condiciones de normoxia e hipoxia, mostró un incremento en los niveles de TNF- α e IL-1 β . Laham *et al.*, (1997) (45), demostraron como la presencia de LPS en cultivos de explantes de placenta estimula la secreción de TNF- α e IL-1 β y que esta ocurre después de 1 y 4 horas de incubación respectivamente. Ma *et al.*, (2006) (46), demostraron en cultivos de células aisladas de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto estimulados en concentraciones crecientes con LPS, la presencia de patrones similares de secreción de IL-8 entre ambos tipos de células, evidenciando la sensibilidad de estas células a responder agentes patógenos bacterianos. Estos hallazgos permiten validar la utilización de los cultivos de explantes de placenta como un modelo in vitro útil en el estudio de los procesos inflamatorios reportados en algunas patologías como: parto prematuro, preeclampsia, etc., y el estudio de la acción del sulfato de magnesio sobre dicho tejido en presencia de cuadros inflamatorios.

Diversas investigaciones han descrito como la secreción y liberación del TNF- α responde a diferentes estímulos como: antígenos bacterianos, virus, parásitos, disminución de oxígeno, disfunción endotelial, isquemia y por acción de otros mediadores celulares

como la IL-1 e IFN- γ , así como por la acción autocrina del TNF- α , entre otros (36, 37, 44, 47-49). Se conoce que la respuesta del TNF- α depende directamente de la unión a sus receptores, describiéndose hasta la fecha dos tipos de receptores estructurales diferentes para TNF- α denominados: a) receptor tipo I (TNF-RI; p55 o p60) el cual presenta una amplia distribución y tiene una expresión constitutiva en diversos tipos de células y b) el receptor tipo II (TNF-RII; p80 o p75), el cual presenta una alta promiscuidad a su ligando y su expresión se genera de forma inducida. La función principal del receptor tipo I está dada en la defensa de los tejidos debido a que regula los procesos pro-inflamatorios y apoptótico, junto a diversos factores de transcripción como: NF κ B, proteínas quinases activadas por mitógenos (MAPK), entre otros. Mientras que el receptor tipo II, su acción está ligada principalmente a los efectos beneficiosos locales sin que estos lleguen a generar efectos perjudiciales en los tejidos. Sin embargo, se ha observado que estímulos constante por patógenos exógenos, estrés oxidativo, disfunción endotelial o reducción de los niveles de oxígeno favorecen que el TNF-RII se comporte como un transportador del TNF- α hacia el receptor TNF-I, el cual presenta alta afinidad por su ligando, lo que potencia la acción pro-inflamatoria del TNF- α (50, 51). Algunos estudios han demostrado la expresión e incremento de TNF-RI en respuesta a cuadros inflamatorios sobre los componentes celulares de la interfase materno-fetal tanto al inicio como al final del embarazo, sin que esta expresión sea evidenciada a nivel sistémico en la madre (52).

Por otro lado, la IL-1 β es una citocina que se produce de forma inmediata tras el contacto de las células implicadas en una respuesta inmune innata con un agente extraño o LPS, generando un aumento a la permeabilidad vascular, respuesta inflamatoria local o generalizada, síntesis de proteína de fase aguda, proliferación de fibroblastos, activación de linfocitos T y B, producción de plaquetas, entre otros. Esta citocina es producida por diferentes tipos de células dentro de las que se destacan: monocitos, macrófagos, células endoteliales, células dendríticas y células NK. Los macrófagos presentes en las vellosidades placentarias es una de las fuentes más importantes de este tipo de citocinas durante el embarazo (37, 51). En reacciones inflamatorias localizadas, tanto la IL-1 β como el TNF- α actúan sobre los macrófagos y células endoteliales

del tejido placentario, permitiendo la producción de quimiocinas que contribuyen a la entrada de los neutrófilos a los tejidos placentarios y su acción frente a los patógenos presentes. Además, el TNF- α , la IL-1 β induce un aumento en la expresión de moléculas de adherencia sobre las células endoteliales (ICAM-1 y VCAM-1), las cuales son reconocidas por linfocitos y monocitos de la circulación sanguínea, esto ocasiona la extravasación de estas células a los espacios tisulares de la placenta favoreciendo una reacción inflamatoria localizada (37).

En esta investigación se evidenció la respuesta anti-inflamatoria del sulfato de magnesio en los cultivos de explantes de placenta previamente estimulados con LPS, al disminuir los niveles de TNF- α e IL-1 β , tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. Rochelson et. al., (2006) (53), demostraron una acción anti-inflamatoria del sulfato de magnesio en cultivos de células endoteliales humanas del cordón umbilical (HuVECs) en presencia antes, durante y después de un estímulo con LPS. También, observaron una reducción en la expresión de ICAM-1 y la inhibición de la degradación del factor IkB α y translocación de NFkB, cuando se adiciona el sulfato de magnesio en los cultivos de HuVECs. A su vez, Dowling et al., (2012) (28), empleando dos modelos experimentales, demostraron como la administración de sulfato de magnesio atenúa la producción de mediadores pro-inflamatorios (CCL-2 o MCP-1; TNF- α e IL-6) dentro de la placenta humana en presencia de LPS. Demostraron además, como el sulfato de magnesio genera la supresión en la activación del factor NFkB dentro del tejido placentario.

Aun cuando los hallazgos obtenidos en este estudio no permiten confirmar el mecanismo de acción por el cual el sulfato de magnesio posee un efecto anti-inflamatorio en los procesos inflamatorios por LPS, todo parece señalar que una de las vías por la cual el sulfato de magnesio genera dicha acción, es a través de la inhibición de la degradación de IkB α y por ende la translocación del factor NFkB en los tejido placentarios, por lo que nuevas investigaciones deberán ser realizadas con el fin de demostrar estos hallazgos.

Por otra parte, la acción anti-inflamatoria descrita para el sulfato de magnesio también ejerce una acción protectora sobre el feto. Tam Tam et al., (2011) (27), empleando modelos de rata preñadas a las cuales se inocularon con LPS demostraron un aumento tanto en el comportamiento materno como fetal de los niveles de secreción de: TNF- α , IL-6 y MCP-1 y GRO-KC,

los cuales se redujeron de forma significativa luego de la administración de sulfato de magnesio en ambos compartimientos. Burd et. al., (2010) (30), igualmente investigaron el efecto del sulfato de magnesio en la prevención de lesiones cerebrales fetales presentes en los partos prematuros asociados con inflamación, concluyendo que aunque no encontraron diferencias en la expresión de citocinas pro-inflamatorias y marcadores de muerte celular, si evidenciaron como el sulfato de magnesio impide cambios morfológicos celulares a nivel neuronal causados por la presencia de LPS.

Los hallazgos encontrados en investigaciones previas juntas con los valorados en este estudio permiten afirmar al sulfato de magnesio como un potente protector y supresor de los efectos perjudiciales encontrados en los cuadros inflamatorios dados durante el embarazo tanto para la madre como para el feto. Además, estos resultados permiten sugerir la administración del sulfato de magnesio por cortos períodos de tiempo, en aquellas madres que durante el embarazo presentaran cuadros infecciosos, con el fin de disminuir los efectos perjudiciales encontrados durante dichos trastornos

Declaración financiamiento y conflictos de interés

Este trabajo fue parcialmente apoyado por la subvención PG 09-6579-2006 de CDCH-UCV y por una subvención de Decanato de Post grado USB. Los autores reportan ningún conflicto de intereses. Los autores solo son responsables del contenido y la redacción del documento

Referencias

- El-Sayed AAF. Preeclampsia: A review of the pathogenesis and possible management strategies based on its pathophysiological derangements. Taiwan J Obstet Gynecol 2017;56:133-138. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2017.08.004>
- Pacheco-Romero J. Introducción al Simposio sobre Preeclampsia. Rev Peru Ginecol Obstet 2017;63(2):199-206. [citado agosto 2019] Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322017000200007
- ACOG Practice Bulletin No. 202. Gestational Hypertension and Preeclampsia. Obstet Gynecol 2019;133(1):e1-e25. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003018>.
- Bolte AC, Van Geijn HP, Dekker GA. Management and monitoring of severe preeclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001;96(1):8-20. [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(00\)00383-3](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(00)00383-3)
- Núñez-González J, Sanabria-Vera Ch, Romero-Adrián T, Núñez L, Montiel I, Boscán F et al. Óxido nítrico, malondialdehído, perfil lipídico, factor de necrosis tumoral alfa y sus receptores solubles en mujeres no embarazadas, gestantes normales y preeclámpicas. Gac Med Caracas 2001;109(3):352-360.
- Aban M, Cinel L, Arslan M, Dilek U, Kaplanoglu M, Arpacı R, et al. Expression of nuclear Factor-Kappa B and placental apoptosis in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and preeclampsia: a immunohistochemical study. Tohoku J Exp Med 2004;204:195-202. [citado agosto 2019] Disponible en: http://www.journal.med.tohoku.ac.jp/2043/TJ2043_04.pdf
- Duley L, Meher S, Abalos E. Management of preeclampsia. BMJ 2006;332:463. <https://doi.org/10.1136/bmj.332.7539.463>
- Feinberg BB. Preeclampsia: The death of goliath. Am J Reprod Immunol 2006;55(2):84-98. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2005.00362.x>
- Pacheco J. Preeclampsia/eclampsia: Reto para el ginecoobstetra. Acta Med Per 2006; 23(2):100-111. [citado agosto 2019] Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v23n2/v23n2a10.pdf>
- Yegüez FA, Castejón OC. Etiopatogenia de la preeclampsia. Gac Med Caracas 2007;115(4):271-273.
- Briones VCG, Meneses CJ, Moreno SA, González DJ, Díaz de León PM, Briones GJ. Preeclampsia: Una nueva teoría para un viejo problema. Rev Aso Mex Med Crit y Ter Int 2008;22(2):99-104. [citado agosto 2019]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medcri/ti-2008/ti082h.pdf>
- Reyna-Villasmil E, Mayner-Tresol G, Herrera-Moya P, Briceño-Perez C. Marcadores clínicos, biofísicos y bioquímicos para la predicción de preeclampsia. Rev Peru Ginecol Obstet 2017;63(2):227-233. [citado agosto 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3234/323451873011.pdf>
- Redman CW, Sargent IL. Immunology of preeclampsia. Am J Reprod Immunol 2010;(63):534-543. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00831.x>
- Proverbio F, Abad C, Proverbio T, Piñero S, Botana D, Chiarello DI, Marín R. Preeclampsia, peroxidación lipídica y Ca-ATPasa. Acta Cient Venez 2009;60(4):196-201.
- Turner JA. Diagnosis and management of preeclampsia: an update. Int J Womens Health 2010;2:327-337. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S8550>
- Aranda P, Planells E, Llopis J. Magnesio. Ars Pharmaceutica 2000;41(1):91-100.
- Simon J, Gray A, Duley L. Cost-effectiveness of prophylactic magnesium sulphate for 9996 women with pre-eclampsia from 33 countries: economic evaluation of the Magpie Trial. BJOG An Intern J Obstet Gynaecol 2005;113(2):144-151. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2005.00785.x>
- Crossen JS, Ter Riet G, Mol BW, Van Der Post JA, Leeflang MM, Meads CA, et al. Are tests for predicting pre-eclampsia good enough to make screening viable? A review of reviews and critical appraisal. Acta Obstet Gynecol Scand 2009;88(7):758-765. <https://doi.org/10.1080/00016340903008953>
- Euser AG, Cipolla MJ. Magnesium sulfate treatment for the prevention of eclampsia: A brief review. Stroke 2009;40(4):1169-1175. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.527788>
- Duley L, Gülmезoglu AM, Henderson-Smart DJ, Chou D. Magnesium sulphate and other anticonvulsants for women with pre-eclampsia. Cochrane Database Syst Rev 2010; (11):CD000025. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000025.pub2>
- Hannan NJ, Brownfoot FC, Cannon P, Deo M, Beard S, Nguyen TV, et al. Resveratrol inhibits release of soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt-1) and soluble endoglin and improves vascular dysfunction—implications as a preeclampsia treatment. Scientific Reports 2017;7(1):1819. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01993-w>
- Kämmerer U, Von Wolff M, Markert UR. Immunology of human endometrium. Inmunobiology 2004;209(7):569-574. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2004.04.009>
- Duley L. Evidence and practice: the magnesium sulphate story. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2005;19(1):57-74. <https://doi.org/10.1016/j.bpb.2004.10.010>
- Recomendación de la OMS para la prevención y el tratamiento de la preeclampsia y eclampsia. [homepage on the internet] The WHO Reproductive Health Library. Ultimo actualización Octubre 2011. Disponible: RHL (<https://extranet.who.int/rhl>).
- Roy J, Kumar Mitra J, Pal A. Magnesium sulphate versus phenytoin in eclampsia—Maternal and foetal outcome. A comparative study. Australas Med J 2013;6(9):483-495. <https://doi.org/10.4066/AMJ.2013.1753>
- Bittar, R. E., Zugaib, M. Tratamento do trabalho de parto prematuro. Rev Bras Ginecol Obstet 2009;31(8):415-422. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032009000800008>
- Tam Tam HB, Dowling O, Xue X, Lewis D, Rochelson B, Metz CN. Magnesium sulfate ameliorates maternal and fetal inflammation in a rat model of maternal infection. Am J Obstet Gynecol 2011;204(4):364 e1-364e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.11.006>
- Dowling O, Chatterjee PK, Gupta M, Tam Tam HB, Xue X, Lewis D, et al. Magnesium sulfate reduces bacterial LPS-induced inflammation at the maternal-fetal interface. Placenta 2012;33(5):392-398. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.013>
- Alday E, Uña R, Redondo FJ, Criado A. Magnesium in anesthesia and postoperative recovery care. Rev Esp Anestesiol Reanim 2005;52(4):222-234. [citado agosto 2019]

- 2019]. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-036969?lang=en>.
30. Burd I, Breen K, Friedman A, Chai J, Elovitz MA. Magnesium sulfate reduces inflammation-associated brain injury in fetal mice. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202(3):292.e1-292.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.01.022>.
 31. Costantine MM, Drever N. Antenatal exposure to magnesium sulfate and neuroprotection in preterm infants. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2011;38(2):351-366. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2011.02.019>.
 32. Meller CH, Izbizky G, Otaño L. Actualización sobre el uso de sulfato de magnesio como neuroprotector en el parto prematuro. *Arch Argent Pediatr*. 2015;113(4):345-352. [citado agosto 2019]. Disponible en: https://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/primero/2015/AE%20Meller_anticipo_6-7-15.pdf
 33. Chiarello D, Marín R, Fulgencio P, Coronado P, Toledo F, Salsoso R, Gutiérrez J, Sobrevia L. Mechanisms of the effect of magnesium salts in preeclampsia. *Placenta* 2018;69:134-139. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.04.011>.
 34. Goncalves J, Méndez Y, Casart YC, Camejo MI. Estandarización de condiciones de cultivos para explantes de placenta humana. XXI Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH). San Pablo, Brasil. Del 22 al 24 de Abril, 2009.
 35. Holcberg G, Amash A, Sapir O, Hallak M, Sheiner E, Ducler D, et al. Different effects of magnesium sulfate and angiotensin II on the capacity of the fetal and maternal compartments of normal human placenta to secrete TNF- α and IL-6. *J Reprod Immunol* 2006;69(2):115-125. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2005.09.005>
 36. Benyo DF, Miles TM, Conrad KP. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(5):1582-1588. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.5.3916>.
 37. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. 2004. Inmunología. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
 38. Makris A, Thornton CE, Xu B, Hennessy A. Garlic Increases IL-10 and Inhibits TNF alfa and IL-6 production in Endotoxin-stimulated Human Placental Explants. *Placenta* 2005; 26(10):828-834. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.10.019>
 39. Sharma A, Satyam A, Sharma JB. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 2007;58(1):21-30. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00486.x>.
 40. Hanna N, Bonifacio L, Weinberger B, Reddy P, Murphy S, Romero R, Sharma S. Evidence for interleukin-10-mediated inhibition of cyclo-oxygenase-2 Expression

and prostaglandin production in preterm human placenta. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55(1):19-27. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2005.00342.x>.

41. Royle C, Lim S, Xu B, Tooher J, Ogle R, Hennessy A. Effect of hypoxia and exogenous IL-10 on the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha and the anti-angiogenic molecule soluble Flt-1 in placental villous explants. *Cytokine* 2009;47(1):56-60. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.04.006>.
42. Peltier MR, Gurzenda EM, Murthy A, Chawala K, Lerner V, Kharode I, et al. Can Oxygen Tension Contribute to an Abnormal Placental Cytokine Milieu? *Am J Reprod Immunol* 2011;66(4):279-285. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.00998.x>.

52. Carpentier PA, Dingman AL, Palmer TD. Placental

43. Denison FC, Kelly RW, Calder AA, Riley SC. Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. *European Society of Hum Reprod* 1998;13(12):3560-3565. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.12.3560>.
44. Rinehart BK, Terrone DA, Lagoo-Deenadayalan S, Barber WH, Hale EA, Martin JN, et al. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alfa, interleukin 1 β , and interleukin 10 is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181(4):915-920. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(99\)70325-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(99)70325-x).

45. Laham N, Brennecke SP, Rice GE. Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: the effects of lipopolysaccharide and cytokines. *Biol Reprod* 1997;57(3):616-620. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.3.616>.

46. Ma Y, Mor G, Abrahams VM, Buhimschi IA, Buhimschi CS, Guller S. Alterations in Syncytiotrophoblast Cytokine Expression Following Treatment with Lipopolysaccharide. *Am J Reprod Immunol* 2006;55(1):12-18. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2005.00347.x>.

47. Malek A, Sager R, Schneider H. Effect of Hypoxia, Oxidative Stress and Lipopolysaccharides on the Release of Prostaglandins and Cytokines from Human Term Placental Explants. *Placenta* 2001;22(15):S45-S50. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0635>.

48. Crocker IP, Tansinda DM, Jones CJ, Baker PN. The influence of oxygen and tumor necrosis factor-alfa on the cellular kinetics of term placental villous explants in culture. *J Histochem Cytochem* 2004;52(6):749-757. <https://doi.org/10.1369/jhc.3a6176.2004>

49. Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ. Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: A potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. *Am J Pathol* 2004;164(3):1049-1061. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63192-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63192-6)

50. Williams MA, Mahomed K, Farrand A, Woelk GB, Mudzamiri S, Madzime S et al. Plasma tumor necrosis factor-alpha soluble receptor p55 (sTNFp55) concentrations in eclamptic, preeclamptic and

TNF- α Signaling in Illness-Induced Complications of Pregnancy. *Am J Pathol* 2011; 178(6):2802-2810. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.042>.

53. Rochelson B, Dowling O, Schwartz N, Metz CN. Magnesium sulfate suppresses inflammatory responses by human umbilical vein endothelial cells (HuVECs) through the NFkappaB pathway. *J Reprod Immunol* 2006;73(2):101-107. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2006.06.004>