



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES
TIPO TOLL (TLR)-2 Y -4 Y DE LAS β -DEFENSINAS HUMANAS (HBD)-
1, -2 Y -3 EN EL CORIOAMNIO HUMANO DURANTE EL TRABAJO DE
PARTO NORMAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A

MARÍA DEL PILAR FLORES ESPINOSA



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. C. VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA

- 2010 -



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Flores
Espinosa
María del Pilar
91133711
Universidad Nacional
Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300870312

2. Datos del tutor

Dra.
Claudia Verónica
Zaga
Clavellina

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Federico
Martínez
Montes

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Claudia
González
Espinosa

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Lorenza
Díaz
Nieto

6. Datos del sinodal 4

M en C
Guadalupe
García
López

7. Datos del trabajo escrito.

Caracterización de los receptores tipo Toll (TLR) -2 y -4 y de las β -defensinas humanas (HBD) -1, -2 y -3 en el corioamnios humano durante el trabajo de parto.

58p
2010

JURADO ASIGNADO:

- Presidente:** Dr. Federico Martínez Montes
- Vocal:** Dra. Claudia González Espinosa
- Secretario:** Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina
- Suplente:** Dra. Lorenza Díaz Nieto
- Suplente:** M. en C. Guadalupe García López

Lugar donde se desarrolló el proyecto:

Instituto Nacional de Perinatología
“Isidro Espinosa de los Reyes”

Sustentante:

María del Pilar Flores Espinosa

Asesor del proyecto:

Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina

CON TODA LA ADMIRACIÓN Y RESPETO AGRADEZCO
SINCERAMENTE:

A la ***Dra. C. Verónica Zaga Clavellina*** por su acertada dirección en el desarrollo de este proyecto, sus enseñanzas y valiosos consejos. Por brindarme más que un espacio en su laboratorio, su calidad humana.

A la ***M. en C. Guadalupe García López***, por su valioso apoyo y sus enseñanzas, así como el estímulo y la compañía que me brindó durante el desarrollo del proyecto.

Al Instituto Nacional de Perinatología y en especial al personal del Laboratorio de Medicina Regenerativa, por las facilidades que me fueron otorgadas y el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Rodrigo López de la Vega de la Dirección de Investigación en el INPer por su apoyo en el proceso y análisis de muestras. Al M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia. Técnico Académico del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Sr. Pedro del Departamento de Parasitología del Hospital General por su apoyo en la preparación de las muestras histológicas.

A mis padres:

Pedro Flores Toledano y Carmen Espinosa Ángeles. Siempre recuerdo la sonrisa y la mirada de mi padre, el aroma y la ternura de los brazos de mi madre, quien no se ha dado nunca por vencida.

A mi hermana:

Gabriela Flores Espinosa. Mi mejor amiga.

A mi abuelita:

Catalina Ángeles Villanueva. Su paciencia e inmenso amor.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Estrategias que favorecen el privilegio inmunológico	3
1.1.1. El sistema Th ₁ /Th ₂	3
1.1.2. Progesterona	4
1.1.3. Expresión de antígenos leucocitarios humanos	5
1.1.4. Tejidos extraembrionarios	6
1.1.4.1 Membranas corioamnióticas.....	7
1.2. Trabajo de parto.....	10
1.2.1. Mecanismos inmunológicos en el miometrio	11
1.2.2. Mecanismos inmunológicos en el cérvix	11
1.2.3. Mecanismos inmunológicos en las membranas corioamnióticas	11
1.3. Inmunidad innata en el embarazo	13
1.3.1. Receptores tipo Toll (TLRs).....	11
1.1.4.1 Receptor tipo Toll-4	15
1.1.4.1 Receptor tipo Toll-2	16
1.3.2. β- defensinas (HBDs)	18
II. ANTECEDENTES	20
2.1. Expresión de TLR's en el aparato reproductor y la interfase materno-fetal.....	20
2.1.1. Aparato reproductor femenino.....	20
2.1.2. Placenta y Decidua.....	21
2.1.3. Membranas corioamnióticas	21
2.2. Señal y función de los TLR's en complicaciones del embarazo.....	22
2.2.1. Modelos de infección.....	22
2.2.3. Casos clínicos en el humano.....	23
III. HIPÓTESIS	24
IV. OBJETIVO GENERAL	25
4.1. Objetivos particulares.....	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1. Material Biológico.....	26

5.2. Anticuerpos y reactivos.....	26
5.3. Métodos.....	26
5.3.1. Obtención de muestras.....	26
5.3.2. Aislamiento y cultivo celular.....	27
5.3.3. Viabilidad celular.....	30
5.3.4. Determinación de IL-1 β y TNF α	30
5.3.5. Determinación de TLR-2 y TLR-4 en membrana celular.....	31
5.3.6. Análisis inmunohistoquímico de TLR-2 y TLR-4.....	31
5.3.7. Determinación de HBD-1, HBD-2 y HBD-3.....	32
5.3.8. Análisis estadístico.....	33
VI. RESULTADOS.....	34
6.1. Validación del modelo.....	34
6.1.1. Estandarización de aislamiento celular.....	34
6.1.2. Viabilidad celular.....	35
6.1.3. Funcionalidad celular.....	36
6.1.2.1. Perfil de secreción de IL-1 β	36
6.1.2.2. Perfil de secreción de TNF- α	37
6.2. Expresión de receptores de inmunidad innata TLR-2 y TLR-4.....	38
6.2.1. Análisis por citometría de flujo.....	38
6.2.2. Inmunolocalización tisular de TLR-2 y TLR-4.....	39
6.3. Secreción de péptidos antimicrobianos.....	42
VII. DISCUSIÓN.....	43
VIII. CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51
APÉNDICE (NOMENCLATURA).....	58

I. INTRODUCCIÓN

El embarazo implica la asociación estrecha de tejidos genéticamente diferentes, los de la madre y los del feto que actúan como un injerto semialogénico al expresar antígenos heredados del padre (Thellin y cols., 2000).

Para evitar el reconocimiento del feto como un agente extraño, el útero gestante opera como un sitio de privilegio inmunológico por la acción de diversos factores inmunológicos que en forma paradójica desarrollan una respuesta de tolerancia hacia el feto, al mismo tiempo que permanece intacta la capacidad para responder de manera eficiente ante la presencia de diversos agentes infecciosos o eventos inmunológicos (Pioli y cols., 2004).

Esta tolerancia hacia el feto es un mecanismo activo en el cual participan simultáneamente mecanismos humorales y celulares, innatos y específicos del sistema materno, así como el desarrollo de tejidos extraembrionarios con mecanismos de inmunidad innata.

1.1 ESTRATEGIAS QUE FAVORECEN EL PRIVILEGIO INMUNOLÓGICO

1.1.1 El sistema Th₁/Th₂

Dentro del sistema inmune, los linfocitos T CD4⁺ o ayudadores (Th₀) se diferencian a linfocitos tipo Th₁ o Th₂ cuyas funciones son antagónicas en la respuesta inmune. La respuesta Th₂ se caracteriza por secretar un patrón de citocinas anti-inflamatorias, entre ellas interleucina (IL)-4, -5 y -10, que favorecen una respuesta humoral, mientras que la respuesta Th₁ genera respuestas pro-inflamatorias al secretar un patrón de citocinas que incluye la IL-1β, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y el interferon gamma (INF-γ) favoreciendo una inmunidad mediada por células (Thellin y cols., 2000).

Wegman (1993) describió que de principio a fin en el embarazo, la respuesta del sistema inmune materno mediada por los linfocitos T se desvía hacia la dominancia en la respuesta Th₂, favoreciendo la producción de altos niveles de IL-4 e IL10 que inhiben la

proliferación y estimulación de células T citotóxicas y células NK, e inhiben la producción de citocinas Th₁ por los macrófagos; al mismo tiempo que se autoregula positivamente la producción de citocinas Th₂. En contraste, la respuesta Th₁ es desfavorable, pues se ha demostrado que INF- γ y TNF- α inhiben el desarrollo embrionario al favorecer la muerte por apoptosis en las células del trofoblasto y el crecimiento placentarion al inhibir la secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Tellin y cols., 2000).

Szekeres-Bartho y cols. (2005) han propuesto que el cambio en el balance Th₁/Th₂ es dirigido en parte por el incremento del nivel de progesterona que estimula la producción del PIBF (factor bloqueador inducido por progesterona), esta proteína es sintetizada por los linfocitos maternos y su activación evita la proliferación de linfocitos Th₁ y en consecuencia disminuye la producción de TNF- α y los niveles de IL-12, inactivándose las células NK dependientes de esta vía (Veenstra y cols., 2003).

Por otro lado la respuesta Th₂ es favorecida por la participación de células no inmunes como los trofoblastos y células deciduales (Chaouat y cols., 1999), las cuales producen citocinas Th₂ y factores que inhiben la actividad citotóxica de los linfocitos Th₁.

1.1.2 Progesterona

Durante el embarazo se interrumpe la producción hormonal de los ovarios y es la placenta quien funciona como glándula endocrina, que produce y secreta las hormonas necesarias para el mantenimiento de la gestación y desarrollo del feto. Las hormonas placentarias son entre otras: la progesterona (P₄), estrógenos, gonadotropina coriónica (HCG), lactógeno placentario (HPL) y la hormona de crecimiento (hPGH). Si bien cada una tiene funciones particulares, es la P₄ la hormona considerada el inmuno-modulador por excelencia en la interfase materno-fetal con funciones pro-gestacionales (Peltier, 2003; Thellin y cols., 2000).

Al inicio del embarazo la P_4 a través de su receptor intracelular, regula vías moleculares y respuestas celulares implicadas en el proceso de implantación. La P_4 promueve la síntesis del factor inhibidor de leucemia (LIF) por el endometrio, que es reconocido por los receptores LIF-R en el sincitiotrofoblasto. La unión de LIF con LIF-R permite la implantación y al mismo tiempo favorece el crecimiento y la diferenciación del trofoblasto (Thellin y cols., 2000).

El mecanismo por el cual la P_4 actúa como inmuno-modulador en los tejidos del aparato reproductor femenino desde el inicio hasta el término del embarazo envuelve acciones directas e indirectas en las células inmunes; la P_4 modula la producción de anticuerpos, reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias por los macrófagos en respuesta a productos bacterianos, inhibe la proliferación de linfocitos y suprime su respuesta inmunológica al impedir la activación del factor nuclear kappa- beta (NF-kB), que regula la expresión de varios genes involucrados en las respuestas inmunes inflamatorias (Peltier, 2003).

En el humano se han identificado dos isoformas del receptor a P_4 , la isoforma B presente durante el embarazo con propiedades progestacionales y la isoforma A con propiedades anti-progestacionales. Por medio de la expresión de la isoforma B, la progesterona contribuye a la inhibición de las contracciones uterinas al inhibir proteínas implicadas en la activación uterina, en particular receptores de estrógeno (Winkler y cols., 2000), así como la secreción de prostaglandinas (PG's) y metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP's) (Goldman y cols., 2005).

1.1.3. Expresión de antígenos leucocitarios humanos

El reconocimiento de lo propio y lo no propio dentro de un organismo es mediado por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), el cual expresa dos clases de antígenos leucocitarios humanos (HLA), moléculas que además de poligénicas, son altamente polimórficas: Clase **I** clásicas (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y no clásicas (HLA-E, HLA-F y HLA-G) y Clase **II** (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR). Los antígenos presentados por las moléculas Clase **II** son necesarios para la respuesta inmune humoral (sistema del complemento); por el contrario, los antígenos presentados por las moléculas Clase **I**, generan respuestas inmunes mediadas por células (fagocitos, linfocitos NK y T citotóxicas).

En el útero están presentes células NK, macrófagos, linfocitos y células dendríticas, con el objetivo de destruir agentes extraños o patógenos. El estudio del MHC durante el embarazo muestra que el sistema materno es incapaz de reconocer al feto como no propio evitando así su rechazo. En este contexto sobresale la molécula HLA-G expresada de forma exclusiva por las células del trofoblasto placentario (Hunt y cols., 2006)

Durante el procesamiento del transcrito primario de ARN del gen HLA-G, se presenta un *splicing* alternativo que da lugar a 7 isoformas, de las cuales: 4 isoformas de este antígeno con dominio membranal (HLA-G1, G2, G3 y G4) y 3 isoformas solubles (HLA-G5 o sG1, G6 o sG2 y G7). Estudios realizados por Hunt y cols. (2006) reportan la expresión de la proteína y el mRNA de HLA-G5 en todas las subpoblaciones de células trofoblásticas, el corion, la decidua y la sangre materna. Mientras que las isoformas HLA-G2 y HLA-G6 se expresan solo en células del citotrofoblasto y el corion, durante la migración e invasión del trofoblasto en la decidua materna.

Evidencias experimentales de Allan y cols. (2000) y Brown y cols. (2004) han mostrado que el receptor inhibitor de leucocitos (LILRB o ILT) es la molécula capaz de reconocer el antígeno HLA-G expresado en las células del trofoblasto. Los linfocitos T y B expresan ILT2, el cual al reconocer el antígeno HLA-G es capaz de inhibir la acción citolítica de los linfocitos, la población más abundante en la decidua materna. Por otro lado las células NK y fagocitos mononucleares expresan ILT4, que ha demostrado ser el principal receptor de las moléculas HLA-G promoviendo la muerte celular en estas células que son la segunda población importante de leucocitos en la decidua materna (Hunt y cols., 2006). De manera que en conjunto, estos efectos en las células del sistema inmune materno permiten la migración y viabilidad de las células trofoblásticas.

1.1.4. Tejidos extraembrionarios

El humano al igual que todos los vertebrados desarrolla durante el embarazo tejidos extraembrionarios que incluyen la placenta y las membranas fetales o membranas corioamnióticas (MC) que proveen al producto con diferentes mecanismos de mantenimiento de su homeostasis (Vadillo y cols., 2004).

La placenta es un órgano de origen materno y fetal que inicia su formación durante la implantación del embrión, cuando las células primordiales de trofoectodermo embrionario invaden el endometrio materno toma el nombre de decidua capsular. Este órgano está especializado en modular el intercambio gaseoso que provee el O₂ necesario para el desarrollo fetal y la liberación de CO₂ en la circulación materna a través de las paredes de las vellosidades para su desecho, paralelamente modula la disponibilidad de materiales nutritivos al feto y los desechos son liberados a la sangre materna. También actúa en la formación de hormonas esteroides que establecen el micro ambiente de tolerancia inmunológica y participan en la maduración del feto (Figura 1A).

Las MC son una entidad anatómica e histológica sumamente compleja y dinámica que secreta diferentes sustancias hacia el líquido amniótico y que es capaz de responder a diferentes señales bioquímicas procedentes tanto del producto como de la madre (Parry y Strauss, 1998; Bryant-Greenwood, 1998 a). Las MC funcionan como frontera entre el producto y la madre, por las características de su estructura y en función conjunta con el líquido amniótico brindan protección mecánica frente a los movimientos del feto.

1.1.4.1 Membranas corioamnióticas

Las MC se componen por la superposición de dos tejidos: el amnios y el corion; cada uno formado por diferentes tipos celulares embebidos en una prominente matriz extracelular (MEC), cuyo principal componente es la colágena (Bryant-Greenwood, 1998 b).

El amnios se forma a partir del ectodermo embrionario, no tiene vasos sanguíneos ni se encuentra innervado, obteniendo sus nutrimentos directamente del líquido amniótico. Se caracteriza por presentar una gran resistencia mecánica debido a su estructura. Este tejido se compone por cinco capas histológicas: **1)** el epitelio amniótico, es la capa que se encuentra en contacto con el producto y el líquido amniótico, formado por una monocapa de células cúbicas que descansan sobre una membrana basal; **2)** membrana basal, constituida principalmente por colágena tipo IV, posiblemente la responsable de mantener la unión entre las células epiteliales y por lo tanto de mantener la integridad estructural del epitelio, también se encuentran

colágenas tipo I, III y glicoproteínas como laminina, nidógeno y fibronectina; las siguientes tres capas corresponden a un amplia estructura de tejido conectivo que se diferencia por los distintos tipos de colágena que los constituyen o por las células presentes en ellas; **3)** la capa compacta, se compone de tejido conectivo organizado en una red tridimensional, compuesta de colágenas tipo I y VI en menor cantidad, fibronectina y nidógeno. Su grosor es mayor al de la membrana basal, lo que le otorga gran capacidad tensil para mantener la integridad mecánica del amnios; **4)** la capa fibroblástica, está constituida por células mesenquimatosas con marcadores de fibroblastos que secretan las colágenas intersticiales de la capa compacta; es posible encontrar macrófagos dispersos en la MEC; **5)** la capa esponjosa o intermedia, se encuentra entre el amnios y el corion, tiene una estructura ondulante, que es poco compacta y con gran contenido de proteoglicanos y colágena no fibrilar. La estructura de esta capa permite al amnios deslizarse sobre el corion y así absorber el estrés mecánico asociado a los movimientos fetales.

El corion se forma a partir del mesodermo, presenta una mayor celularidad que el amnios, lo que lo hace parecer mas grueso, está formado por dos capas: **1)** la pseudo membrana basal, esta en contacto con la capa esponjosa y presenta una estructura similar a la membrana basal, constituida por colágena tipo I, III, IV y proteoglicanos; **2)** la capa de trofoblastos con polaridad hacia la decidua materna forma la principal población del corion, aunque es posible encontrar células con marcadores de leucocitos, en su mayoría macrófagos así como también fibroblastos, todos embebidos en una MEC laxa que no forma una red tridimensional como la del amnios, sino que son pocas las fibras de colágenas tipo I, III, IV y proteoglicanos. La porción final del corion se interdigita con la decidua materna (Figura 1B) (Vadillo y cols., 2004, Vega y cols., 2008).

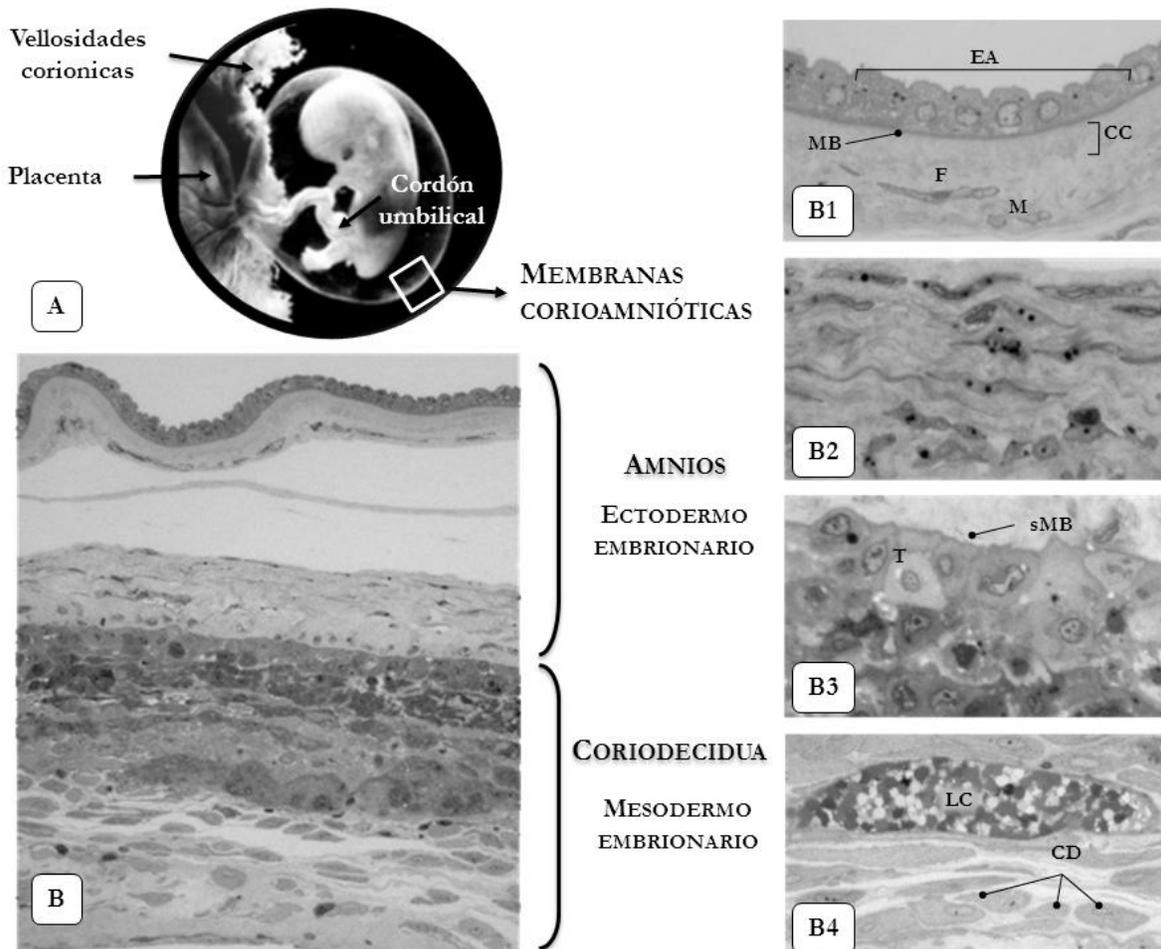


Figura 1. A: Esquema que muestra la ubicación del feto en la interfase materno-fetal y su relación con las membranas corioamnióticas. **B:** Corte semifino transversal (1mm) de las membranas corioamnióticas a término de (37 semanas de edad gestacional) sin trabajo de parto, incluidas en EPON, teñidas con azul de toluidina al 0.5 % y analizadas en microscopio de luz. Se observan los dos tejidos superpuestos: amnios y corion (20x). En la columna derecha se observan detalles de las capas que componen cada tejido (40x). **B1)** Se observa las células cúbicas que conforman el epitelio amniótico (EA) que descansan sobre la membrana basal (MB) rica en colágena tipo IV, adyacente se encuentra la capa compacta (CC) que forma una red tridimensional, compuesta de colágenas tipo I y VI, la capa fibroblástica se reconoce por la presencia de fibroblastos (F) y macrófagos (M). **B2)** Se observan la estructura ondulante de la capa esponjosa formada por la colágena no fibrilar y un gran contenido de proteoglicanos. **B3)** Se observa la estructura similar a la membrana basal (sMB) y la principal población del corion, los trofoblastos (T). **B4)** Se observan las células de la decidua materna (CD) con las que se interdigita el corion y un vaso infiltrado con leucocitos (L). (Modificado de Vadillo y cols., 2004).

1.2. TRABAJO DE PARTO

El trabajo de parto se inicia por la pérdida del privilegio inmunológico que se establece durante el embarazo en la interface materno fetal y es el resultado de varios eventos endocrinos e inmunológicos que dirigen procesos mecánicos y bioquímicos en el ambiente materno (Peltier, 2003), los cuales se coordinan con señales de origen fetal.

Los procesos mecánicos indispensables para la expulsión del producto son: **1)** la dilatación del cérvix, **2)** el inicio de las contracciones uterinas que incrementan en amplitud y frecuencia, y **3)** la ruptura de las membranas corioamnióticas en la región más cercana al cérvix.

Diversos estudios en modelos animales como la oveja (Liggins y cols., 1973), mono rhesus (Bosu y cols., 1973) y cobayo (Illingworth y cols., 1974) revelan que durante las últimas etapas de gestación y en el inicio del trabajo de parto se disminuye la producción de P₄; en cambio en el humano, el inicio del trabajo de parto no está asociado con la disminución en la concentración de P₄, pero se ha observado un cambio en el número y afinidad de los receptores de progesterona en el miometrio, de la isoforma B a la isoforma A (Pieber y cols., 2001).

El cambio en el perfil de los receptores de progesterona sumado con la infiltración de leucocitos poco antes de iniciarse el trabajo de parto, está asociado al incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-8, IL-1 β , IL-6 y TNF- α en la interfase materno-fetal, amplificando la respuesta fisiológica de trabajo de parto (Pieber y cols., 2001, Goldman y cols., 2005).

Estas citocinas actúan como reguladores de la expresión de otros mediadores que favorecen el trabajo de parto, entre los que se encuentran diversas enzimas y moléculas; principalmente las metaloproteinasas (MMPs) y prostaglandinas (PGs) que actúan directamente sobre los distintos tejidos de la interfase materno-fetal (Figura 2).

1.2.1. Mecanismos inmunológicos en el miometrio

Hacia las semanas finales del embarazo, el miometrio se torna crecientemente sensible a la oxitocina debido a que IL-6 incrementa la expresión de los receptores a oxitocina en las células del miometrio (Rauk y cols., 2001), simultáneamente incrementa el número de uniones Gap en el miometrio, indispensables para la instalación de contracciones uterinas sincrónicas.

Por otro lado IL-1 β y TNF- α modulan la biosíntesis de PGs, ya que estimulan la secreción de ácido araquidónico e inducen la expresión de la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), activando el metabolismo de los fosfolípidos (Molnar y cols., 1993; Rauk y cols., 2000) que da como principal producto la prostaglandina E₂ (PGE₂). La actividad de PGE₂ incrementa los niveles de Ca²⁺ en las células del miometrio para generar las contracciones uterinas y en conjunto con TNF- α estimula la producción de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) ó Gelatinasa B, para el desprendimiento de la placenta (Thorntons y cols., 1992).

1.2.2. Mecanismos inmunológicos en el cérvix

La dilatación del cérvix, mas allá de ser un evento físico-anatómico, es el resultado de una reacción de tipo inflamatoria en el que diversas señales inmunológicas se coordinan con elementos vaso activos como la PGE₂ y PGF_{2 α} y factores quimiotáticos como la IL-8, que juega un papel clave en la quimiotaxis, activación y degranulación de granulocitos neutrofilicos en el estroma cervical y miometrio (Elliot y cols., 2000; Winkler, 2000).

1.2.3. Mecanismos inmunológicos en las membranas corioamnióticas

Durante el trabajo de parto las MC amortiguan la presión ejercida por las contracciones uterinas lo que en conjunto con la degradación del tejido conectivo ocasiona el debilitamiento progresivo de estos tejidos.

La degradación del tejido conectivo se debe a la influencia del ambiente inmunológico del cérvix y a la presencia de las citocinas IL-1 β y TNF- α que están presentes en el epitelio

amniótico y el corion (Young y cols., 2002), donde estimulan la producción de las MMPs, (Vadillo y cols., 2004) enzimas que tienen como sustrato a la mayoría de los componentes de la MEC. Una característica de estas enzimas es que son secretadas como zimógenos o proenzimas hacia el espacio extracelular donde son activadas por otros miembros de la familia o por diferentes proteasas extracelulares (Estrada-Gutiérrez y cols., 2005). Entre las principales MMPs que han sido localizadas en las MC, se encuentra la MMP-9 que tiene como principal sustrato la colágena tipo IV (Vadillo y cols., 2004), al actuar esta enzima no solo desorganiza la red de las fibras de colágenas, sino que los proteoglicanos tienden a hidratarse, disgregando aun más la estructura de la MEC. El resultado se observa a simple vista como un “hinchamiento” de las MC que caracteriza el trabajo de parto activo.

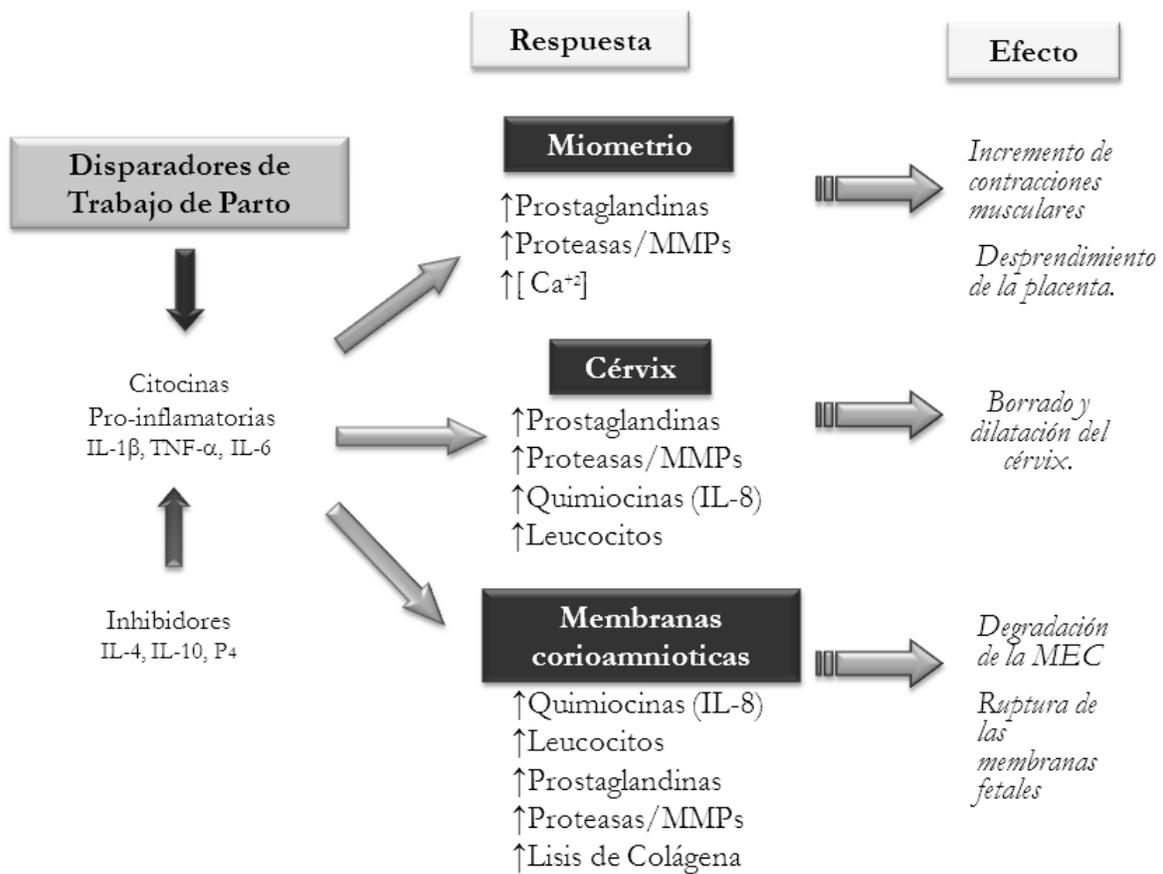


Figura 2. Mecanismos inmunológicos que dirigen el trabajo de parto en el ambiente materno-fetal.

1.3. INMUNIDAD INNATA EN EL EMBARAZO

El sistema inmune innato se caracteriza por responder de manera rápida y eficiente ante un reto inmunológico o infección. Las superficies epiteliales representan la primer línea de defensa del cuerpo contra los microorganismos patógenos, actuando como una barrera física, por lo tanto cuando se daña o rompe un tejido, se facilita la entrada de los microorganismos al sistema y se complica la infección (Romero y cols., 2006).

Durante el embarazo las MC (amnios y corion), la placenta y la decidua materna, son los tejidos que protegen tanto al feto como a la madre de un proceso infeccioso a nivel cérvico-vaginal que puede extenderse de manera ascendente a la región coriodesidual (infección intrauterina) y eventualmente atravesar e infectar las membranas corioamnióticas (corioamnioitis) y eventualmente acceder a la cavidad amniótica en donde la esterilidad del líquido amniótico se destruye (infección intramniótica) (Romero y cols., 1988)

Estos tejidos representan más que una barrera física contra los microorganismos. Muchos epitelios expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), entre los cuales se encuentra la familia de receptores tipo Toll (TLRs), capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y productos metabólicos de éstos como son diversas endotoxinas. La activación de estos TLRs por sus agonistas induce la generación de péptidos antimicrobiales naturales (NAPs), como las α y β defensinas (HBDs), elafina, el inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI) entre otros. Estas moléculas clave del sistema inmune innato tienen acción antibacteriana, antiviral y antifúngica, causando daño a la membrana celular de los patógenos o interrumpiendo las señales celulares de activación (Hancock y cols., 2000).

1.3.1. Receptores Tipo Toll

Los receptores Tipo Toll (TLRs) son proteínas conservadas evolutivamente, el primer gen Toll fue descrito por Hashimoto y cols. (1988) en la mosca de la fruta durante el desarrollo dorsoventral de la larva, posteriormente Lemaitre y cols. (1996) demostraron que Toll era parte de la defensa contra una infección fúngica en la mosca. Un año más tarde Medzhitov y

cols. (1997) describieron un homólogo del receptor Toll en humanos con la capacidad de inducir la expresión de genes involucrados en las respuestas inflamatorias (Takeda y Akira, 2005; Krishnan y cols., 2007).

Los TLRs estructuralmente se caracterizan por presentar un dominio intracelular homólogo a los del receptor de IL-1 (IL-1R) referido como dominio Toll/IL-1R (TIR), este dominio contiene tres regiones: Box 1, es la secuencia de identificación del dominio. Box 2, forma un importante anillo en su estructura que le permite acoplarse con diferentes proteínas adaptadoras intra-citoplasmáticas que contienen dominios relacionados con la apoptosis y activación celular o con otros TLRs cuando estos forman dímeros durante la señalización. Una mutación en esta región incapacita a la proteína para producir señal. La función de Box 3 no ha sido determinada, pero se sugiere que participa de manera importante en el proceso de señalización. El dominio extracelular de estos receptores presenta secuencias repetidas de leucina (LRR), que posee tres regiones semejantes a las inmunoglobulinas que les permiten reconocer a los diferentes PAMPs (Figura 3) (Krishnan y cols., 2007).

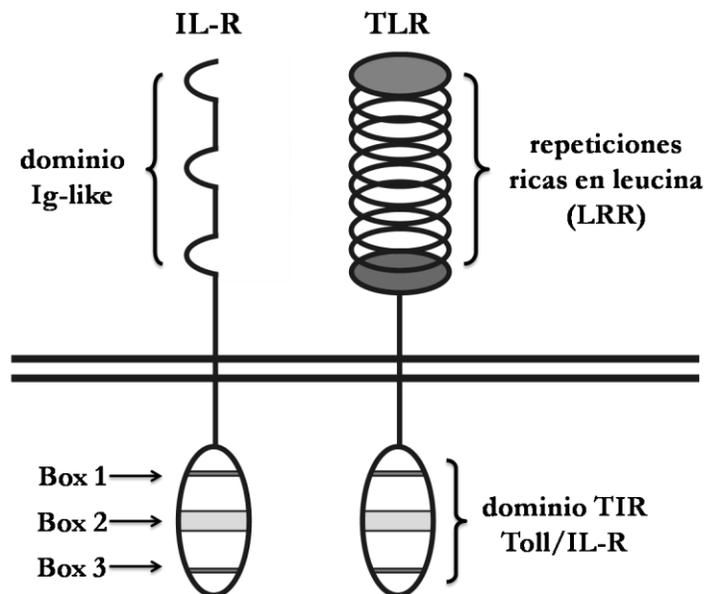


Figura 3. Muestra la alta similitud entre IL-R y TLR, ambos receptores difieren en su dominio extracelular, IL-R posee un dominio similar a IG, mientras que TLR posee un dominio rico en repeticiones de leucina (LRR). el dominio intracelular es el mismo, Toll/IL-R (TIR) indicando la similitud en el nivel de señalización de ambos receptores. (Modificado de Krishnan y cols., 2007)

A la fecha se han descrito 13 miembros de la familia de TLRs (Tabla 1) con ligandos específicos para reconocer una gran diversidad de agentes patógenos. Los TLRs se expresan en células inmunes (dendríticas, monocitos y macrófagos entre otros) para la posterior activación del sistema inmune adaptativo, así como también en células no inmunes del sistema nervioso central, mucosa intestinal y diferentes epitelios, donde actualmente se ha observado que son capaces de reconocer el tejido dañado por infección o estrés ambiental, reconociendo moléculas celulares endógenas.

TLRs	Moléculas adaptadoras	Localización	Especies	Ligandos
TLR-1	MyD88 / Mal	Superficie celular	Humano/ Ratón	PAM3CSK4
TLR-2	MyD88 / Mal	Superficie celular	Humano/ Ratón	PAM3CSK4, MALP2
TLR-3	TRIF	Compartimiento celular	Humano/ Ratón	LTA, Zym, dsRNA, Poly-IC, viral RNA, siRNA, mRNA endógeno
TLR-4	MyD88 / Mal / TRIP/ TRAM	Superficie celular	Humano/ Ratón	LPS, MMTV, VSV-G, Taxol, proteína F, Fibronectina, HSP60, HSP70
TLR-5	MyD88	Superficie celular	Humano/ Ratón	Flagelinas
TLR-6	MyD88 / Mal	Superficie celular	Humano/ Ratón	MALP2, LTA, Zym
TLR-7	MyD88	Compartimiento celular	Humano/ Ratón	ssRNA, IAQ (R848)
TLR-8	MyD88	Compartimiento celular	Humano/ Ratón	ssRNA, IAQ (R848)
TLR-9	MyD88	Compartimiento celular	Humano/ Ratón	CpG-ODN
TLR-10	Desconocido	Superficie celular	Humano	Desconocido
TLR-11	MyD88	Superficie celular	Ratón	Profilina
TLR-12	Desconocido	Desconocido	Ratón	Desconocido
TLR-13	Desconocido	Desconocido	Ratón	Desconocido

Tabla 1. Familia de TLRs y sus ligandos (Traducido de Krishnan y cols., 2007)

1.3.1.1. Receptor tipo Toll-4

TLR-4 fue el primer receptor reconocido en mamíferos, es el receptor esencial para el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS), componente principal de la pared celular en bacterias gram-negativas y es activado por ligandos endógenos como las proteínas de choque térmico (HSP60 y HSP70), el extra dominio A de fibronectinas, oligosacáridos y ácido hialurónico, sulfato de heparina y fibrinógeno (Takeda y Akida, 2005). TLR-4 se clasifica como

un receptor de membrana celular; sin embargo, la expresión de este receptor se ha localizado a nivel subcelular en macrófagos después de su unión con el ligando, mientras que en células epiteliales del intestino reside en el aparato de Golgi (Hornef y cols., 2002).

En células de mamíferos: monocitos y macrófagos, la vía de transducción de la señal inicia cuando el LPS se une a LBP (proteína de unión a LPS). Este complejo LPS-LBP es reconocido por el receptor de membrana CD14, molécula accesoria que permite la interacción con el TLR-4; sin embargo, para que se genere la respuesta inflamatoria es necesaria la unión de la proteína MD2 asociada a la porción extracelular del TLR-4. De esta manera se activa MyD88 (factor de diferenciación mielodica) generando una cascada de fosforilación que libera al NF- κ B permitiendo su traslado hacia el núcleo para unirse a la región promotora de diversos genes asociados a la respuesta pro-inflamatoria para iniciar la síntesis de citocinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios, así como péptidos antimicrobianos. Asociado a TLR-4 también se ha observado una vía independiente de MyD88 en la cual el dominio intracelular (TIR) interacciona con la molécula adaptadora acoplada a TRIF (TRAM), esta molécula permite que la molécula inductora del INF- β (TRIF) active una cinasa, la proteína-1 de interacción con el receptor (RIP-1). RIP-1 es la clave de que la ruta independiente de TLR-4 pueda dirigir la activación de NF κ B, MAPKs, apoptosis o necrosis dependiendo del contexto en que se encuentre la célula (Figura 4) (Arancibia y cols., 2007).

1.3.1.2. Receptor tipo Toll-2

TLR-2 tiene como ligandos principales a los lipopéptidos microbianos, péptidoglicano y ácido lipoteicoico de bacterias gram-positivas, además reconoce formas atípicas de LPS como el de *Leptospira interrogans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Helicobacter pylori*; en contraste con el TLR-4 que sólo identifica LPS de *E. coli* y *Salmonella sp* (Takeda y Akida, 2005). Sin embargo, TLR-2 presenta una característica particular para reconocer una amplia variedad de PAMPs, la cual consiste en formar heterodímeros con otros TLRs. Así la coexpresión de TLR-1 con TLR-2 permite la detección de lípidos tripalmitoilados, mientras que la unión con TLR-6 permite la distinción entre los triacil y diacil lipopéptidos como MALP2 de micoplasma.

La vía de transducción de TLR-2 implica el reconocimiento directo de los PAMP's induciendo la proteína adaptadora MyD88, que a su vez induce la translocación del NF- κ B (Figura 4) para generar la respuesta contra los agentes que dañan al hospedero (Arancibia y cols., 2007).

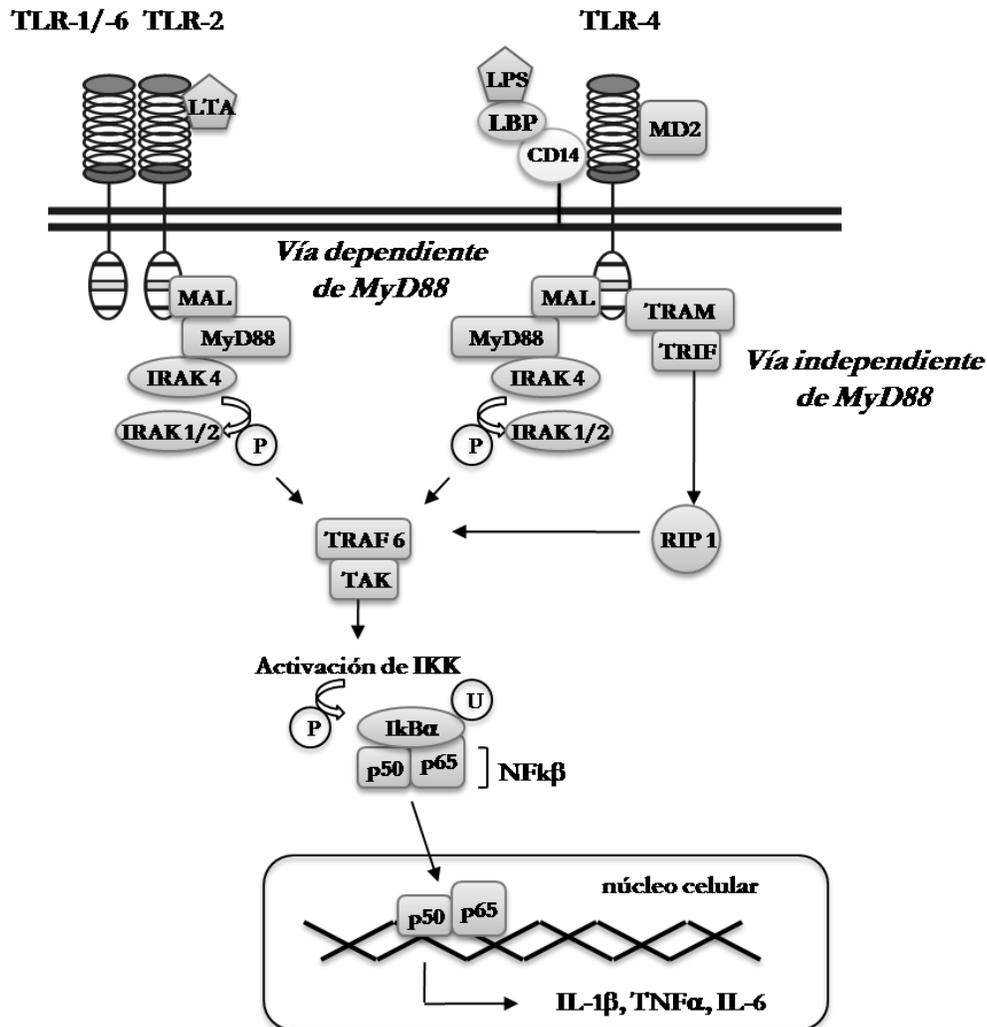


Figura 4. Mecanismo de señalización de los TLRs. En la vía dependiente de MyD88 el reconocimiento de PAMPs activa al receptor que se une a través de la región 2 y 3 de su dominio intracelular a la proteína MAL; esta se acopla con MyD88, la cual actúa sobre la cinasa asociada al receptor de IL (IRAK 4) que se autofosforila, generando las cinasas 1 y 2 (IRAK 1/2). Estas proteínas reclutan al factor 6 asociado al receptor del TNF (TRAF 6) y que en conjunto con otras proteínas activan al complejo IKK, el cual fosforila a I κ B α , que se disocia del NF κ B. El I κ B α liberado se ubiquitina para ser degradado por proteosomas. El NF κ B liberado se traslada al núcleo celular, donde se une al ADN y activa los promotores que contienen el dominio κ B, esto activa los genes asociados a la respuesta inflamatoria, como IL-1 β , TNF α , IL-6, entre otros. La vía independiente de MyD88 es seguida por TLR-3 y TLR-4, en el caso de TLR-4 el dominio intracelular (TIR) interactúa con la molécula adaptadora acoplada a TRIF (TRAM) y esta molécula adaptadora que ahora contiene al dominio TIR y es inductora del INF- β (TRIF) activa una cinasa, la proteína de interacción con el receptor (RIP-1), el cual recluta a TRAF 6 y sigue la misma ruta antes descrita hasta la liberación del NF κ B (Modificado de Krishnan y cols., 2007).

1.3.2. β -defensinas humanas

Las defensinas son moléculas conservadas evolutivamente, presentes en vertebrados y existiendo moléculas equivalentes en invertebrados y plantas. Entre ellas las β -defensinas (HBDs) son una familia de pequeños péptidos con carga positiva, que contienen seis residuos de cisteína conectados entre sí por puentes disulfuro (Bals y cols., 2001). Se han identificado hasta 28 secuencias para β -defensinas en el humano, pero solo 4 se han identificado funcionalmente expresadas en células epiteliales, leucocitos, macrófagos y neutrófilos (Tabla 2) (Schutte y cols., 2002).

Se ha demostrado que estos péptidos tienen un efecto directo antimicrobiano, con capacidad para eliminar *in vitro* gran variedad de bacterias gram-positivas y gram-negativas, virus con y sin envoltura, hongos y algunos parásitos (Bals y cols., 2001)

El mecanismo por el cual estos péptidos ejercen su actividad antimicrobiana aún es desconocido. Entre las posibilidades se han descrito: 1) la formación de poros en las membranas de los microorganismos que permite verter el contenido microbiano; 2) la activación de enzimas que degraden la pared celular de las bacterias; 3) alteración de la pared celular de los microorganismos; 4) evitar la adherencia a la pared de las células epiteliales del hospedero y 5) despolarización de la membrana de los microorganismos (Soto y cols., 2007)

Actualmente se ha descrito que la mayoría de estas moléculas, presentan propiedades quimiotácticas, que les permiten modular una respuesta inmune induciendo la producción de citocinas en distintos tipos celulares, vinculando la respuesta de la inmunidad innata con la respuesta de inmunidad adaptativa. En el caso de HBD-1, -2 y -3 se ha demostrado que atraen a los linfocitos y células dendríticas a través de la unión al receptor para la quimiocina CCL20 (CCR6). Por otro lado se ha demostrado que la HBD-2 tiene la capacidad de inducir la degranulación de mastocitos y liberación de histamina y prostaglandina (Yang y cols., 1999).

Defensinas	Células productoras	Síntesis y secreción	Quimiotaxis
HBD-1	Células epiteliales de mucosa oral y nasal, glándulas salivares, intestino, piel, ojos, tracto urogenital, riñones. Monocitos, macrófagos, queratinocitos.	Constitutiva	Células dendríticas inmaduras Linfocitos T
HBD-2	Células epiteliales del intestino, tráquea, útero, riñones, pulmones, glándulas salivales, mucosa oral y nasal. Monocitos, macrófagos, queratinocitos.	Inducible en respuesta a microorganismos TNF- α , IL-1 β y factores de crecimiento.	Linfocitos T Células dendríticas inmaduras Células cebadas Mastocitos
HBD-3	Células epiteliales del intestino, tráquea, útero, riñones, pulmones, glándulas salivales, mucosa oral y nasal. Monocitos, macrófagos, queratinocitos.	Inducible en respuesta a microorganismos TNF- α , IL-1 β e IFN- γ	Monocitos Células dendríticas Macrófagos
HBD-4	Células epiteliales en antro gástrico, testículos y tracto respiratorio.	Inducible en respuesta a estímulos inflamatorios	Monocitos Macrófagos

Tabla 2. Características generales de las β -defensinas.

II. ANTECEDENTES

Durante el embarazo los TLRs y las HBDs se expresan en células especializadas del sistema inmune, en células de los tejidos del tracto reproductor femenino y en células de los tejidos extraembrionarios; sin embargo, sus patrones de expresión y síntesis varían de acuerdo a la edad gestacional y debido a algunas condiciones particulares como en el parto pretérmino o el desarrollo de una infección a nivel intrauterino o intramniótico.

2.1. EXPRESIÓN DE TLRs Y HBDs EN EL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO Y LA INTERFASE MATERNO-FETAL.

2.1.1. Aparato reproductor femenino

En el tracto reproductor femenino se pueden apreciar dos compartimentos: el primero que comprende a la vagina y el cérvix representa un ambiente “no estéril”, debido a que están en constante presencia de microorganismos como consecuencia de su proximidad al recto, en este compartimiento se incrementa la expresión de HBD-2 y -3 en la vagina (Narvekar y cols., 2007) y de TLR-2 en el tejido cervical (Pioli y cols., 2004). El endocérvix representa un sitio de transición hacia el segundo compartimiento que comprende el endometrio y las tubas uterinas que representa un ambiente estéril y en los cuales se expresan TLR-4, TLR-2 (Pioli y cols., 2004) y las HBD-2, -3 y -4 (Narvekar y cols., 2007). La expresión de TLR-1, -3 y -6 (Fazeli y cols., 2005) al igual que HBD-1 (Fleming y cols., 2003, Valore y cols., 1998) se ha identificado en las células epiteliales de todo el tracto reproductor femenino en mujeres no embarazadas.

Por otra parte se han observado patrones de expresión de estos elementos de inmunidad innata en relación con las fases del ciclo menstrual; durante la fase proliferativa se incrementa la expresión de HBD-4 y disminuyen los niveles de HBD-3 y -1 (Fleming y cols., 2003); durante la fase secretora se elevan los niveles de expresión de TLR 2, 3, 4 y 9 (Hirata y cols., 2007, Aflatoonian y cols., 2007), finalmente durante la menstruación, periodo en el que la población de neutrófilos muy densa en el endometrio, la HBD-2 muestra un pico de expresión (Fleming y cols., 2003), en conjunto los datos sugieren que la expresión de estos elementos pudiera estar regulada por hormonas sexuales, participando en el remodelado del endometrio y otros tejidos gestacionales preparándolos para la implantación del embrión.

2.1.2. Placenta y Decidua

Los TLRs son expresados principalmente en células del trofoblasto placentario con un patrón que varía de acuerdo con el estado de diferenciación de las mismas células y la edad gestacional. Durante el primer trimestre del embarazo TLR-2 y -4 son expresados en el citotrofoblasto veloso y el trofoblasto extra veloso (Bejiar y cols., 2006). Para el tercer trimestre de embarazo las células del sincitiotrofoblasto presentan inmunoreactividad para TLR-2 y -4 (Holmlund, y cols., 2002, Bejiar y cols., 2006) así como la expresión de RNAm de TLR-6 (Mitsunari y cols., 2006).

La expresión de TLRs también ha sido reportada en otros tipos celulares de la placenta a término como células de Hofbauer (Kumazaki y cols., 2004), células endoteliales y fibroblastos que expresan TLR-4, mientras que TLR-2 se ha localizado en células endoteliales, macrófagos y fibroblastos (Ma y cols., 2007).

Los diversos tipos celulares de la decidua (NK, células dendríticas y linfocitos), tienen la capacidad de producir gran variedad de mediadores inflamatorios, en estas células se han identificado TLR-1 a -10 durante el primer trimestre de embarazo (Krikun y cols., 2007) y TLR-1, -2, -4 y -6 en el tercer trimestre (Canavan y Simhan, 2007). TLR-2 y -4 también se han detectado en el infiltrado celular que incluye macrófagos y neutrófilos, sugiriendo una participación importante de estas células en la respuesta contra agentes infecciosos y/o el inicio de trabajo de parto (Kim y cols., 2004).

2.1.3. Membranas fetales

Existen pocos estudios que hablen de la expresión de los TLRs en la membrana corioamniótica con respecto a la edad gestacional o el trabajo de parto, la mayoría de los trabajos donde se analiza la expresión de los TLRs son modelos de infección donde se estudia la función del receptor frente a su agonista específico. Sin embargo dentro de estos mismos hay algunas referencias que son relevantes para nuestro trabajo; se ha identificado que TLR4 se expresa difuso en el citoplasma de las células del epitelio amniótico alrededor de las 10 semanas de gestación, después de las 25 semanas su expresión se polariza hacia la superficie apical (Adams y cols., 2007).

2.2. SEÑAL Y FUNCIÓN DE LOS TLRs Y LAS HBDs EN COMPLICACIONES DEL EMBARAZO

2.2.1. Modelos de infección

Tomando como base los estudios de la expresión de los diferentes TLRs en los tejidos gestacionales, son TLR2 y 4 los receptores que muestran una variación más notable de acuerdo a variables normales del embarazo como edad gestacional y el perfil hormonal de la madre; debido a que estos son los principales receptores para el reconocimiento de diversos PAMPs, se ha estudiado su respuesta en la interfase materno-fetal empleando modelos de infección que recrean el ambiente de una infección intrauterina o corioamnioitis (CAM).

Wang y Hirsch (2003) han reportado que la expresión de TLR4 funcional es esencial para la inducción del parto pretérmino por bacterias gram-negativas. Utilizando un modelo de infección intrauterina en ratonas C3H/HeJ (incapaces de expresar TLR4), observaron que *E.Coli* induce el parto pretérmino en el 100% de ratonas del grupo control pero no es capaz de inducirlo (0%) en el grupo C3H/HeJ. Elovitz y cols., (2003) utilizando solo la endotoxina LPS de las bacterias observaron resultados similares. Por otro lado Wang y Hirsch (2003) describen un incremento de COX-2 en los tejidos maternos en ambos grupos, mientras que solo en el grupo C3H/HeJ observan una disminución de la enzima catabolizadora de prostaglandinas (PGDH) en tejidos maternos y extraembrionarios, por lo que concluyeron que TLR4 induce el parto pretérmino al disminuir la degradación de las prostaglandinas y no su síntesis.

Por otro lado la estimulación de explantes de placenta humana del primer trimestre de embarazo con LPS mostró que los trofoblastos a través de TLR4 producen una respuesta inflamatoria incrementando los niveles de citocinas, mientras que los Peptidoglicanos reconocidos por TLR2 inducen apoptosis en los trofoblastos. En explantes de placentas a término estimulados con LPS y Zymozan (agonista de TLR-2), se incrementó la producción de IL-6 e IL-8 (Holmlund y cols., 2002), indicando que el trofoblasto tiene la capacidad no solo de reconocer los agentes patógenos, sino de responder contra éstos, activando las células del sistema inmune.

En membranas corioamnióticas humanas a término estimuladas con LPS se demostró que TLR-4 se expresa intensamente y de forma secuencial en la membrana apical, el citoplasma y finalmente en el compartimiento basal, al respecto los autores sugieren que la expresión de este receptor es un mecanismo para monitorear la presencia de patógenos en el líquido amniótico (Adams y cols., 2007).

2.2.2. Casos clínicos en el humano

La evidencia de la expresión de TLRs en complicaciones del embarazo muestra que la expresión de la proteína TLR-4 se incrementa en el trofoblasto intersticial de pacientes con preeclampsia (Kim y cols., 2005) y en células de Hofbauer en casos de parto pretérmino y CAM (Kumazaki y cols., 2004). En membranas fetales de pacientes sanas, la expresión de TLR-2 se observa polarizada hacia la superficie basal del epitelio amniótico sin embargo este arreglo se pierde en casos de CAM e incrementan los niveles de mRNA tanto en los casos de parto a término, pretérmino y CAM (Kim y cols., 2004), por su parte HBD-1, -2 y -3 son expresadas a nivel de proteína y RNAm, tanto en células del epitelio amniótico como en trofoblastos de la coriodecidua en membranas con trabajo de parto y parto pretérmino (King y cols., 2007, Stock y cols., 2007).

Un estudio genético reveló una asociación del polimorfismo Asp299Gly para el gen TLR-4 con el incremento en el riesgo de parto pretérmino y por lo tanto con el incremento en la probabilidad de desarrollar sepsis por gram-negativas (Lorenz y cols., 2002). El análisis genómico del DNA de infantes portadores del polimorfismo del alelo de TLR2 (-16934TA/AA Y 2258GA/AA) presentaron periodos de gestación más cortos (Krediet y cols., 2007). También se ha observado una asociación entre el alelo T para TLR-4 399 con la susceptibilidad del desarrollo de vaginosis bacteriana (Goepfert y cols., 2005) y el alelo G para TLR-4 896 con un incremento en el pH vaginal, los niveles de *Gardnerella vaginalis* y la concentración de anaerobios gram-negativos (Genc y cols., 2004).

III. HIPÓTESIS

El trabajo de parto normal es un evento inmunológico por lo tanto la expresión de TLR-2 y TLR-4, así como la secreción de HBD-1, HBD-2 y HBD-3 se deben incrementar en el trabajo de parto; sugiriendo que juegan un papel clave en la modulación del proceso inflamatorio que actúa sobre las MC y los tejidos de la interfase materno-fetal, en el trabajo de parto.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en la expresión de los receptores de inmunidad innata TLR-2 y TLR-4 y los niveles de secreción de las HBD-1, HBD-2 y HBD-3 por las distintas poblaciones de las MC, asociados al trabajo de parto.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Estandarizar las condiciones de aislamiento de las poblaciones celulares de las MC.
- Determinar la actividad metabólica de las poblaciones celulares aisladas de las MC como prueba de su viabilidad en cultivo.
- Determinar los niveles de IL-1 β y TNF- α secretados *in vitro* por las diferentes poblaciones celulares aisladas de las MC, como prueba de su funcionalidad en cultivo.
- Analizar el patrón de expresión en membrana celular de los receptores de TLR-2 y TLR-4 en células aisladas del epitelio amniótico y del corion de membranas corioamnióticas con y sin trabajo de parto, mediante citometría de flujo.
- Analizar el patrón de distribución de los receptores de TLR-2 y TLR-4 en membranas corioamnióticas con y sin trabajo de parto, mediante inmunohistoquímica.
- Cuantificar los niveles de secreción *in vitro* de HBD-1, -2 y -3 en cultivos celulares de amnios y corion aislados de MC con y sin trabajo de parto, mediante ELISA.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Las MC utilizadas en el proyecto fueron tomadas de pacientes regulares del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) sin antecedentes de infección intrauterina, producto único y paridad satisfecha con un periodo de gestación de 37 a 40 semanas. Para la estandarización de las condiciones de aislamiento cultivo celular se usaron MC de mujeres intervenidas por cesárea. Para el análisis de TLRs y HDBs, se usaron MC de mujeres con fisiología de trabajo de parto cuyo alumbramiento fue vía vaginal y MC obtenidas por cesárea que no mostraran signos clínicos de trabajo de parto, como grupo control.

Este proyecto de investigación fue aprobado por el comité interno de Investigación y Ética del INPer (Código 212250-06101).

5.2 ANTICUERPOS Y REACTIVOS

Los anticuerpos monoclonales anti-TLR-4 (HTA125), anti-TLR-2 (TL2.1) biotinilados y conjugados con fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE) fueron comprados a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, E.U.A.). Los anticuerpos monoclonales y policlonales anti-TNF- α y anti-IL-1 β con las proteínas recombinantes correspondientes se adquirieron a R&D systems (Minneapolis, E.U.A.). Los anticuerpos anti-HBD-1, -2 y -3 se adquirieron a Peprotech (Princeton, E.U.A.). En los ensayos se usaron reactivos y soluciones de grado analítico.

5.3 MÉTODOS

5.3.1. Obtención de muestras

Las MC fueron obtenidas de la unidad tocoquirúrgica en la sala de expulsión momentos después del alumbramiento, para lo cual se separaron de la placenta y se colocaron en un frasco con medio estéril Dulbecoco Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-BRL, Bethesda, E.U.A.) para ser transportadas al laboratorio.

Se realizó un control microbiológico de las muestras, utilizando el medio en el cual se transportaron a laboratorio. El análisis incluyó la búsqueda de organismos anaerobios y aerobios, incluyendo *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* y *Gardnerella vaginalis* asociados a infecciones cervicovaginales. Solo se usaron las muestras que no presentaron resultados positivos de crecimiento bacteriano.

5.3.2. Aislamiento y cultivo de células.

Para estandarizar el método de aislamiento de las diferentes poblaciones celulares a partir de MC a término, se emplearon tres tipos de enzimas colagenasas: I, II y IV a una concentración de 1mg/g de tejido, empleando DMEM con 10% SFB durante 3 h. A partir de estos primeros ensayos se determinó utilizar la colagenasa tipo IV con la cual se hicieron más ensayos variando la concentración de la misma, el medio de cultivo utilizado para preparar la solución de digestión y el tiempo de digestión de los tejidos.

La efectividad de todos los ensayos se determinó por el rendimiento (10^6 células/g) y el porcentaje de viabilidad por tinción con azul tripán en una dilución 1:10.

Los medios utilizados finalmente para el aislamiento y cultivo de cada población celular fueron específicos; se utilizó medio AmnioMax suplementado (Gibco-BRL, Bethesda, E.U.A.) para las células del epitelio amniótico y DMEM suplementado con 15% de suero fetal bovino, 1% piruvato de sodio y 1% antibiótico antimicótico, para los trofoblastos obtenidos del corion.

El método finalmente se estandarizó como de la siguiente manera: en la campana de flujo laminar, las membranas se lavaron con solución salina estéril hasta eliminar la mayor cantidad de sangre, el corion se limpió con gasas estériles secas para retirar la capa gruesa de la decidua. Posteriormente se separó el amnios del corion manualmente, ambos tejidos se lavaron por última vez en solución salina y se cortaron en trozos pequeños, finalmente se colocaron en el medio de digestión de acuerdo al tipo celular AmnioMax o DMEM, preparado con 2 mg/ml de colagenasa tipo IV (Sigma, St Louis, E.U.A.) y 1mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) por cada gramo de tejido. El tejido se incubó a 37° C durante una 1 ½ h aplicando fuerza física por pipeteo cada 30 min.

Después del tiempo de digestión la suspensión obtenida se filtró en una malla de gasa para eliminar el tejido no digerido. Posteriormente la suspensión se paso a través de filtros MACs de 30µm para obtener una suspensión celular pura. Esta suspensión se centrifugó a 1439 xg durante 3 minutos y el pellet celular se lavó con PBS 1X con 0.5% BSA y de nuevo se centrifugó a 1439 xg durante 3 min, el pellet se resuspendió en 2ml de medio de cultivo correspondiente a la población celular.

La suspensión celular se pasó por un gradiente de percoll (Sigma, St Louis, E.U.A.) con fases de 5, 20, 40 y 60 % y se centrifugó durante 20 minutos a 1279 xg, recuperando al término las células suspendidas entre las fases de 20 y 40%, las cuales se suspendieron en el medio de cultivo correspondiente a cada población para lavarlas y eliminar el percoll. En las células obtenidas se realizó un conteo y se determinó la viabilidad por tinción con azul tripán en una dilución 1:10 (Fig.5).

El origen y pureza de las células aisladas se determinó se caracterizó por su morfología en el cultivo. Las células del epitelio amniótico presentan una forma cúbica, mientras que los trofoblastos se observan hexagonales y algunos autores describen que en cultivo estos interaccionan entre si formando estructuras similares a sincicios (Kliman 1986).

Para los experimentos de expresión de TLR-2 y TLR-4 se utilizaron las células aisladas de aquellos ensayos en que se obtuvo una viabilidad igual o mayor al 95%. Las células se sembraron en cajas de 6 pozos con aproximadamente 1.2×10^6 células en 2ml de medio correspondiente al tipo celular.

Los cultivos celulares se emplearon para diferentes pruebas variando el tiempo en que se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO₂, para la determinación de IL-1β, TNF-α, HBD-1, -2 y -3, por lo cual los medios se recuperaron y se mantuvieron a -70°C hasta su posterior uso. La concentración de proteínas en todas las muestras fue determinada con el método de Bradford (1976).

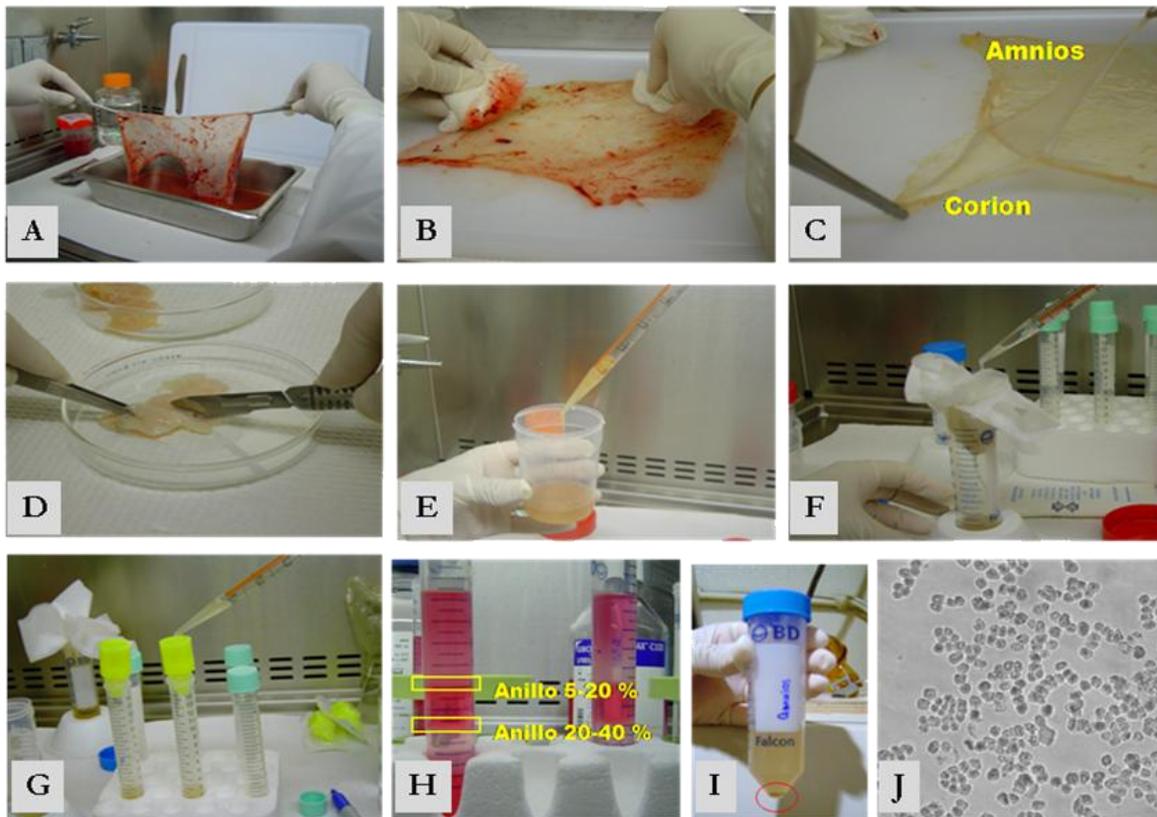


Fig. 5. Proceso de aislamiento celular. A) Las membranas se lavaron con solución salina. B) Se retiró de la decidua materna con gasas secas estériles. C) Se separaron manualmente las capas adosadas: amnios y corion. D) Cada tejido se cortó en trozos pequeños. E) Cada tejido se colocó en solución de digestión con colágenasa IV por 1h a 37°C. E) Para ayudar a la digestión del tejido se aplicó fuerza por pipeteo. F) Para eliminar el tejido no digerido se filtró la solución con una malla de gasa y G) posteriormente con filtros MACs de 30 μm . H) La solución final se hizo pasar por un gradiente de percoll donde se observaron 2 anillos celulares, el anillo menos denso se observó entre las fases de 5 y 20% conteniendo células muertas y detritus, mientras que en el anillo más denso formado entre las fases de 20 y 40% se encontraron las células de interés. I) El anillo de interés se tomó con cuidado por pipeteo, se lavó para eliminar el percoll y obtener el botón celular. Las células se suspendieron en Medio DMEM ó AmnioMax de acuerdo al tipo celular para su cultivo. (J) Se muestran células del epitelio amniótico suspendidas en medio AmnioMax observadas en microscopio invertido con el objetivo 40X.

5.3.3. Viabilidad del cultivo celular

Para determinar la viabilidad celular en cultivo se utilizó el kit de viabilidad celular XTT (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany) que consiste en una prueba colorimétrica, basada en la oxidación de la sal amarilla de tetrazolio XTT (sodio3-1[fenilaminacarbonil] 3,4 tetrazolium]-bis (4-metoxi-6-nitro) benceno hidrato ácido sulfónico) a una sal de formazán de color naranja, mediante una reacción catalizada por una deshidrogenada mitocondrial, esta conversión solo puede ser hecha por células activas metabólicamente.

Para el ensayo se cultivaron las células en cajas de 24 pozos, colocando la misma cantidad de células en cada pozo (2.4×10^6). Se agregaron 50 μ l de la mezcla de reactivo XTT (acoplador de electrones – sal XTT en proporción 1:50) al medio de cultivo por un periodo de 30 minutos en el cual se observó la reacción y tras los cuales se recuperó el medio y se centrifugó a 360 xg durante 1 minuto para eliminar células desprendidas. El cambio de color se cuantificó mediante espectrofotometría a 450nm, en intervalos de 0, 12, 24, 36 y 48 horas de cultivo.

5.3.4. Determinación de IL-1 β y TNF α

Las concentraciones de IL-1 β y TNF α se cuantificaron mediante inmunoanálisis de ELISA tipo sándwich, en microplacas de 96 pozos (Nunc Maxisorp, Dinamarca), siguiendo los métodos del fabricante (Kit Duo Set ELISA, R&D Systems). Cada pozo fue cubierto con 100 μ l de anticuerpo de captura a una concentración de 4 μ g/ml. La placa se incubó toda la noche a temperatura ambiente; la fracción no unida se removió mediante lavados con PBS- Tween 0.05%; posteriormente se bloqueó con 300 μ l por pozo de agente diluyente por 1 hora a temperatura ambiente.

Después se lavaron las placas con PBS-Tween 0.05%, se hizo una curva estándar con IL-1 β recombinante humana cuya sensibilidad fue de 4 pg/ml en un intervalo de 4 a 256 pg/ml. La curva estándar de TNF α recombinante humana, tuvo una sensibilidad de 3.91 pg/ml en un rango de 15 a 960 pg/ml.

Un volumen de 100 µl de cada estándar o muestra se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las placas con PBS-Tween 0.05%, para agregar 100 µl de anticuerpo de detección a una concentración de 300 ng/ml incubándolo por 3 horas a temperatura ambiente. Después de lavar nuevamente las placas se agregaron 100 µl de conjugado estreptavidina-HRP durante 20 minutos, tras los cuales se lavaron las placas por última vez con PBS-Tween 0.05% y se agregaron 100 µl del substrato por 20 minutos protegiéndolo de la luz, la reacción se detuvo agregando 50 µl de solución 2N H₂SO₄, tras lo cual las placas se leyeron a 450 nm en un lector de microplacas (Dynatech MR500).

5.3.5. Determinación de TLR -2 y -4 en la membrana celular

Las células aisladas mediante la Colagenasa IV se colectaron en tubos de 5 ml de fondo cónico y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos, el pellet celular se lavó con PBS-EDTA (PBS 1x, 2% EDTA y 0.5% BSA) y se centrifugó nuevamente a 2500 rpm durante 5 minutos.

Las células se marcaron con anticuerpos monoclonales conjugados con FITC y PE para TLR-4 y TLR-2 en una dilución 1:20 en PBS-EDTA y se incubaron durante 1 hora a 4°C protegidas de la luz, a los controles de autofluorescencia no se les agregó ningún anticuerpo. Terminado el tiempo de incubación las muestras se lavaron con PBS-EDTA y se fijaron con 100 µl de una solución de paraformaldehído al 4% (Kit IntraPrep, Beckman Coulter, Brea, E.U.A.) durante 15 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz, posteriormente se lavaron las muestras con PBS-EDTA, finalmente las células se suspendieron en 1ml de PBS-EDTA y se guardaron a 4°C protegidas de la luz para su lectura en el citómetro de flujo (Beckman Coulter, Brea, E.U.A.).

5.3.6. Análisis Inmunohistoquímico para TLR-2 y TLR-4

Para el análisis del patrón de expresión de TLR-2 y TLR-4 en el tejido, se utilizaron los anticuerpos monoclonales TLR-4 y TLR-2 y el kit de detección Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, E.U.A.).

Los cortes de las MC fijados en paraformaldehído al 4% y embebidos en parafina, se desparafinaron en xilol y se hidrataron con lavados de 5 minutos de xilo-etanol absoluto (1:1) y grados decrecientes de etanol: 100, 96, 70, 50 y 30% y finalmente con agua bidestilada.

La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con una incubación de 20 minutos con H₂O₂ al 0.3%, terminado este tiempo de incubación se lavaron las muestras con PBS. El bloqueo con suero se aplicó durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y posteriormente las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario a una concentración de 10 µg/ml. Para el control negativo se utilizó PBS-BSA 1% en lugar del anticuerpo.

Las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado por 30 minutos, se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) por 30 minutos, las muestras nuevamente se lavaron en PBS, y finalmente se revelaron las proteínas inmunoreactivas con la adición de 3-3' diaminobenzidina (DAB, Sigma, St Louis, E.U.A.) por 10 minutos. La reacción se paró con un lavado en agua destilada de 5 minutos y posteriormente un lavado en PBS de 5 minutos. Se hizo una contra tinción del núcleo celular con hematoxilina durante 1 minuto, el exceso de hematoxilina se lavó con agua corriente y finalmente los cortes se deshidrataron con lavados de etanol en grados crecientes a partir de 70, 96 y 100%, etanol absoluto-xilol (1:1) y finalmente xilol, se montaron en húmedo con medio no acuoso (Entellan, Hatfield, E.U.A.) y se analizaron por microscopía de luz.

5.3.7. Determinación de HBD-1, HBD-2 y HBD-3.

Los niveles de secreción de las HBDs se cuantificaron mediante ELISA siguiendo el método del fabricante (Kit anti- HBD, PrepoTech) en placas de 96 pozos (Nunc Maxisorp, Dinamarca). Las placas fueron cubiertas con 100 µl del anticuerpo de captura a una concentración de 0.5 µg/ml para HBD-1 y -3 y de 0.25 µg/ml para HBD-2 incubando toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se lavaron con PBS-Tween para remover las fracciones no adheridas y se bloquearon con 300 µl de PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron con PBS-Tween 0.05% y se realizaron las curvas estándar usando anticuerpos recombinantes. La curva estándar de anti-HBD-1 recombinante tuvo una sensibilidad de 0.2 pg/ml en un intervalo de 4 a 1000 pg/ml, para anti-HBD-2 recombinante la sensibilidad fue de 0.002 pg/ml en un intervalo de 8.0 a 1000 pg /ml y anti-HBD-3 recombinante tuvo una sensibilidad de 0.03pg/ml en un intervalo de 4.0 a 1000 pg/ml.

Se agregaron 100 µl de cada estándar o muestra en los pozos y se incubó la placa durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las placas para agregar 100 µl de anticuerpo de detección a una concentración de 0.5 µg/ml incubándolo por 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las placas se agregaron 100 µl de conjugado avidina-HRP durante 30 minutos, tras los cuales se lavaron las placas y se agregaron 100 µl del sustrato ABTS por aproximadamente 45 minutos protegiéndolo de la luz, una vez observado el cambio de color, las placas se leyeron a 405 nm en un lector de microplacas (Dynatech MR500).

5.3.8. Análisis estadístico

La comparación entre los diferentes grupos se hizo mediante una prueba no paramétrica de ANOVA de Kruskal-Wallis en las que una $P \leq 0.05$ se consideró significativa. La expresión gráfica y tabular de los resultados muestra los promedios y su desviación estándar.

VI. RESULTADOS

6.1. VALIDACIÓN DEL MODELO

6.1.1. Estandarización del aislamiento celular

Para obtener el mayor número de células posibles y cultivos puros de las principales poblaciones celulares a partir de MC se hicieron ensayos de digestión de la MEC con tres diferentes enzimas (Tabla 3). De estos ensayos se determinó utilizar la colagenasa tipo IV por la alta viabilidad que se obtuvo y por las características de esta enzima de degradar el principal componente de las MC colágena tipo IV. Las células aisladas se caracterizaron por la morfología que presentaron en el cultivo (Figura 6).

TRATAMIENTO	RENDIMIENTO 10 ⁶ células /g	% VIABILIDAD
a) colagenasa tipo I		
1mg/g de tejido X 3 h	0.92	52
b) colagenasa tipo II		
1mg/g de tejido X 3 h	0.7	34
c) colagenasa tipo IV		
1mg/g de tejido X 3 h	0.61	54
1mg/g de tejido X 2 h	0.69	68
1mg/g de tejido X 1 h	0.64	84
2mg/g de tejido X 1 h DMEM con 10% SFB	3.9	84
2mg/g de tejido X 1 h DMEM con 15% SFB *	5.1	93
2mg/g de tejido X 1 h AmnioMax ϕ	4.6	92

Tabla 3. Variaciones en el método de digestión enzimática de la MEC para la obtención de células a partir de MC. Se indican el medio y la enzima con los cuales se estandarizó el método para la obtención de los trofoblastos (*) y células del amnios (ϕ) que se utilizaron en los posteriores experimentos.

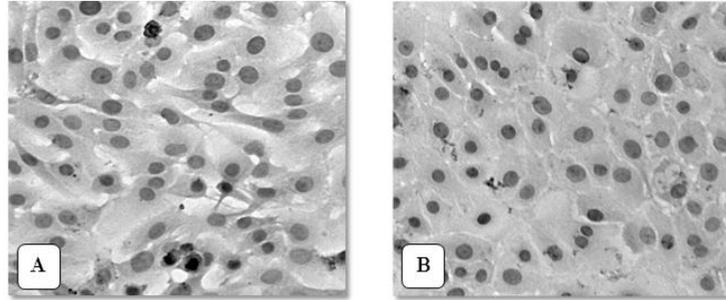


Figura 6. Cultivos de 48h de células obtenidas con colagenasa tipo IV a partir de MC a término. El origen y pureza de las células se caracterizó por morfología. A: se observan las células aisladas del epitelio amniótico con una forma cúbica. B: se observan los trofoblastos aislados con una morfología hexagonal.

6.1.2. Viabilidad celular

Con el objetivo de garantizar la viabilidad de las células aisladas de las membranas corioamnióticas se hicieron pruebas de la actividad metabólica mitocondrial a las células del amnios y del corion mantenidas en cultivo durante 48 horas. Esta prueba permitió demostrar que después de ser aisladas, la actividad metabólica de las células amnióticas en cultivo disminuyó a las 24 horas, este cambio fue atribuido a las condiciones del cultivo, ya que si bien la viabilidad disminuyó las células que permanecieron en cultivo se mantuvieron viables y metabólicamente activas hasta las 48 horas. Por otro lado las células del corion mantienen sus niveles de actividad metabólica estables durante las 48h después de ser aisladas (Figura 7).

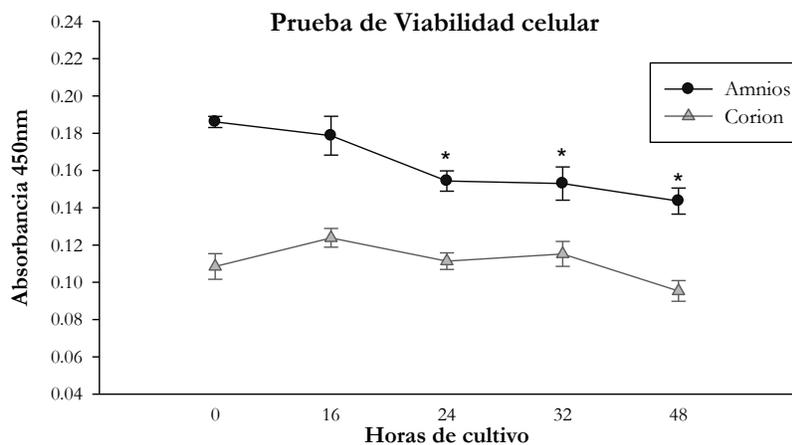


Figura 7. Prueba de viabilidad en células aisladas de MC controles sin trabajo de parto, utilizadas para la validación del modelo (MC n=3, cada ensayo fue hecho por triplicado), se indica las diferencias significativas de cada población respecto al tiempo 0 (*P<0.01).

6.1.3. Funcionalidad celular

Con la finalidad de asegurar que las células aisladas mantienen *in vitro* su capacidad para secretar moduladores pro-inflamatorios como IL-1 β y TNF α como prueba de su funcionalidad, se procedió a caracterizar el perfil de secreción de estas dos citocinas.

6.1.3.1. Perfil de secreción de IL-1 β

El perfil de secreción de IL-1 β en el amnios muestra una tendencia a incrementar de manera dependiente del tiempo; sin embargo, este incremento no fue significativo con respecto al tiempo cero (P=0.215), retornando al nivel basal a las 48 horas.

Los niveles de secreción del corion fueron significativamente (P \leq 0.01) superiores a la del amnios. La secreción de IL-1 β no mostró cambios significativos, manteniéndose en niveles estables durante las 48 h de cultivo (Figura 8).

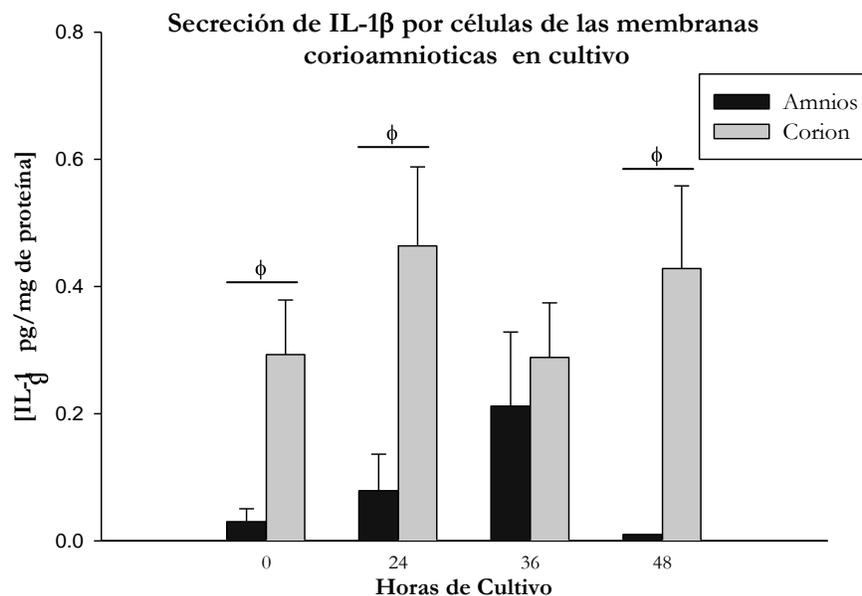


Figura 8. Concentración de IL-1 β en el medio de cultivo de amnios y de corion de MC controles sin trabajo de parto, utilizadas para la validación del modelo (MC n=3, cada ensayo fue hecho por triplicado). Se indican las diferencias significativas de cada población respecto al tiempo 0 * y entre grupos ϕ .(P<0.01)

6.1.3.2. Perfil de secreción de TNF- α .

El perfil de secreción de TNF- α en el amnios muestra que la producción de esta citocina es prácticamente indetectable en el tiempo cero, es después de 24 horas en cultivo que la concentración en el medio muestra un incremento significativo ($P \leq 0.01$); sin embargo, esta tendencia se revierte de una manera dependiente del tiempo hasta que a las 48 horas se retorna a los niveles basales.

En el corion el perfil de secreción de TNF- α incrementa significativamente ($P \leq 0.01$) durante las 24 horas, para posteriormente retornar a un valor cercano al basal entre las 36 y 48 horas. Los niveles de secreción del corion fueron significativamente ($P \leq 0.01$) superiores a la del amnios. (Figura 9).

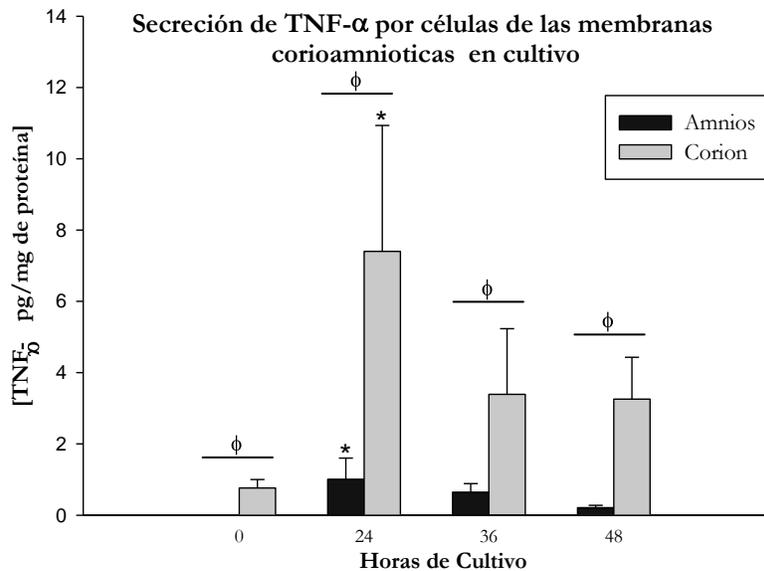


Figura 9. Concentración de TNF α en el medio de cultivo de amnios y de corion de MC controles sin trabajo de parto, utilizadas para la validación del modelo (MC n=3, cada ensayo fue hecho por triplicado). Se indican las diferencias significativas de cada población respecto al tiempo 0 * y entre grupos ϕ ($P < 0.01$).

6.2. EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE INMUNIDAD INNATA TLR-2 Y TLR -4.

6.2.1. Análisis por citometría de flujo

La expresión de los resultados en esta sección se hizo mediante porcentajes de células positivas para TLR-2 y/o TLR -4 (Figura 10). Comparado con las condiciones control, la población de células amnióticas aisladas de membranas con trabajo de parto presentan un porcentaje significativamente mayor ($p \leq 0.05$) de células positivas para TLR-2. Sin embargo, las células del corion permanecen sin cambio después del trabajo de parto ($p = 0.1$).

Por otro lado el patrón de expresión de TLR-4 en las células del epitelio amniótico después del trabajo de parto también mostró un incremento significativo ($p \leq 0.05$) mientras que en las del corion no hubo diferencia ($p = 0.3$) en relación al trabajo de parto (Tabla 4).

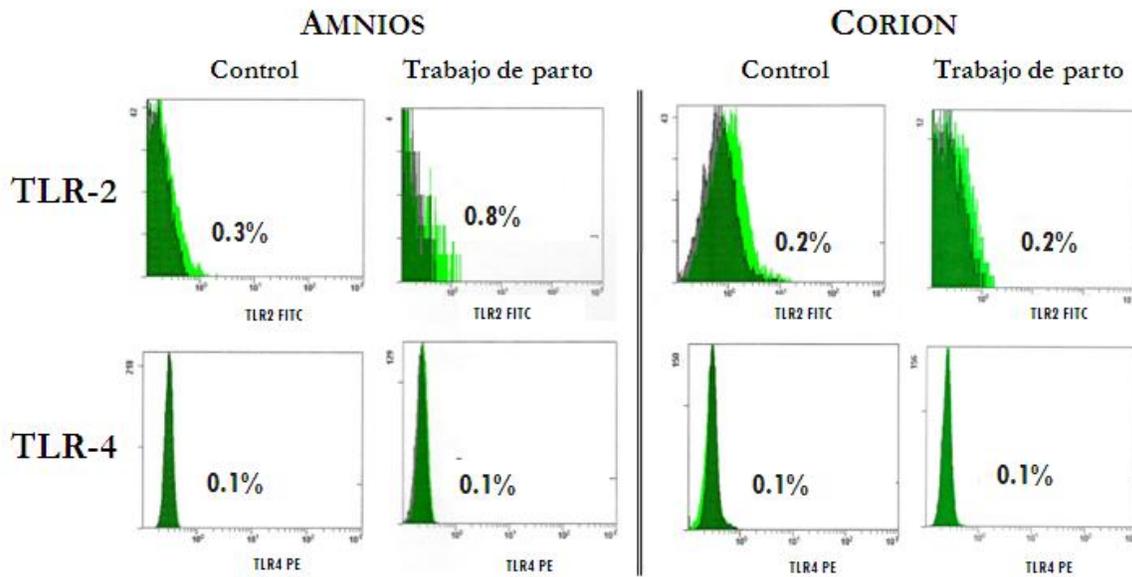


Figura 10. Diagramas representativos del análisis de citometría de flujo de las células aisladas de las MC con y sin trabajo de parto; el área gris representa la señal de autofluorescencia, el área verde representan la señal positiva de la población.

	AMNIOS		CORION	
	Control sin Trabajo de Parto	Trabajo de Parto	Control sin Trabajo de Parto	Trabajo de parto
TLR-2	0.37 ± 0.14	0.82 ± 0.31*	0.16 ± 0.10	0.13 ± 0.21
TLR-4	0.10 ± 0.01	0.22 ± 0.06*	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.01

Tabla 4. Se representan los valores promedios del porcentaje de la señal positiva para TLR-2 y TLR-4 de células aisladas del amnios con (n=7) y sin trabajo de parto (n= 3) y del corion de MC con (n=4) y sin trabajo de parto (n= 3, *P≤0.05).

6.2.2. Inmunolocalización tisular de TLR-2 y TLR-4.

El análisis por inmunohistoquímica muestra que el patrón de inmunoreactividad de TLR-2 y TLR-4 es claramente diferente antes y después del trabajo de parto.

En las membranas control sin trabajo de parto, no se detectó inmunoreactividad para los receptores TLR-2 y TLR-4.

En las membranas con trabajo de parto, el epitelio amniótico mostró una fuerte inmunoreactividad para TLR-2 y TLR-4 tanto en el citoplasma como en la membrana celular. Los trofoblastos del corion mostraron un patrón desigual de inmunoreactividad, TLR-2 se localizo distribuido en el citoplasma, mientras que la señal de TLR-4 se localizó principalmente en la membrana (Figura 10 y 11).

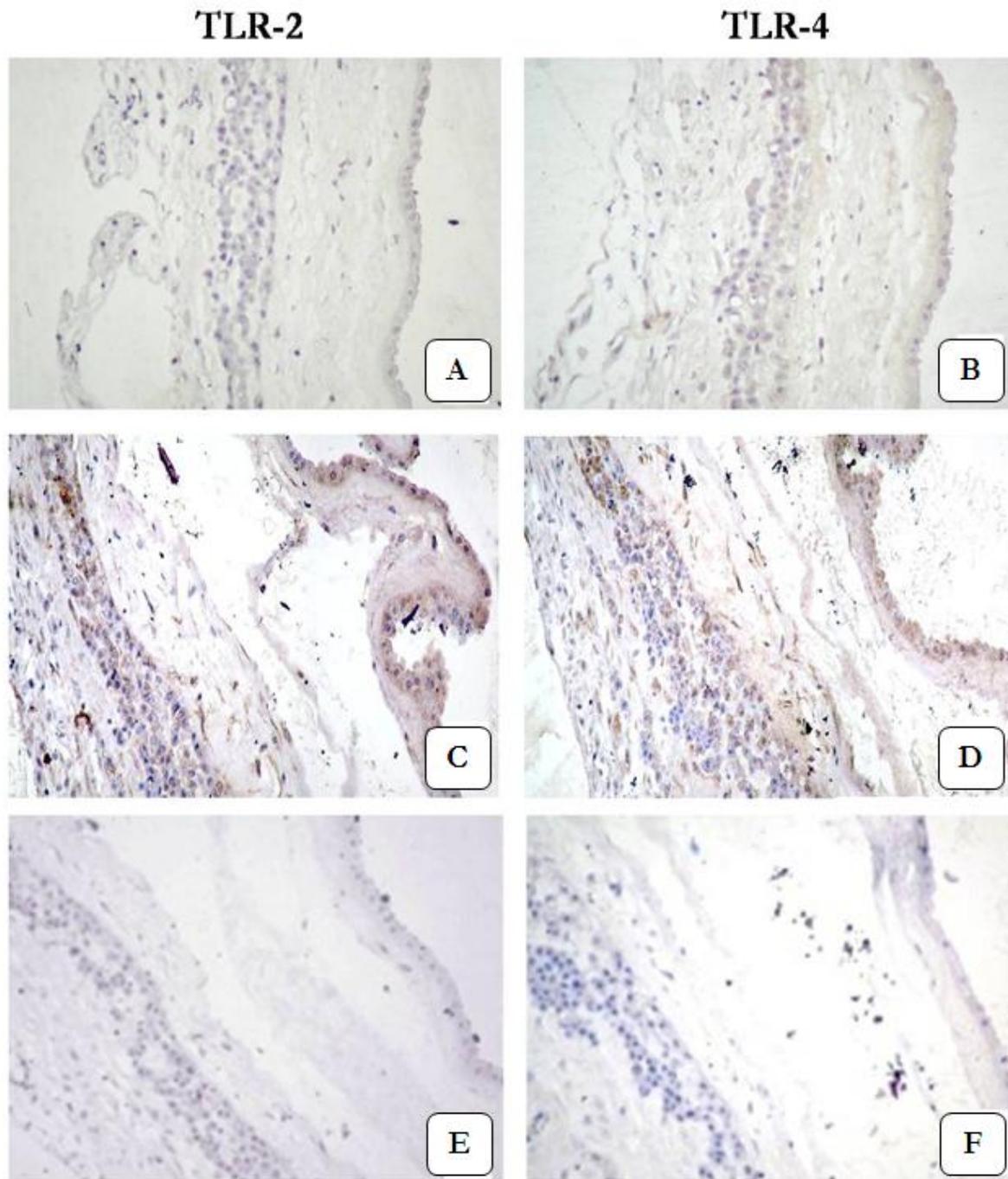


Figura 10. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica en cortes semifinos ($1\mu\text{m}$) de MC. No se detectó inmunoreactividad para TLR-2 y TLR-4 en las MC sin trabajo de parto (grupo control) $n=3$ (A y B). En MC con trabajo de parto la inmunoreactividad para TLR-2 y TLR-4 se detectó tanto en células del epitelio amniótico, como en los trofoblastos del corion $n=4$ (C y D). Se muestran los controles negativos a los que no se les puso anticuerpo primario (E y F). El aumento original de las imágenes es de 20x.

TLR-2

TLR-4

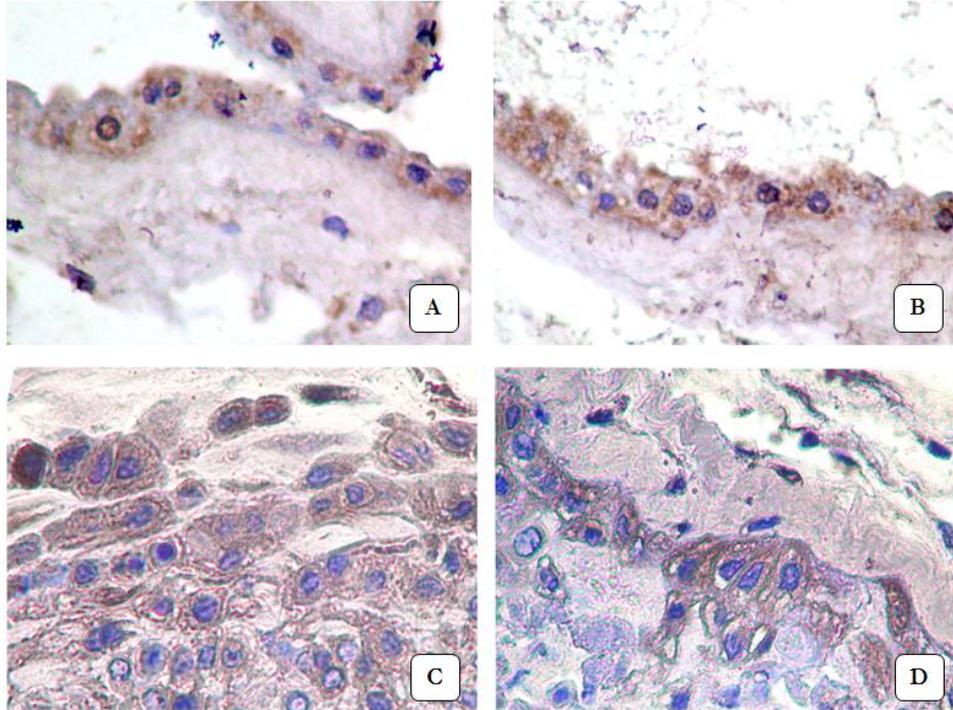


Figura 11. Inmunoreactividad en las células del epitelio amniótico de TLR-2 (A) y TLR-4 (B) en el citoplasma y membrana celular. En los trofoblastos muestran la señal de TLR-2 en el citoplasma (C) y de TLR-4 en la membrana celular (D). El aumento original de todas las imágenes es 40x.

6.3. SECRECIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

La concentración de HBD-1 en el medio de los cultivos celulares de amnios y corion no muestra diferencia entre el grupo de trabajo de parto y el grupo control sin trabajo de parto, demostrando que su expresión es constitutiva.

Mientras que las concentraciones de HBD-2 y -3 secretadas por células aisladas de MC con trabajo de parto, mostraron un incremento significativo ($p \leq 0.05$) a las 24 horas de cultivo, comparadas las concentraciones secretadas por células aisladas de MC sin trabajo de parto..

Particularmente las células del epitelio amniótico secretaron 10 veces más HBD-2 y 20 veces más HBD-3, en tanto los trofoblastos del corion secretaron 20 veces más HBD-2 y hasta 40 veces más HBD-3 a las 24 horas de cultivo (Tabla 5).

	AMNIOS		CORION	
	Control sin Trabajo de Parto	Trabajo de Parto	Control sin Trabajo de Parto	Trabajo de Parto
HBD-1	0.378 \pm 0.032	0.316 \pm 0.035	0.348 \pm 0.030	0.411 \pm 0.06
HBD-2	0.002 \pm 0.006	0.017 \pm 0.005*	0.001 \pm 0.008	0.024 \pm 0.002*
HBD-3	0.038 \pm 0.006	0.648 \pm 0.071*	0.022 \pm 0.006	0.811 \pm 0.251*

Tabla 5. HBD-1, -2 y -3 pg/mg de proteína total a las 24 h en el medio de cultivo de células aisladas de MC (n=3, tomando tres replicas para cada ensayo) se indican las diferencias significativas entre el grupo de trabajo de parto y el grupo control sin trabajo de parto (* $P \leq 0.05$)

VII. DISCUSIÓN

El curso exitoso del embarazo desde la implantación hasta el inicio del trabajo de parto es el resultado de distintas estrategias inmunológicas que convergen en la unidad feto-placentaria permitiendo que el feto crezca y se desarrolle en un ambiente inmunológicamente privilegiado.

Parte clave de estas estrategias consiste en el re-direccionamiento de las células del sistema inmune materno hacia un perfil donde sus propiedades citotóxicas son inhibidas y la tolerancia hacia los antígenos fetales es promovida (Hunt, 2006).

Estos mecanismos de tolerancia hacia el feto no comprometen la capacidad del sistema inmune materno ni de los tejidos embrionarios y extraembrionarios para responder rápida y eficientemente ante cualquier reto inmunológico o infeccioso que represente un peligro. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa de los diferentes tejidos de la interfase materno-fetal y su regulación es clave para poder coordinar cualquier tipo de respuesta inmunológica.

Los receptores tipo Toll (TLR's) y los patrones anti-microbianos naturales son elementos clave de la inmunidad innata, y existen evidencias experimentales que demuestran que su síntesis, activación y secreción juegan un papel estratégico en los distintos tejidos del tracto reproductor femenino antes y durante el embarazo (Aflatoonian y cols., 2007; Fleming y cols., 2003)

En los tejidos extra-embryonarios como la placenta y las membranas corioamnióticas, su síntesis y secreción basal ha sido atribuida a la capacidad innata de estos tejidos para defender y de ser necesario contener posibles procesos infecciosos durante el embarazo (Kumazaki y cols., 2004; King y cols., 2007).

La activación de estos receptores representa un eslabón clave en la modulación de señales pro-inflamatorias que encienden y mantienen la progresión del trabajo de parto (Krediet y cols., 2007), evento eminentemente pro-inflamatorio en el que se regulan positivamente distintos factores efectoros como MMP's y PG's a partir de la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF α , IL-6 e IL-8 (Peltier, 2003).

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar el patrón de expresión de los receptores TLR-2 y TLR-4, así como los perfiles de secreción de las HBD -1, HBD-2 y HBD-3 en células del epitelio amniótico y trofoblastos del corion aislados a partir de MC humanas a término con y sin trabajo de parto.

La obtención de células epiteliales del amnios y de trofoblastos del corion, requirió la estandarización y validación de un protocolo que permitiera separar y purificar a estas dos poblaciones partiendo de una misma membrana. Las características morfológicas que presentaron las poblaciones, nos permitieron asegurar que el método de separación manual del amnios y el corion, así como el uso de un gradiente de percoll para separar los diversos tipos celulares presentes en las capas histológicas de ambos tejidos, resultó eficiente en la obtención de las células de nuestro interés.

Después del proceso de aislamiento las dos poblaciones fueron sometidas a pruebas de viabilidad celular y funcionalidad *in vitro*. Estas pruebas permitieron determinar que los experimentos para la caracterización de los perfiles de síntesis/secreción de TLR's y β -defensinas tendrían que hacerse dentro de las primeras 24 horas inmediatamente después del proceso de purificación, lo que nos permitió garantizar el uso de células viables y funcionales.

Los datos obtenidos por medio de la citometría de flujo mostraron que en comparación con la misma población celular proveniente de MC de cesárea sin trabajo de parto, las células del epitelio amniótico aisladas de MC con trabajo de parto activo incrementan en forma significativa los niveles de expresión de TLR-2 y TLR-4. Por otro lado el patrón de expresión de estos receptores no cambió significativamente en la población de trofoblastos del corion de MC con trabajo de parto activo.

Una de las razones por las que se obtuvieron valores tan bajos de la señal positiva en el análisis por citometría de flujo, pudo deberse a que el proceso de digestión enzimática utilizado para el aislamiento de las células, alteró la integridad de los receptores presentes en la membrana celular, o bien que la disociación celular dirigiera una internalización de los receptores por esta razón fue que decidimos analizar el patrón de inmunoreactividad de estos receptores mediante inmunohistoquímica, utilizando cortes histológicos de las mismas membranas.

Los resultados mostraron que ni el epitelio amniótico, ni el epitelio coriónico de las membranas control fue posible detectar inmunoreactividad positiva para TLR-2 y TLR-4; sin embargo, las membranas con trabajo de parto mostraron en el epitelio amniótico fuerte inmunoreactividad para ambos receptores, tanto en membrana celular como en el citoplasma. Los trofoblastos del corion mostraron un patrón de inmunoreactividad diferencial ya que formas inmunoreactivas de TLR-2 estuvieron más claramente distribuidas en el citoplasma, mientras que la señal de TLR-4 estuvo distribuida principalmente en la membrana celular.

La señal de TLR-2 en el citoplasma puede considerarse como una señal de que este receptor ha sido activado, en las células epiteliales del intestino se ha visto que el TLR-4 al activarse por el reconocimiento de su agonista se transloca hacia el citoplasma, aunque se desconoce el mecanismo de internalización (Hornef y cols. 2002).

Estos resultados coinciden con parte de lo publicado por Kim y cols. (2004), quienes han asociado el incremento en la expresión de RNAm y de inmunoreactividad de TLR-2 y TLR-4 en el epitelio amniótico de membranas en el trabajo de parto y el parto pretérmino.

Una característica de los epitelios es que sus células presentan una polarización basal-apical, ya que separan compartimentos de diferente composición química; en este sentido Kim y cols. (2004) observaron que en el epitelio amniótico, la señal de TLR-2 en membranas con parto pretérmino se localizó en la región basal, pero en aquellas que además de parto pretérmino desarrollaron una infección la señal se localizó en el citoplasma, es decir estas células mostraron una distribución diferente de la señal para TLR-2 en función al desarrollo de una corioamnioitis.

Por otro lado Adams y cols. (2006) describieron una respuesta muy similar del amnios vía TLR-4 en un modelo de estimulación *ex vivo* con LPS, en el que se observó la traslocación de este receptor desde la región apical del epitelio amniótico a través del citoplasma, hacia la región basal que esta en contacto con la corodecidua.

Estos datos nos permiten concluir que durante el trabajo de parto, si bien los trofoblastos del corion expresan TLR-2 y TLR-4, son las células del epitelio amniótico las que probablemente regulan algunas de las vías de señalización provenientes de la cavidad amniótica y por lo tanto del feto, ya que además de expresar ambos receptores, otros autores han demostrado que estos tienen la capacidad de reorientar espacialmente esta expresión. Sin embargo el hecho de que los trofoblastos del corion no presenten esta capacidad de polarización no descarta su participación en la modulación de una respuesta inmunológica.

Existen evidencias de que comparado con la región coriodecidual, el amnios tiene una capacidad limitada en la secreción de factores pro-inflamatorios; sin embargo, tiene la capacidad de transducir señales capaces de promover y coordinar la síntesis de factores pro-inflamatorios por parte de otras poblaciones celulares de la misma membrana (Zaga y cols., 2004).

Durante el trabajo de parto el amnios es la región de las membranas corioamnióticas que presenta una mayor permeabilidad y una mayor producción de PGE₂ ya que aquí hay poca actividad de la 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH), enzima que cataliza el primer paso en la inactivación de las PGs (Nakla y cols., 1986). Se ha visto que la expresión de un TLR-4 funcional es necesaria y actúa no en la síntesis de PGs, sino regulando una menor degradación de las mismas al disminuir los niveles de la 15-PGDH durante el parto pretérmino por el reconocimiento de patógenos involucrados en la corioamnioitis (Wang y Hirsch, 2003).

Algunos otros estudios han revelado la presencia de polimorfismos de TLR-2 y TLR-4 que han sido asociados con periodos de gestación mas cortos y el riesgo a desarrollar parto pretérmino, así como una susceptibilidad a desarrollar una infección por bacterias (Lorenz y cols., 2002; Krediet y cols., 2007). Adicionalmente, existe evidencia de que TLR-4 puede reconocer moléculas endógenas del hospedero como fibronectinas, colágeno y proteínas de choque térmico, lo cual sugiere que este puede reconocer señales de riesgo que no necesariamente están relacionadas con procesos de infección y si con procesos de daño celular, iniciando la respuesta de procesos de inflamación en tejidos estériles (Kaczorowski y cols., 2008).

La capacidad de las distintas poblaciones celulares de las membranas corioamnióticas para responder a distintos estímulos vía estos receptores ha sido previamente estudiada y se ha demostrado que tanto TLR- 2 (Abrahams y cols., 2005) y mas recientemente TLR-4 (Equils y cols., 2006) están involucrados en las vías de señalización que inducen apoptosis, proceso que contribuye al debilitamiento de las membranas corioamnióticas durante el trabajo de parto normal y bajo condiciones patológicas (Arechavaleta y cols., 2002).

Los receptores tipo Toll, son clave en la inducción de la secreción de moduladores pro-inflamatorios tales como IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF α , que son secretados tanto por tejidos maternos como fetales que regulan la expresión de otros mediadores que favorecen el trabajo de parto, entre los que se encuentra la ciclo-oxigenasa -2 (COX-2) que modula la síntesis de PG's y la secreción de diferentes MMPs.

Otro elemento clave que puede contribuir e incrementaren los niveles de moduladores pro-inflamatorios en la unidad feto-placentaria durante el trabajo de parto son las moléculas con capacidades antimicrobianas, entre ellas las HBDs. Existen evidencias de que estos péptidos son secretados principalmente por células epiteliales, además de que atraen y activan células inflamatorias tales como neutrofilos, células B y macrófagos; las cuales, una vez activadas secretan más moduladores proinflamatorios que regulan positivamente a los péptidos antimicrobianos (Bals, 2000).

La participación de estos péptidos antimicrobianos en la interfase-materno fetal es un campo que comienza a investigarse. King y cols., (2007) han reportado que la inmunoreactividad de las HBD-1, -2 y -3 esta presente en las membranas corioamnióticas al final de la gestación sin diferencias asociadas al inicio de trabajo de parto normal. Sin embargo la expresión de RNAm y la secreción *in vitro* de HBD-2 y -3 por los trofoblastos del corion (King y cols., 2007) las células del epitelio amniótico (Stock y cols., 2007) incrementa cuando son estimulados con IL-1 β y TNF- α .

La incongruencia de estos resultados con los nuestros puede deberse a que se utilizaron técnicas diferentes, siendo la ELISA una prueba cuantitativa y que fue la que nosotros

empleamos para observar las diferencias en la secreción de HBDs al medio de cultivo, mientras que King y cols., reportaron la expresión de HBDs a nivel de proteína en las células

Por otra parte Soto y cols. (2007) estudiaron la presencia de estos péptidos antimicrobianos específicamente en el ambiente fetal, analizando los niveles de secreción de la β -defensina-2 en muestras de líquido amniótico de pacientes con diferentes diagnósticos. Los datos observados en su estudio muestran que la secreción de β -defensina-2 esta presente en líquido amniótico desde el segundo trimestre de embarazo y no es incrementado con la edad gestacional. En relación a los diferentes diagnósticos, el incremento significativo se ve asociado a procesos de infección intramniótica, sin embargo hay una ligera tendencia a incrementarse en relación al trabajo de parto. Soto y cols. señalan que los niveles de β -defensina-2 pueden ser producto de la secreción no solo de las membranas corioamnióticas, sino de la piel y otros epitelios del feto en respuesta a la infección.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que en comparación con las condiciones control los niveles de secreción *in vitro* de la HBD-1 tanto en las células amnios como en los trofoblastos del corion, se mantienen sin cambios significativos después del trabajo de parto. El patrón constitutivo de esta defensina ha sido previamente demostrado en células trofoblásticas del corion tratadas con IL-1 β y TNF- α (King, et. al. 2007).

A diferencia de la HBD-1, los niveles de secreción *in vitro* de HBD-2 y HBD-3 fueron significativamente superiores en los cultivos de células amnióticas y trofoblastos aislados de membranas con trabajo de parto. Es interesante el hecho de que la secreción basal de ambas defensinas por las dos poblaciones celulares fue similar; sin embargo, después del trabajo de parto la secreción de HBD-3 se incrementó significativamente, además de que los trofoblastos fueron la población más activa en la secreción de esta defensina.

El incremento en la expresión de receptores TLR2 y TLR4 principalmente en la región amniótica y el incremento en la secreción de HBD-2 y HBD-3 tanto por las células del amnios como los trofoblastos del corion durante el trabajo de parto, le confiere a estos elementos de

la de la inmunidad innata un papel clave en la compleja red de señales que modula en forma autocrina y parácrina la secreción de factores pro-inflamatorios en la unidad feto-placentaria.

Evidencias preliminares en nuestro laboratorio señalan a la existencia de una respuesta diferencial de las distintas poblaciones celulares de las membranas corioamnióticas ante distintos estímulos inmunológicos e infecciosos (Zaga-Clavellina y cols., 2007). Bajo estas circunstancias las membranas corioamnióticas humanas se encuentran posicionadas estratégicamente no solo para mantener el privilegio inmunológico de la cavidad uterina, sino que una vez llegado el momento, pueden responder de forma coordinada a distintas señales de origen materno y fetal y comenzar a contribuir con la secreción de factores pro-inflamatorios que eventualmente activan otros moduladores efectores que favorecen la activación del miometrio, la contractibilidad uterina, dilatación cervical y finalmente la ruptura de las membranas corioamnióticas.

La coordinación de todos estos eventos son clave durante el inicio y progresión del trabajo de parto y su alteración en tiempo espacio puede resultar en una condición patológica que pone en riesgo la viabilidad del producto.

CONCLUSIONES:

- DURANTE EL TRABAJO DE PARTO EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES TLR-2 Y TLR-4 INCREMENTA TANTO EN LAS CÉLULAS AMNIOTICAS COMO EN LOS TROFOBLATOS DE LAS MEMBRANAS CORIOAMNIOTICAS HUMANAS.
- DURANTE EL TRABAJO DE PARTO LAS CÉLULAS DEL EPITELIO AMNIÓTICO MUESTRAN INMUNOREACTIVIDAD PARA TLR-2 Y TLR-4 EN LA MEMBRANA CELULAR Y EL CITOPLASMA.
- DURANTE EL TRABAJO DE PARTO LOS TROFOBLATOS MUESTRAN INMUNOREACTIVIDAD PARA TLR-2 EN EL CITOPLASMA Y TLR-4 EN MEMBRANA.
- LOS NIVELES SECRETADOS DE HBD-1 POR LAS CÉLULAS DEL EPITELIO AMNIÓTICO Y LOS TROFOBLASTOS DEL CORION NO MUESTRAN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS ASOCIADOS AL TRABAJO DE PARTO.
- DURANTE EL TRABAJO DE PARTO LAS CELULAS DEL EPITELIO AMNITICO Y LOS TROFOBLASTOS DEL CORION SECRETAN NIVELES SIGNIFICATIVAMENTE SUPERIORES DE HBD-2 Y HBD-3.
- LOS TROFOBLASTOS DEL CORION FUERON LA POBLACIÓN MÁS ACTIVA EN LA SECRECIÓN DE LA HBD-3 DESPUÉS DEL TRABAJO DE PARTO.

BIBLIOGRAFÍA

Abrahams VM, Visintin I, Aldo PB, Guller S, Romero R, Mor G. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. *Journal of Immunology*. 2005; 175:8096-8104.

Adams K, Lucas J, Kapur R, Stevens A. LPS induces translocation of TLR4 in amniotic epithelium. *Placenta*. 2007; 28(5-6):477-481.

Aflatoonian R, Tuckerman E, Elliot SL, Bruce C, Aflatoonian A, Li TC, Fazeli A. Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium. *Human Reproduction*. 2007; 22:586-593.

Allan DS, Mc Michael AJ, Braud VM. The ILT family of leukocyte receptors. *Immunobiology*. 2000; 202, 34–41

Allport VC, Pieber D, Slater DM, Newton R, White JO, Bennett PR. Human labor is associated with nuclear factor-kappaB activity which mediates cyclo-oxygenase-2 expression and is involved with the “functional progesterone withdrawal”. *Molecular Human Reproduction*. 2000; 7:581-586.

Arancibia S, Beltrán C, Aguirre M, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses. *Biological Research*. 2007; 40:97-112.

Arechavaleta VF, Mayon GMD, Gonzalez JM, Hernandez GC, Vadillo OF. Association of Type II Apoptosis and 92k-Da Type IV Collagenase Expression in Human Amniochorion in Prematurely Ruptured Membranes With Tumor Necrosis Factor Receptor-1 Expression. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2002; 9:60-67.

Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research*. 2000; 1:141-150.

Barrera D, Ávila E, Díaz L. Papel inmunológico de la progesterona en el mantenimiento del embarazo. *Revista de Investigación Clínica*. 2007; 59(2):139-145.

Bejiar EC, Mallard C, Powell TL. Expression and subcellular localization of TLR-4 in term and first trimester human placenta. *Placenta* 2006; 27:322-326.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72:248-254.

Bryant-Greenwood G, Millar L, Yamamoto S, Bogic L, Tashima L. Preterm birth: the premature rupture of the fetal membrane in the absence of infection. *Prenatal and*

Neonatal Medicine: the International Journal of Basic and Clinical Research and Practice. 1998a; 3:60-63.

Bryant-Greenwood G. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta*. 1998b; 19(1):1-11.

Bowen J, Chamley L, Mitchell M, Keelan J. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy women. *Placenta*. 2002; 23:239-256.

Bosu WTK, Johansson EDB, Gemzell C. Peripheral plasma levels of oestrogens, progesterone and 17alpha-hydroxyprogesterone during gestation in the rhesus monkey. *Acta Endocrinologica*. 1973; 74:348-360.

Brown D, Trowsdale J, Allen R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens*. 2004; 64:215–225.

Canavan TP, Simhan HN. Innate Immune function of the human decidual cell at the maternal-fetal interface. *Journal of Reproductive Immunology*. 2007; 74:46-55.

Chaouat, G, Cayol, V, Mairovitz V, Dubanchet, S. Localization of the Th2 cytokines IL-3, IL-4, IL-10 at the fetomaternal interface during human and murine pregnancy and lack of requirement for Fas/Fas ligand interaction for a successful allogeneic pregnancy. *American Journal of]Reproductive Immunology*. 1999; 42:1-3.

Elovitz MA, Wang Z, Chien EK, Rychlik DF, Phillippe M. A new model for inflammation-induced preterm birth the role of platelet-activating factor and toll-like receptor-4. *The American Journal of Pathology*. 2003; 163:2103-2111.

Elliott CL, Slater DM, Dennes W, Poston L, Bennett PR. Interleukin 8 expression in human myometrium: changes in relation to labor onset and with gestational age. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2000; 43:271-277.

Equils O, LuD, Gatter M, et.al. Chlamydia heat shock protein 60 induces trophoblast apoptosis through TLR4. *Journal of Immunology*. 2006; 177: 1257-1263.

Estrada GG, Zaga V, Gonzalez JMA, Beltrán MJ, Maida CR, Giono CS, Vadillo OF. Initial characterization of the microenvironment that regulates connective tissue degradation in amniochorion during normal human labor. *Matrix Biology*. 2005; 24:306-312.

Fazeli A, Bruce C, Anumba D. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. *Human Reproduction* 2005; 20:1372-8.

Fleming DC, King AE, Williams ARW, Critchley HOD, Kelly RW. Hormonal contraception can suppress natural antimicrobial gene transcription in human endometrium. *Fertility and Sterility*. 2003; 79: 856–863

Genc MR, Vardhana S, Delaney ML, Onderdonk A, Tuomala R, Norwitz E, Witkin SS. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology.* 2004; 116:152-156.

Goldman S, Weiss A, Almalah I, Shalev E. Progesterone receptor expression in human decidua and fetal membranes before and after contractions: possible mechanism for functional progesterone withdrawal. *Molecular Human Reproduction.* 2005; 11: 269-77.

Goepfert AR, Varner M, Ward K, Macpherson C, Klebanoff M, Goldenberg RL, Mercer B, Meis P, Iams J, Moawad A, Carey JC, Leveno K, Wapner R, Caritis SN, Miodovnik M, Sorokin Y, O'Sullivan MJ, Van Dorsten JP, Langer O. Differences in inflammatory cytokine and Toll-like receptor genes and bacterial vaginosis in pregnancy. *American Journal Obstetrics & Gynecology.* 2005; 193:1478-1485.

Hancock R, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends in Microbiology.* 2000; 8 (9):402-410.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 1988; 52:269-279.

Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, Harada M, Takemura Y, Koga K, Yoshino O, Tajima T, Hasegawa A, Yano T, Taketani Y. Expression of toll-like receptors 2, 3,4 and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle. *Journal of Reproductive Immunology.* 2007; 74:53-60.

Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, Sandstedt B, Bremme K, Ekström ES, Scheynius A. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology.* 2002; 107(1):145-151.

Hornef MW, Frisan T, Vanderwalle A, Normark S, Richter- Dahlfors A. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *The Journal of Experimental Medicine.* 2002; 195:559-570.

Hunt SJ. Stranger in stranger land. *Immunological Reviews.* 2006; 213: 36-47.

Illingworth DV, Challis JRG, Ackland N, Burton AM, Heap RB, Perry JS. Parturition in the guinea-pig; plasma level of steroid hormones, steroid-binding proteins, and oxytocin, and the effect of corticosteroids, prostaglandins and adrenocorticotrophin. *The Journal of Endocrinology.* 1974; 63:557-570.

Kaczorowski DJ, Mollen KP, Edmons R, Billiar TR. Early events in the recognition of danger signals after tissue injury. *Journal of leukocyte Biology,* 2008; 83:546-552.

Keelan J, Blumenstein M, Helliwell R, Sato T, Marvin K, Mitchell M. Cytokines, prostaglandins and parturition. *Placenta*. 2003; 24 (A):533-546.

Kim Y, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim M, Kuvaniemi H. Toll-like receptor -2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *American Journal Obstetrics & Gynecology*. 2004; 191 (4):1346-1355.

Kim YM, Romero R, Oh SY, Kim CJ, Kilburn BA, Armant DR, Nien JK, Gomez R, Mazor M, Saito S, Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptor 4: a potential link between “danger signals”, the innate immune system, and preeclampsia? *American Journal Obstetrics & Gynecology*. 2005, 193(3 pt2):921-927.

King A, Paltoo A, Kelly R, Sallenave J, Bocking A, Challis, J. Expression of Natural Antimicrobials by Human Placenta and Fetal Membranes. *Placenta*. 2007; 28 (2-3):161-169.

[Kliman HJ](#), [Nestler JE](#), [Sermasi E](#), [Sanger JM](#), and [Strauss JF III](#). Purification, characterization and *in vitro* differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*. 1986; 118: 1567-1582.

Krediet TG, Wiertsema SP, Vossers MJ, Hoeks SB, Fler A, Ruven HJ, Rijkers GT. Toll-like receptor 2 polymorphism is associated with preterm birth. *Pediatric Research*. 2007; 62:474-476.

Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. Toll-like receptor signal transduction. *Experimental and Molecular Medicine*. 2007; 39(4): 421-438.

Krikun G, Lockwood CJ, Abrahams VM, Mor G, Paidas M, Guller S. Expression of Toll-like receptors in the human deciduas. *Histology and Histopathology*. 2007; 22:847-854.

Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Human Pathology*. 2004; 35 (1):47-54.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86: 973.

Liggins GC, Fairclough RJ, Grieves SA, Kendall JZ, Knox BS. The mechanisms of initiation of parturition in the ewe. *Recent Progress in Hormone Research*. 1973; 29:111-159.

Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz D. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatric Research* 2002; 52(3): 373-376.

Ma Y, Krikum G, Abrahams VM, Mor G, Guller S. Cell type-specific expression and function of toll-like receptors 2 and 4 in human placenta: implications in fetal infection. *Placenta*. 2007; 28:1024-1031.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394-397.

Mitsunari M, Yoshida S, Shoji T, Tsukihara S, Iwabe T, Harada T, Terakawa N. Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. *Journal of Reproductive Immunology*. 2006; 72(1-2):46-59.

Molnar M, Romero R, Hertelendy F. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate arachidonic acid release and phospholipid metabolism in human myometrial cells. *American Journal Obstetrics & Gynecology*. 1993; 169:825-829.

Narvekar N, Lakha F, Critchley HO, Glasier AF, Williams AR, Leminen R, Heikinheimo O, Kelly RW, Baird DT. Changes in vaginal morphology, steroid receptor and natural antimicrobial content following treatment with low-dose mifepristone. *Contraception*. 2007; 75: 271–280.

Nakla S, Skinner K, Mitchell BF, Challis JRG. Changes in prostaglandin transfer across human fetal membranes obtained after spontaneous labor. *American Journal Obstetrics & Gynecology*. 1986; 155:1337-1341.

Parry S, Strauss J. Premature Rupture of the fetal membranes. *The New England Journal of Medicine*. 1998; 338 (10):663-668.

Peltier M. Immunology of term and preterm labor. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003; 1:122.

Pioli P, Amiel E, Schaefer T, Connolly J, Wira C, Guyre P. Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in tissue of the human female reproductive tract. *Infection and Immunity*. 2004; 72(10):5799-5806.

Pieber D, Allport VC, Hills F, Johnson M, Bennett PR. Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labor. *Molecular Human Reproduction*. 2001; 7:875-879.

Rauk PN, Chiao JP. Interleukin-1 stimulates human uterine prostaglandin production through induction of cyclooxygenase-2 expression. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2000; 43:152-159.

Rauk P, Friebe-Hoffmann U, Winebrenner L, Chiao J. Interleukin-6 up-regulates the oxytocin receptor in cultured uterine smooth muscle cells. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2001; 45:148-153.

Romero R, Mazor M, Wu YK, Sirtori M, Oyarzun E, Mitchell MD, Hobbins JC. Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Seminars in Perinatology*. 1988; 12:262-279

Romero R, Espinoza J, Kusanovic J, Gotsch F, Hassan S, Erez O, Chaiworapongsa T, Mazor M. The preterm parturition syndrome. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2006; 113 (3):17-42.

Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PB Jr. Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99, 2129-2133.

Sennström MB, Ekman G, Westergren-Thorsson G, Malmström A, Byström B, Endrésen U, Mlambo N, Norman M, Ståbi B, Brauner A. Human cervical ripening and inflammatory process mediated by cytokines. *Molecular Human Reproduction*. 2000; 6:375-381.

Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szereday L, Barakonyi A, Palkovics T, Papp O, Varga P. Progesterone-dependent immunomodulation. *Chemical Immunology and Allergy*. 2005; 89:118-125.

Soto E, Espinoza J, Nien JK, Kusanovic JP, Erez O, Richani K, Santolaya-Forgas J, Romero R. Human b-defensin-2: A natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*; 2007; 20 (01):15-22.

Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA. Natural antimicrobial production by the amnion. *American Journals of Obstetrics & Gynecology*. 2007; 196:255.e1-255e6.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 2005; 17(1): 1-14.

Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental "graft": ten ways support a child for nine months. *Current Opinion in Immunology* 2000; 12:731-737.

Thornton S, Gillespie J, Greenwell J, Dunlop W. Mobilization of calcium by the brief application of oxytocin and prostaglandin E2 in single cultured human myometrial cells. *Experimental Physiology*. 1992; 77(2): 385-388.

Vadillo F, Zaga V, Estrada G. Capitulo 25. Mecanismos moleculares de la rotura prematura de membranas. *Parto prematuro*. Editorial Médica Panamericana, México 2004.

Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB Jr, Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues *The Journal of Clinical Investigation*. 1998. 101(8):1633-1642.

Veenstra van Nieuwenhoven A, Heineman M, Faas M. The immunology of successful pregnancy. *Human Reproduction Update* 2003; 9(4):347-357.

Vega SR, Castillo CM, Hornelas OY, Gómez LN, Beltrán MJ, Vadillo OF. Análisis tridimensional de la estructura de las membranas corioamnióticas humanas al término de la gestación. *Ginecología y Obstetricia de México*. 2008; 76(1):38-44.

Wang H, Hirsch E. Bacterially-induced preterm labor and regulation of prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of toll-like receptor 4. *Biology of Reproduction*. 2003; 69 (6):1957-1963.

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993; 14:353-356.

Winkler M, Rath W, Fischer DC, van de Leur E, Haubeck H. Regulation of interleukin-8 synthesis in human lower uterine segment fibroblasts by cytokines and growth factors. *Obstetrics and Gynecology*. 2000; 95:584-588.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schroder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 1999; **286**, 525-528.

Young A, Thomson AJ, Ledingham MA, Jordan F, Greer IA, Norman JE. Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term. *Biology of Reproduction*. 2002; 66:445-449.

APÉNDICE

Abreviaturas

CAM	Coriamnioitis
COX-2	Ciclooxigenasa 2
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HBDs	Beta defensinas humanas
HCG	Hormona gonadotropina coriónica humana
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
hPGH	Hormona de crecimiento placentario humano
HPL	Hormona de lactógeno placentario
HSP60/70	Proteínas de choque térmico
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
ILT	Transcritos tipo Ig
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LILRB	Receptor inhibidor de leucocitos
LPS	Lipopolisacárido
MAL	Adaptador tipo MyD88
MCH	Membranas corioamnióticas humanas
MD-2	Diferenciación mieloide-2
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMPs	Metaloproteasas de matriz extracelular
MyD88	Factor de diferenciación mieloide 88
NAPs	Péptidos antimicrobianos naturales
NF-kb	Factor nuclear del locus kappa de las células B
NK	Células asesinas naturales
P4	Progesterona
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PE	Ficoeritrina
PGs	Prostaglandinas
PIBF	Factor bloqueador inducido por progesterona
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
SLPI	Inhibidor de proteasas secretado por leucocitos
Th	Linfocitos T cooperadores
TIR	Dominio del receptor Toll similar a IL
TIRAP	Proteína contenedora del dominio TIR
TLRs	Receptores Toll-like o tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa