



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PAPEL MODULADOR DE LA PROGESTERONA SOBRE ELEMENTOS DE LA
INMUNIDAD INNATA DEL EPITELIO AMNIOTICO HUMANO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARIA DEL PILAR FLORES ESPINOSA

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. C. VERONICA ZAGA CLAVELLINA
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
FACULTAD DE CIENCIAS**

MÉXICO, D.F. MARZO 2013



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 9 de diciembre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **FLORES ESPINOSA MARÍA DEL PILAR** con número de cuenta **300870312**, con la tesis titulada **"PAPEL MODULADOR DE LA PROGESTERONA SOBRE ELEMENTOS DE LA INMUNIDAD INNATA DEL EPITELIO AMNIÓTICO HUMANO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA**:

Presidente: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
Vocal: DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ
Secretario: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
Suplente: DRA. ROCÍO ÁNGELES GARCÍA BECERRA
Suplente: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de febrero de 2014

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta tesis es resultado del trabajo de investigación aceptado en el programa de estudios de Maestría, los cuales fueron posibles gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (*CONACYT*), registro número 262663 y el apoyo para la terminación de la tesis otorgada por el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (*COMECYT*), registro número 13BTM2336.

Al Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, y de manera especial a la *Dra. Verónica Zaga Clavellina,* porque no solo me brindó las facilidades para realizar la parte experimental de este trabajo, su tiempo, su apoyo académico, sino por sus consejos y enseñanzas que me han hecho crecer.

A los miembros del comité Tutor, el *Dr. Horacio Merchant Larios* y el *Dr. Ignacio Camacho Arroyo,* por su tiempo, sus comentarios y sugerencias sobre la marcha de este trabajo, siendo un apoyo en la dirección del mismo, mejorándolo sustancialmente.

A los miembros del jurado: el *Dr. Luis I. Terrazas Valdés,* el *Dr. E. Galileo Escobedo González* y la *Dra. Rocío A. García Barrera,* quienes enriquecieron esta tesis con sus observaciones, consejos y comentarios, por toda su disposición.

Quiero agradecer y compartir la satisfacción de este trabajo con las personas que estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y orientación en cada momento durante este par de años de formación.

En primer lugar a Vero, porque siempre me animaste y enseñaste con tu ejemplo, a creer en lo que uno hace. Gracias, por compartir tus experiencias académicas y personales conmigo, eres una gran persona.

A Mon y Ángel, unos excelentes compañeros de laboratorio, que siempre me animaron, me apoyaron y junto con las “chicas de Andro” Heidi, Mon, Xochitl y Mari hicieron de los días de trabajo, días gratos y alegres.

A mis amigos “biólogos” Raquel, Fer, Luisa y Rafa que me han acompañado desde el inicio de este camino académico, por seguir cerca y darme su cariño, pese a la distancia y las circunstancias que nos separan.

A mis amigos de siempre, Marisol, Saúl, Héctor, Félix y Sergio, por las experiencias que hemos compartido, las pruebas que hemos superado; por las pláticas terapéuticas, los regaños, los ánimos, por entender mis manías y compartirme las suyas, su paciencia y todo su cariño.

A mi familia a quienes también les dedico esta tesis, porque han sido el pilar fundamental que me ha sostenido con su apoyo y cariño infinito; gracias Mamá, Gaby-la mejor hermana del mundo- y Dani. A mis ángeles, mi Papá y mi Abuelita. A Angelito y Pedrito Damián, niños hermosos que me enseñan tanto y me entregan su amor en las cosas más simples de la vida.



Contenido

Resumen	8
Abstract	10
I. Introducción	1
1. El papel de la progesterona (P4) en el embarazo	1
1.1 El mecanismo de acción de la P4	2
1.2 El receptor de progesterona (RP).....	3
1.3 La P4 y el privilegio inmunológico en el embarazo	4
1.4 Retiro funcional de la P4	5
2. El trabajo de parto.....	6
2.1 Fisiología del trabajo de parto.....	6
3. Infección intrauterina y parto pretérmino.....	8
3.1 Inflamación en respuesta a la infección.....	8
3.2 Microbiología de la infección intrauterina/intraamniótica.....	9
3.3 Ruta de infección intrauterina/intraamniótica	9
4. Las membranas corioamnióticas.....	11
5. Inmunidad innata en el embarazo, primera línea de defensa	14
5.1 Receptores tipo Toll (TLRs).....	14
5.2 TLR-4.....	15
II. Antecedentes	18
1. La activación del TLR-4 en modelos <i>in vitro</i> de infección intrauterina	18
2. TLR-4/MyD88 funcional, es indispensable para dirigir la respuesta inflamatoria en una infección con <i>E. coli</i>	19
3. La P4 como modulador del ambiente inflamatorio en la interfase materno-fetal.....	20
III. Justificación y planteamiento del problema	23
IV. Hipótesis	24
V. Objetivo general	25
1. Objetivos particulares	25
VI. Metodología	26
1. Muestras biológicas.....	26
2. Reactivos	27
3. Procesamiento de las membranas corioamnióticas humanas.....	27

4. Viabilidad metabólica de los explantes de epitelio amniótico.....	28
5. Estimulación y tratamiento del epitelio amniótico en cultivo	29
6. Técnica de Western Blot	30
7. Técnica de inmunohistoquímica	31
8. Técnica de ELISA.....	33
9. Análisis estadístico	35
VII. Resultados.....	36
1. Validación del modelo.....	36
2. Efecto de la P4 sobre la expresión del TLR-4/MyD88 en el epitelio amniótico estimulado con LPS	37
2.1 Expresión del TLR-4 en el epitelio amniótico humano.....	37
2.2 Inmunolocalización de TLR-4.....	38
2.3 Expresión de MyD88	39
3. Efecto de la progesterona en el patrón de secreción de citocinas pro-inflamatorias	40
3.1 Secreción de TNF- α e IL-6	40
3.2 Secreción de IL-8	42
3.3 Secreción IL-10	43
3.4 Secreción de HBD-2	44
VIII. Discusión	45
IX. Conclusiones	58
X. Perspectivas	60
Referencias bibliográficas	61
Anexos.....	72
1. Abreviaturas	72
2. Publicación derivada del trabajo de investigación.....	73

Resumen

Durante el embarazo las membranas corioamnióticas humanas actúan como una barrera física e inmunológica que delimita la cavidad amniótica y mantiene al producto en un ambiente inmunológicamente privilegiado.

La infección de las membranas corioamnióticas induce la secreción de moduladores pro-inflamatorios a través de la activación de elementos de inmunidad innata que expresan estos tejidos, incluido el receptor tipo toll (TLR)-4 que le confiere la capacidad de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos Gram negativos.

Por otro lado, la progesterona (P4), hormona esteroide indispensable durante la gestación, ejerce propiedades anti-inflamatorias que favorecen el equilibrio inmunológico de la unidad feto-placentaria y que permite la co-existencia de tejidos maternos y fetales.

EL objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto modulador de la P4 sobre la expresión de TLR-4/MyD88 y la secreción de los moduladores pro-inflamatorios TNF- α , IL-6, IL-8, el péptido antimicrobiano HBD-2 y la citocina anti-inflamatoria IL-10 asociados a la activación de TLR-4 por el lipopolisacárido (LPS) en el epitelio amniótico humano.

Se utilizaron explantes de epitelio amniótico con edad gestacional a término (37-29 semanas), sin evidencia de trabajo de parto activo ni antecedentes de infección. Los explantes fueron pre-tratados durante 24h con 0.01, 0.1 y 1.0 μ M de P4, posteriormente fueron co-tratados con 1000ng/ml de lipopolisacárido (LPS) hasta

las 48h. La expresión de TLR-4 se detectó por medio de Western blot e inmunohistoquímica, las concentraciones de MyD88, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 y HBD-2 fueron cuantificadas por ELISA.

Las concentraciones de 0.01 y 1.0 μ M de P4 disminuyeron de manera significativa la expresión de TLR-4/MyD88 inducida por el LPS. El LPS incrementó la concentración de TNF- α (32 veces), IL-6 (8 veces), IL-8 (3 veces), IL-10 (3 veces) y HBD-2 (5 veces) secretadas por los explantes del epitelio amniótico. La concentración de P4 a 1.0 μ M fue la dosis más efectiva para disminuir la secreción de TNF- α , IL-6 y HBD-2, inducidos por LPS. La P4 no tuvo ningún efecto sobre la secreción de IL-10. El co-tratamiento de los explantes con RU486 a una concentración de 1.0 μ M bloqueó el efecto de la P4.

En conclusión la P4 inhibe la expresión de TLR-4/MyD88 inducida por LPS y la secreción de moduladores pro-inflamatorios en el epitelio amniótico humano. Estos resultados pueden explicar parcialmente cómo la P4 puede proteger la región amniótica de las membranas y generar un mecanismo compensatorio que limite la secreción de moduladores pro-inflamatorios, los cuales podrían poner en peligro el privilegio inmune durante el embarazo.

Abstract

During pregnancy, human amniochorion act as a physical barrier by delimiting the amniotic cavity, which maintains or preserves the product in an immunologically privileged environment.

The amniochorion infection induces the secretion of pro-inflammatory modulators through activating the innate immunity elements expressed in these tissues, including toll-like receptor (TLR)-4 which confers the ability to recognize pathogen-associated molecular patterns of Gram negative bacteria.

Progesterone (P4) a steroid hormone essential during pregnancy, exerts anti-inflammatory properties that promote immune balance between the fetus and placenta allowing the co-existence of maternal and fetal tissues.

The objective of this study was to characterize the modulatory effect of P4 on the TLR-4/MyD88 expression and secretion of pro-inflammatory factors including TNF- α , IL-6, IL-8, the antimicrobial peptide HBD-2 and the anti-inflammatory cytokine IL-10 in human amniotic epithelium after being exposed to LPS.

Explants of amniotic epithelium at term gestation (37-39 weeks) without evidence of active labor or history of infection were used. The explants were pre-treated for 24h with 0.01, 0.1 and 1.0 μ M of P4, then were co-treated with LPS 1000ng/ml for 48h. The TLR-4 expression was detected by Western blot and immunohistochemistry. The concentration of MyD88, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 and HBD-2 were quantified by ELISA.

P4 at 0.01 and 1.0 μ M significantly decreased the expression of LPS-induced TLR-4/MyD88. LPS increased the concentration secreted of TNF- α (32 times), IL-6 (8 times), IL-8 (3 times), IL-10 (3 times) and HBD-2 (5 times) in explants of amniotic epithelium. The concentration of P4 at 1.0 μ M was the most effective dose to reduce the secretion of TNF- α , IL-6 and HBD-2 induced by LPS. P4 had no effect on the secretion of IL-10. Co-treatment of explants with a concentration 1.0 μ M of RU486 blocked the effect of P4.

In conclusion P4 inhibited LPS-induced TLR-4/MyD88 expression and the secretion of pro-inflammatory modulators in human amniotic epithelium. These results may partially explain how P4 could protect the amniotic region of fetal membranes and generate a compensatory mechanism that limits the secretion of pro-inflammatory modulators, which could jeopardize the immune privilege during pregnancy.

I. Introducción

En el humano, el embarazo es el resultado de múltiples mecanismos inmunológicos y endocrinológicos desarrollados por la madre y el feto, que permiten que el producto con características de semi-aloinjerto no sea rechazado y se desarrolle en un ambiente inmunológicamente privilegiado (Thellin y cols., 2000).

Este ambiente está caracterizado por el fino equilibrio entre la tolerancia del sistema inmune materno para proteger al feto y el mantenimiento de las competencias inmunológicas que permiten a la madre y al feto responder a la presencia de agentes patógenos (Pioli y cols., 2004).

1. El papel de la progesterona (P4) en el embarazo

La P4 (4-Pregnona, 3, 20 diona) es una hormona esteroide esencial para establecer y mantener el embarazo, no solo por sus efectos endocrinos sino por su capacidad de regular la respuesta inmunológica materno-fetal (Goldman y Shalev, 2007).

Al inicio de la gestación la P4 es producida por el cuerpo lúteo hasta la semana 10 de la gestación, momento en el que la placenta adquiere un tamaño considerable y produce la cantidad suficiente de esta hormona para mantener el tejido endometrial hasta el término de la gestación. Las membranas corioamnióticas también producen P4, sin embargo, su producción es menor a la de la placenta (Mitchell y cols., 1987). A través de la acción del citocromo P450, estos tejidos extraembrionarios pueden convertir las lipoproteínas de baja densidad a

pregnenolona, y posteriormente a P4 mediante la acción de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD) (Albrecht y Pepe, 1990).

1.1 El mecanismo de acción de la P4

Debido a la naturaleza lipídica de la P4, ésta atraviesa la membrana celular pasivamente y es capaz de unirse a su receptor. El receptor de progesterona (RP), se encuentra en el citoplasma unido a complejos de proteínas de estrés térmico (heat shock protein-HSP). La unión de la P4 y el RP induce la separación de los complejos HSP, permitiendo la fosforilación y dimerización del RP seguido de su eventual translocación al núcleo, donde el dímero se une a secuencias específicas del ADN que actúan como elementos de respuesta a P4 en la región promotora de diferentes genes blanco, lo que produce el reclutamiento de co-activadores o inhibidores que modulan la actividad transcripcional (Figura 1) (Druckmann y Druckmann, 2005).

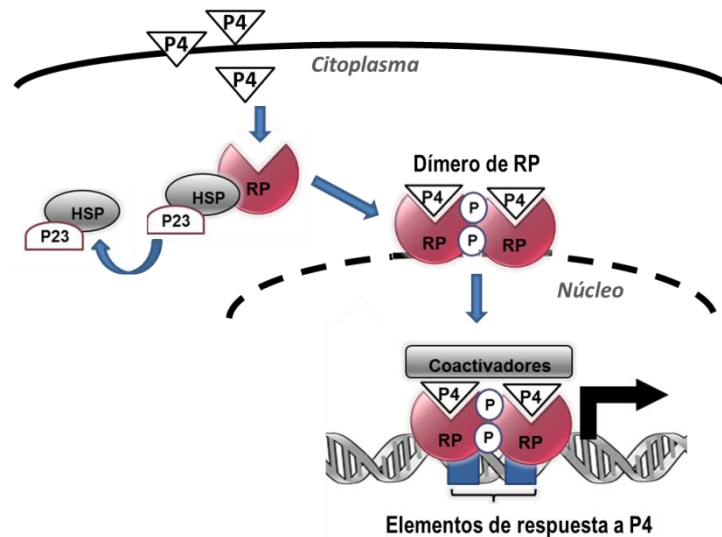


Figura 1. Mecanismo clásico de acción de la P4, vía su unión al receptor nuclear y la transcripción de elementos de respuesta a P4.

1.2 El receptor de progesterona (RP)

El RP, pertenece a la familia de receptores nucleares, que actúan como factores de activación transcripcional dependientes de ligando. Se han caracterizado cinco isoformas del RP (Goldman y cols., 2005); sin embargo, las mejor caracterizadas son la isoforma A (RP-A) de 82 kDa y la B (RP-B) de 116 kDa, ambas son transcritas a partir del mismo gen, localizado en el cromosoma 11 q22-q23 humano, por un proceso de corte y empalme alternativo que genera dos promotores (Rousseau-Mercky cols., 1987). Los niveles de expresión de ambas isoformas son específicos de cada tejido y son reguladas diferencialmente por distintos factores (Duffy y cols., 1997; Mote y cols, 2002; Richer y cols., 2002).

Existen diferencias estructurales entre las isoformas A y B, esta última presenta tres dominios de activación transcripcional de los cuales el AF-3 le confiere una mejor interacción con el ADN y por lo cual actúa como el principal activador de los ERP (Wen y cols., 1994); mientras que la isoforma A pierde este dominio AF-3 y presenta un dominio inhibitorio (ID) actuando como un represor de la actividad del RP-B (Figura 2) (Vegeto y cols., 1993).



Figura 2. Estructura de las isoformas del RP humano. **HDB**, dominio de unión a la hormona (P4); **H**, región en bisagra; **DBD**, dominio de unión al ADN; **ID**, dominio de inhibición y **AF-1, -2 y -3**, secuencias con funciones de activación transcripcional (Modificado de Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007)

1.3 La P4 y el privilegio inmunológico en el embarazo

Durante el establecimiento del privilegio inmunológico, la P4 estimula a los linfocitos para que produzcan el factor bloqueante inducido por P4 (PIBF), el cual tiene la capacidad de inducir la producción de citocinas del perfil Th2- como la interleucina (IL)-4 y la IL-10- con funciones anti-inflamatorias y bloquear la secreción de IL-12, citocina indispensable para la proliferación y activación de las células T y NK (Szekeres-Bartho, 2009).

También se ha demostrado que la P4 induce la expresión del antígeno leucocitario humano (HLA)-G en las células del trofoblasto (Yie y cols., 2006), antígeno que forma parte del complejo mayor de histocompatibilidad, su función es la de redireccionar la respuesta inmune materna hacia un mecanismo de tolerancia que inicia cuando HLA-G se une al receptor inhibitor de células NK (KIR) y al receptor inhibitor de linfocitos (ILT), esta unión genera una señal intracelular que suprime la actividad lítica de ambos tipos (LeMaoult J y cols., 2005).

Por otro lado la P4 actúa como factor endocrino que induce la proliferación y decidualización del endometrio para crear un ambiente propicio para la implantación. Así mismo, la P4, regula la dinámica uterina manteniendo al miometrio relativamente quiescente (Goldman y cols., 2005).

1.4 Retiro funcional de la P4

A diferencia de otras especies de mamíferos, en las cuales la disminución súbita de los niveles de P4 al final del tercer trimestre juega un papel importante en el inicio del trabajo de parto (Smith y cols., 2002; Spencer y cols., 2004); en el humano y primates superiores, los niveles de P4 aumentan a través de la gestación alcanzando concentraciones séricas de 150ng/ml (0.1 μ M) a las 40 semanas de embarazo y de 27.5- 30ng/ml (0.01 μ M) en el líquido amniótico al tercer trimestre de embarazo (Mazor y cols., 1994), niveles que se mantienen hasta el momento en que el trabajo de parto inicia.

Existe evidencia que indica que el RP-A y el RP-B ejercen funciones diferentes y aunque dichas diferencias no han sido completamente caracterizadas, la unión de la P4 con el RP-B está asociada con efectos fisiológicos progestacionales, mientras que la unión de la hormona con el RP-A se asocia a efectos anti-progestacionales (Mulac-Jericevic & Conneely, 2004).

Durante todo el embarazo y justo antes del trabajo de parto, la isoforma que se expresa en forma predominante en los diferentes tejidos fetales y maternos es la B; sin embargo, las señales del inicio de trabajo de parto coinciden con la disminución significativa en la expresión de la isoforma B y un aumento de la isoforma A, fenómeno conocido como "*retiro funcional de la progesterona*" (Allport y cols, 2001). El retiro funcional de la P4, explica la disminución de la sensibilidad del útero como órgano blanco de la P4, lo que induce –en parte- la activación de los mecanismos del trabajo de parto (Karalis y cols., 1996; Rezapour y cols., 1997; Keelan y cols., 1997; Mesiano y cols., 2002).

2. El trabajo de parto

El trabajo de parto en el humano es considerado un evento multifactorial asociado a un proceso inflamatorio en la interfase materno-fetal (Patni y cols., 2007) que se inicia alrededor de la semana 37 de la gestación.

El trabajo de parto se caracteriza por tres procesos fisiológicos claves: 1) la activación del miometrio y el establecimiento de las contracciones uterinas, 2) la maduración cervical que implica el borramiento y la dilatación del cérvix y 3) en las etapas más avanzadas, la ruptura de las membranas corioamnióticas.

2.1 Fisiología del trabajo de parto

Hacia el final del tercer trimestre del embarazo el estiramiento muscular del útero induce la activación del factor de transcripción nuclear kB (NFkB), factor que activa la transcripción de genes de la respuesta inflamatoria, induciendo la producción de IL-1 β y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El aumento de estas citocinas promueve la síntesis de prostaglandinas (PGs)-tales como PGE₂ y PGF_{2 α} - por las células del miometrio, en las cuales se incrementan los receptores de oxitocina y las uniones Gap intercelulares; la actividad de las PGs y el receptor de oxitocina incrementan los niveles de Ca²⁺ en las células del miometrio generando las contracciones uterinas intensas y frecuentes (Challis y cols., 2000, Mesiano y cols., 2002).

En el cérvix, las PGs alteran la permeabilidad de los vasos sanguíneos incrementando su flujo, lo cual junto con la acción quimioatrayente de IL-8- inducida por la activación del NFkB- generan un ambiente rico en leucocitos y

neutrófilos. La activación y degranulación de neutrófilos reclutados en el estroma cervical, produce cambios en el colágeno y el tejido conectivo, dirigiendo los cambios estructurales del borramiento y la dilatación del cérvix (Timmons y cols., 2010, Norman y cols., 2007).

En las membranas corioamnióticas, la degradación del tejido conectivo se debe a la influencia del ambiente pro-inflamatorio en el cérvix que induce la secreción de IL-1 β y TNF- α , estimulando la producción de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP)-9 y MMP-2, enzimas con actividad gelatinasa que degradan selectivamente los diferentes componentes de la matriz extracelular (MEC) de las membranas corioamnióticas, jugando un papel clave en el daño estructural y la pérdida de la fuerza tensil de estos tejidos, provocando su ruptura (Figura 3) (Keelan y cols., 1997, Allport y cols, 2001, Norman y cols., 2007).

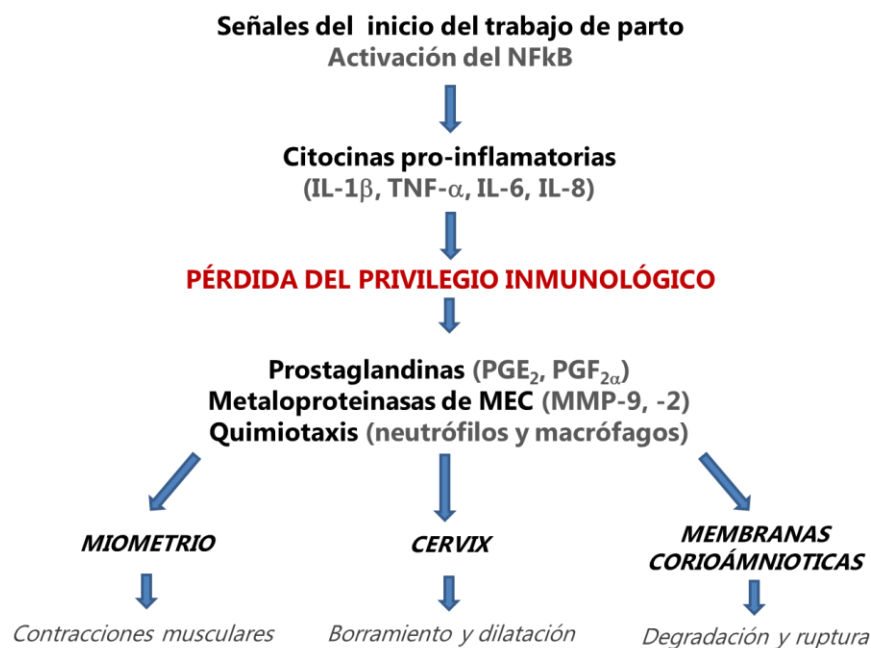


Figura 3. Mecanismos que caracterizan el trabajo de parto (modificado de Patni y cols., 2007).

3. Infección intrauterina y parto pretérmino

El desarrollo de un proceso infeccioso a nivel intrauterino, ocasiona la pérdida del privilegio inmunológico de la interfase materno-fetal, generando una respuesta inflamatoria que compromete la continuidad del embarazo. Un proceso de esta naturaleza es reconocido como el principal factor de riesgo asociado con los nacimientos a edades gestacionales inferiores a las 37 semanas, condición patológica conocida como parto pretérmino (Hillier SL y cols., 1991).

Alrededor del 30% de los partos pretérmino son atribuidos a un proceso infeccioso en la interfase materno-fetal, esta condición patológica genera serias secuelas en los recién nacidos, principalmente complicaciones del sistema respiratorio y del sistema nervioso central, asociadas con un incremento en la morbi-mortalidad neonatal (Asrat, 2001; Goldenberg y cols., 2000).

3.1 Inflamación en respuesta a la infección

Evidencias clínicas y experimentales sostienen que una infección a nivel intrauterino genera una respuesta que se caracteriza por el incremento en la expresión, síntesis y secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 en los tejidos gestacionales, tanto maternos como fetales, incluido el líquido amniótico (infección intraamniótica) (Romero y cols., 1998; Sennstrom y cols., 2000; Dudley y cols., 1992; Reisenberger y cols., 1997; Saito y cols., 1993).

Estos moduladores inmunológicos representan el primer grupo de moléculas que se sintetizan como parte de la respuesta a la infección e inducen el incremento de la expresión, síntesis y secreción de los factores pro-degradativos como PGE₂, PGF_{2 α} ,

MMP-2 y MMP-9, los cuales dirigen el inicio prematuro y la progresión de los mecanismos del trabajo de parto (Vadillo-Ortega y cols., 1995; Fortunato y cols., 2000; Zaga-Clavellina y cols., 2006a; Zaga-Clavellina y cols., 2006b).

3.2 Microbiología de la infección intrauterina/intraamniótica

Los principales microorganismos asociados como agentes causales de infección intrauterina/intraamniótica se encuentran distribuidos en una amplia gama de virulencia y mecanismos de infección (Tabla 1) (Parry y Strauss, 1998, McGregor y French, 2000; Newton y cols., 2005; Mikamo y cols., 1999).

Organismo	Clasificación	% asociación a parto pretérmino
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Mycoplasma	47.4*
<i>Mycoplasma hominis</i>	Mycoplasma	30.4*
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Gram variable (+)	24.5*, 9.8 ^{ox}
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Gram positiva	6.9 ^{ox}
<i>Streptococcus grupo B</i>	Gram positiva	14.6*
<i>Escherichia coli</i>	Gram negativa	8.2*, 8.6 ^{ox}
<i>Fusobacterium spp</i>	Gram negativa	5.4*, 3.0 ^{ox}
<i>Candida albicans</i>	Levadura (Gram positiva)	10.8 ^{ox}

Tabla 1. Frecuencia de microorganismos encontrados en cultivos de líquido amniótico* y raspados vaginales^{ox} asociados a parto pretérmino (Newton y cols., 2005; Mikamo y cols., 1999).

3.3 Ruta de infección intrauterina/intraamniótica

Evidencia clínica y experimental sustenta que la vía más común a través de la cual los microorganismos patógenos pueden acceder a la cavidad intrauterina, es a través de la propagación ascendente desde el tracto genital bajo.

Una vez que los patógenos ascienden por el canal cervico-vaginal, entran en la cavidad uterina y se establecen en la región coriodecidual de las membranas corioamnióticas. En las etapas más avanzadas de la infección, los patógenos pueden alcanzar la región amniótica de las membranas, la cual representa la última barrera que el patógeno tiene que atravesar para ganar acceso a la cavidad amniótica e infectar el líquido amniótico y al feto (Figura 4 A) (Romero y cols. 1988).

Actualmente Kim y cols. (2009), han descrito otro posible escenario, en el cual los patógenos acceden a la cavidad amniótica a través de una región restringida de las membranas corioamnióticas, una vez dentro de la cavidad amniótica los patógenos proliferan de manera que la invasión a las membranas corioamnióticas se extiende principalmente a partir del líquido amniótico (Figura 4 B).

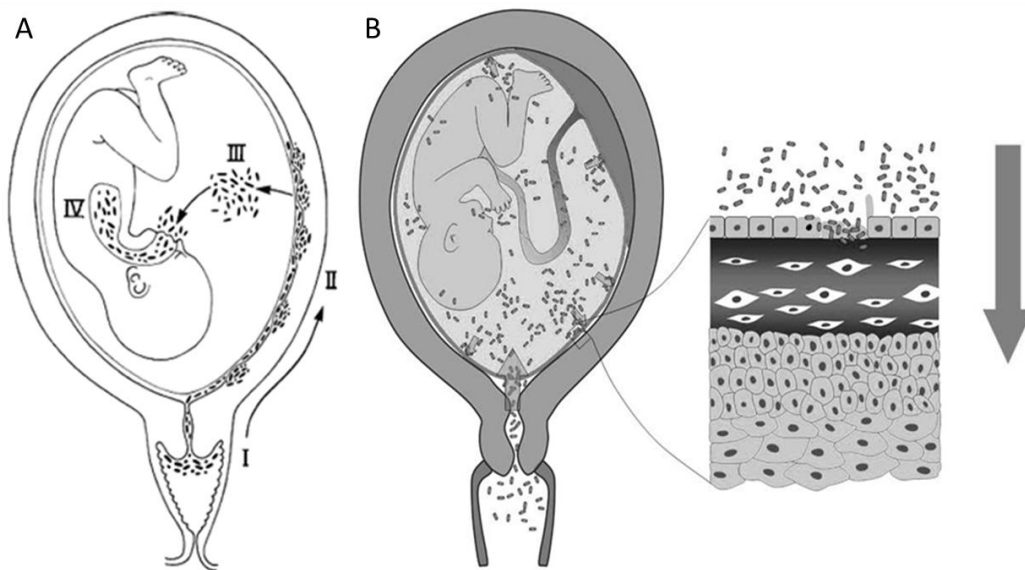


Figura 4. A. Modelo de infección ascendente: I. Infección vaginal. II. Infección coriodecidual. III. Infección de líquido amniótico. IV. Infección del feto (Tomado de Romero y cols., 1988). B. Modelo de infección de las membranas corioamnióticas a partir del líquido amniótico (Tomado de Kim y cols., 2009).

Considerando cualquiera de estos posibles escenarios, las membranas corioamnióticas son un elemento clave para contener el proceso infeccioso. Estos tejidos tienen una localización estratégica dentro de la interfase materno-fetal, en especial el epitelio amniótico, que en cualquiera de los dos escenarios constituye la última barrera que los patógenos deben atravesar para propagar la infección hacia los otros tejidos.

4. Las membranas corioamnióticas

Las membranas corioamnióticas constituyen una entidad anatómica e histológica sumamente compleja y dinámica que mantiene el equilibrio entre los fluidos maternos y fetales, realizando un intercambio constante de agua, electrolitos, nutrientes y hormonas; además de responder a diferentes señales bioquímicas procedentes tanto del producto como de la madre (Parry y Strauss, 1998; Bryant-Greenwood 1998).

Alrededor del día 7 posterior a la fecundación, comienza a formarse la cavidad amniótica a partir de una hendidura de la hoja ectodérmica, esta cavidad se expande por el crecimiento del celoma embrionario y finalmente es delimitada por el amnios hacia finales de la tercera semana del embarazo. El amnios se extiende sobre el cordón umbilical y forma parte de la piel del feto. De manera casi paralela, el corion se forma a partir de la hoja endodérmica, de la cual se origina el sincitiotrofoblasto en la zona de implantación y a partir del cual se diferencia el citotrofoblasto que formará el corion capsular. Debido al rápido crecimiento de la cavidad amniótica, el amnios y el corion comienzan a acercarse y eventualmente quedan en contacto alrededor de la semana 12 (Benirschke y cols., 2006). Así, las membranas corioamnióticas se componen por la superposición de estos dos

tejidos: el corion y el amnios; cada uno formado por diferentes tipos celulares embebidos en una prominente matriz extracelular, cuyo principal componente es la colágena (Figura 5) (Bryant-Greenwood, 1998).

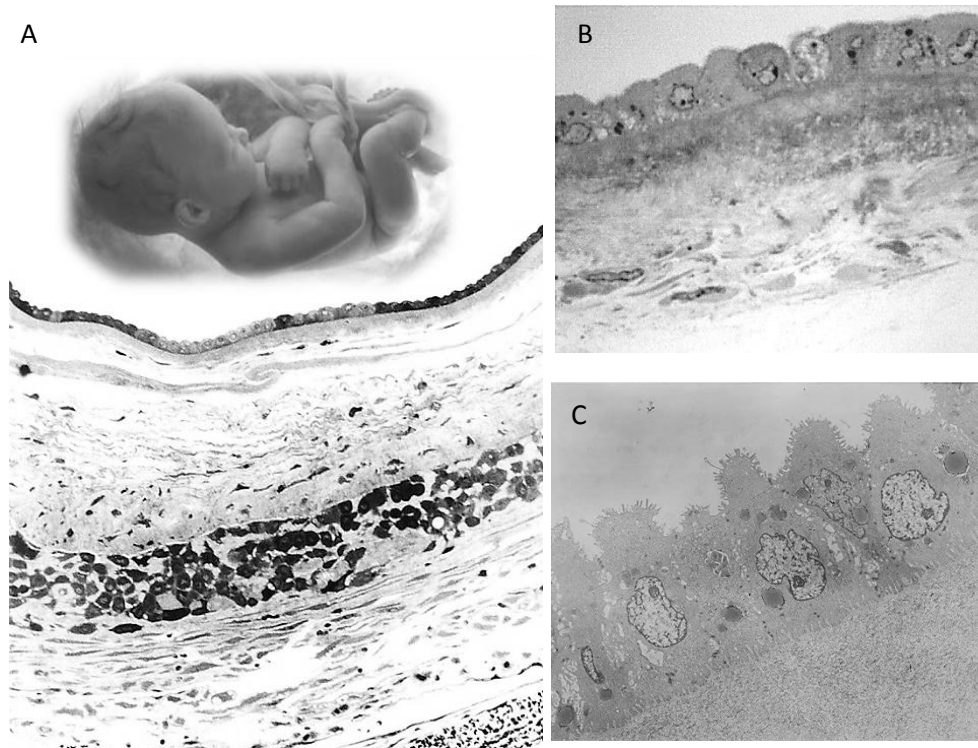


Figura 5. **A.** Imagen compuesta que ejemplifica la ubicación del feto dentro de la cavidad amniótica, delimitada por las membranas corioamnióticas. La composición celular de las membranas corioamnióticas se muestra en un corte semifino (1 μ m) de tejido a término y sin trabajo de parto, incluido en EPON. **B.** El amnios compuesto por el epitelio amniótico, sobre la membrana basal y las diferentes capas de tejido fibroso que lo componen. **C.** Células cúbicas y ciliadas que componen al epitelio amniótico.

El Corion se forma a partir del endodermo y es la zona histológica más gruesa y con mayor celularidad de las membranas, está formado por dos capas: 1) la pseudo membrana basal, actúa como estructura de anclaje para los trofoblastos, constituida por colágena tipo I, III, IV y proteoglicanos; 2) La capa de trofoblastos, presenta una polaridad hacia la decidua materna y forma la principal población

celular del corion; aunque es posible encontrar células con marcadores de leucocitos, en su mayoría macrófagos y fibroblastos, todos embebidos en una matriz laxa compuesta por pocas fibras de colágena tipo I, II, IV, V, VI y proteoglicanos (Bryant-Greenwood, 1998; Bourne, 1966).

El Amnios se forma a partir del ectodermo embrionario, no tiene vasos sanguíneos por lo que obtiene sus nutrimentos directamente del líquido amniótico. Se caracteriza por presentar una gran resistencia mecánica debido a su estructura, constituida por cinco capas: 1) El epitelio amniótico, es la capa más interna y se encuentra en contacto directo con el líquido amniótico y el feto, formado por células cúbicas coronadas por muchas microvellosidades y unidas entre sí por uniones de tipo estrechas, que descansan sobre una membrana basal; 2) La membrana basal, una estrecha capa de tejido conectivo constituido principalmente por colágena tipo IV, es responsable de mantener la unión entre las células epiteliales y por lo tanto de mantener la integridad estructural del epitelio; 3) La capa compacta, se compone de tejido conectivo organizado en una compleja red tridimensional, compuesta por colágena tipo I, III, IV, V,VI y fibronectina. Su grosor es mayor al de la membrana basal, que junto a su estructura de red 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 esta capa; 5) La capa esponjosa; también llamada intermedia, por su posición 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 sin causar daño a la estructura de las membranas.

Considerando las características estructurales de las membranas corioamnióticas entre las cuales destaca ser un tejido no innervado ni vascularizado, es factible considerar que los mecanismos de inmunidad innata juegan un papel clave para regular diferentes eventos durante el embarazo y parte de los mecanismos de defensa ante cualquier reto inmunológico y/o infeccioso (Kim y cols., 2004; Patni S y cols., 2007).

5. Inmunidad innata en el embarazo, primera línea de defensa

Durante el embarazo las membranas corioamnióticas, constituyen no solo una barrera física sino también inmunológica. Evidencia experimental indica que parte de las propiedades inmunológicas de estos tejidos son atribuibles a la inmunidad innata, específicamente a través de la expresión y activación de diferentes miembros de la familia de receptores tipo Toll, que les permiten reconocer de manera específica la presencia de diferentes microorganismos (Patni y cols, 2009; Abrahams y cols., 2013; Giallux y cols., 2010).

5.1 Receptores tipo Toll (TLRs)

Los TLRs son proteínas altamente conservadas evolutivamente, el primer gen Toll fue descrito por primera vez en el desarrollo dorso-ventral en la larva de la mosca de la fruta, posteriormente se descubrió que estos genes codificaban para receptores como parte de un mecanismo de defensa contra la infección por hongos (Lemiatre y cols., 1996). Un año más tarde Medzhitov (1997) describió un

homólogo del TLR en los humanos con la capacidad de inducir la expresión de genes involucrados en las respuestas inflamatorias.

En humanos, a la fecha se han descrito 10 TLRs, cada uno con ligandos específicos que permiten a las células del sistema inmune reconocer una gran diversidad de agentes patógenos (Akira y cols., 2001).

Los TLRs son glicoproteínas transmembranales tipo I, que presentan un dominio extracelular con secuencias repetidas ricas en leucinas (LRR), responsable de mediar el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); una hélice simple transmembranal lo une al dominio intracelular, el cual es similar al dominio del receptor de IL-1 (IL-1R) por lo que es referido como dominio Toll/IL-1R (TIR); este dominio contiene regiones que le permiten acoplarse a diferentes proteínas citoplasmáticas que dirigen la señalización intracelular en respuesta a la unión del receptor con su ligando (Janesses y Beyaert, 2003).

5.2 TLR-4

El TLR-4 es el miembro más estudiado de la familia de TLRs, el gen de TLR-4 se localiza en el cromosoma 9 y codifica para 3 isoformas cuyas funciones aún no se han descrito.

El principal ligando de TLR-4 es el lípido A, componente bioactivo del lipopolisacárido (LPS), elemento de la pared celular en bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* y *Vibrio cholerae*. La toxicidad del LPS está asociada

con el lípido A y su inmunogenicidad está relacionada con los componentes del polisacárido (Chang y cols., 2010).

A diferencia de otros TLRs que reconocen de manera directa a sus ligandos, el TLR-4 necesita de la participación de proteínas accesorias: la proteína de unión a LPS (lipopolisaccharide binding protein-LBP) y el receptor de membrana CD14, cuya función principal es extraer el LPS de la pared celular de la bacteria y unirse a la proteína llamada factor de diferenciación mieloide 2 (MD-2), una proteína que se asocia al dominio extracelular del TLR-4 para inducir la transducción de señales intracelulares. Una vez que el TLR-4 es activado tiene dos vías de señalización, conocidas como vía dependiente del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y la vía independiente de esta proteína (Lu y cols., 2008).

Cuando la activación de la vía es dependiente de MyD88, esta proteína recluta y se asocia con el dominio TIR del dímero de TLRs. La activación de MyD88 genera una cascada de fosforilación, en la que participan proteínas de la familia IRAK (quinasas asociadas al receptor de IL-1). La activación de IRAK-1 e IRAK-4 conduce a la fosforilación de la cinasa TRAF6 (Factor asociado al receptor de TNF 6), esta cinasa se encarga de la activación del complejo citoplasmático IKK, que al fosforilarse induce la fosforilación y posterior degradación del inhibidor del NFkB (I κ B), de modo que el NF-kB es liberado, permitiendo su traslado hacia el núcleo para unirse a la región promotora de genes asociados a la respuesta pro-inflamatoria para iniciar la síntesis de diversas citosinas y moduladores pro-inflamatorios (Figura 6) (Lu y cols., 2008).

La vía dependiente de MyD88 también puede inducir la fosforilación de las MAPK's cinasas (ERK, JNK y p38) promoviendo la translocación nuclear del factor AP1. La vía independiente de MyD88, involucra el adaptador TRIF (adaptador que contiene el dominio TIR e induce al Interferón) la cual activa IRF-3 (Factor regulador de Interferon-3), provocando la síntesis de interferón tipo I (IFN) α/β (Lu y cols., 2008).

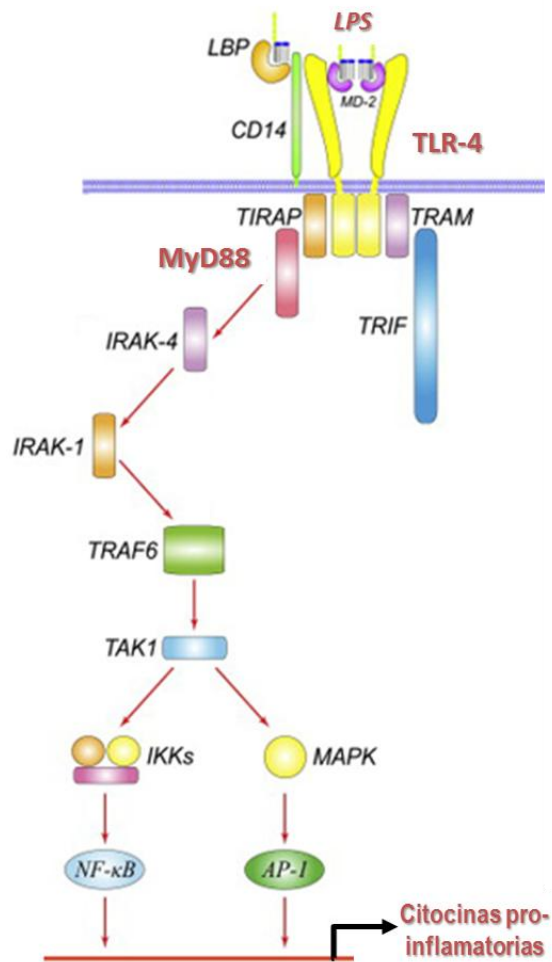


Figura 6. Señalización de TLR-4 activada por LPS, se muestra la vía dependiente de MyD88 que induce la producción de citocinas pro-inflamatorias (Tomado de Lu y cols., 2008).

II. Antecedentes

Existen evidencias que asocian el reconocimiento y activación de los TLRs con los mecanismos fisiopatogénicos que explican el inicio del trabajo de parto en condiciones normales y patológicas (Ma y cols, 2007). La expresión del gen y la forma proteica del TLR-4 se incrementan en membranas corioamnióticas provenientes de partos normales y pretérmino, pero el aumento más significativo se observa en los partos pretérmino complicados con infección intrauterina y coriamnionitis histológica (Kim y cols., 2004; Ma y cols., 2007).

1. La activación del TLR-4 en modelos *in vitro* de infección intrauterina

La capacidad de respuesta de las membranas corioamnióticas ha sido abordada previamente en nuestro laboratorio y en otros grupos de trabajo, donde el estímulo *in vitro* de las membranas utilizando bacterias vivas como *Candida albicans* (Zaga-Clavellina y cols., 2006a), *Streptococcus grupo B* (Zaga-Clavellina y cols., 2006b), *Escherichia coli* (Zaga-Clavellina y cols., 2007), *Gardnerella vaginalis* (Zaga-Clavellina y cols., 2012) ha demostrado que estos tejidos tienen la capacidad de reconocer y responder de manera tejida específica, secretando diversos moduladores pro-inflamatorios (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) y pro-degradativos (MMP-9 y -2, PGE₂ y Cox-2, ciclooxigenasa tipo 2, enzima catalizadora de la producción de PGs), reproduciendo de manera eficiente las condiciones inflamatorias que ocurren *in vivo* durante un proceso infeccioso intrauterino.

Por otro lado, el estímulo de las membranas utilizando únicamente la endotoxina LPS -molécula reconocida por el TLR-4- ha demostrado ser suficiente para

reproducir el modelo de infección con bacterias Gram negativas (Garcia-Lopez y cols., 2007; Thiex y cols., 2009; Thiex y cols., 2010).

Adicionalmente, la estimulación *in vitro* del epitelio amniótico humano con LPS se traduce en la expresión y translocación de TLR-4 hacia la membrana basal de este tejido (Adams y cols., 2007); en células aisladas del epitelio amniótico humano, la activación de TLR-4 induce el aumento en la secreción de péptidos antimicrobianos como la HBD-2 y -3 tanto en los tejidos (Szukiewicz y cols., 2008; Buhimschi y cols., 2004) como en el líquido amniótico en respuesta a un proceso de corioamnionitis (Soto y cols., 2007).

En trofoblasto humano el estímulo *in vitro* con LPS, induce el incremento significativo de TLR-4 (Deng, 2009) y la síntesis de IL-6, IL-8, IL-1 β y TNF α (Holmlund y cols, 2002).

2. TLR-4/MyD88 funcional, es indispensable para dirigir la respuesta inflamatoria en una infección con *E. coli*

Wang y Hirsh (2003) han demostrado en un modelo de ratones hembra knockout para el TLR-4 C3H/HeJ, que la expresión del receptor funcional es esencial para inducir parto pretérmino. La activación del TLR-4 funcional en respuesta al estímulo con bacterias de la cepa *E. coli* inactivadas por calor, disminuye de manera significativa la expresión a nivel de ARNm de la enzima 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH)-enzima que cataliza el primer paso en la inactivación de las PGs en el miometrio y las membranas corioamnióticas-, la disminución de la

15-PGDH, incrementa la acción de las PGs sobre estos tejidos, provocando la degradación de la colágena y la ruptura de las membranas corioamnióticas.

Recientemente, Adams K.M. y cols. (2008), demostraron en un modelo de primates superiores, que la inoculación intraamniótica con LPS incrementa de manera significativa la expresión de PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, $TNF-\alpha$ e IL-8 en el líquido amniótico así como de IL1- β , $TNF-\alpha$, además de un incremento significativo en la actividad uterina. Estos efectos fueron inhibidos al bloquear el TLR-4 usando un antagonista, que evita el reconocimiento y la activación del receptor en respuesta al estímulo con LPS, lo cual es suficiente para inhibir la cascada de moduladores inflamatorios y factores de degradación que dirigen el trabajo de parto pretérmino inducido por la infección.

Por otro lado Filipovich y cols (2009) han demostrado que MyD88 es una proteína adaptadora esencial en la vía de activación del TLR-4 en respuesta a LPS para inducir parto pretérmino.

3. La P4 como modulador del ambiente inflamatorio en la interfase materno-fetal

Se ha documentado que la P4 inhibe varias proteínas involucradas en la activación intrauterina y el remodelado del cérvix; también la síntesis y expresión de diferentes moduladores pro-inflamatorios asociados al trabajo de parto normal, así como aquellos asociados a infecciones (Szekeres-Bartho y cols., 1996). La expresión de las isoformas A y B del RP ha sido demostrada en la decidua, la placenta y en las membranas fetales, sin embargo en estas últimas aún no ha sido bien caracterizada; Goldman y cols. (2005), reportaron la expresión de las isoformas A y

B en estos tejidos, así como la expresión de una isoforma C de 60 kDa, previamente descrita en otros tejidos y una isoforma de 36 kDa de manera dominante en el epitelio amniótico.

A nivel clínico existen pruebas de que el pre-tratamiento con 17-alfa hidroxiprogestero (17OHP) inhibe de manera significativa el desarrollo de trabajo de parto pretérmino en pacientes con alto riesgo y antecedentes de pérdida gestacional (Meiss, 2003).

Una explicación parcial de como la P4 tiene este efecto se basa en la evidencia experimental, en explantes de decidua tomados previo al inicio de las contracciones, cultivados *in vitro* y tratados con P4, se demostró que esta hormona es capaz de disminuir significativamente la expresión y secreción de las formas inactivas de MMP-2 y MMP-9, efecto revertido por el uso de RU486-compuesto sintético esteroideo que actúa como antagonista de la P4-, indicando que este efecto puede ser mediado por la vía clásica de acción del RP, sobre elementos de respuesta a P4 a nivel genómico (Goldman y cols. 2007).

En cultivos *in vitro* de trofoblastos placentarios, el tratamiento con P4 y acetato de medroxiprogestero (MPA) incrementó de manera significativa la actividad de la 15-PGDH; mientras que el tratamiento con RU486 revierte el efecto de la P4, disminuyendo significativamente la actividad de la 15-PGDH y favoreciendo la actividad de la PGE₂ (Patel y cols. 2003).

La expresión de la isoforma B en estos tejidos está asociada con la modulación del ambiente pro-inflamatorio; en células del epitelio amniótico en cultivo, tratadas

con IL-1 β incrementa de manera significativa la síntesis de PGE₂ e IL-8 y la expresión de ARNm de COX-₂ e IL-8, sin embargo la P4 es capaz de reprimir significativamente la síntesis de estas moléculas (Loudon y cols., 2003). En membranas corioamnióticas en cultivo tratadas con LPS se demostró que el pre-tratamiento con P4 y/o progestinas como 17OHP o MPA inhiben la actividad de marcadores de apoptosis como la caspasa 3 y TNF α inducidos por LPS (Luo y cols., 2010).

Si bien el mecanismo por el cual la P4 regula la respuesta inflamatoria en estos tejidos aún se desconoce, estudios recientes fortalecen la hipótesis de que esta hormona modula la respuesta inmune mediante la inhibición de los TLRs. En un modelo murino de infección/inflamación se demostró que el pre-tratamiento con MPA inhibe de manera significativa los niveles del ARNm de TLR-2, TLR-4, TNF- α , e IL-1 β inducidos por la infusión intrauterina de LPS en cérvix y placenta (Elovitz y Wang, 2004; Elovitz y Mrinalini, 2005; Elovitz y González, 2008). En monocitos humanos obtenidos de sangre de cordón, la P4 disminuyó de manera significativa la secreción de TNF- α e IL-6 producidas en respuesta al estímulo con diferentes patógenos o endotoxinas (*E. coli*, *Streptococcus B*, LPS y Pam3CSK) e inhibió la activación del NF κ B (Giannoni y cols. 2011).

III. Justificación y planteamiento del problema

Si bien existen evidencias clínicas y experimentales de que la P4 puede inducir efectos anti-inflamatorios, el mecanismo mediante el cual esto sucede no ha sido completamente dilucidado. Los antecedentes expuestos indican que esta hormona esteroide juega un papel inmuno-modulador clave durante el embarazo, regulando la síntesis de moduladores pro-inflamatorios que a su vez modulan la síntesis de factores pro-degradativos involucrados directamente en la remodelación del tejido. Estos mecanismos de regulación resultan ser el control –al menos parcial- de la cascada de eventos que desencadenan el inicio y progresión del trabajo de parto.

Tomando en cuenta que los mecanismos que condicionan el inicio de trabajo de parto pretérmino y/o la ruptura prematura de membranas asociados a un proceso infeccioso han sido parcialmente comprendidos, el presente proyecto tiene la intención de evaluar el efecto modulador de la P4 sobre los diferentes elementos de respuesta inmune innata del epitelio amniótico humano estimulado con LPS.

La caracterización del mecanismo de reconocimiento específico de los patógenos a través del TLR-4 y el efecto de la P4 sobre este, permitirá comprender parte de las competencias inmunológicas básicas de este tejido clave en la protección y mantenimiento de la cavidad amniótica como un compartimiento inmunológicamente privilegiado.

IV. Hipótesis

Si la P4 tiene la capacidad de inducir/mantener un ambiente anti-inflamatorio, entonces el pre-tratamiento del epitelio amniótico con P4 inhibirá la síntesis y/o activación del TLR-4/MyD88 y por lo tanto también la secreción de citocinas pro-inflamatorias y péptidos antimicrobianos inducidos por la estimulación con LPS.

V. Objetivo general

Caracterizar el efecto modulador de la P4 sobre la expresión del TLR-4/MyD88 y la secreción de los moduladores pro-inflamatorios TNF- α , IL-6, IL-8, el péptido antimicrobiano HBD-2 y la citocina anti-inflamatoria IL-10 asociados a la activación de TLR-4 por el LPS en el epitelio amniótico humano.

1. Objetivos particulares

- Determinar el patrón de expresión proteica del TLR-4/MyD88 en el epitelio amniótico humano, en condiciones basales, después del estímulo con LPS y el tratamiento con diferentes concentraciones de P4.
- Determinar el patrón de secreción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-8 en el epitelio amniótico humano, en condiciones basales, después del estímulo con LPS y el tratamiento con diferentes concentraciones de P4.
- Determinar los niveles de la citocina anti-inflamatoria IL-10 secretados por el epitelio amniótico humano, en condiciones basales, después del estímulo con LPS y el tratamiento con diferentes concentraciones de P4.
- Determinar la secreción del péptido antimicrobiano HBD-2 por el epitelio amniótico humano en condiciones basales, después del estímulo con LPS y el tratamiento con diferentes concentraciones de P4.

VI. Metodología

1. Muestras biológicas

El uso de las membranas corioamnióticas humanas para este proyecto (No. de registro 212250-06161), fue aprobado por los comités internos de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer IER). Las membranas corioamnióticas utilizadas en todos los experimentos, fueron tomadas una vez que las mujeres accedieron a participar en el estudio y después de haber firmado el consentimiento informado.

En el estudio participaron 15 mujeres embarazadas sanas atendidas en el INPer IER (Tabla 2), con periodo gestacional a término, de producto único, intervenidas por cesárea electiva, sin antecedentes ni signos clínicos de infección intrauterina. Se excluyeron a mujeres embarazadas que padecieran diabetes mellitus, hipertensión arterial, obesidad o que estuvieran bajo algún tratamiento con antibióticos.

Característica	Promedio	Rango
Edad materna en años (\pm DE)	29.69 (5.64)	(23-37)
Edad gestacional en semanas (\pm DE)	38.08 (1.06)	(37-39)
Número de gesta (\pm DE)s	2.5 (0.79)	(1-4)

Tabla 2. Características maternas de la población que participó en el estudio.

Las células mononucleares de sangre periférica ó PBMC (de sus siglas en inglés: peripheral blood mononuclear cells) utilizadas como control positivo en las técnicas de Western blot e inmunohistoquímica, se obtuvieron de un pool de muestras de sangre total de 5 donadores sanos de género masculino.

2. Reactivos

El lipopolisacárido de *E. coli* (055:B5), la progesterona (4-Pregnona-3,20 diona) y el anti-progestágeno RU486 (Mifepristone) fueron comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) con la debida carta responsiva de uso.

3. Procesamiento de las membranas corioamnióticas humanas

Inmediatamente después del nacimiento, las membranas corioamnióticas fueron cortadas a 5-6 cm de distancia del disco placentario y colocadas en un contenedor estéril con medio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, Bethesda, MD) para su transporte al laboratorio.

En el laboratorio, las membranas se procesaron en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar, donde fueron lavadas con solución salina (NaCl 0.9%), para eliminar los residuos de sangre. El amnios se separó manualmente de la coriodecidua con ayuda de pinzas, se cortaron explantes de 12 mm de diámetro. Dos explantes de epitelio amniótico por pozo se cultivaron en cajas de 24 pozos (Corning, St. Lowell, MA) con 500 µl de DMEM libre de hormonas y sin rojo de fenol, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 1% de piruvato de sodio 1 mM y 1% de antibiótico antimicótico (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin y 0.25 µg/ml anfotericina) (Gibco BRL). Los explantes fueron cultivados a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ (Figura 7).

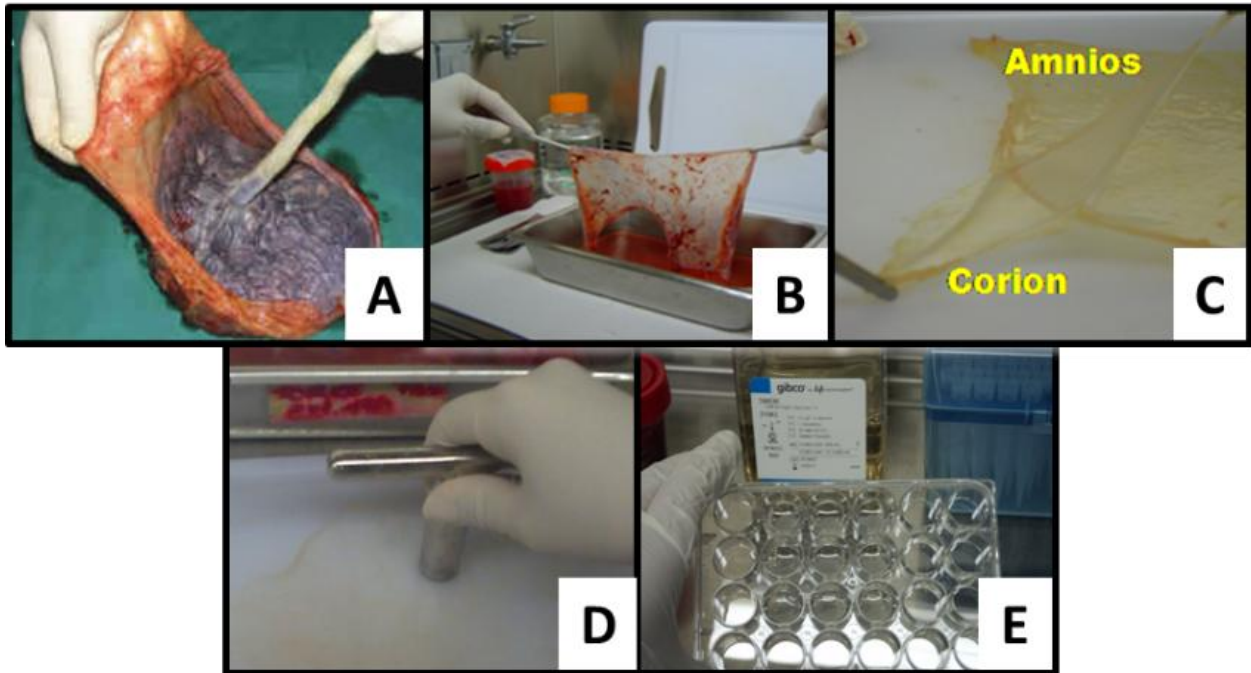


Figura 7. *Procesamiento de Tejidos. A. Toma de la muestra en el quirófano. B. Lavado de membranas en campana de flujo laminar. C. Separación manual del corión y el amnios. D. Corte de los explantes del epitelio amniótico. E. Cultivo de explantes*

4. Viabilidad metabólica de los explantes de epitelio amniótico

Para demostrar que la viabilidad de los explantes no disminuía de manera significativa durante la duración del experimento, se realizó una prueba de viabilidad metabólica utilizando el Kit XTT (Roche Applied Science, Mannheim, DE), este ensayo comercial tiene como fundamento, la reducción de la sal de tetrazolio (XTT) color amarillo a la sal de formazan color naranja, por acción de una deshidrogenasa mitocondrial. La reacción colorimétrica es un indicador de células metabólicamente activas, que se consideran viables.

Este ensayo consistió en mantener los explantes en cultivo durante 96 h, se agregaron 250 μ l de mezcla XTT-acoplador de electrones en una proporción 50:1 a cada pozo a las 0, 24, 48, 72 y 96 h, los cultivos se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂, monitoreando la reacción cada 25 min, el desarrollo máximo de color se observó después de 1 h de incubación. Tiempo en que se recuperaron los medios para la lectura a 450 nm.

5. Estimulación y tratamiento del epitelio amniótico en cultivo

Durante las primeras 24 h de cultivo, los explantes del epitelio amniótico fueron pre-tratados con concentraciones de 1.0, 0.1 y 0.01 μ M de P4. Posteriormente los explantes se lavaron con solución salina y se co-estimularon con 1000 ng/ml de LPS y/o las diferentes concentraciones de P4 durante 24 h. Los explantes también fueron co-tratados con LPS y RU486 en presencia y en ausencia de P4. Como controles adicionales, fueron incluidos el tratamiento solo con P4 y el tratamiento solo con RU486, ambos sin el estímulo con LPS (Figura 8).

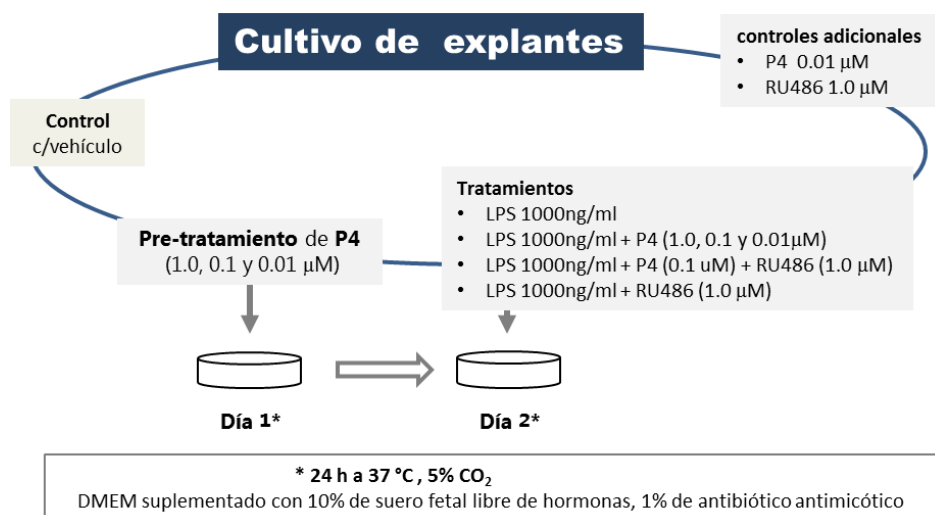


Figura 8. Esquema que muestra las distintas modalidades de tratamientos del epitelio amniótico en cultivo. Cada experimento se realizó por triplicado.

Después de 24 h de co-estimulación y tratamiento de los tejidos, el medio de cultivo de cada tratamiento se recuperó en su totalidad (600 μ l) y se guardó a -40 °C para posteriormente determinar la concentración de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 y HBD-2 por ELISA. Los tejidos recuperados de cada tratamiento fueron pesados para normalizar los valores de ELISA en función del peso de tejido, posteriormente se procesaron para obtener el extracto proteico de la fracción citosólica y/o para hacer inmunohistoquímica.

6. Técnica de Western Blot

Para obtener el extracto de proteínas totales presentes en el tejido, las muestras se congelaron rápidamente a -80 °C en 300 μ l de Cell Extraction Buffer (Invitrogen California, USA) compuesto de: Tris 10 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 1 mM, Na₄P₂O₇ 20 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Tritón X-100 1%, Glicerol 10%, SDS 0.1%, Desoxicolato 0.5%, PMSF 1 mM y 1:1000 de un coctel de inhibidores de proteasas P8340 (Sigma-Aldrich).

Los tejidos se mantuvieron a -80 °C por 2 h, posteriormente se descongelaron, manteniéndolos a 4 °C y se centrifugaron a 14 000 rpm a 4 °C durante 15 min para recuperar el sobrenadante y cuantificar la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976).

Geles al 10% (SDS-PAGE) fueron preparados y en ellos se cargaron 20 μ g/pozo de proteína de cada muestra. La electroforesis se corrió en cámaras Mini-Protean tetra cell (Bio-Rad, Hércules CA) a 120 V durante 1.5 h, posteriormente los geles se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa 0.45 μ m Hybond (GE Healthcare

Limited, Buckinghamshire UK) en cámara Mini Trans-blot (BioRad) a 150 V durante 1 h.

Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con TBS1X (Tris HCl 20 mM pH7.6, NaCl 137 mM) con 3.5% de leche baja en grasa durante 2 h. Posteriormente se retiró la solución de bloqueo, sin realizar lavados se agregó el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-TLR-4 (H-80) (Santa Cruz Biotechnology California, USA) diluido 1:1000 en buffer TBS-Tween 0.05% y 3% de leche baja en grasa y se incubó toda la noche a 4 °C con agitación constante. Terminado el tiempo de incubación la membranas de nitrocelulosa se lavaron cinco veces durante 10 min con TBS-Tween 0.05%.

Una vez concluida la serie de lavados las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con HRP, anti-IgG de conejo (Vector Laboratories, Inc, California, USA) diluido 1:10,000 en buffer de TBS-Tween 0.05% y 3% de leche baja en grasa, con el cual se incubó por 1h a temperatura ambiente; finalmente las membranas se lavaron con TBS-Tween 0.05% y se agregó el reactivo quimioluminiscente Super Signal (Thermo Scientific Pierce, Waltham MA) para revelar la señal en placas de autoradiografía Hyperfilm ECL (GE Healthcare Limited).

7. Técnica de inmunohistoquímica

Para localizar la forma proteica de TLR-4 en el epitelio amniótico, los tejidos controles y tratados se lavaron con solución salina, posteriormente se pasaron por un gradiente del 10 al 30% de sacarosa en PBS 1X con 0.1% de azida de sodio, con el fin de proteger/mantener la integridad estructural del tejido evitando que se

formen cristales dentro del tejido cuando este es congelado. Finalmente los tejidos se congelaron en medio OCT-Tissue-Tek (Sakura Finetek, Inc. Torrance, California, USA) para realizar los cortes en criostato y colocarlos sobre laminillas silanizadas. Inmediatamente los tejidos se descongelaron a temperatura ambiente y se fijaron con acetona a -20 °C por 15 min.

La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó sumergiendo las laminillas en una solución de metanol con 0.05% de peróxido de hidrógeno durante 15 min. Las muestras se lavaron con PBS 1X y la unión inespecífica se bloqueó con una solución de 10% de suero de caballo inactivado y 30% de suero humano inactivado en PBS 1X, durante 1h a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

Las muestras se lavaron y se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo policlonal de conejo anti-TLR-4 (Novus, Littleton, USA) a una concentración de 10 µg/ml. Para el control negativo se utilizó un Isotipo de IgG de conejo (Santa Cruz Biothecnology) a la misma concentración.

Las muestras se lavaron con PBS 1X y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con Biotina anti-conejo (Vector) a una concentración de 10 µg/ml. Posteriormente las muestras se incubaron con el conjugado estreptavidina-peroxidasa por 5 min, finalmente para revelar las proteínas inmunoreactivas se adicionó el sustrato AEC kit (Invitrogen) y se monitoreo el desarrollo de color durante 15 min. La reacción se paró con un lavado de agua destilada durante 5 min, tras el cual se contra-tiñeron los núcleos celulares con hematoxilina de Harris por 30 seg, lavando inmediatamente con agua de la llave y finalmente las muestras se montaron en húmedo con el medio acuoso

Permunt (Fischer Scientific, USA.) dejándose secar para analizarse posteriormente por microscopía de luz.

8. Técnica de ELISA

Para medir la Expresión de MyD88 se utilizó una prueba de ELISA DuoSet (R&D Systems), utilizando como muestras los extractos de proteínas obtenidas a partir del tejido.

La concentración de las citocinas (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10) y el péptido antimicrobiano HBD-2 en los medios de cultivo provenientes de los diferentes tratamientos, se determinaron mediante ensayos de ELISA específicos usando kits comerciales tipo duoset: para las citocinas (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) y para péptidos antimicrobianos (Pepro Tech, Rock Hill, NJ, USA). Las concentraciones de los anticuerpos y recombinantes utilizados para cada ensayo se muestran en la siguiente Tabla:

ELISA	Anticuerpo de captura	Anticuerpo de detección	Curva estándar	Sensibilidad
<i>MyD88</i>	0.4 μ g/ml	200 ng/ml	0.3-20 ng/ml	0.1 ng/ml
<i>TNF-α</i>	4 μ g/ml	250 ng/ml	0.5-10 ng/ml	0.2 ng/ml
<i>IL-6</i>	2 μ g/ml	200 ng/ml	0.5-10 ng/ml	0.2 ng/ml
<i>IL-8</i>	0.5 μ g/ml	100 μ g/ml	15.6-1000 pg/ml	10 pg/ml
<i>HDB-2</i>	2 μ g/ml	0.5 μ g/ml	15.6-1000 pg/ml	10 pg/ml
<i>IL-10</i>	0.25 μ g/ml	200 μ g/ml	31.25-2000 pg/ml	10 pg/ml

Para el procedimiento general de las ELISAS se colocaron 100 μ l del anticuerpo de captura en placas NUNC (Nalgene Nunc, Dinamarca), las placas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente.

Terminando la incubación y para eliminar el exceso de anticuerpo las placas se lavaron con PBS-Tween y la unión inespecífica de los anticuerpos se bloqueó colocando 300 μ l de una solución de albúmina al 1% en PBS 1X a cada pozo, durante 1 h a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con PBS-Tween 20 y se colocaron 100 μ l de cada punto de la curva o de muestra incubando por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se lavaron y se agregaron 100 μ l del anticuerpo de detección a cada pozo. Las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, tras lo cual se retiró el anticuerpo no adherido con lavados de PBS-Tween 20.

Después de los lavados, se agregaron 100 μ l del conjugado estreptavidina-HRP/avidina-HRP a cada pozo, incubando por 20-30 min a temperatura ambiente. Para el desarrollo de color, las placas se lavaron nuevamente con PBS-Tween 20 y se agregaron 100 μ l del sustrato correspondiente ABTS (Peprotech) y H₂O₂-Tetrametilbencidina (R&D Systems), monitoreando la reacción durante 20 min.

La reacción de las placas de los kits de R&D Systems se paró con 50 μ l de una solución 2N de H₂SO₄, la densidad óptica se leyó a 450 nm; las placas de los kits de Peprotech se leyeron a 405 nm.

Los valores crudos de las ELISAs fueron normalizados en función del peso húmedo de los tejidos, dividiendo el valor de la ELISA entre el peso del tejido en mg, para obtener el valor correspondiente al producido por mg de tejido.

9. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó en el programa Sigma Stat 11.0 (Systat Software, California, USA). Las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnoff y Shapiro Wilk fueron aplicadas y posteriormente se realizó una prueba de t-Student para hacer las comparaciones entre los grupos; en los casos en que los datos no pasaron la prueba de normalidad se realizó una prueba de Mann-Whitney U, en ambos casos se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

VII. Resultados

1. Validación del modelo

La prueba de viabilidad metabólica hecha con el sistema colorimétrico XTT demostró que los explantes del epitelio amniótico en cultivo mantienen sus capacidades metabólicas sin cambios significativos durante las 96 h de cultivo (Figura 7).

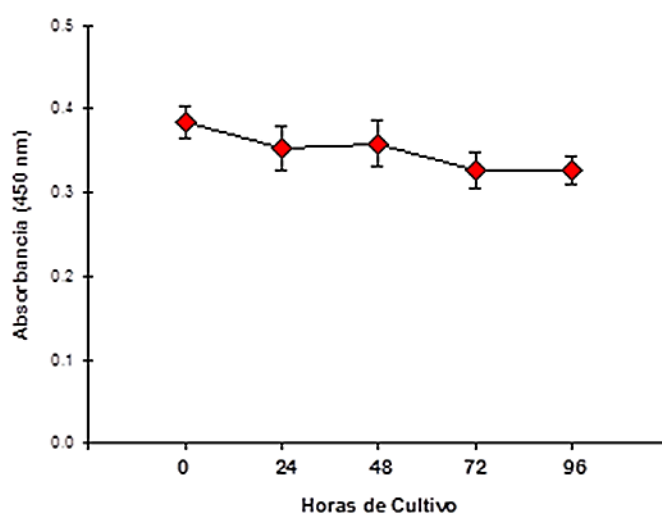


Figura 7. Ensayo de viabilidad de los explantes del epitelio amniótico. La gráfica representa el promedio \pm error estándar, $n=3$ membranas.

Una vez demostrado que los explantes se mantienen metabólicamente viables, se procedió a implementar los diferentes tratamientos al epitelio amniótico, que consistieron básicamente en el pre-tratamiento con P4 en el día 1 de cultivo y el co-tratamiento con P4, LPS y RU486 en el día 2.

2. Efecto de la P4 sobre la expresión del TLR-4/MyD88 en el epitelio amniótico estimulado con LPS

2.1 Expresión del TLR-4 en el epitelio amniótico humano

La expresión de TLR-4 a nivel de proteína medida por medio del western blot, demostró que en comparación con las condiciones basales, estimular el epitelio amniótico con 1000 ng/ml de LPS incrementa la expresión de TLR-4 significativamente. El pre-tratamiento con las tres concentraciones de P4 (1.0, 0.1 y 0.01 μM) es efectivo para disminuir la expresión de la forma proteica del TLR-4 en el epitelio amniótico. El co-tratamiento con RU486 bloquea el efecto de la P4, observándose valores de la expresión del TLR-4 cercanos a los inducidos por el LPS (Figura 8).

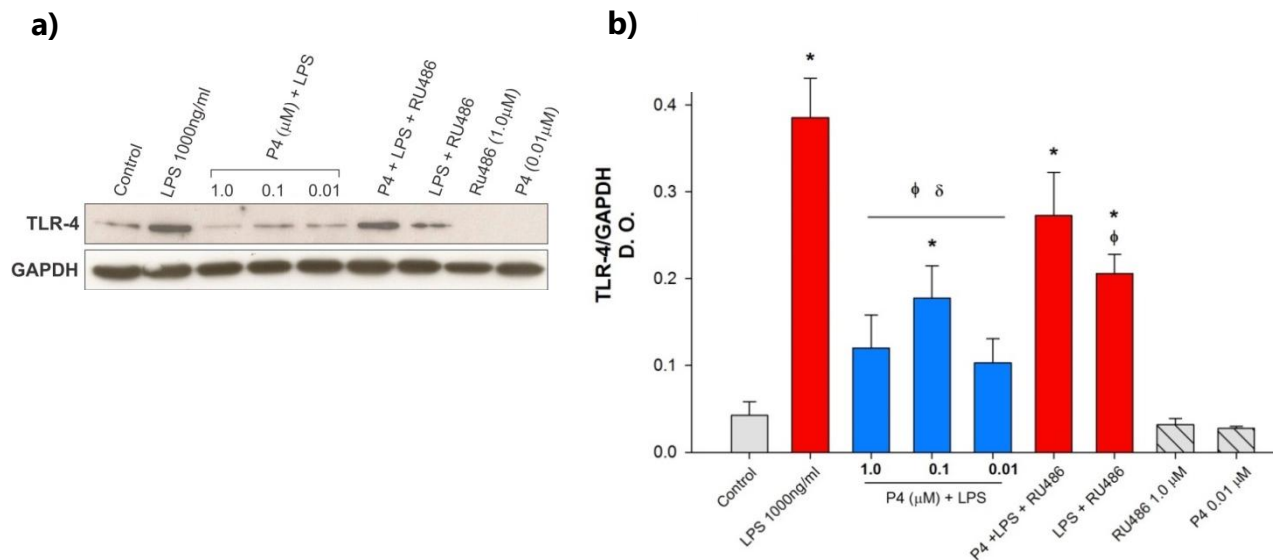


Figura 8. a) Western blot representativo de la expresión del TLR-4 en el epitelio amniótico humano. El peso correspondiente a la señal del TLR-4 fue de 93 kDa y de GAPDH utilizado como control, fue de 36 kDa. **b)** Análisis semicuantitativo de la intensidad óptica de las bandas del western blot. La gráfica representa el promedio \pm error estándar, $n=15$. * $p < 0.05$ vs control, ϕ $p < 0.05$ vs LPS, δ $p < 0.05$ vs P4+LPS+RU486.

2.2 Inmunolocalización de TLR-4

El análisis de la expresión del TLR-4 en cortes de epitelio amniótico confirmó los resultados obtenidos mediante la técnica de Western blot, mostrando que el estímulo con LPS incrementa las formas inmunoreactivas, localizándose la señal en prácticamente todas las células que conforman el epitelio amniótico (Figura 9b). Mientras que el co-tratamiento con P4 a 1.0 (Figura 9c) y 0.01 μM (Figura 9d) inhiben la expresión del TLR-4 en la mayoría de las células. El co-tratamiento con RU486, bloquea el efecto de la P4 sobre la expresión del TLR-4, observándose un incremento de la señal de TLR-4 (Figura 9e).

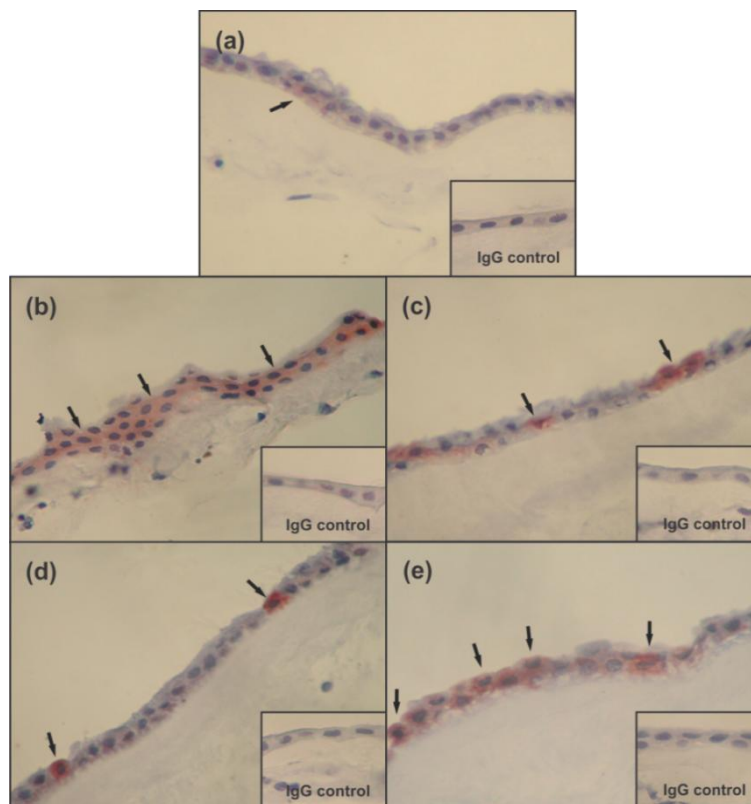


Figura 9. Localización del TLR-4 en tejidos congelados del epitelio amniótico. **a)** Control, **b)** tratamiento con LPS 1000ng/ml, **c)** co-tratamiento con LPS 1000ng/ml y 1.0 μM de P4, **d)** co-tratamiento con LPS 1000ng/ml y 0.01 μM de P4, **e)** co-tratamiento con LPS 1000ng/ml, 0.01 μM de P4 y 1.0 μM de RU486.

2.3 Expresión de MyD88

El patrón de expresión de MyD88 fue similar al observado en la expresión del TLR-4 (Figura 10). Comparado con el control (16.40 ± 5.98 pg/mg de tejido), el tratamiento con 1000 ng/ml de LPS incrementó la expresión de MyD88 4 veces (72.14 ± 9.05 pg/mg de tejido). El pre-tratamiento con las tres concentraciones de P4 (1.0, 0.1 y 0.01 μ M) fue capaz de disminuir la expresión de MyD88 (26.11 ± 6.60 pg/mg de tejido, 49.81 ± 9.60 pg/mg de tejido y 29.50 ± 6.30 pg/mg de tejido respectivamente) inducida por el LPS. El co-tratamiento con P4 y el anti progestágeno RU486 revirtió el efecto de la progesterona (70.61 ± 10.57 pg/mg de tejido).

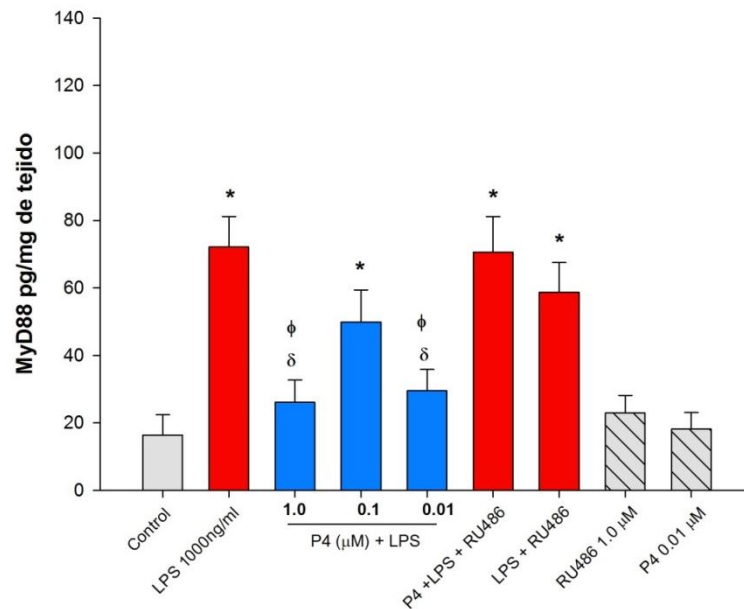


Figura 10. Expresión de MyD88 determinada por ELISA, utilizando el extracto de proteínas citosólicas del epitelio amniótico bajo los diferentes tratamientos. La grafica representa el promedio \pm el error estándar, $n= 15$. * $p < 0.05$ vs control, ϕ $p < 0.05$ vs LPS, δ $p < 0.05$ vs P4+LPS+RU486.

3. Efecto de la progesterona en el patrón de secreción de citocinas pro-inflamatorias

Considerando que la activación del TLR-4 induce la secreción de citocinas pro-inflamatorias, decidimos cuantificar la secreción de TNF- α e IL-6, citocinas que se emplean comúnmente como marcadores de un proceso inflamatorio en las MCH (Cobo y cols., 2009).

3.1 Secreción de TNF- α e IL-6

Los niveles de TNF- α en el control fueron de 0.71 ± 0.11 ng/mg de tejido, casi indetectables, los de IL-6 fueron de 94.45 ± 16.66 pg/mg. La estimulación de los explantes con 1000 ng/ml de LPS indujo un incremento de 32 veces la secreción de TNF- α (22.59 ± 3.74 ng/mg de tejido) y 8 veces la secreción de IL-6.

Las tres concentraciones de P4 (1.0, 0.1 y 0.01 μ M) disminuyeron la secreción de TNF- α inducido por el LPS hasta un 60% (7.15 ± 0.75 ng/mg de tejido, 7.92 ± 0.71 ng/mg de tejido y 8.33 ± 0.87 ng/mg de tejido respectivamente), mientras que la secreción de IL-6 solo disminuyó con las concentraciones de 1.0 y 0.1 μ M de P4 50 y 35% respectivamente (384.08 ± 50.79 pg/mg de tejido y 472.84 ± 34.86 pg/mg de tejido).

El RU486 bloquea el efecto de la P4 induciendo un incremento en la secreción de TNF- α e IL-6 de 17.52 ± 3.35 pg/mg de tejido y 733.14 ± 82.73 pg/mg de tejido, valores similares a los inducidos por el LPS (Figuras 11 y 12).

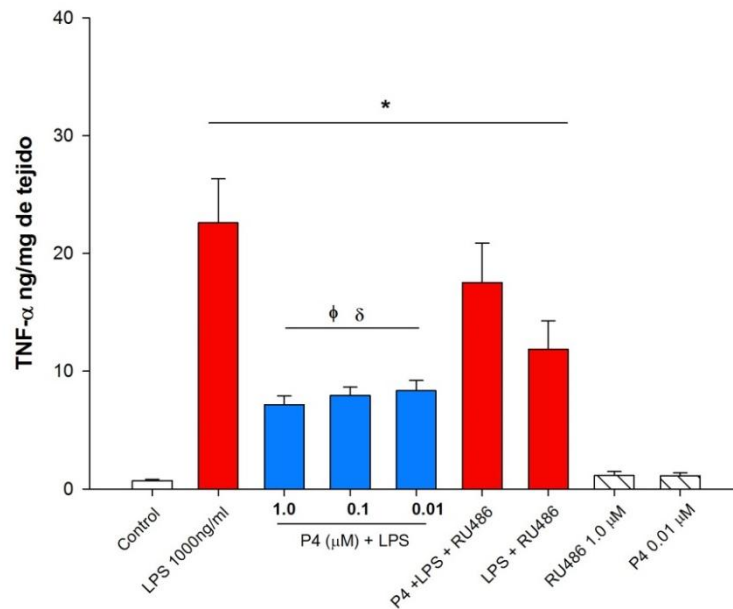


Figura 11. Concentración de TNF- α determinada por ELISA en el medio de cultivo de los explantes del epitelio amniótico en los diferentes tratamientos. La gráfica representa el promedio \pm el error estándar, $n=15$. * $p < 0.05$ vs control, ϕ $p < 0.05$ vs LPS, δ $p < 0.05$ vs P4+LPS+RU486.

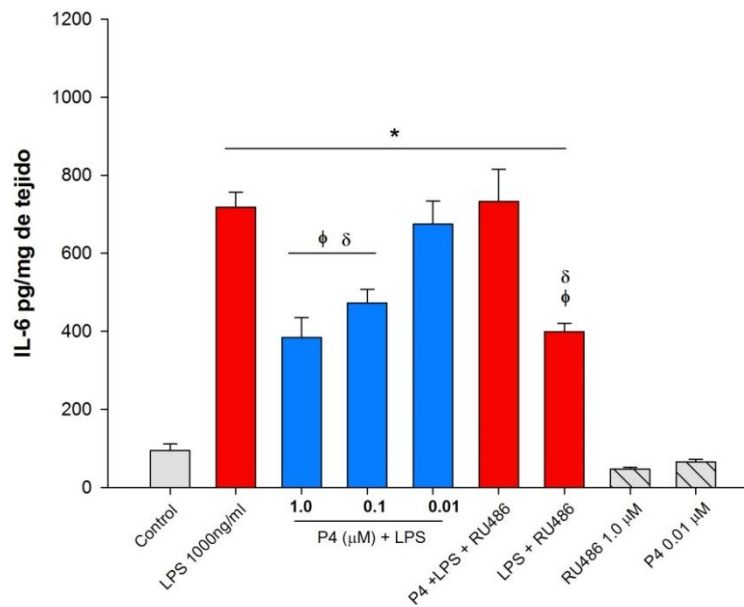


Figura 12. Secreción al medio de cultivo de IL-6 medida por ELISA como respuesta a los diferentes tratamientos aplicados al epitelio amniótico. La gráfica representa el promedio \pm el error estándar, $n=15$. * $p < 0.05$ vs control, ϕ $p < 0.05$ vs LPS, δ $p < 0.05$ vs P4+LPS+RU486.

3.2 Secreción de IL-8

El perfil de secreción de IL-8 secretada al medio se incrementó 3 veces (67.99 ± 9.36 pg/mg de tejido) cuando el epitelio fue estimulado con 1000 ng/ml de LPS, comparado con el control (23.86 ± 5.7 pg/mg de tejido). El pre-tratamiento con 1.0, 0.1 y 0.01 μ M de P4 disminuyó la secreción de IL-8 a niveles cercanos al basal (33.33 ± 4.23 , 30.24 ± 5.70 y 22.03 ± 6.22 pg/mg de tejido respectivamente). La adición de RU486 incrementó 2 veces la secreción de esta quimiocina (61.01 ± 14.60 pg/mg de tejido), revirtiendo el efecto de la P4 (Figura 13).

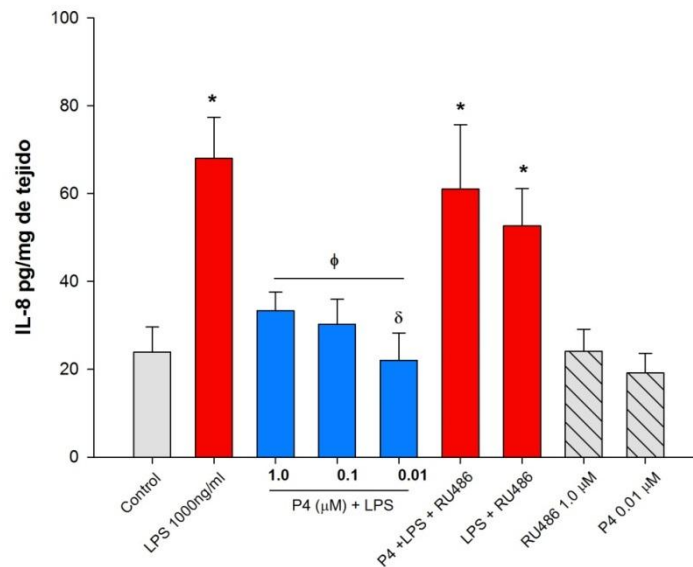


Figura 13. Secreción de IL-8 determinada por ELISA en los explantes del epitelio amniótico en los diferentes tratamientos. La gráfica representa el promedio \pm el error estándar, $n = 15$. * $p < 0.05$ vs control, ϕ $p < 0.05$ vs LPS, δ $p < 0.05$ vs P4+LPS+RU486.

3.3 Secreción IL-10

Comparado con el control (0.88 ± 0.24 pg/mg de tejido), el tratamiento con la endotoxina incrementó 3 veces la secreción de IL-10 (2.51 ± 0.17 pg/mg de tejido), mientras que la P4 fue incapaz de disminuir la secreción inducida por el LPS (Figura 14).

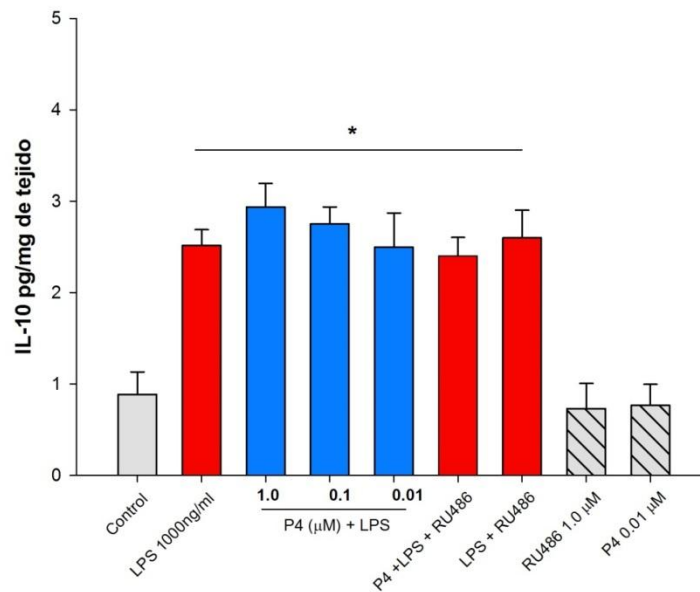


Figura 14. Valores de IL-10 secretados por el epitelio amniótico en los diferentes tratamientos, determinados por ELISA. La grafica representa el promedio \pm el error estándar, $n = 15$. * $p < 0.05$ vs control, $^{\phi} p < 0.05$ vs LPS, $^{\delta} p < 0.05$ vs P4+LPS+RU486.

3.4 Secreción de HBD-2

El estímulo de los explantes del epitelio amniótico con 1000ng/ml de LPS, incrementó la secreción de HBD-2 hasta 5 veces (246.88 ± 21.95 pg/mg de tejido) comparado con el control (50.368 ± 3.78 pg/mg de tejido). La concentración de P4 1.0 μ M fue la más efectiva para disminuir hasta un 50% la secreción de HBD-2 inducida por LPS (123.54 ± 25.34 pg/mg de tejido). El RU486 recuperó el efecto del LPS incrementando la secreción de HBD-2 (273.18 ± 36.43 pg/mg de tejido) (Figura 15).

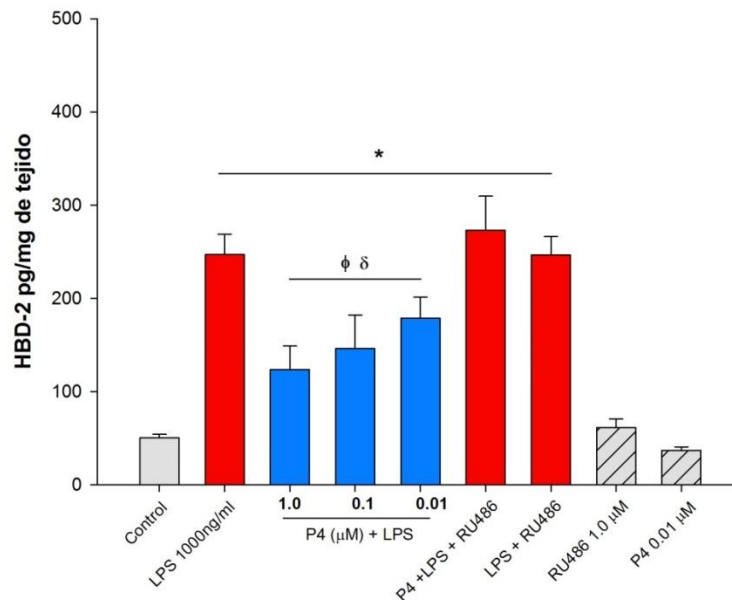


Figura 15. Concentración de HBD-2 medida por ELISA, secretada por los explantes del epitelio amniótico en los diferentes tratamientos. La gráfica representa el promedio \pm el error estándar, $n=15$. * $p < 0.05$ vs control, ϕ $p < 0.05$ vs LPS, δ $p < 0.05$ vs P4+LPS+RU486.

VIII. Discusión

Actualmente, la prevención y comprensión de los mecanismos fisiopatogénicos que condicionan el desarrollo del parto prematuro siguen siendo una prioridad obstétrica y perinatal; si bien esta patología es de origen multifactorial, el desarrollo de un proceso infeccioso a nivel intrauterino es considerado el principal factor causal, ya que la complicación de éste puede ocasionar la infección de la cavidad amniótica y eventualmente del feto. En este contexto, evidencia clínica indica que el uso de antibióticos no es recomendado, ni efectivo para prevenir el desarrollo de esta patología (Subramaniam y cols., 2012).

En este sentido, es poco probable que el patógeno por sí solo ocasione la interrupción del embarazo, puesto que se ha detectado la presencia de bacterias en las membranas corioamnióticas de pacientes con embarazo a término intervenidas por cesárea (Steel y cols., 2005); sin embargo, la respuesta inmune de los tejidos maternos y fetales inducida por el patógeno, parece ser el principal factor que altera el ambiente inmunológicamente privilegiado, activando la cascada de citocinas pro-inflamatorias y PGs incompatibles con el embarazo (Ilievski y cols., 2007).

Durante el embarazo las competencias inmunológicas de las membranas corioamnióticas son claves para entablar una respuesta efectiva frente a distintos agentes patógenos que invaden la cavidad intrauterina, ya que desde el punto de vista anatómico, éstas se encuentran estratégicamente posicionadas entre la cavidad uterina ya contaminada y la cavidad amniótica aún estéril. En estos tejidos el reconocimiento de los patógenos y la eventual respuesta inmunológica es

atribuida a la expresión y activación de los receptores de inmunidad innata de la familia de los TLRs (Abrahams y cols., 2013).

Por otro lado, la P4 tiene como una de sus principales funciones el establecimiento y mantenimiento del embarazo (Astle S y cols., 2003). La administración profiláctica de P4 en mujeres gestantes, se basa en diversos estudios clínicos que han demostrado los beneficios de esta hormona para tratar pacientes con historial de pérdidas gestacionales recurrentes (Daya y cols., 1989; Hussain y cols., 2012) y/o antecedentes de parto pretérmino espontáneo o asociado a cuello cervical corto (<15 mm de longitud) (da Fonseca y cols., 2003, O'Brien y cols., 2009, Fonseca y cols., 2007).

El estudio de las propiedades de la P4 en presencia de un proceso infeccioso durante el embarazo, solo han sido estudiadas en modelos animales. El pretratamiento con P4, después de la infusión de LPS por vía intrauterina en un modelo murino, demostró que la P4 ejerce acciones anti-inflamatorias, al disminuir la secreción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas por el útero, cérvix y placenta (Elovitz y Mrinalini, 2005). Este cambio hacia un ambiente anti-inflamatorio, incrementa la expresión del factor inhibidor de la leucemia (LIF) a nivel del ARNm en el útero. LIF, proteína necesaria para la implantación del blastocisto, disminuye la producción de óxido nítrico, lo que se consiguió disminuir la reabsorción fetal embrionaria inducida por el LPS, prolongando así el embarazo y llevándolo a término en la mayoría de los casos. (Aisemberg J y cols., 2013).

En este trabajo nosotros investigamos el efecto de la P4 sobre la expresión y síntesis de diversos elementos de inmunidad innata del epitelio amniótico humano, asociados al estímulo con LPS de *E. coli*.

Nuestros resultados demuestran que la P4 regula a la baja la expresión del receptor de membrana TLR-4 y de la proteína adaptadora MyD88, así como la secreción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-8 y el péptido antimicrobiano HBD-2, mientras que no mostró efecto alguno sobre la secreción de la citocina anti-inflamatoria IL-10.

La participación del TLR-4 en el reconocimiento del LPS por el epitelio amniótico humano, fue demostrada por Adams y cols., (2007) en un modelo de estimulación *ex vivo* de las membranas corioamnióticas humanas con LPS; el estímulo indujo una translocación del TLR-4 desde la zona apical a la zona basal –en contacto con el corion- de las células del epitelio amniótico, sugiriendo un papel regulador del receptor en el reconocimiento de los patógenos intraamnióticos y una regulación pos-transcripcional del TLR-4 en este tejido.

El presente trabajo demuestra que la estimulación *in vitro* de los explantes del epitelio amniótico humano con LPS incrementó la expresión del receptor, estos resultados son congruentes con datos clínicos que reportan el incremento de la expresión del TLR-4 a nivel de proteína y el ARNm en las membranas corioamnióticas de pacientes diagnosticadas con corioamnionitis histológica, respecto a aquellas pacientes que no presentaron esta patología (Kim y cols., 2004).

Estos resultados indican que TLR-4 es un elemento esencial para la activación de la respuesta inmune, en las membranas corioamnióticas humanas, lo cual es sustentado por los resultados obtenidos de un modelo primate no humano, que demostraron el incremento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias y PGs en respuesta a la estimulación intraamniótica con LPS, misma que puede ser inhibida al bloquear la activación de TLR-4 con un antagonista sintético (TLR-4A), lo que coincide con la disminución significativa de la actividad uterina, convirtiendo a este receptor en una molécula clave que podría ser modulada diferencialmente en el tratamiento del parto pretérmino asociado a infección (Adams y cols., 2008).

Considerando esto último, nosotros estudiamos el efecto de la P4 sobre la expresión del TLR-4, observando que el pre-tratamiento con P4 de los explantes del epitelio amniótico regula a la baja la expresión del TLR-4 inducida por el LPS. Este resultado es respaldado por dos modelos experimentales, uno en monocitos/macrófagos humanos (Srivastava y cols., 2007) y otro en fibroblastos de cérvix humano (Fukuyama y cols., 2012); en los cuales la P4 demostró ser un eficiente regulador/inhibidor de la expresión del TLR-4 inducida por LPS.

Debido al efecto inhibitorio de la P4 sobre el TLR-4 que demostrado en este trabajo, se decidió evaluar si la hormona podría ejercer efectos moduladores sobre la vía de señalización del TLR-4, por lo que se decidió medir la expresión a nivel de proteína de MyD88, una proteína adaptadora clave en la activación de TLR-4 en respuesta a LPS. Los resultados confirman que efectivamente, el tratamiento con LPS incrementa de manera significativa los niveles citoplasmáticos de MyD88 en un patrón muy similar al observado en el TLR-4, sugiriendo que la expresión de ambos elementos está coordinada. Este efecto también ha sido reportado a nivel del

ARNm en leucocitos de sangre periférica de neonatos diagnosticados con infección por bacterias Gram-negativas (Zhang y cols., 2010).

Por otro lado, nuestros resultados demostraron que el pre-tratamiento con P4 disminuye de manera significativa los niveles citoplasmáticos de la proteína de MyD88 comparados con los niveles observados en el epitelio amniótico tratado únicamente con LPS.

El efecto de la P4 sobre MyD88 no ha sido estudiado, existe un solo reporte al respecto en células mononucleares de recién nacidos estimulados con *E. coli*, en donde la P4 no tiene efecto sobre MyD88 a nivel del ARNm ni de proteína (Giannoni y cols., 2011); sin embargo, evidencia experimental ha demostrado que la débil respuesta a LPS de las células inmunes de los recién nacidos está asociada a bajos niveles de expresión del TLR-4 y MyD88 (Yan y cols., 2004).

En este contexto, Filipovich y cols. (2009) utilizando ratones knockout incapaces de expresar MyD88, demostraron que la señalización del TLR-4 dirigida por MyD88 en respuesta a una infección intrauterina con *E. coli*, es necesaria para desarrollar el parto pretérmino.

Las evidencias citadas y los resultados de este trabajo, sugieren que la expresión del TLR-4 y la activación de la cascada de señalización dependiente de MyD88, es un mecanismo fundamental del epitelio amniótico para responder a una infección por bacterias Gram negativas, así mismo sugieren que la P4 es capaz de regular este mecanismo.

Evidencia clínica y experimental sustenta de manera consistente que la secreción masiva y descontrolada de factores pro-inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 por parte de los tejidos maternos y fetales en respuesta a proceso infeccioso altera irreversiblemente el equilibrio inmunológico e induce el encendido del trabajo de parto (Gomez y cols., 1995; Menon y cols., 2004).

Nuestro trabajo demuestra que la estimulación de los explantes del epitelio amniótico con LPS incrementó la secreción de TNF- α , una citocina cuyos niveles son indetectables a lo largo del embarazo normal, y que se incrementan de manera significativa en la cavidad amniótica y en sangre periférica de la madre cuando ésta desarrolla un proceso infeccioso a nivel de la cavidad intraamniótica (Romero y cols., 1989), condición bajo la cual, esta citocina induce la producción de PGs y MMPs en el amnios, la decidua y el miometrio (Romero y cols., 1988).

Modelos experimentales con primates no humanos, proveen importante evidencia de la regulación temporal de la secreción/producción de las citocinas pro-inflamatorias bajo un escenario de infección intrauterina. Estos estudios indican que en respuesta a la infección con patógenos como el *Streptococcus agalactiae* (Gravett y cols., 1994), *E. coli* y/o LPS (Creasey y cols., 1991) TNF- α es la primer citocina en ser secretada, misma que actúa como un modulador clave en la secreción de otras citocinas, entre ellas IL-6 e IL-8 en el líquido amniótico.

Los efectos citotóxicos a nivel celular, tisular y sistémicos de TNF- α han sido ampliamente reportados (Park y cols., 2004; Procianoy 2012). Durante el embarazo, Holmgren y cols., (2008) demostraron en un modelo murino, que el bloqueo de la acción de TNF- α con el uso de un anti-TNF- α disminuye de manera significativa la

muerte fetal y la pérdida gestacional. Adicionalmente se demostró que el bloqueo de la acción de TNF- α coincidió con la disminución significativa en los niveles del ARNm de IL-6 e IL-1 β , lo que confirma el papel clave que tiene TNF- α en el inicio y mantenimiento de la secreción de otros moduladores pro-inflamatorios.

En nuestro modelo, el pre-tratamiento de explantes de epitelio amniótico con P4 inhibió la secreción de TNF- α inducida por el LPS, estos resultados son congruentes con otros estudios en los que la P4 regula la producción de TNF- α inducida por el tratamiento con LPS o *E. coli* en células mononucleares de recién nacidos (Schwartz y cols., 2009; Peltier y cols., 2008).

Un dato relevante sobre el efecto de la P4 en la regulación de TNF- α , ha sido reportado en un trabajo con macrófagos estimulados con LPS, demostrando que la producción de TNF- α puede ser regulada por la P4 vía la inhibición del NF κ B, disminuyendo la producción posiblemente no solo de TNF- α , sino de otras citocinas pro-inflamatorias (Miller y cols., 1996).

IL-6 es una citocina usada por consenso como biomarcador para diagnosticar un proceso de inflamación en un estado asintomático de infección intraamniótica o síndrome de respuesta inflamatoria fetal, ambos, factores de riesgo para desarrollar un parto pretérmino, (Gomez y cols., 1998; Cobo y cols., 2009).

Nuestro estudio indicó que el epitelio amniótico secreta altos niveles de IL-6 en respuesta al estímulo con LPS, lo que confirma lo previamente reportado por Fortunato y cols. (1996). Por otro lado, evidencia experimental indica que la infección *in vitro* de células del amnios humano con *Mycoplasma hominis* y

Streptococo aureus –microorganismos asociados a infección intrauterina– también induce el incremento de IL-6 (Reisenberg y cols., 1997; Reisenberg y cols., 1998).

Por otro lado la pre-tratamiento de los explantes de epitelio amniótico con P4 inhibe de manera significativa la secreción de IL-6 inducida por el tratamiento con LPS. Este efecto de la P4 sobre IL-6 ha sido reportado por Anbe y cols. (2007) en un modelo murino de infusión intraamniótica de LPS; así mismo, Kim y su grupo, (2012) reportaron en fibroblastos cervicales humanos que el incremento en la concentración de IL-6 a nivel del ARNm y proteína inducido por la estimulación con LPS puede ser suprimido por el pre-tratamiento con P4. Esto sugiere que el uso de P4 vaginal puede limitar –parcialmente- la respuesta pro-inflamatoria e inhibir en consecuencia la producción/secreción de prostaglandinas por las células deciduales y amnióticas (Mitchell y cols., 1991).

Otro modulador de interés para nuestro estudio fue IL-8, una quimiocina que participa directamente en la activación de neutrófilos y linfocitos T. Altos niveles de este modulador han sido reportados en líquido amniótico de mujeres con infección intrauterina (Romero y cols., 1991; Hsu y cols., 1998) y parto pretérmino (Saito y cols., 1993; Park y cols., 2005).

Estudios clínicos demostraron que altos niveles de IL-8 en suero materno, líquido amniótico y sangre de cordón umbilical están relacionadas con la presencia de patógenos en la cavidad amniótica (Witt y cols., 2005); los resultados de nuestros experimentos reproducen parcialmente esta condición, ya que demostramos que el estímulo con LPS de los explantes del epitelio amniótico induce una mayor secreción de IL-8; resultado que es sustentado con la utilización de cultivos

primarios de células amnióticas humanas que al ser infectados con *Mycoplasma hominis* y *Streptococo aureus* secretan niveles significativamente altos de IL-8 en comparación con niveles basales (Resisenberg y cols., 1998).

Evidencia experimental adicional demuestra que la secreción de IL-8 por las células del amnios y del corion es regulada por otras citocinas como IL-1 β y TNF- α (Trautman y cols., 1992; Ito y cols., 1994).

Por otro lado, los resultados del presente trabajo demuestran que la P4 tuvo un efecto inhibitor sobre la secreción de IL-8 inducida por el LPS, un efecto similar que también ha sido reportado en células del epitelio amniótico co-tratadas con P4, bloqueando la capacidad de IL-1 β para inducir IL-8 (Luodon y cols., 2003). Si bien nosotros no medimos la producción de IL-1 β porque el amnios no la produce (Bowen y cols., 2002), observamos un efecto del LPS sobre TNF- α otra citocina que regula la secreción de IL-8, de manera simultánea al LPS-como ya describimos anteriormente - la P4 también inhibe la secreción de TNF- α en nuestro modelo, lo cual podría estar relacionado con la disminución de IL-8.

Las citocinas hasta ahora discutidas están relacionadas con la producción de PGs y el ambiente pro-inflamatorio en la interfaz materno-fetal, mientras que la IL-10 fue caracterizada en un inicio como una citocina con funciones anti-inflamatorias; la evidencia actual, indica que en el humano, IL-10 parece tener más bien un papel regulador, pudiendo actuar como una molécula estimuladora o inmunosupresora dependiendo de las condiciones del ambiente inmunológico (Mitchell y cols., 2004).

En el embarazo, IL-10 es reconocida por ejercer efectos anti-inflamatorios, evidencia experimental indica que IL-10 es capaz de inhibir la generación de contracciones uterinas inducidas por IL-1 β en primates no humanos (Sadowsky y cols., 2003).

En el humano, la expresión de IL-10 en los tejidos que componen a la interfase materno-fetal, es mayor en las etapas tempranas del embarazo, disminuyendo hacia el término del mismo (Trautman y cols., 1997), con lo cual las concentraciones de citocinas pro-inflamatorias comienza a predominar hacia el final del embarazo, este cambio en el perfil de las citocinas presentes es necesario para iniciar el trabajo de parto (Hanna y cols., 2000), sugiriendo un papel regulador de IL-10 sobre el ambiente inmunológico asociado al inicio del trabajo de parto.

En este contexto, se ha demostrado que en el ratón, IL-10 ejerce un papel de resistencia a inducir el parto pretérmino inducido por LPS (Robertson y cols., 2006).

Nuestros resultados confirman que la estimulación del epitelio amniótico con LPS induce el incremento significativo de los niveles de IL-10 secretados al medio. Esta respuesta ha sido observada y reportada recientemente por nuestro grupo y la hemos relacionado como parte de un mecanismo de compensación de las membranas para intentar acotar los efectos citotóxicos asociados a la infección con *E. coli* (Zaga-Clavellina y cols., 2007).

Nuestros resultados mostraron que la P4 no tuvo ningún efecto sobre la secreción de IL-10 inducido por LPS en el epitelio amniótico; resultados que sustentan esta idea son los reportados en arterias fetoplacentarias estimuladas con LPS donde la

P4 no inhibe la secreción de IL-10 (Shields y cols., 2005). Esto indica que en presencia de P4, la IL-10 se suma al efecto de la P4 y actúa como un regulador que favorece un ambiente anti-inflamatorio.

En membranas corioamnióticas humanas IL-10 disminuye la producción de TNF- α inducida por LPS (Fortunato y cols., 1997), la secreción de IL-10 parece ser un mecanismo de estos tejidos para modular la inflamación inducida por una infección y mantener un ambiente de tolerancia durante el embarazo. En relación a esto, IL-10 y la P4 tienen un efecto negativo sobre la producción de PGs, MMPs y el ambiente pro-inflamatorio en las membranas corioamnióticas (Fortunato y cols., 2001; Goldman y cols., 2007).

Por último estudiamos la secreción de HBD-2, un péptido con capacidades antimicrobianas, este péptido es secretado por el epitelio amniótico al líquido amniótico de manera basal y puede ser inducido por infección intraamniótica (King y cols., 2007; Stock y cols., 2007), lo que es congruente con el incremento en la secreción de este péptido inducido por el LPS en los explantes del epitelio amniótico que demostró nuestro trabajo.

Nuestros resultados experimentales indican que la P4 fue capaz de inhibir la secreción de HBD-2 inducida por LPS, lo que está sustentado por lo reportado por Han y cols., (2010) quien demuestra exactamente el mismo efecto anti-HBD2 de la P4 en células del epitelio vaginal estimulados por LPS.

En conjunto nuestros resultados demuestran que la P4 tiene un efecto regulador del ambiente inflamatorio en el epitelio amniótico, el co-tratamiento de los

explantas del epitelio amniótico con el anti-progestágeno RU486 bloquea el efecto de la P4, evitando la acción anti-inflamatoria. Estos resultados nos permiten sugerir que los efectos de la P4 sobre el epitelio amniótico, pueden ser mediados por la unión de la P4 al RP a través del mecanismo de acción clásico de la P4, ó bien por la unión al receptor de glucocorticoides (GR), como ha sido demostrado en macrófagos (Jones y cols., 2008).

A la fecha no existen reportes de la existencia de elementos de respuesta a P4 en el promotor del gen de TLR-4, la evidencia experimental sugiere que al menos en macrófagos la P4 puede inhibir la respuesta mediada por TLR-4 inhibiendo la activación del NFkB e incrementando la expresión del ARNm de la proteína supresora de la señalización de citocinas (SOCS1) (Su y cols., 2009). Esta molécula disminuye la expresión del TLR-4 en células inmunes (Baetz y cols., 2004), de modo que la inducción de SOCS en los tejidos fetales, como la placenta y las membranas corioamnióticas por la P4, puede ser un mecanismo complementario de protección inmunológica contra el efecto citotóxico de las citocinas pro-inflamatorias asociadas a un proceso infeccioso (Blumenstein M, 2005).

Es importante señalar que nuestro modelo experimental, al igual que cualquier modelo presenta algunas limitaciones, principalmente el hecho de que estudiamos el efecto de la P4 únicamente en el epitelio amniótico, lo cual representa una pérdida de la respuesta de las membranas corioamnióticas como una unidad funcional, además si bien utilizamos tejidos humanos, nuestros resultados solo pueden ser aplicados a membranas corioamnióticas sanas de edad gestacional a término.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la P4 tiene un efecto modulador sobre los elementos de inmunidad innata del epitelio amniótico, la inhibición del TLR-4/MyD88 –el primer paso en el reconocimiento del patógeno y en el inicio de la respuesta inmune innata- en este tejido y la regulación a la baja de la secreción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 y la quimiocina IL-8, representa un mecanismo novedoso que puede explicar parcialmente el mecanismo por el cual la P4 disminuye el riesgo de parto pretérmino (Figura 16).

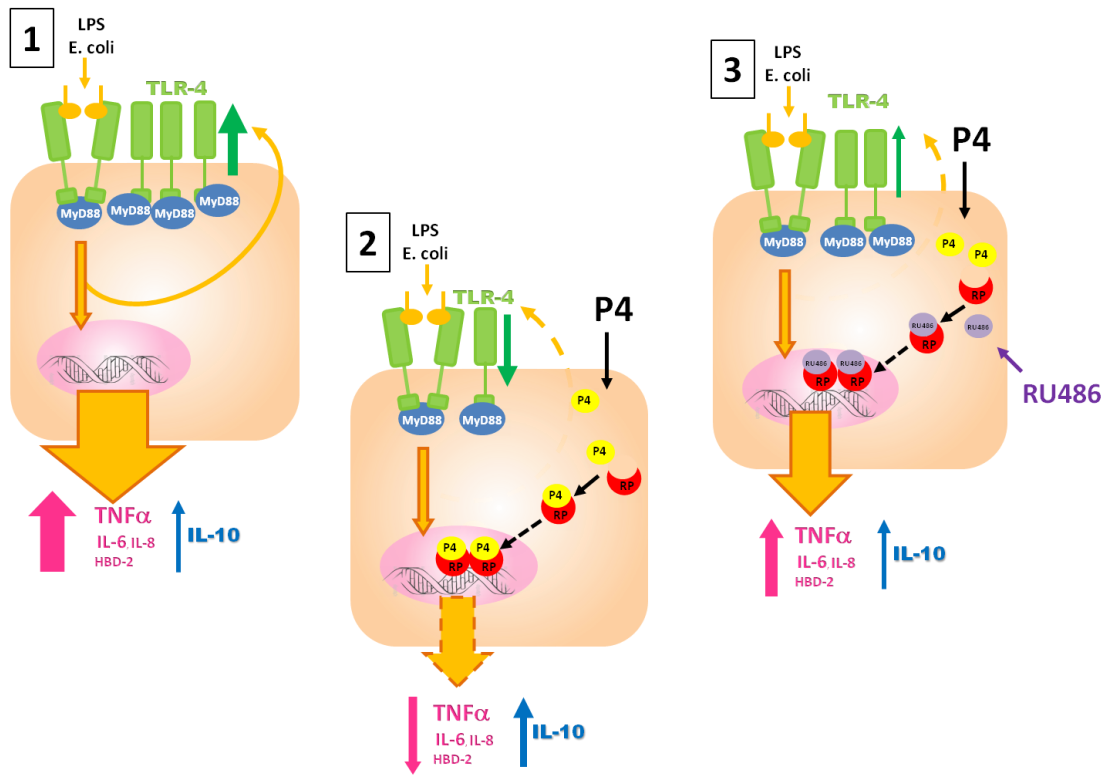


Figura 16. Modelo hipotético de acción de la P4 sobre el TLR-4 en el epitelio amniótico humano. **1.** La activación de TLR-4 por el LPS induce el incremento de citocinas pro-inflamatorias, la HBD-2, la IL-10 e induce el incremento en la expresión del mismo receptor y de MyD88. **2.** La P4 disminuye la secreción de citocinas pro-inflamatorias inducidas por la activación del TLR-4 en respuesta a LPS, pero no tiene efecto sobre IL-10, también disminuye la expresión de TLR-4 y MyD88. **3.** El efecto de la P4 es mediado vía la unión al RP, ya que en presencia de RU486, este antagonista de la P4 revierte el efecto de la hormona sobre los elementos de inmunidad innata del epitelio amniótico humano.

IX. Conclusiones

1. La estimulación del epitelio amniótico humano con LPS induce el incremento en la expresión del TLR-4 y de la proteína adaptadora MyD88 indispensable en la vía de activación de este receptor.
2. El incremento en la expresión/activación del TLR-4 inducido por el LPS coincide con el incremento en la secreción de TNF α , IL-6, IL-8 y HBD-2 al medio por el epitelio amniótico.
3. La P4 inhibe de manera significativa los niveles del TLR-4/ MyD88 inducidos por el LPS.
4. La P4 inhibe de manera significativa los niveles de TNF α , IL-6, IL-8 y HBD-2 inducidos por el LPS.
5. El co-tratamiento con el antagonista de P4, RU486, bloquea el efecto anti-inflamatorios de la P4 en el epitelio amniótico.

X. Perspectivas

Los hallazgos presentados en este trabajo demuestran un importante efecto de la P4 sobre la expresión de TLR4/MyD88 y la cascada de citocinas pro-inflamatorias que caracterizan el ambiente inmunológico asociado al parto pretérmino; sin embargo, son necesarios más estudios para comprender el papel de la P4 en los diferentes tejidos gestacionales humanos durante un proceso de infección.

En este sentido, nuestras perspectivas incluyen estudiar el patrón de expresión de las isoformas A y B del RP y el efecto de la P4 a nivel transcripcional sobre la expresión del ARNm del TLR-4, MyD88 y SOCS1 en el epitelio amniótico estimulado con LPS.

Caracterizar el efecto de P4 en la coriodecidual y posteriormente en un modelo de transwell en el cual la organización estructural de las membranas se mantiene intacta.

Referencias bibliográficas

- **Abrahams VM, Potter JA, Bhat G, Peltier MR, Saade G, Menon R.** Bacterial modulation of human fetal membrane Toll-like receptor expression. *Am J Reprod Immunol.* 2013; 69(1):33-40.
- **Adams KM, Lucas J, Kapur RP, Stevens AM.** *LPS Induces Translocation of TLR4 in Amniotic Epithelium.* *Placenta.* 2007; 28(5-6):477-81.
- **Adams Waldorf KM, Persing D, Novy MJ, Sadowsky DW, Gravett MG.** *Pretreatment with toll-like receptor 4 antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced preterm uterine contractility, cytokines, and prostaglandins in rhesus monkeys.* *Reprod Sci.* 2008; 15(2):121-7.
- **Aisemberg J, Vercelli CA, Bariani MV, Billi SC, Wolfson ML, Franchi AM.** *Progesterone is essential for protecting against LPS-induced pregnancy loss. LIF as a potential mediator of the anti-inflammatory effect of progesterone.* *PLoS One.* 2013; 8(2):e56161.
- **Akira S, Takeda K, Kaisho T.** *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.* *Nat Immunol* 2001; 2:675-680.
- **Albrecht ED, Pepe GJ.** *Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy.* *Endocr Rev.* 1990; 11(1):124-50.
- **Allport VC, Pieber D, Slater DM, Newton R, White JO, Bennett PR.** *Human labour is associated with nuclear factor-kappaB activity which mediates cyclooxygenase-2 expression and is involved with the 'functional progesterone withdrawal'.* *Mol Hum Reprod.* 2001; 7(6):581-6.
- **Anbe H, Okawa T, Sugawara N, Takahashi H, Sato A, Vedernikov YP, Saade GR, Garfield RE.** *Influence of progesterone on myometrial contractility in pregnant mice treated with lipopolysaccharide.* *J Obstet Gynaecol Res.* 2007; 33(6):765-71.
- **Asrat T.** *Intra-amniotic infection in patients with preterm prelabor rupture of membranes.* *Pathophysiology, Detection, and Management.* *Clinic Perinatol* 2001; 28:735-751.
- **Astle S, Slater DM, Thornton S.** *The involvement of progesterone in the onset of human labour.* *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;108(2):177-81.
- **Baetz A, Frey M, Heeg K, Dalpke AH.** *Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells.* *J Biol Chem.* 2004; 279(52):54708-15.
- **Blumenstein M, Keelan JA, Bowen-Shauver JM, Mitchell MD.** *Suppressors of cytokine signaling proteins in human preterm placental tissues.* *J Mol Endocrinol.* 2005; 35(1):165-75.
- **Bradford MM.** *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
- **Bryant-Greenwood GD.** *The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function.* *Placenta* 1998; 19:1-11.

- **Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM.** *The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity.* Am J Obstet Gynecol. 2004; 191(5):1678-87.
- **Boonyaratanakornkit V, Edwards DP.** *Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids.* Semin Reprod Med. 2007;25(3):139-53
- **Bourne GL.** *The anatomy of the human amnion and chorion.* Proc R Soc Med. 1966; 59(11 Part 1):1127-8.
- **Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD.** *Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition.* Placenta. 2002; 23(4):257-73.
- **Chaiworapongsa T, Romero R, Kim JC, Kim YM, Blackwell SC, Yoon BH, Gomez R.** *Evidence for fetal involvement in the pathologic process of clinical chorioamnionitis.* Am J Obstet Gynecol. 2002; 186(6):1178-82.
- **Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ.** *Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm.* Endocr Rev. 2000; 21(5):514-50.
- **Chang J, Jain S, Carl DJ, Paoletta L, Darveau RP, Gravett MG, Adams Waldorf KM.** *Differential host response to LPS variants in amniochorion and the TLR4/MD-2 system in Macaca nemestrina.* Placenta. 2010;31(9):811-7.
- **Cobo T, Palacio M, Navarro-Sastre A, Ribes A, Bosch J, Filella X, Gratacós E.** *Predictive value of combined amniotic fluid proteomic biomarkers and interleukin-6 in preterm labor with intact membranes.* Am J Obstet Gynecol. 2009; 200(5):499.e1-6.
- **Creasey AA, Stevens P, Kenney J, Allison AC, Warren K, Catlett R, Hinshaw L, Taylor FB Jr.** *Endotoxin and cytokine profile in plasma of baboons challenged with lethal and sublethal Escherichia coli.* Circ Shock. 1991; 33(2):84-91.
- **da Fonseca EB, Bittar RE, Carvalho MH, Zugaib M.** *Prophylactic administration of progesterone by vaginal suppository to reduce the incidence of spontaneous preterm birth in women at increased risk: a randomized placebo-controlled double-blind study.* Am J Obstet Gynecol. 2003; 188(2):419-24.
- **Daya S.** *Efficacy of progesterone support for pregnancy in women with recurrent miscarriage. A meta-analysis of controlled trials.* Br J Obstet Gynaecol. 1989; 96(3):275-80.
- **Deng F, Han F, Wu C.** *Expression and immune effect of toll-like receptor 4 in human trophoblast cells.* J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2009; 29(3):359-62.
- **Dudley DJ, Trautman MS, Edwin SS, Ludin-Schiller S, Mitchel MD.** *Biosynthesis of interleukin-6 by cultured human chorion leave cells: regulation by cytokines.* J.Clin Endocrinol Metab 1992; 75:1081-1086.
- **Druckmann R, Druckmann MA.** *Progesterone and the immunology of pregnancy.* J Steroid Biochem Mol Biol. 2005; 97(5):389-96.

- **Duffy DM, Wells TR, Haluska GJ, Stouffer RL.** *The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle.* Biol Reprod. 1997; 57(4):693-9
- **Elovitz M, Wang Z.** *Medroxyprogesterone acetate, but not progesterone, protects against inflammation-induced parturition and intrauterine fetal demise.* Am J Obstet Gynecol. 2004; 190(3):693-701.
- **Elovitz MA, Mrinalini C.** *Can medroxyprogesterone acetate alter Toll-like receptor expression in a mouse model of intrauterine inflammation?.* Am J Obstet Gynecol. 2005; 193(3 Pt 2):1149-55.
- **Elovitz MA, Gonzalez J.** *Medroxyprogesterone acetate modulates the immune response in the uterus, cervix and placenta in a mouse model of preterm birth.* J Matern Fetal Neonatal Med. 2008 Apr; 21(4):223-30.
- **Filipovich Y, Lu SJ, Akira S, Hirsch E.** *The adaptor protein MyD88 is essential for E coli-induced preterm delivery in mice.* Am J Obstet Gynecol. 2009; 200(1):93.e1-8.
- **Fonseca EB, Celik E, Parra M, Singh M, Nicolaides KH.** *Progesterone and the risk of preterm birth among women with a short cervix.* N Engl J Med. 2007; 2;357(5):462-9.
- **Fortunato SJ, Menon RP, Swan KF, Menon R.** *Inflammatory cytokine (interleukins 1, 6 and 8 and tumor necrosis factor-alpha) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations.* Am J Obstet Gynecol. 1996; 174(6):1855-61.
- **Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ.** *Interleukin-10 and transforming growth factor-beta inhibit amniochorion tumor necrosis factor-alpha production by contrasting mechanisms of action: therapeutic implications in prematurity.* Am J Obstet Gynecol. 1997; 177(4):803-9.
- **Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ.** *Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance in vitro: a possible infectious pathway to rupture.* Obstet Gynecol 2000; 95:240-244.
- **Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ, LaFleur B.** *Interleukin-10 inhibition of gelatinases in fetal membranes: therapeutic implications in preterm premature rupture of membranes.* Obstet Gynecol. 2001; 98(2):284-8.
- **Fukuyama A, Tanaka K, Kakizaki I, Kasai K, Chiba M, Nakamura T, Mizunuma H.** *Anti-inflammatory effect of proteoglycan and progesterone on human uterine cervical fibroblasts.* Life Sci. 2012; 90(13-14):484-8.
- **Garcia-Lopez G, Vadillo-Ortega F, Merchant-Larios H, Maida-Claros R, Osorio M, Soriano-Becerril D, Flores-Herrera H, Beltran-Montoya J, Garfias-Becerra Y, Zaga-Clavellina V.** *Evidence of in vitro differential secretion of 72 and 92 kDa type IV collagenases after selective exposure to lipopolysaccharide in human fetal membranes.* Mol Hum Reprod. 2007; 13(6):409-18.
- **Gillaux C, Méhats C, Vaiman D, Cabrol D, Breuiller-Fouché M.** *Functional screening of TLRs in human amniotic epithelial cells.* J Immunol. 2011; 1;187(5):2766-74.

- **Giannoni E, Guignard L, Knaup Reymond M, Perreau M, Roth-Kleiner M, Calandra T, Roger T.** *Estradiol and progesterone strongly inhibit the innate immune response of mononuclear cells in newborns.* Infect Immun. 2011; 79(7):2690-8.
- **Gomez R, Ghezzi F, Romero R, Muñoz H, Tolosa JE, Rojas I.** *Premature labor and intra-amniotic infection. Clinical aspects and role of the cytokines in diagnosis and pathophysiology.* Clin Perinatol. 1995; 22(2):281-342.
- **Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM.** *The fetal inflammatory response syndrome.* Am J Obstet Gynecol. 1998; 179(1):194-202.
- **Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW.** Intrauterine infection and preterm delivery. N Engl J Med. 2000; 342(20):1500-7.
- **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.* Mol Hum Reprod 2005; 11(4):269-277.
- **Goldman S, Shalev E.** *Progesterone receptor profile in the decidua and fetal membrane.* Front Biosci. 2007; 12:634-48.
- **Goldman S, Weiss A, Shalev E.** The effect of progesterone on gelatinase expression in the decidua and fetal membranes before and after contractions. Am J Obstet Gynecol. 2007; 197(5):521.e1-7.
- **Gotkin JL, Celver J, McNutt P, Shields AD, Howard BC, Paonessa DJ, Napolitano PG.** *Progesterone reduces lipopolysaccharide induced interleukin-6 secretion in fetoplacental chorionic arteries, fractionated cord blood, and maternal mononuclear cells.* Am J Obstet Gynecol. 2006; 195(4):1015-9.
- **Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, Edwards JL, Cook MJ, Novy MJ.** *An experimental model for intraamniotic infection and preterm labor in rhesus monkeys.* Am J Obstet Gynecol. 1994; 171(6):1660-7.
- **Han JH, Kim MS, Lee MY, Kim TH, Lee MK, Kim HR, Myung SC.** *Modulation of human beta-defensin-2 expression by 17beta-estradiol and progesterone in vaginal epithelial cells.* Cytokine. 2010; 49(2):209-14.
- **Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury J, Sharma S.** *Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts.* J Immunol. 2000; 164(11):5721-8.
- **Hillier SL, Krohn MA, Kiviat NB, Watts DH, Eschenbach DA.** *Microbiologic causes and neonatal outcomes associated with chorioamnion infection.* Am J Obstet Gynecol. 1991; 165(4 Pt 1):955-61.
- **Holmgren C, Esplin MS, Hamblin S, Molenda M, Simonsen S, Silver R.** *Evaluation of the use of anti-TNF-alpha in an LPS-induced murine model.* J Reprod Immunol. 2008; 78(2):134-9.
- **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):145-51.

- **Hunt JS, Petroff MG, Petroff MG, McIntire RH, Ober C.** *HLA-G and Immune tolerance in pregnancy.* 2005, FASEB J 19:681-693.
- **Hussain M, El-Hakim S, Cahill DJ.** *Progesterone supplementation in women with otherwise unexplained recurrent miscarriages.* J Hum Reprod Sci. 2012; 5(3):248-51.
- **Hsu CD, Meaddough E, Aversa K, Hong SF, Lu LC, Jones DC, Copel JA.** *Elevated amniotic fluid levels of leukemia inhibitory factor, interleukin 6, and interleukin 8 in intra-amniotic infection.* Am J Obstet Gynecol. 1998; 179(5):1267-70.
- **Ilievski V, Lu SJ, Hirsch E.** *Activation of toll-like receptors 2 or 3 and preterm delivery in the mouse.* Reprod Sci. 2007; 14(4):315-20.
- **Ito A, Nakamura T, Uchiyama T, Hirose K, Hirakawa S, Sasaguri Y, Mori Y.** *Stimulation of the biosynthesis of interleukin 8 by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in cultured human chorionic cells.* Biol Pharm Bull. 1994; 17(11):1463-7.
- **Janssens S, Beyaert R.** *Role of Toll-like receptors in pathogen recognition.* Clin Microbiol Rev. 2003; 16(4):637-46.
- **Karalis K, Goodwin G, Majzoub JA.** *Cortisol blockade of progesterone: a possible molecular mechanism involved in the initiation of human labor.* Nat Med. 1996; 2(5):556-60.
- **Keelan JA, Coleman M, Mitchell MD.** *The molecular mechanisms of term and preterm labor: recent progress and clinical implications.* Clin Obstet Gynecol. 1997; 40(3):460-78.
- **Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim GJ, Kim MR, Kuivaniemi H, Tomp G, Espinoza J, Bujold E, Abrahams VM, Mor Gil.** *Toll-like receptor- 2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis.* Am J Obstet Gynecol 2004; 191: 1346-1355.
- **Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, Kim JS, Yoo W, Lee DC, Mittal P, Erez O, Kusanovic JP, Hassan SS, Kim CJ.** *Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection.* Lab Invest. 2009; 89(8):924-36.
- **Kim MG, Shim JY, Pak JH, Jung BK, Won HS, Lee PR, Kim A.** *Progesterone modulates the expression of interleukin-6 in cultured term human uterine cervical fibroblasts.* Am J Reprod Immunol. 2012; 67(5):369-75.
- **King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR.** *Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes.* Placenta. 2007; 28(2-3):161-9.
- **LeMaout J, Zafaranloo K, Le Danff C, Carosella ED.** *HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells.* FASEB J. 2005; 19(6):662-4.
- **Jones LA, Anthony JP, Henriquez FL, Lyons RE, Nickdel MB, Carter KC, Alexander J, Roberts CW.** *Toll-like receptor-4 mediated macrophage activation is*

differentially regulated by progesterone via the glucocorticoid and progesterone receptors. Immunology. 2008; 125: 59–69.

- **Loudon JA, Elliott CL, Hills F, Bennett PR.** *Progesterone represses interleukin-8 and cyclo-oxygenase-2 in human lower segment fibroblast cells and amnion epithelial cells.* Biol Reprod. 2003; 69(1):331-7.
- **Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS.** *LPS/TLR4 signal transduction pathway.* Cytokine. 2008; 42(2):145-51.
- **Luo G, Abrahams VM, Tadesse S, Funai EF, Hodgson EJ, Gao J, Norwitz ER.** *Progesterone inhibits basal and TNF-alpha-induced apoptosis in fetal membranes: a novel mechanism to explain progesterone-mediated prevention of preterm birth.* Reprod Sci. 2010; 17(6):532-9.
- **Ma Y, Krikun 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(10):1024-31.
- **Mazor M, Hershkovitz R, Chaim W, Levy J, Sharony Y, Leiberman JR, Glezerman M.** *Human preterm birth is associated with systemic and local changes in progesterone/17 beta-estradiol ratios.* Am J Obstet Gynecol. 1994; 171(1):231-6.
- **McGregor JA, French JI.** *Review. Bacterial vaginosis in pregnancy.* Obstet Gynecol Surv. 2000; 55(5 Suppl 1):S1-19.
- **Menon R, Fortunato SJ.** *Fetal membrane inflammatory cytokines: a switching mechanism between the preterm premature rupture of the membranes and preterm labor pathways.* J Perinat Med. 2004; 32(5):391-9.
- **Meis PJ, Klebanoff M, Thom E, Dombrowski MP, Sibai B, Moawad AH, Spong CY, Hauth JC, Miodovnik M, Varner MW, Leveno KJ, Caritis SN, Iams JD, Wapner RJ, Conway D, O'Sullivan MJ, Carpenter M, Mercer B, Ramin SM, Thorp JM, Peaceman AM, Gabbe S.** *Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate.* N Engl J Med. 2003; 348(24):2379-85.
- **Mesiano S., Eng-Cheng C., Fitter JT., Kwek K., Yeo G., Smith R.** *Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium.* J Clin Metab. 2002, 87(6):2924-2930.
- **Mikamo H, Sato Y, Hayasaki Y, Kawazoe K, Hua YX, Tamaya T.** *Bacterial isolates from patients with preterm labor with and without preterm rupture of the fetal membranes.* Infect Dis Obstet Gynecol. 1999; 7(4):190-4.
- **Mills AA, Yonish B, Feng L, Schomberg DW, Heine RP, Murtha AP.** *Characterization of progesterone receptor isoform expression in fetal membranes.* Am J Obstet Gynecol. 2006; 195(4):998-1003.
- **Miller L, Hunt JS.** *Sex steroid hormones and macrophage function.* Life Sci. 1996; 59(1):1-14.
- **Mitchell BF, Challis JR, Lukash L.** *Progesterone synthesis by human amnion, chorion, and decidua at term.* Am J Obstet Gynecol. 1987; 157(2):349-53.

- **Mitchell MD, Dudley DJ, Edwin SS, Schiller SL.** *Interleukin-6 stimulates prostaglandin production by human amnion and decidual cells.* Eur J Pharmacol. 1991; 192(1):189-91.
- **Mitchell MD, Simpson KL, Keelan JA.** *Paradoxical proinflammatory actions of interleukin-10 in human amnion: potential roles in term and preterm labour.* J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89(8):4149-52.
- **Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL.** *Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis.* Breast Cancer Res Treat. 2002; 72(2):163-72.
- **Mulac-Jericevic B, Conneely OM.** *Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors.* Reproduction. 2004; 128(2):139-46.
- **Newton ER.** *Preterm labor, preterm premature rupture of membranes, and chorioamnionitis.* Clin Perinatol. 2005; 32(3):571-600.
- **Norman JE, Bollapragada S, Yuan M, Nelson SM.** *Inflammatory pathways in the mechanism of parturition.* BMC Pregnancy Childbirth. 2007; 7 Suppl 1:S7.
- **O'Brien JM, Defranco EA, Adair CD, Lewis DF, Hall DR, How H, Bsharat M, Creasy GW.** *Effect of progesterone on cervical shortening in women at risk for preterm birth: secondary analysis from a multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* Ultrasound Obstet Gynecol. 2009; 34(6):653-9.
- **Oh SY, Kim CJ, Park I, Romero R, Sohn YK, Moon KC, Yoon BH.** *Progesterone receptor isoform (A/B) ratio of human fetal membranes increases during term parturition.* Am J Obstet Gynecol. 2005; 193(3 Pt 2):1156-60.
- **Patel FA, Funder JW, Challis JR.** Mechanism of cortisol/progesterone antagonism in the regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase activity and messenger ribonucleic acid levels in human chorion and placental trophoblast cells at term. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88(6):2922-33.
- **Patni S, Flynn P, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, Thornton CA.** *An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour.* BJOG. 2007; 114(11):1326-34.
- **Patni S, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, Thornton CA.** *Expression and activity of Toll-like receptors 1-9 in the human term placenta and changes associated with labor at term.* Biol Reprod. 2009; 80(2):243-8.
- **Park KH, Yoon BH, Shim SS, Jun JK, Syn HC.** *Amniotic fluid tumor necrosis factor-alpha is a marker for the prediction of early-onset neonatal sepsis in preterm labor.* Gynecol Obstet Invest. 2004; 58(2):84-90.
- **Parry S and Strauus JF.** *Premature rupture of the fetal membranes.* N Engl J Med 1998; 338:663-668.
- **Peltier M.R.** *Immunology of term and preterm labor.* Reprod Biol Endocrinol. Rev.2003; 1:122.
- **Peltier MR, Tee SC, Smulian JC.** *Effect of progesterone on proinflammatory cytokine production by monocytes stimulated with pathogens associated with preterm birth.* Am J Reprod Immunol. 2008; 60(4):346-53.

- **Petroff, M. G., Chen, L., Phillips, T. A., Azzola, D., Sedlmayr, P., and Hunt, J. S.** *B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface.* Biol. Reprod. 2003; 68, 1496–1504
- **Pieber D, Allport VC, Bennett PR.** *Progesterone receptor isoform A inhibits isoform B mediated transactivation in human amnion.* Eur J Pharm 2001; 427:7-11.
- **Piccinni MP.** *T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss.* Reprod Biomed Online. 2006; 13(6):840-4.
- **Pioli PA, Amiel E, Schaefer TM, Connolly JE, Wira CR, Guyre PM.** *Differential expresión of Toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract.* Infect Immun 2004; 72:5799-5806.
- **Procianoy RS, Silveira RC.** *Association between high cytokine levels with white matter injury in preterm infants with sepsis.* Pediatr Crit Care Med. 2012; 13(2):183-7.
- **Reisenberger K, Egarter C, Schiebel I, Obermair A, Kiss H, Lehner R.** *In vitro cytokine and prostaglandin production by amnion cell in the presence of bacteria.* Am J Obstet Gynecol 1997; 176:981-4.
- **Reisenberger K, Egarter C, Knöfler M, Schiebel I, Gregor H, Hirschl AM, Heinze G, Husslein P.** *Cytokine and prostaglandin production by amnion cells in response to the addition of different bacteria.* Am J Obstet Gynecol. 1998; 178(1 Pt 1):50-3.
- **Rezapour M, Bäckström T, Lindblom B, Ulmsten U.** *Sex steroid receptors and human parturition.* Obstet Gynecol. 1997; 89(6):918-24.
- **Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB.** *Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells.* J Biol Chem. 2002; 277(7):5209-18.
- **Robertson SA, Skinner RJ, Care AS.** *Essential role for IL-10 in resistance to lipopolysaccharide-induced preterm labor in mice.* J Immunol. 2006; 177(7):4888-96.
- **Romero R, Mazor M.** *Infection and preterm labor.* Clin Obstet Gynecol. 1988; 31:553-584.
- **Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, Cerami A.** *Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor.* Am J Obstet Gynecol. 1989; 161(2):336-41.
- **Romero R, Ceska M, Avila C, Mazor M, Behnke E, Lindley I.** *Neutrophil attractant/activating peptide-1/interleukin-8 in term and preterm parturition.* Am J Obstet Gynecol. 1991; 165(4 Pt 1):813-20.
- **Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R.** *Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23.* Hum Genet. 1987; 77(3):280-2.
- **Sadowsky DW, Novy MJ, Witkin SS, Gravett MG.** *Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1beta-induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys.* Am J Obstet Gynecol. 2003; 188(1):252-63

- **Saito S, Kasahara T, Kato Y, Ishihara Y, Ichijo M.** *Elevation of amniotic fluid interleukin 6 (IL-6), IL-8 and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term and preterm parturition.* Cytokine. 1993; 5(1):81-8.
- **Schwartz N, Xue X, Elovitz MA, Dowling O, Metz CN.** *Progesterone suppresses the fetal inflammatory response ex vivo.* Am J Obstet Gynecol. 2009; 201(2):211.e1-9.
- **Sennstrom MB, Ekman G, Westergren-Thorsson G, Malmstrom A, Bystrom B, Endresen U, Mlambo N, Norman M, Stabi B, Brauner A.** *Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines.* Mol Hum Reprod 2000; 6:375-381.
- **Shields AD, Wright J, Paonessa DJ, Gotkin J, Howard BC, Hoeldtke NJ, Napolitano PG.** *Progesterone modulation of inflammatory cytokine production in a fetoplacental artery explant model.* Am J Obstet Gynecol. 2005; 193(3 Pt 2):1144-8.
- **Smith R, Mesiano S, McGrath S.** *Hormone trajectories leading to human birth.* Regul Pept. 2002; 108(2-3):159-64.
- **Soto E, Espinoza J, Nien JK, Kusanovic JP, Erez O, Richani K, Santolaya-Forgas J, Romero R.** *Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity.* J Matern Fetal Neonatal Med. 2007; 20(1):15-22.
- **Spencer TE, Burghardth RC, Johnson GA, Bazer FW.** *Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy.* Anim Reprod Sci 2004; 83:537-550.
- **Srivastava MD, Thomas A, Srivastava BI, Check JH.** *Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone.* Leuk Lymphoma. 2007; 48(8):1610-7.
- **Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, Miles L, Duggan P, Reynolds PR, Feldman RG, Sullivan MH.** *Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor.* Pediatr Res. 2005; 57(3):404-11.
- **Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA.** *Natural antimicrobial production by the amnion.* Am J Obstet Gynecol. 2007; 196(3):255.e1-6.
- **Su Li, Yixi Sun, Feng Ma, Pingping Lü, Hefeng Huang, Jun Zhou.** *Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF- κ B activation and enhancing SOCS1 expression.* Immunology Letters. 2009; 125:151-155.
- **Subramaniam A, Abramovici A, Andrews WW, Tita AT.** *Antimicrobials for preterm birth prevention: an overview.* Infect Dis Obstet Gynecol. 2012; 2012:157159.
- **Szekeres-Bartho J, Faust Z, Varga P, Szereday L, Kelemen K.** *The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production.* Am J Reprod Immunol. 1996; 35(4):348-51.
- **Szukiewicz D, Szewczyk G, Pyzlak M, Klimkiewicz J, Maslinska D.** *Increased production of beta-defensin 3 (hBD-3) by human amniotic epithelial cells (HAEC)*

after activation of toll-like receptor 4 in chorioamnionitis. *Inflamm Res*. 2008; 57 Suppl 1:S67-8.

- **Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E.** *Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months.* *Curr Opin Immunol*. 2000. 12(6):731-7.
- **Thiex NW, Chames MC, Loch-Caruso RK.** *Tissue-specific cytokine release from human extra-placental membranes stimulated by lipopolysaccharide in a two-compartment tissue culture system.* *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 7:117.
- **Thiex NW, Chames MC, Loch-Caruso RK.** *Tissue-specific induction of COX-2 and prostaglandins in lipopolysaccharide-stimulated extraplacental human gestational membranes in a 2-chamber transwell culture system.* *Reprod Sci*. 2010; 17(12):1120-9.
- **Timmons B, Akins M, Mahendroo M.** *Cervical remodeling during pregnancy and parturition.* *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21(6):353-61.
- **Trautman MS, Dudley DJ, Edwin SS, Collmer D, Mitchell MD.** *Amnion cell biosynthesis of interleukin-8: regulation by inflammatory cytokines.* *J Cell Physiol*. 1992; 153(1):38-43.
- **Trautman MS, Collmer D, Edwin SS, White W, Mitchell MD, Dudley DJ.** *Expression of interleukin-10 in human gestational tissues.* *J Soc Gynecol Investig*. 1997; 4(5):247-53.
- **Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, Strauss JF.** *92-kd type IV Collagenase (Matrix Metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor.* *Am J Pathol* 1995; 146:148-156.
- **Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP.** *Human progesterone receptor A form is a cell and promoter specific repressor of human progesterone receptor B function.* *Mol Endo* 1993; 7:1244-1255.
- **Wang H, Hirsch E.** *Bacterially-induced preterm labor and regulation of prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of toll-like receptor 4.* *Biol Reprod* 2003; 69:1957-1963.
- **Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP.** *The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells.* *Mol Cell Biol*. 1994; 14(12):8356-64.
- **Witt A, Berger A, Gruber CJ, Petricevic L, Apfalter P, Husslein P.** *IL-8 concentrations in maternal serum, amniotic fluid and cord blood in relation to different pathogens within the amniotic cavity.* *J Perinat Med*. 2005; 33(1):22-6.
- **Yan SR, Qing G, Byers DM, Stadnyk AW, Al-Hertani W, Bortolussi R.** *Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide.* *Infect Immun*. 2004; 72(3):1223-9.
- **Yie SM, Li LH, Li GM, Xiao R, Librach CL.** *Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro.* *Hum Reprod*. 2006; 21(1):46-51.

- **Zaga-Clavellina V, López GG, Estrada-Gutierrez G, Martinez-Flores A, Maida-Claros R, Beltran-Montoya J, Vadillo-Ortega F.** *Incubation of human chorioamniotic membranes with Candida albicans induces differential synthesis and secretion of interleukin-1beta, interleukin-6, prostaglandin E, and 92 kDa type IV collagenase.* Mycoses. 2006a; 49(1):6-13.
- **Zaga-Clavellina V, Merchant-Larios H, García-López G, Maida-Claros R, Vadillo-Ortega FJ.** *Differential secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after selective infection with group B streptococci in human fetal membranes.* Soc Gynecol Investig. 2006b; 13(4):271-9.
- **Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, Espejel-Nuñez A, Flores-Pliego A, Soriano-Becerril D, Maida-Claros R, Merchant-Larios H, Vadillo-Ortega F.** *In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with Escherichia coli in human fetal membranes.* Reprod Biol Endocrinol. 2007; 5:46.
- **Zaga-Clavellina V, Martha RV, Flores-Espinosa P.** *In vitro secretion profile of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6, and of human beta-defensins (HBD)-1, HBD-2, and HBD-3 from human chorioamniotic membranes after selective stimulation with Gardnerella vaginalis.* Am J Reprod Immunol. 2012; 67(1):34-43.
- **Zhang JP, Yang Y, Levy O, Chen C.** *Human neonatal peripheral blood leukocytes demonstrate pathogen-specific coordinate expression of TLR2, TLR4/MD2, and MyD88 during bacterial infection in vivo.* 118. Pediatr Res. 2010;68(6):479-83.

Anexos

1. Abreviaturas

<i>ADN</i>	Acido desoxirribonucleico
<i>ARNm</i>	Acido ribonucleido mensajero
<i>GR</i>	Receptor de glucocorticoides
<i>HBD-2</i>	Beta defensina humana 2
<i>IL-10</i>	Interleucina 10
<i>IL-1β</i>	Interleucina 1 beta
<i>IL-6</i>	Interleucina 6
<i>IL-8</i>	Interleucina 8 (actualmente llamada CXCL8)
<i>LPS</i>	Lipopolisacárido
<i>MEC</i>	Matriz extracelular
<i>MMPs</i>	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
<i>MyD88</i>	Factor de diferenciación mieloide 88
<i>NFkB</i>	Factor nuclear kappa de las células B activadas
<i>P4</i>	Progesterona
<i>PAMPs</i>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<i>PGs</i>	Prostaglandinas
<i>RP</i>	Receptor de progesterona
<i>RP-A</i>	Isoforma A del receptor de progesterona
<i>RP-B</i>	Isoforma B del receptor de progesterona
<i>SOCS 1</i>	Proteína supresora de la señalización de citocinas 1
<i>TLR</i>	Receptor tipo Toll
<i>TLR-4</i>	Receptor tipo Toll-4
<i>TNF-α</i>	Factor de necrosis tumoral alfa

2. Publicación derivada del trabajo de investigación

Progesterone Elicits an Inhibitory Effect upon LPS-Induced Innate Immune Response in Pre-Labor Human Amniotic Epithelium

Pilar Flores-Espinosa^{1,7}, Montserrat Pineda-Torres¹, Rodrigo Vega-Sánchez², Guadalupe Estrada-Gutiérrez³, Aurora Espejel-Nuñez³, Arturo Flores-Pliego³, Rolando Maida-Claros⁴, Yuriria Paredes-Vivas¹, Iyari Morales-Méndez⁵, Irma Sosa-González⁵, Angel Chávez-Mendoza⁶, Verónica Zaga-Clavellina¹

¹Department of Cell Biology, Instituto Nacional de Perinatología 'Isidro Espinosa de los Reyes', Mexico City, Mexico;

²Department of Nutrition Research, Instituto Nacional de Perinatología 'Isidro Espinosa de los Reyes', Mexico City, Mexico;

³Department of Immunobiochemistry, Instituto Nacional de Perinatología 'Isidro Espinosa de los Reyes', Mexico City, Mexico;

⁴Department of Neonatology, Instituto Nacional de Perinatología 'Isidro Espinosa de los Reyes', Mexico City, Mexico;

⁵Department of Infectology, Instituto Nacional de Perinatología 'Isidro Espinosa de los Reyes', Mexico City, Mexico;

⁶Department of Periodontology, Centro Interdisciplinario de Ciencias de la Salud, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico;

⁷Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Keywords

Chorioamnionitis, human amniotic epithelium, inflammation, innate immunity, progesterone, TLR-4

Correspondence

Verónica Zaga-Clavellina, Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes, Montes Urales 800, Lomas Virreyes, D.F. 11000, México.
E-mail: sciencefeedback@gmail.com

Submission June 21, 2013;
accepted September 9, 2013.

Citation

Flores-Espinosa P, Pineda-Torres M, Vega-Sánchez R, Estrada-Gutiérrez G, Espejel-Nuñez A, Flores-Pliego A, Maida-Claros R, Paredes-Vivas Y, Morales-Méndez I, Sosa-González I, Chávez-Mendoza A, Zaga-Clavellina V. Progesterone elicits an inhibitory effect upon LPS-induced innate immune response in pre-labor human amniotic epithelium. *Am J Reprod Immunol* 2014; 71: 61–72

doi:10.1111/aji.12163

Introduction

The maternal–fetal interface is an immunologically unique site that promotes tolerance to the allogeneic fetus, while maintaining host defense mechanisms against possible pathogens. In this context, the

Problem

Infection of human fetal membranes elicits secretion of pro-inflammatory modulators through its innate immune capacities. We investigated the effect of lipopolysaccharide (LPS) and progesterone (P4) upon expression of TLR-4/MyD88, TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, and HBD2 on the human amniotic epithelium.

Method of study

Explants of the human amniotic epithelium were pre-treated with 0.01, 0.1, and 1.0 μM of P4; then cotreated with 1000 ng/mL LPS. TLR-4 was immuno-detected, and concentrations of MyD88, TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, and HBD2 were quantified by ELISA.

Results

P4 significantly reduced the expression of LPS-induced TLR-4/MyD88. LPS increased the concentrations of TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, and HBD2 by factors of 30-, eight, three, three, and fivefold, respectively. P4 at 1.0 μM was the most effective dose to blunt the secretion of TNF α , IL-6, and HBD-2. RU-486 blocks the effect of P4.

Conclusion

P4 inhibited LPS-induced TLR-4/MyD88 and pro-inflammatory factors in the human amniotic epithelium. These results could explain partially how P4 can protect the amniotic region of fetal membranes and generate a compensatory mechanism that limits the secretion of pro-inflammatory modulators, which could jeopardize the immune privilege during pregnancy.

relation between mother and fetus is the result of a very finely tuned relationship between the immune and endocrine system.¹

During gestation, the innate immune system is essential to elicit an immediate immune response against microorganisms as well as a rapid and

efficient recognition of infectious 'non-self' pathogens.² In the maternal–fetal interface, fetal membranes represent a physical and immunologic barrier that protects the sterile amniotic cavity. The amnion is the innermost layer of the membranes, in direct contact with the fetus and amniotic fluid, composed of a single layer of epithelial cells, a basement membrane, and an avascular connective tissue matrix.³

During an infectious process that ascends from the lower genital tract reaching the uterine cavity, the human amniotic epithelium represents the last barrier of the fetal membranes that a pathogen has to breach before contaminating the amniotic fluid and, eventually, the fetus.⁴ On the other hand, endotoxin [lipopolysaccharide (LPS)] from gram-negative bacteria is found in the amniotic fluid in intra-uterine infections associated with the risk for spontaneous premature labor,⁵ bronchopulmonary dysplasia, respiratory distress syndrome,⁶ and abortion.^{7,8}

Progesterone (P4) is an essential steroid hormone in different reproductive events; in mammals, it is produced by the granulosa cells and corpus luteum of the ovary and plays an essential role in establishing and maintaining pregnancy.⁹ Experimental and clinical evidence indicate that P4 has immune suppressive properties and, although reports exist indicating its anti-inflammatory effects, the mechanism of action has not been characterized precisely. However, there are reports that support P4's prevention of the pro-inflammatory process may be exerted through modulation of the host immune response.^{10–12}

Toll-like receptors (TLRs) are a class of transmembrane receptors that represent the first line of recognition and defense in the fetal–maternal interface against bacteria, fungi, and viruses. It plays a key role in the cytokine production and during initiation and/or maintenance of labor.^{13–15}

Infection and inflammation of human fetal membranes (chorioamnionitis) have been associated with an increase in TLR-4 expression¹⁵ and a translocation process of the TLR-4 receptor in the human amniotic epithelium.¹⁶ Experimental evidence obtained from animal models supports that TLR-4 is strongly expressed by the fetal membranes, and its activation is critical for LPS-induced preterm birth.^{17,18}

Ligation of LPS to TLR-4 triggers an intracellular signaling cascade that results in transcriptional activation of genes encoding pro-inflammatory mediators and chemokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, and

IL-8,^{19,20} as well as antimicrobial peptides such as human beta defensins (HBD)-2.²¹ This signaling cascade is compatible with an efficient immune response against pathogens; however, these modulators are incompatible with the continuity of pregnancy as they alter the fine immunologic equilibrium at the maternal–fetal interface.²²

This study was conducted to determine whether P4 can modulate the expression pattern of TLR-4/MyD88 and the secretion pattern of TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, and HBD-2 in pre-labor human amniotic epithelium stimulated with LPS of *Escherichia coli*.

Material and methods

Biological Samples

The Internal Review Board of the Instituto Nacional de Perinatología 'Isidro Espinosa de los Reyes' (INPer IER) in Mexico City approved this study (212250-06161). Participants were recruited from the obstetrics outpatient service of this institution and signed consent form.

Fifteen intact/whole pre-labor fetal membranes were collected from women who underwent elective Cesarean section at term (37–39 weeks). All women were from an urban area of Mexico City, 23–34 years old, previously normotensive, with no history of diabetes mellitus, thyroid, liver, or chronic renal disease.

All women had uneventful pregnancies, with no evidence of active labor, cervical dilation, or loss of the mucus plug. In addition, none had any clinical or microbiological signs of chorioamnionitis or of lower genital tract infection; multifetal pregnancies were excluded from this study.

The fetal membranes were transported to the laboratory in sterile Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 2.5 μ g/mL amphotericin. Microbiological analysis was conducted to preclude the presence of chorioamnion infection. Immediately after delivery, a sterile swab was rolled across randomly selected areas of the fetal membranes. The swabs were rolled onto Columbia agar with 5% sheep blood, which was used as a primary isolation medium for fastidious and non-fastidious aerobic microorganisms.

Appropriate selective media were used for detection of specific pathogens, for example, MacConkey

II agar (*E. coli*), Gardnerella selective agar with 5% human blood (*G. vaginalis*), potato dextrose agar (*C. albicans*), agar with 5% human blood (group B streptococci), and chocolate II agar (*N. gonorrhoeae*).

A CDC anaerobe 5% sheep blood agar plate was streaked to isolate obligate and facultative anaerobes as well as microaerophilic bacteria, using a Gas Pak™ EZ anaerobic system. All culture media were purchased from BD (Franklin Lakes, NJ, USA) and were incubated following manufacturer's instructions. An additional swab was inoculated into urea-arginine LCYO2 broth (BioMerieux, Geneve, SWZ) to detect mycoplasma infection. Only membranes negative for aerobic and anaerobic microorganisms were used for this study.

Reagents

Progesterone (4 pregnene-3,20-dione), LPS (from *Escherichia coli* 055:B5), and RU486 (mifepristone) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA).

Pre-Labor Human Amniotic Epithelium Culture

The human amniotic epithelium and choriodecidua were manually and completely separated; the human amniotic epithelium was rinsed twice with saline solution (0.9% NaCl) and cut into disks (diameter 12 mm) using a biopsy punch. Two pieces of human amniotic epithelium were placed in each well of a 12-well tissue culture plate with 0.6 mL of DMEM (Gibco) without red phenol and supplemented with heat-inactivated and hormone-free 10% fetal calf serum; 1 mM sodium pyruvate and 1X antibiotic-antimycotic solution (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2.5 µg/mL amphotericin) were added to each well. The explants were then incubated under 5% CO₂ in 95% air at 37°C.

Treatment of Human Amniotic Epithelium

The first 24 hr of culture, the explants were incubated in absence (basal control) and presence of three different concentrations (1.0 µM, 10.1 µM, and 0.01 µM) of P4 for 24 hr; after this time, fresh medium was added including costimulations with 1000 ng/mL of LPS plus 0.01, 0.1, and 1 µM of P4. Another set of experiments was included, co-incubating the explants with LPS (1000 ng/mL) plus the highest concentration of P4 (1 µM) and RU-486

(1 µM). Controls were also included using LPS, P4, or RU-486 alone.

After treatments, the tissues were processed: (i) to obtain total protein from cytosolic fraction for Western blot to detect TLR-4 and ELISA to detect MyD88, and (ii) cryopreservation for immunohistochemistry (TLR-4). Culture media were collected to determine the concentrations of TNFα, IL-6, IL-8, IL-10, and HBD-2 by ELISA.

Cytosolic Fraction

Once the treatments were completed, the tissues were weighed and the protein extract was obtained incubating the tissues in 200 µL of cell extraction buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM Na₄P₂O₇, 2 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 1 mM PMSF and 1:1000 protease inhibitor P8340 (Sigma) at -70°C for 2 hr, then the samples were thawed and centrifuged at 11,190 g, 15 min, at 4°C. The total concentration of protein was determined by the method of Bradford.

Western Blotting

Regulatory effects of P4 and LPS upon TLR-4 protein expression were studied by Western blot of the cytosolic fraction. Total protein (20 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 10% gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) under reducing conditions and electrotransferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK) in a buffer containing 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% methanol. After transfer, membranes were incubated at room temperature for 2 hr in TBS (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl) containing 4% fat-free milk. Primary and secondary antibodies were diluted in 1% non-fat milk, 0.05% Tween-20 in TBS.

Membranes were incubated with the polyclonal rabbit anti-human TLR-4 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) and clone H-80 diluted 1:1000 at 4°C overnight under constant agitation. Following multiple washes with TBS-0.05% Tween-20, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibody for 1 hr at room temperature. Detection of HRP-conjugated antibody was performed using West Pico Supersignal (Thermo

Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Chemiluminescence was detected with high performance film (GE Healthcare Limited).

ELISA to Detect MyD88

Quantification of MyD88 in the cytosolic fraction was assessed using a DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The capture anti-human MyD88 antibody was used at 4.0 $\mu\text{g/mL}$, the biotinylated goat anti-human MyD88 antibody was used at 200 ng/mL, and the standard curve was from 0.3 to 20 ng/mL with a sensitivity of 0.1 ng/mL.

Immunohistochemistry

After treatments, the human amniotic epithelium explants were fixed in 4% paraformaldehyde and cryoprotected using a sucrose gradient (10%, 2:1 10–30%; 1:1 10–30%; 1:2 10–30%; 30% three times, 15 min each). Then the tissues were embedded in medium for frozen tissue, OCT-Tissue-Tek (Sakura Finetek, Inc., Torrance, CA, USA). Sections of 10–15 μm were processed for immunohistochemical staining using the polyclonal rabbit anti-human TLR-4 (Novus, Littleton, CO, USA). The antibody was used at 10 $\mu\text{g/mL}$. Normal rabbit IgG control (Santa Cruz Biotechnology, Inc) was used as a negative control. Binding of primary antibodies was detected using biotinylated horse anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA), followed by a streptavidin peroxidase conjugate and 3-amino-9-ethylcarbazole in N,N-dimethylformamide (AEC) color development substrate (Invitrogen). Tissue sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma) and cover-slipped for evaluation through light microscopy.

TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, and HBD-2 Assays

The concentrations of TNF α , IL-6, IL-8, IL-10 (R&D Systems), and HBD2 (Pepro Tech, Rock Hill, NJ, USA) present in cell culture supernatants were determined by ELISA using human-specific duo-set kits according to manufacturer's instructions. Capture antibodies were used at different concentrations: anti-TNF α (4 $\mu\text{g/mL}$); anti-IL6 (2 $\mu\text{g/mL}$), anti-IL8 (0.5 $\mu\text{g/mL}$), anti-IL10 (2 $\mu\text{g/mL}$), and anti-HBD-2 (0.25 $\mu\text{g/mL}$).

For TNF- α assay, a standard curve was developed from 0.5 to 10 ng/mL with a sensitivity of 0.2 ng/

mL; for the IL-6 assay, the curve was linear from 0.5 to 10 ng/mL with a sensitivity of 0.2 ng/mL. The curves for IL-8 and HBD-2 were from 15.6 to 1000 pg/mL with a sensitivity of 10 pg/mL; for IL-10, the curve was from 31.25 to 2000 pg/mL with a sensitivity of 10 pg/mL.

Statistical Analyses

Descriptive statistics (mean, standard deviation, standard error, median, and range) were obtained for each variable. Data distribution was tested for normality using Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests. When distribution was normal, Student's *t*-test was used to analyze for differences among groups. Mann–Whitney *U*-test was used when data were not normally distributed. In each case, a *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using SPSS 17 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Bars in the graphs represent mean values and standard error of the mean (S.E.M.).

Results

Pattern of Expression of TLR-4/MyD88

Western blot analysis of the cytosolic fractions indicated that stimulation of human amniotic epithelium explants with 1000 ng/mL of LPS up-regulated TLR-4 expression. The three concentrations of P4 were effective to inhibit TLR-4 expression. Costimulation with RU-486 blocked the effect of P4 and increased the expression of this receptor (Fig. 1).

The level of MyD88 in the cytosolic fraction measured by ELISA indicated that this adaptor molecule displayed a pattern of expression similar to TLR-4. In comparison with the basal level (16.4 ± 5.98 pg/mg of tissue), LPS-induced fourfold increases (72.14 ± 9.05 pg/mg of tissue). Only 1 and 0.01 μM of P4 decreased in a significant manner [threefold (26.11 ± 6.60 pg/mg of tissue) and 2.5-fold (29.5 ± 6.30 pg/mg of tissue), respectively], the concentration of this protein in the tissue (Fig. 2).

Immunohistochemistry confirmed the Western blot results and revealed an increase in TLR-4 immunoreactive forms after stimulation with LPS, the strongest TLR-4 signal being localized in the nucleus, cytoplasm, and cell membrane (Fig. 3b). In comparison with tissues stimulated with LPS, costimulation with 1.0 μM P4 (Fig. 3c) and 0.01 μM P4 (Fig. 3d)

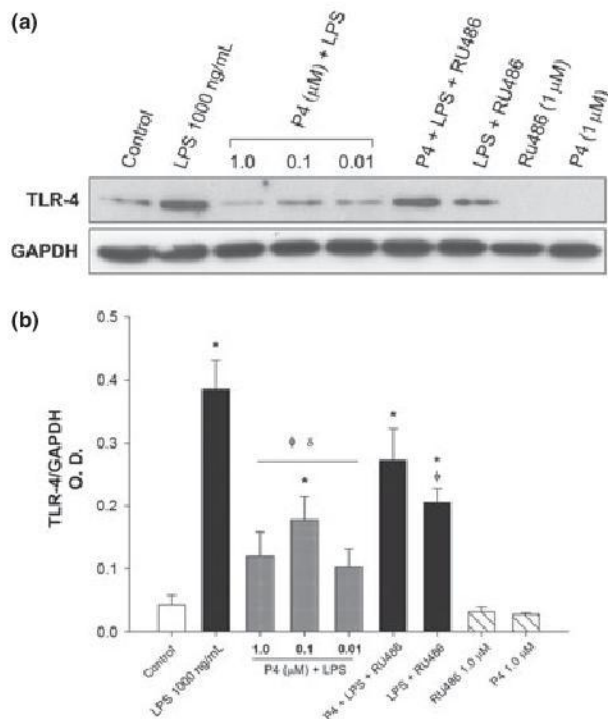


Fig. 1 TLR-4 pattern expression in human amniotic epithelium explants by Western blotting. (a) A positive band corresponding to TLR-4 protein was seen at 93 kDa and to GAPDH at 36 kDa. The densitometric analysis (b) shows that the expression of TLR-4 was up-regulated after treatment with LPS. P4 treatment inhibits the LPS-induced TLR-4 expression. Cotreatment with RU-486 blocks the effect of P4. Data represent means \pm S.E.M., $P \leq 0.05$ * versus control; ϕ versus LPS treatment; δ versus P4 + LPS + RU486 treatment.

decreased the expression of immunoreactive forms of TLR-4. Addition of RU-486 blocked the effect of P4 and increased the expression of TLR-4 (Fig. 3e).

Secretion Profile of TNF α

In comparison with the basal level (0.71 ± 0.11 ng/mg of tissue), stimulation of the human amniotic epithelium explants with 1000 ng/mL of LPS induced a significant 30-fold increase (22.6 ± 3.74 ng/mg of tissue, $P \leq 0.05$) of TNF α concentration in the culture medium. Costimulation with 1.0, 0.1, and 0.01 μ M of P4 decreased fold- (7.15 \pm 0.75 ng/mg of tissue), 2.8- (7.92 ± 0.71 ng/mg of tissue), and 2.7-fold (8.33 ± 0.87 ng/mg of tissue) the concentration of this cytokine, respectively. Costimulation with 1 μ M RU486 reverted the effect of P4, increasing two times (17.52 ± 3.35 ng/mg of tissue) the concentration of TNF α (Fig. 4).

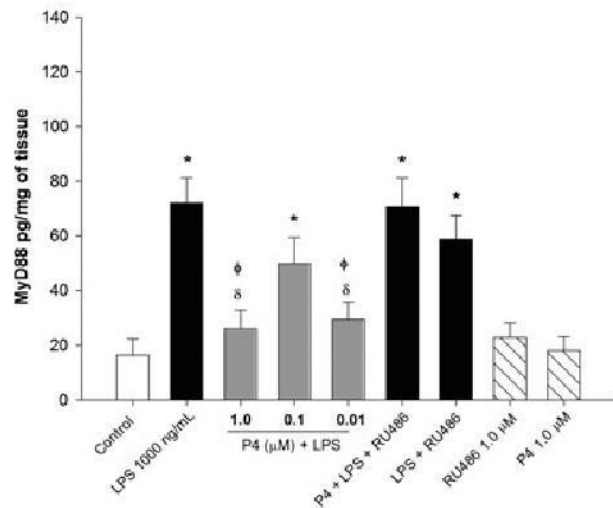


Fig. 2 *In vitro* concentration profile of MyD88 in human amniotic epithelium explants. MyD88 was measured in the nuclear fraction of the explants from basal control and different modalities of stimulation. Data represent means \pm S.E.M. of 15 independent experiments performed in triplicate. $P \leq 0.05$ * versus control; ϕ versus LPS treatment; δ versus P4 + LPS + RU486 treatment.

Secretion Profile of IL-6

Compared with basal outputs (94.45 ± 16.66 pg/mg of tissue) by human amniotic epithelium explants, stimulation with LPS increased eightfold (718.40 ± 37.91 pg/mg of tissue) the concentration of IL-6. Costimulation with LPS and 1.0 and 0.1 μ M of P4 inhibited significantly ($P \leq 0.05$) IL-6 secretion [2.0- (384.08 ± 50.79 pg/mg of tissue) and 1.5-times (472.84 ± 34.86 pg/mg of tissue), respectively]. Co-incubation with the antiprogestagen, RU-486, induced a twofold increase in IL-6 concentration (Fig. 5).

Secretion Profile of IL-8

Stimulation of the amnion epithelium with LPS enhanced IL-8 secretion by threefold (67.99 ± 9.36 pg/mg of tissue). Costimulation with 1.0, 0.1, and 0.01 μ M of P4 decreased in a significant way the secretion of LPS-induced IL-8 [two (33.33 ± 4.23 ng/mg of tissue), two (30.24 ± 5.70 ng/mg of tissue), and threefold (22.03 ± 6.22 ng/mg of tissue)], respectively; addition of 1 μ M RU-486 increased twofold the concentration of this cytokine in the culture medium (Fig. 6).

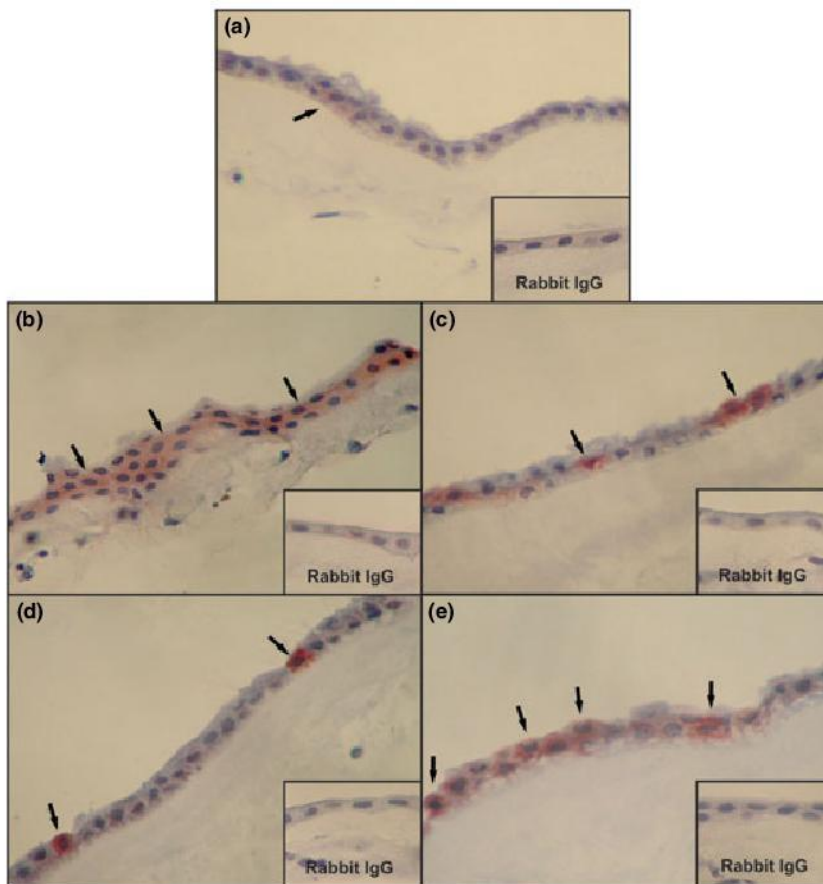


Fig. 3 Immunoreactivity of TLR-4 in human amniotic epithelium explants. Panel a shows a non-stimulated control membrane (40X). Panel b shows TLR-4 immunoreactive forms in the human amniotic epithelium stimulated with 1000 ng/mL of LPS for 24 hr. Panel c and d show the pattern of expression of TLR-4 after cotreatment of the amnion epithelium with LPS and 1 μ M P4 and LPS plus 0.01 μ M P4, respectively. Panel e shows the pattern of TLR-4 expression in explants stimulated with LPS + P4 + RU486.

Secretion Profile of IL-10

Compared with basal outputs (0.88 ± 0.24 pg/mg of tissue), stimulation of amniotic epithelium explants with 1000 ng/mL of LPS enhanced IL-10 secretion around 4 times (2.51 ± 0.17 pg/mg of protein). Regardless of the concentration, co-incubation with P4 did not suppress significantly the levels of LPS-induced secretion of IL-10 (Fig. 7).

Secretion Profile of HBD-2

LPS stimulation increased fivefold (246.8 ± 21.95 ng/mg of protein) the concentration of HBD-2 in comparison with basal level (50.36 ± 3.78 ng/mg of protein). Costimulation with 1 μ M P4 was the most effective to inhibit HBD-2, reduced 50% (123.54 ± 25.34 ng/mg of protein) the secretion of this peptide in comparison with LPS alone. The addition of 1 μ M RU-486 increased twofold the concentration of this defensin in the culture medium (Fig. 8).

Discussion

Microbial invasion of the amniotic cavity is a pathological condition associated with a robust intra-amniotic inflammatory response and acute histologic chorioamnionitis.²³ The traditional paradigm outlines that microorganisms from the lower genital tract cross intact membranes to gain access to the amniotic cavity;⁴ however, recent evidence indicates that, in some cases, bacterial infiltration into amnion epithelial cells is a primary mode of bacterial propagation into the chorioamniotic membranes.²⁴ In both scenarios, immunologic competence of the amniotic epithelium is required to respond against pathogens and protect the fetus.

The human amniotic epithelium is minimally vascularized; hence, its immunologic properties have been attributed partly to the innate immune system. During the course of this study, we investigated the effect of P4 on term human amniotic epithelium stimulated with LPS. P4 was found to down-regulate the synthesis and expression of TLR-4 and its

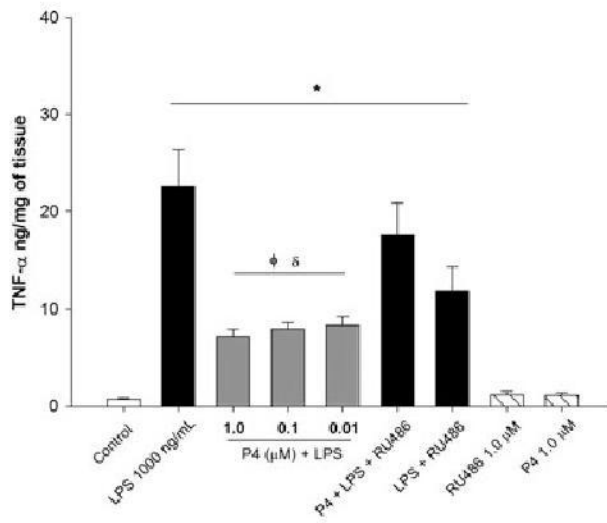


Fig. 4 *In vitro* secretion profile of TNF α in human amniotic explants. TNF α was measured in the culture medium from basal control and different modalities of stimulation. Data represent means \pm S.E.M. of 15 independent experiments performed in triplicate. $P \leq 0.05$ * versus control; ϕ versus LPS treatment; δ versus P4 + LPS + RU486 treatment.

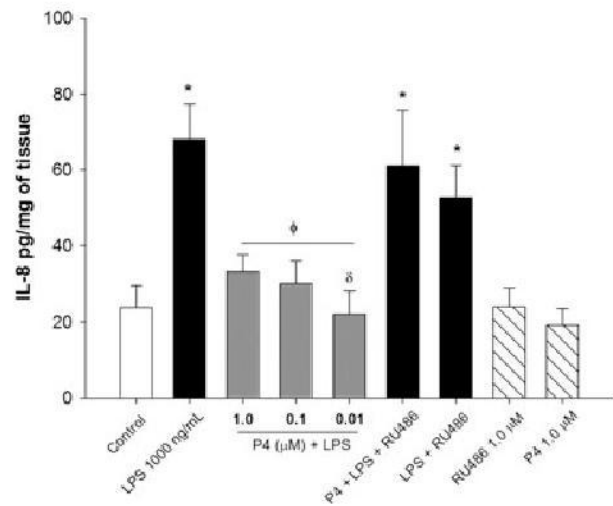


Fig. 6 *In vitro* secretion profile of IL-8 in human amniotic explants. IL-8 was measured in the culture medium from basal control and different modalities of stimulation. Data represent means \pm S.E.M. of 15 independent experiments performed in triplicate. $P \leq 0.05$ * versus control; ϕ versus LPS treatment; δ versus P4 + LPS + RU486 treatment.

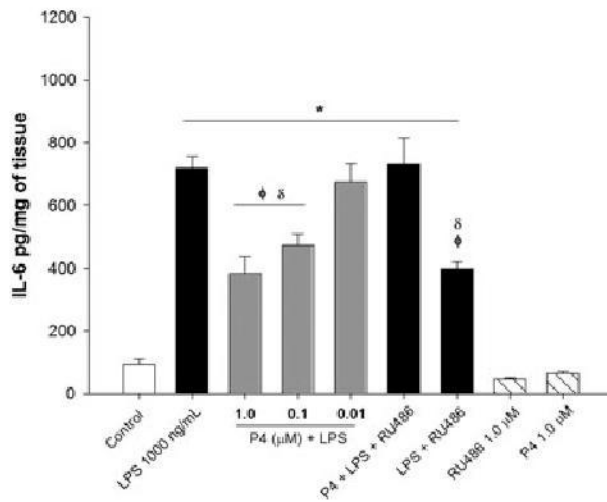


Fig. 5 *In vitro* secretion profile of IL-6 in human amniotic explants. IL-6 was measured in the culture medium from basal control and different modalities of stimulation. Data represent means \pm S.E.M. of 15 independent experiments performed in triplicate. $P \leq 0.05$ * versus control; ϕ versus LPS treatment; δ versus P4 + LPS + RU486 treatment.

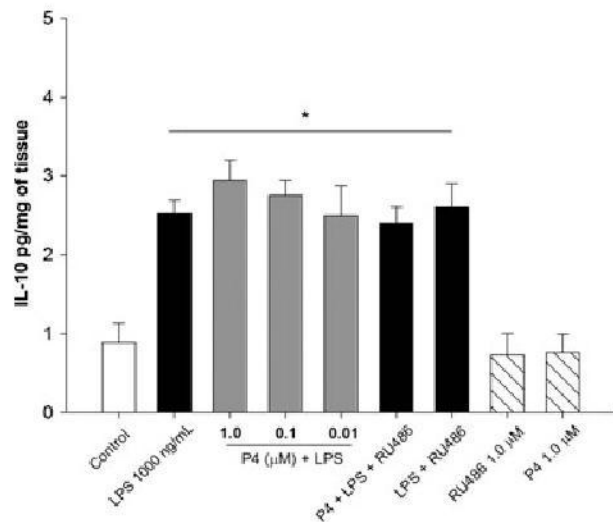


Fig. 7 *In vitro* secretion profile of IL-10 in human amniotic explants. IL-10 was measured in the culture medium from basal control and different modalities of stimulation. Data represent means \pm S.E.M. of 15 independent experiments performed in triplicate. $P \leq 0.05$ * versus control.

adaptor protein MyD88, and to inhibit the secretion of pro-inflammatory cytokines TNF α , IL-6, IL-8, and the antimicrobial peptide HBD-2, but not the anti-inflammatory IL-10.

During an infectious process, the amnion region secretes pro-inflammatory modulators such as TNF α , IL-6, IL-8^{1,4,5,25} and antimicrobial peptides such as HBD-2,²⁶ representing the first line of defense

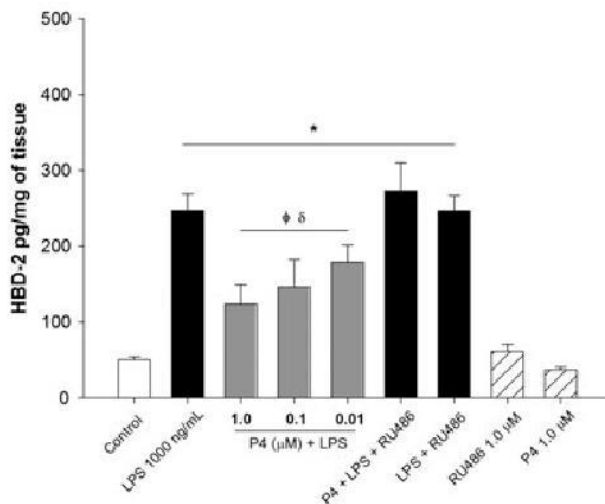


Fig. 8 *In vitro* secretion profile of HBD-2 in human amniotic explants. HBD-2 was measured in the culture medium from basal control and different modalities of stimulation. Data represent means \pm S.E.M. of 15 independent experiments performed in triplicate. $P \leq 0.05$ * versus control; ϕ versus LPS treatment; δ versus P4 + LPS + RU486 treatment.

against different microbial insults; however, these immune molecules are incompatible with pregnancy continuity because they alter the fine equilibrium of the immune milieu in the maternal–fetal interface.²²

On the other hand, P4 has been recognized as essential for the establishment and maintenance of pregnancy.²⁷ In humans^{28–30} and animals,³¹ supplementation with P4 has been shown to be effective in preventing preterm labor. Although the P4 mechanism has not been completely explained, there is evidence that this steroid hormone has a clear effect on the innate and adaptive immune system by displaying anti-inflammatory effects.^{32,33}

The present results indicate that LPS up-regulates the expression of TLR-4 protein in the human amniotic epithelium, which is concurrent with evidence indicating that mRNA and the protein of TLR-4 are significantly higher in the human amniotic epithelium of chorioamniotic membranes of patients with chorioamnionitis than in patients without this condition.¹⁵

Using a murine model, it has been demonstrated that TLR-4 controls the magnitude of the LPS-induced cytokine response during the perinatal period,³⁴ which is supported by results indicating that the pre-treatment with the TLR-4 antagonist inhibits LPS-induced preterm uterine contractility, pro-inflammatory cytokines, and prostaglandins in rhesus monkeys.¹⁷

In this work, we also demonstrated that cotreatment with P4 down-regulates the expression of LPS-induced TLR-4, an effect that is blocked by RU-486. These results suggest that P4 could be acting through both the progesterone (PR) and the glucocorticoid receptors (GR), which has been demonstrated in macrophages.³²

Immunomodulatory capacities of P4 have been supported by different studies, including those that indicate that the intra-uterine infusion of LPS in a mouse model induces up-regulation of TLR-4 messenger RNA in the uterus, cervix, and placenta, an effect that is inhibited by the pre-treatment with the synthetic progestin, medroxyprogesterone acetate (MPA).³⁵

Experimental evidence about the possible mechanisms by which P4 can modulate TLR-4 indicates that P4 inhibits TLR-4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF- κ B activation and enhancing suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) expression.³³

Our results are similar to those obtained from other experimental models, such as cultured fibroblasts from human uterine cervix³⁶ and human monocytes,³⁷ in which P4 was shown to be a potent inhibitor of LPS-stimulated TLR-4 expression at the protein level.

On the other hand, the present results indicate that LPS stimulation of the human amniotic epithelium up-regulated the expression of MyD88, which has been reported also in human neonatal peripheral blood leukocytes infected with gram-negative bacteria³⁸ and in a rat model of intra-uterine inflammation.³⁹

In this study, we also demonstrated that following stimulation of TLR-4 with LPS and cotreatment with P4 there was a significant reduction in the expression of MyD88 at the protein level. This adapter protein initiates a signaling cascade, leading to NF- κ B activation and the subsequent production of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines, chemokines, and costimulatory molecules.⁴⁰ There are not many references about the effect of P4 on MyD88; however, Giannoni et al.,⁴¹ showed that P4 did not alter TLR-4/MyD88 at the protein level in mononuclear cells of newborns.

The present work indicates that stimulation of the human amniotic epithelium with LPS up-regulates the synthesis and secretion of TNF α . This is a key pro-inflammatory cytokine in term and preterm labor⁴ that is secreted by chorioamniotic membranes as part of the response against infection with live gram-nega-

tive microorganisms⁴² and is secreted by the amnion region after stimulation with LPS.²⁵ In addition, the pre-treatment of human amniotic epithelium explants with P4 inhibited the TNF α increase stimulated by LPS. This agrees with previous reports indicating that pre-treatment with P4 induces the suppression of TNF α synthesis by fetal mononuclear cells isolated from umbilical cord blood stimulated with LPS.⁴³

Evidence on the possible mechanisms by which P4 can inhibit pro-inflammatory cytokines indicates that TNF α production by macrophages is inhibited by P4 through increased inhibitory-kB transcription limiting nuclear factor-kB activity and, thus, decreasing cytokine production.⁴⁴

On the other hand, IL-6 is a potent pro-inflammatory cytokine that has been used as a biomarker to predict preclinical asymptomatic infection in preterm premature rupture of membranes (PPROM).⁴⁵ Elevated concentration of IL-6 in fetal and maternal compartments has been associated with an increased risk of preterm birth and/or neonatal morbidity.⁴⁶ Our present results indicate that stimulation of the human amniotic epithelium with LPS up-regulates markedly the synthesis and secretion of IL-6, which has been also reported in primary cultures of the human amnion after stimulation with *Mycoplasma hominis* and *Streptococcus aureus*.^{47,48}

In previous studies from our laboratory, we demonstrated that IL-6 secreted by the amnion is a key constituent of the integral response of human chorioamniotic membranes against the infection with gram-negative bacteria,⁴⁹ gram variable bacteria,⁵⁰ and yeast.⁵¹

The present work also demonstrated that pre-stimulation of pre-labor human amniotic epithelium with P4 decreased the level of IL-6 production induced by LPS. The effect of P4 on IL-6 secretion has been previously reported by Anbe et al.,⁵² who demonstrated that P4 significantly decreases the IL-6 level induced by LPS in pregnant mice.

Additionally, P4 reduces LPS-induced IL-6 secretion in fetoplacental chorionic arteries, fractionated cord blood, maternal mononuclear cells,⁵³ and human uterine cervical fibroblasts.³⁶

An increased level of IL-8, a potent neutrophil chemo-attractant, has been demonstrated in the amniotic fluid with chorioamnionitis⁵⁴ and in preterm labor,⁵⁵ suggesting that IL-8 is part of the host response to microbial invasion of the amniotic cavity.

Our present results demonstrated that the stimulation of pre-labor human amniotic epithelium

explants with LPS of *Escherichia coli* increased significantly the concentration of IL-8, which is concurrent with previous evidence indicating that explants of whole fetal membranes cultured in a two-compartment tissue culture system and infected with live *E. coli* increase the secretion of IL-8 in both amnion and chorionic regions.⁴⁹ Stimulation of amnion explants with different bacteria associated with preterm labor such as *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma hominis*, and *Streptococcus aureus* also induces increased IL-8 secretion.⁴⁷

We observed that pre-treatment of human amniotic epithelium explants with P4 decreased the level of IL-8 induced by LPS treatment. This finding is supported by a previous report that IL-1 β -induced IL-8 secretion in pre-labor amnion cells can be attenuated by cotreatment with P4.⁵⁶

The immunology of maternal–fetal interface is very complex; however, the existence of a fine balance between locally produced pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines is critical for the success of pregnancy.⁵⁷ Among these locally produced factors, IL-10 seems to be the most potent immunosuppressive and anti-inflammatory molecule.⁵⁸

Reports of IL-10 production in the fetal membranes have been inconsistent; the chorion appears to secrete small amounts of IL-10 at term, whereas amnion's basal production is low or undetectable.^{58,59} Our results indicate that the concentration of IL-10 increased markedly the response to the LPS stimulus; this result is supported by previous evidence indicating that regardless of the zone of stimulation of fetal membranes, the amnion responds to the contact with *E. coli* by increasing significantly the rate of IL-10 secretion.⁴⁹

An essential role has been ascribed to IL-10 in the resistance to LPS-induced preterm labor in mice.⁶⁰ In addition, IL-10 has been ascribed a modulatory role in resolving the inflammatory process associated with labor at term and with intra-uterine infection-associated preterm labor.⁵⁹ Our results showed that regardless of the concentration, P4 did not inhibit the LPS-induced IL-10 secretion. An explanation could be that P4 and IL-10 share some similar immunocapacities, both can modulate inflammation in the maternal–fetal interface and represent similar compensatory mechanisms that maintain tolerance during pregnancy. This hypothesis could be supported by previous evidence indicating that pre-treatment of fetoplacental arteries with P4 does not modify the secretion pattern of IL-10 *in vitro*.⁶¹

During an infectious process in the maternal–fetal interface, the secretion of antimicrobial peptides such as HBD-2 is a key event to establish the first line of defense.²¹ The amnion secretes this peptide basally and in response to pro-inflammatory cytokines.^{21,62}

Our results demonstrated that the stimulation of the human amniotic epithelium with LPS increased the secretion level of HBD-2. This pattern has also been observed when the membranes are stimulated directly in the amniotic region with *E. coli*.²⁶

Regarding the effect of P4 on LPS-induced secretion of HBD-2, our results indicate that this hormone was capable of inhibiting markedly this defensin. These results concur with evidence indicating that the treatment of vaginal epithelial cells with P4 inhibits the secretion of HBD-2 induced by LPS.⁶³

Together, these results support that P4 induces immunomodulatory effects on the innate immune capacities of human amniotic epithelium under infection conditions. Although the present experimental evidence indicates that P4 can modify the expression pattern of the protein forms of TLR-4/MyD88 as well as TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, and HBD-2, more studies are required to determine whether P4 can inhibit the pro-inflammatory activity of the human amnion through inhibition of the NF- κ B, as reported in other models.⁴¹

Additionally, inhibition of P4's effects after costimulation with RU-486 supports the possibility that the anti-inflammatory effect of this hormone could be mediated by both PR and GR.⁶⁴ The current information about the expression pattern of RP in the human amnion is controversial;^{65–67} however, expression and functionality of GR have been consistently described in the human amnion.^{66,68} More studies are required to determine the mechanisms by which P4 exerts its immunomodulatory effect on the amnion.

Finally, it must be taken into account that, as any experimental model, our model has several limitations, including the physical separation from the choriodecidual region and that these results can be applied only to term pre-labor human membranes.

Conclusions

The generation of an effective immune response against an infection with a minimal tissue damage requires a delicate balance between pro- and anti-inflammatory responses. The present results support the concept that inhibition of TLR-4/MYD88 by P4 may explain in part the *in vivo* mechanisms by

which this hormone could protect the amniotic cavity by attenuating some of the cytotoxic effects of pro-inflammatory cytokines, which can irreversibly jeopardize the continuity of gestation.

Acknowledgments

These studies were supported by Instituto Nacional de Perinatología 'Isidro Espinosa de los Reyes', project # 06161 to VZC and by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT) (Grant No. 61590 to VZC). We would like to thank CONACyT (Scholarship #262663) and Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT-13BTM2336) for supporting the MS studies of PF. We thank Ingrid Mascher for editorial assistance and Renee Van Erp, Daudi Langat, and David Wheaton for the revision of the manuscript and language corrections. We would also like to thank the women for their cooperation in donating membranes for research.

References

- 1 Szekeres-Bartho J: Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol* 2002; 21:471–495.
- 2 Koga K, Mor G: Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci* 2008; 15:231–242.
- 3 Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleish R, Bright N, Macvicar J: Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 1993; 14:385–406.
- 4 Romero R, Mazar M, Wu YK, Sirtori M, Oyarzun E, Mitchell MD, Hobbins JC: Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Semin Perinatol* 1988; 12:262–279.
- 5 Romero R, Roslansky P, Oyarzun E, Wan M, Emamian M, Novitsky TJ, Gould MJ, Hobbins JC: Labor and infection. II. Bacterial endotoxin in amniotic fluid and its relationship to the onset of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:1044–1049.
- 6 Romero R, Gomez R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazar M, Edwin SS, Berry SM: A fetal systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:186–193.
- 7 Clark DA, Foerster K, Fung L, He W, Lee L, Mendicino M, Markert UR, Gorczynski RM, Marsden PA, Levy GA: The *fgl2* prothrombinase/fibroleukin gene is required for lipopolysaccharide-triggered abortions and for normal mouse reproduction. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:99–108.
- 8 Foerster K, He W, Manuel J, Bartczak A, Liu M, Markert UR, Levy GA, Clark DA: LPS-induced occult loss in mice requires FGL2. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:524–529.
- 9 Stites DP, Siiteri PK: Steroids as immunosuppressants in pregnancy. *Immunol Rev* 1983; 75:117–138.
- 10 Miyaura H, Iwata M: Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol* 2002; 168:1087–1094.

- 11 Butts CL, Shukair SA, Duncan KM, Bowers E, Horn C, Belyavskaya E, Tonelli L, Sternberg EM: Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int Immunol* 2007; 19:287–296.
- 12 Butts CL, Bowers E, Horn JC, Shukair SA, Belyavskaya E, Tonelli L, Sternberg EM: Inhibitory effects of progesterone differ in dendritic cells from female and male rodents. *Genet Med* 2008; 5:434–447.
- 13 Janeway CA Jr, Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197–216.
- 14 Patni S, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, Thornton CA: Expression and activity of Toll-like receptors 1–9 in the human term placenta and changes associated with labor at term. *Biol Reprod* 2009; 80:243–248.
- 15 Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim GJ, Kim MR, Kuivaniemi H, Tromp G, Espinoza J, Bujold E, Abrahams VM, Mor G: Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:1346–1355.
- 16 Adams KM, Lucas J, Kapur RP, Stevens AM: LPS induces translocation of TLR4 in amniotic epithelium. *Placenta* 2007; 28:477–4781.
- 17 Adams Waldorf KM, Persing D, Novy MJ, Sadowsky DW, Gravett MG: Pretreatment with toll-like receptor 4 antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced preterm uterine contractility, cytokines, and prostaglandins in rhesus monkeys. *Reprod Sci* 2008; 15:121–127.
- 18 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. *Am J Pathol* 2003; 163:2103–2111.
- 19 Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085–2088.
- 20 Underhill DM, Ozinsky A: Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:103–110.
- 21 King A, Paltoo A, Kelly R, Sallenave J, Bocking A, Challis J: Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 2007; 28:161–169.
- 22 Raghupathy R: Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997; 18:478–482.
- 23 Yoon BH, Romero R, Park JS, Chang JW, Kim YA, Kim JC, Kim KS: Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:1254–1260.
- 24 Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, Kim JS, Yoo W, Lee DC, Mittal P, Erez O, Kusanovic JP, Hassan SS, Kim CJ: Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Lab Invest* 2009; 89:924–936.
- 25 Zaga V, Estrada-Gutiérrez G, Beltran-Montoya J, Maida-Claros R, Lopez-Vancell R, Vadillo-Ortega F: Secretions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or choriondecidua with lipopolysaccharides or group B streptococci. *Biol Reprod* 2004; 7:1296–1302.
- 26 García-Lopez G, Flores-Espinosa P, Zaga-Clavellina V: Tissue-specific human beta-defensins (HBD)1, HBD2, and HBD3 secretion from human extra-placental membranes stimulated with *Escherichia coli*. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8:146.
- 27 Astle S, Slater DM, Thornton S: The involvement of progesterone in the onset of human labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 108:177–1781.
- 28 Fonseca EB, Celik E, Parra M, Singh M, Nicolaidis KH: Progesterone and the risk of preterm birth among women with a short cervix. *N Engl J Med* 2007; 357:462–469.
- 29 Hassan SS, Romero R, Vidyadhari D, Fusey S, Baxter JK, Khandelwal M, Vijayaraghavan J, Trivedi Y, Soma-Pillay P, Sambarey P, Dayal A, Potapov V, O'Brien J, Astakhov V, Yuzko O, Kinzler W, Dattel B, Sehdev H, Mazheika L, Manchulenko D, Gervasi MT, Sullivan L, Conde-Agudelo A, Phillips JA, Creasy GW: Vaginal progesterone reduces the rate of preterm birth in women with a sonographic short cervix: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; 38:18–31.
- 30 Romero R, Nicolaides K, Conde-Agudelo A, Tabor A, O'Brien JM, Cetingoz E, Da Fonseca E, Creasy GW, Klein K, Rode L, Soma-Pillay P, Fusey S, Cam C, Alfirevic Z, Hassan SS: Vaginal progesterone in women with an asymptomatic sonographic short cervix in the midtrimester decreases preterm delivery and neonatal morbidity: a systematic review and metaanalysis of individual patient data. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206:124.e1–124.e19.
- 31 Aisemberg J, Vercelli CA, Bariani MV, Billi SC, Wolfson ML, Franchi AM: Progesterone is essential for protecting against LPS-induced pregnancy loss. LIF as a potential mediator of the anti-inflammatory effect of progesterone. *PLoS ONE* 2013; 8:e56161.
- 32 Jones LA, Anthony JP, Henriquez FL, Lyons RE, Nickdel MB, Carter KC, Alexander J, Roberts CW: Toll-like receptor-4-mediated macrophage activation is differentially regulated by progesterone via the glucocorticoid and progesterone receptors. *Immunology* 2008; 125:59–69.
- 33 Su L, Sun Y, Ma F, Lü P, Huang H, Zhou J: Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappaB activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunol Lett* 2009; 125:151–155.
- 34 Harju K, Ojaniemi M, Rounioja S, Glumoff V, Paananen R, Vuolteenaho R, Hallman M: Expression of toll-like receptor 4 and endotoxin responsiveness in mice during perinatal period. *Pediatr Res* 2005; 57:644–648.
- 35 Elovitz MA, Mrinalini C: Can medroxyprogesterone acetate alter Toll-like receptor expression in a mouse model of intrauterine inflammation? *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193:1149–1155.
- 36 Fukuyama A, Tanaka K, Kakizaki I, Kasai K, Chiba M, Nakamura T, Mizunuma H: Anti-inflammatory effect of proteoglycan and progesterone on human uterine cervical fibroblasts. *Life Sci* 2012; 90:484–488.
- 37 Srivastava MD, Thomas A, Srivastava BI, Check JH: Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. *Leuk Lymphoma* 2007; 48:1610–1617.
- 38 Zhang JP, Yang Y, Levy O, Chen C: Human neonatal peripheral blood leukocytes demonstrate pathogen-specific coordinate expression of TLR2, TLR4/MD2, and MyD88 during bacterial infection *in vivo*. *Pediatr Res* 2010; 68:479–483.
- 39 Yu X, Xiao CJ, Dai HM, Wang W, Meng J, Zhang XT, Ning Q, Luo XP: Effect of intrauterine lipopolysaccharide infusion on Toll-like receptor 4 signaling transduction pathway in lungs of perinatal rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2009; 47:667–671.

- 40 Bowie A, O'Neill LA: The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000; 67:508–514.
- 41 Giannoni E, Guignard L, Knaup Reymond M, Perreau M, Roth-Kleiner M, Calandra T, Roger T: Estradiol and progesterone strongly inhibit the innate immune response of mononuclear cells in newborns. *Infect Immun* 2011; 79:2690–2698.
- 42 Menon R, Peltier MR, Eckardt J, Fortunato SJ: Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201 306.e1–306.e6.
- 43 Holberg G, Amash A, Sapir O, Sheiner E, Levy S, Huleihel M: Perfusion with lipopolysaccharide differently affects the secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 by term and preterm human placenta. *J Reprod Immunol* 2007; 74:15–23.
- 44 Miller L, Hunt JS: Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sci* 1996; 59:1–14.
- 45 Cobo T, Palacio M, Navarro-Sastre A, Ribes A, Bosch J, Filella X, Gratacós E: Predictive value of combined amniotic fluid proteomic biomarkers and interleukin-6 in preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200:499.e1–499.e6.
- 46 Sorokin Y, Romero R, Mele L, Wapner RJ, Iams JD, Dudley DJ, Spong CY, Peaceman AM, Leveno KJ, Harper M, Caritis SN, Miodovnik M, Mercer BM, Thorp JM, O'Sullivan MJ, Ramin SM, Carpenter MW, Rouse DJ, Sibai B: Maternal serum interleukin-6, C-reactive protein, and matrix metalloproteinase-9 concentrations as risk factors for preterm birth <32 weeks and adverse neonatal outcomes. *Am J Perinatol* 2010; 27:631–640.
- 47 Reisenberger K, Egarter C, Knöfler M, Schiebel I, Gregor H, Hirschl AM, Heinze G, Husslein P: Cytokine and prostaglandin production by amnion cells in response to the addition of different bacteria. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:50–53.
- 48 Reisenberger K, Egarter C, Schiebel I, Obermair A, Kiss H, Lehner R: *In vitro* cytokine and prostaglandin production by amnion cells in the presence of bacteria. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:981–984.
- 49 Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, Espejel-Núñez A, Flores-Pliogo A, Soriano-Becerril D, Maida-Claros R, Merchant-Larios H, Vadillo-Ortega F: *In vitro* secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with *Escherichia coli* in human fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5:46.
- 50 Zaga-Clavellina V, Martha RV, Flores-Espinosa P: *In vitro* secretion profile of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6, and of human beta-defensins (HBD)-1, HBD-2, and HBD-3 from human chorioamniotic membranes after selective stimulation with *Gardnerella vaginalis*. *Am J Reprod Immunol* 2012; 67:34–43.
- 51 Zaga-Clavellina V, López GG, Estrada-Gutiérrez G, Martínez-Flores A, Maida-Claros R, Beltran-Montoya J, Vadillo-Ortega F: Incubation of human chorioamniotic membranes with *Candida albicans* induces differential synthesis and secretion of interleukin-1beta, interleukin-6, prostaglandin E, and 92 kDa type IV collagenase. *Mycoses* 2006; 49:6–13.
- 52 Anbe H, Okawa T, Sugawara N, Takahashi H, Sato A, Vedernikov YP, Saade GR, Garfield RE: Influence of progesterone on myometrial contractility in pregnant mice treated with lipopolysaccharide. *J Obstet Gynaecol Res* 2007; 33:765–771.
- 53 Gotkin JL, Celver J, McNutt P, Shields AD, Howard BC, Paonessa DJ, Napolitano PG: Progesterone reduces lipopolysaccharide induced interleukin-6 secretion in fetoplacental chorionic arteries, fractionated cord blood, and maternal mononuclear cells. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195:1015–1019.
- 54 Romero R, Ceska M, Avila C, Mazor M, Behnke E, Lindley I: Neutrophil attractant/activating peptide-1/interleukin-8 in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:813–820.
- 55 Park JS, Park CW, Lockwood CJ, Norwitz ER: Role of cytokines in preterm labor and birth. *Minerva Ginecol* 2005; 57:349–366.
- 56 Loudon JA, Elliott CL, Hills F, Bennett PR: Progesterone represses interleukin-8 and cyclo-oxygenase-2 in human lower segment fibroblast cells and amnion epithelial cells. *Biol Reprod* 2003; 69:331–337.
- 57 Dealtry GB, O'Farrell MK, Fernandez N: The Th2 cytokine environment of the placenta. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123:107–119.
- 58 Trautman MS, Collmer D, Edwin SS, White W, Mitchell MD, Dudley DJ: Expression of interleukin-10 in human gestational tissues. *J Soc Gynecol Investig* 1997; 4:247–253.
- 59 Simpson KL, Keelan JA, Mitchell MD: Labor-associated changes in interleukin-10 production and its regulation by immunomodulators in human choriondecidua. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4332–4337.
- 60 Robertson SA, Skinner RJ, Care AS: Essential role for IL-10 in resistance to lipopolysaccharide-induced preterm labor in mice. *J Immunol* 2006; 177:4888–4896.
- 61 Shields AD, Wright J, Paonessa DJ, Gotkin J, Howard BC, Hoeldtke NJ, Napolitano PG: Progesterone modulation of inflammatory cytokine production in a fetoplacental artery explant model. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193:1144–1148.
- 62 Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA: Natural antimicrobial production by the amnion. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196:255.e1–255.e6.
- 63 Han JH, Kim MS, Lee MY, Kim TH, Lee MK, Kim HR, Myung SC: Modulation of human beta-defensin-2 expression by 17beta-estradiol and progesterone in vaginal epithelial cells. *Cytokine* 2010; 49:209–214.
- 64 Mahajan DK, London SN: Mifepristone (RU486): a review. *Fertil Steril* 1997; 68:967–976.
- 65 Merlino A, Welsh T, Erdonmez T, Madsen G, Zakar T, Smith R, Mercer B, Mesiano S: Nuclear progesterone receptor expression in the human fetal membranes and decidua at term before and after labor. *Reprod Sci* 2009; 6:357–363.
- 66 Patel FA, Funder JW, Challis JR: Mechanism of cortisol/progesterone antagonism in the regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase activity and messenger ribonucleic acid levels in human chorion and placental trophoblast cells at term. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2922–2933.
- 67 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. *Mol Hum Reprod* 2005; 11:269–277.
- 68 Sun K, Myatt L: Enhancement of glucocorticoid-induced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by proinflammatory cytokines in cultured human amnion fibroblasts. *Endocrinology* 2003; 144:5568–5577.