



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES**

Escherichia coli modula la expresión de cuatro
microRNAs asociados a la respuesta inflamatoria en las
membranas fetales humanas en un modelo experimental
de infección

TESIS

Que para obtener el título de:

ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

P R E S E N T A

DRA. DENISE ACUÑA GONZÁLEZ

DR. TOMÁS HERRERÍAS CANEDO

Profesor Titular del Curso en Especialización en

Ginecología y Obstetricia

M en C. HÉCTOR FLORES HERRERA

Director de Tesis



MÉXICO DISTRITO FEDERAL 2015



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.

***Escherichia coli* modula la expresión de cuatro microRNAs asociados a la respuesta inflamatoria en las membranas fetales humanas en un modelo de infección**

Acuña-González DE¹., Flores-Herrera H²

¹ Médico Residente de la Especialidad de Ginecología y Obstetricia, Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

² Investigador en ciencias médicas; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

.

Correspondencia:

Denise Acuña González, MR.

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, cp. 11000

México D.F

Correo electrónico: denise_012@hotmail.com

AUTORIZACIÓN DE TESIS

TÍTULO DE LA TESIS "*Escherichia coli* modula la expresión de cuatro microRNAs asociados a la respuesta inflamatoria en las membranas fetales humanas en un modelo de infección"



Dr. Enrique Alfonso Gómez Sánchez

Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"



Dr. Tomás Herreras Canedo

Profesor Titular del Curso en Especialización en Ginecología y Obstetricia
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"



M en C. Héctor Flores Herrera

Director de Tesis

Investigador en Ciencias Médicas.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Sistema Nacional de Investigadores (SNI)-1
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUCCIÓN	9
4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSIÓN	21
7. CONCLUSIÓN	22
8. BIBLIOGRAFÍA	24
9. FIGURAS Y PIE DE FIGURAS	28

RESUMEN

Introducción

La corioamnionitis (CAM), se define como la inflamación aguda de las diferentes membranas fetales las cuales están conformadas por dos membranas, el amnios y el corion, que son capas estrechamente adherentes que constan de varios tipos de células, incluyendo células epiteliales, células mesenquimales y células trofoblásticas, rodadas de una matriz de colágeno. La CAM explica hasta el 70% de los nacimientos prematuros, la ruptura prematura de las membranas fetales y la activación prematura del trabajo de parto.

Objetivo

Determinar la expresión de cuatro microRNAs asociados a la respuesta inflamatoria en las membranas fetales humanas después de la infección con *Escherichia coli*.

Material y métodos

Diecisiete membranas fetales humanas a término fueron obtenidas por cesárea electiva. Las membranas fetales fueron lavadas, cortadas y montadas en el sistema de Transwell e incubadas a 37°C en medio de cultivo DMEM por 24 horas. Posteriormente, las membranas fueron asignadas a tres grupos experimentales: 1) membranas fetales humanas sin infección (control); membranas fetales humanas infectadas con *E. coli* (10^6 UFC/ml) por la región del amnios; y 3) membranas fetales humanas infectadas con *E. coli* (10^6 UFC/ml) en la región de la coriodecidua. El medio de cultivo se recuperó a las 24 horas y se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos el sobrenadante se recuperó y almacenó a -70°C hasta realizar los ensayos de

expresión y la cuantificación de las citocinas inflamatorias. Los grupos fueron comparados usando el análisis de ANOVA seguida de la prueba de Dunnet con una diferencia significativa menor al 0.05

Resultados

Se procesaron un total de 30 membranas fetales humanas las cuales fueron montadas en el sistema de Transwell para su infección con *Escherichia coli* (10^6 UFC/ml). En la región de la coriodecidua se observó un aumento en la expresión del microRNA-21 ($p = 0.016$) y una disminución de los microRNA-126 ($p = 0.025$), -146 ($p \leq 0.001$); en contraparte en el epitelio amniótico se dio una disminución del microRNA-126 ($p = 0.001$) y un aumento de los microRNA-21 ($p \leq 0.001$), -106 ($p = 0.006$) y -146 ($p \leq 0.001$). En ambas zonas de infección se detectó un aumento de la IL-1 β con respecto al grupo control.

Conclusiones

Escherichia coli aumenta de manera importante la secreción de la respuesta inflamatoria mediada por la IL-1 β e inhibiendo su regulación mediante la expresión de los microRNA-126 y -146 y aumentando la diferenciación de las respuesta inmunológica celular mediada por el microRNA-21. Estos microRNA pueden ser utilizados como biomarcadores asociados a la respuesta inflamatoria.

Palabras clave. Membranas fetales humanas, microRNAs, infección, *Escherichia coli*, retro-transcripción, reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

Introduction

The chorioamnionitis (CAM), is defined as an acute inflammation of the different cell populations (amnion, chorion, and decidua) composing a human fetal membranes. The CAM explains up to 70% of premature births, premature rupture of fetal membranes and premature labor activation.

The chorioamnionitis (CAM), is defined as an acute inflammation of the different fetal membranes which are formed by two membranes, amnion and chorion, which are closely adherent layers consisting of several cell types, including epithelial cells, mesenchymal cells and trophoblast cells, embedded in a collagen matrix. The CAM explains up to 70% of premature births, premature rupture of fetal membranes and premature labor activation.

Objective:

To determine the expression of four microRNAs associated with the inflammatory response in human fetal membranes after infection with *Escherichia coli*.

Material and methods

Seventeen human term fetal membranes were obtained by elective cesarean section. The fetal membranes were washed, cut and mounted in the Transwell system and incubated at 37 ° C in DMEM culture medium for 24 hours. Subsequently, membranes were assigned to three experimental groups: 1) human fetal membranes without infection (control); human fetal membranes infected with *E. coli* (10^6 CFU / ml) in the region of the amnion; and 3) human fetal membranes infected with *E. coli* (10^6 CFU / ml) in the region of the coriodecidua. The culture medium was recovered after 24 hours

and centrifuged at 12 000 rpm for 5 minutes the supernatant was recovered and stored at -70 ° C until testing and quantification of expression of inflammatory cytokines. The groups were compared using ANOVA analysis followed by Dunnet's test with a least significant difference at 0.05

Results

A total of 30 human fetal membranes which were mounted on the Transwell system for infection with *Escherichia coli* (10^6 CFU / mL) were processed. In the region of the coriodesidua recorded growth was observed in the expression of microRNA-21 ($p = 0.016$) and a decrease of the microRNA-126 ($p = 0.025$), -146 ($p \leq 0.001$); counterpart in the amniotic epithelium decreased microRNA-126 ($p = 0.001$) and an increase in microRNA-21 ($p \leq 0.001$), -106 ($p = 0.006$) and -146 ($p \leq 0.001$) was given. In both areas of infection increased IL-1 β compared to the control group was detected.

Conclusions

Escherichia coli significantly increased secretion of the inflammatory response mediated by IL-1 β and inhibiting the expression of the microRNA-21 and -126 and increased the differentiation of cell mediated immune response microRNA-21. These microRNAs can be used as biomarkers associated with the inflammatory response.

Keywords.

Human fetal membranes, microRNAs, infection, *Escherichia coli*, retro-transcription reaction Polymerase chain.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones durante el embarazo explican el 12% de los nacimientos prematuros, la ruptura prematura de las membranas fetales, el bajo peso de los recién nacidos y la mortalidad materno fetal [1-4]. Las bacterias patógenas que se establecen en el canal cérvico vaginal ascienden a la cavidad uterina y de ésta forma contactan a las diferentes poblaciones celulares que conforman a las membranas fetales humanas activando la respuesta inflamatoria [5-10] y la secreción de diferentes metaloproteasas de matriz extracelular [11-14]. Las bacterias comúnmente asociadas con los nacimientos prematuros se encuentran Gram negativas (*Escherichia coli*), Gram positivas (*Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Gardnerella vaginalis*, *Listeria monocytogenes*) y bacterias atípicas (*Ureaplasma urealyticum*) [15-17].

En nuestro grupo de investigación hemos demostrado mediante un modelo experimental de infección que al incubar a las membranas fetales humanas con *Escherichia coli* se incrementa la secreción de diferentes citocinas inflamatorias como la interleucina (IL)-1- β , -6, -8 y, TNF α asociadas con la ruptura prematura de las membranas fetales humanas [18, 19].

En este escenario infeccioso/inflamatorio se ha demostrado la participación de una clase particular de RNA pequeños no-codificantes denominados microRNAs los cuales regulan la secreción inflamatoria [20-22].

Los microRNAs son RNA pequeños de 18 a 24 nucleótidos de longitud, los cuales son no codificantes y son generados a partir de un transcrito endógeno con estructura de horquilla. Actualmente existen más de 700 secuencias registradas para *Homo sapiens* en la base de datos de microRNAs. Muchos de los microRNAs en animales bilaterales (simetría bilateral) se encuentran altamente conservados (55% de los microRNAs de *Caenorhabditis elegans* tienen homólogos con en humanos), lo que sugiere que posiblemente los microRNAs se encuentren implicados en la evolución.

Los microRNAs controlan la expresión de genes específicos mediante la represión del RNAm, ya sea por desestabilización del transcrito, inhibición transcripcional o ambas; sin embargo, recientes investigaciones han demostrado que también pueden unirse a otras regiones como los exones codificadores de proteínas. También se encuentran involucrados en muchos procesos biológicos como el desarrollo, funciones celulares y control metabólico. Se ha demostrado que los microRNAs se encuentran asociados y participa activamente en numerosas patologías, incluyendo diferentes tipos de cáncer y patologías asociadas al embarazo. Además se han identificado concentraciones de microRNAs en el suero y plasma sanguíneo con altas correlaciones respecto a los tejidos donde son producidos.

Recientemente Barrientos Galeana y colaboradores (2013) demostraron en pacientes con evidencias clínicas de corioamnioítis la regulación diferencial de los microRNA-106, -126 y -146 con respecto al grupo sin trabajo de parto. En éste mismo estudio se demostró que éste aumento está asociado con la secreción de IL-1 β [23]. Sin embargo, en este estudio no se demostró si el

epitelio amniótico o el tejido de la coriodecidua participan activamente en la regulación de la expresión de estos microRNAs, por lo que en el presente estudio nos hemos propuesto evaluar la expresión de estos microRNAs en las MFH en un modelo experimental de infección.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio Cuasi-experimental de tipo Observacional y Transversal en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) en el periodo 2013-2014.

El perfil de secreción de los microRNAs fue evaluado mediante la técnica molecular de retro transcripción-PCR y la determinación de la IL-1 β mediante el análisis de ELISA

El tamaño de la muestra fue determinada en base a la experiencia experimental y mediante diferentes estudios previamente reportados por nuestro grupo de investigación.

Los criterios de inclusión fueron pacientes sanas con seguimiento en el INPER, sin síntomas o signos de corioamniotitis, (tales como fiebre, taquicardia fetal, taquicardia materna, dolor o sensibilidad uterina, líquido fétido o purulento. Datos de laboratorio. Biometría hemática completa (sin leucocitosis, ni bandemia). Sin comorbilidades asociadas.

Criterios de exclusión: Pacientes que hayan recibido tratamientos terapéuticos o profilácticos de antibiótico previos a la toma de la muestra.

La variable dependiente del estudio fue la infección de las placentas con *Escherichia coli* y la variable independiente la expresión de microRNAs y la secreción de la IL-1B.

Obtención de las membranas fetales

Membranas fetales humanas a término (37-40 semanas de gestación; n=30) sin trabajo de parto activo, ruptura prematura de las membranas fetales y sin

complicaciones obstétricas asociadas a la respuesta inflamatoria fueron obtenidas posterior a la realización de cesárea electiva. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado avalado por el comité de investigación y ética institucional. Las MFH, fueron separadas de la placenta y transportadas al laboratorio en medio DMEM estéril. Una porción de las MFH fueron analizadas en el laboratorio de microbiología del INPer para la detección de bacterias patógenas. Si las membranas fetales humanas fueron positivas en el crecimiento de algún patógeno esta membrana no será utilizada para los ensayos experimentales.

Las MFH fueron cortadas y montado en el sistema de Transwell como previamente ha sido reportado por nuestro grupo [19]. Este sistema permite tener dos regiones (amnios y coriodecidua) independientes pero manteniendo la estructura y comunicación celular. Las MFH fueron incubadas en una caja de 12 pozos y se les adicionaron a cada compartimiento 1 ml de medio de cultivo DMEM (Figura 7C) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB). Los explantes se incubaran a 37°C con 5% de CO₂ por 24 horas y posteriormente las MFH fueron lavadas dos veces y se agregó medio DMEM suplementado con hidrolizado de lactoalbúmina al 2% e incubados en las condiciones arriba descritas.

Cepa de Escherichia coli

E. coli fue aislada de sangre periférica neonatal de madre que tuvo signos y síntomas de corioamnionitis con ruptura prematura de membranas fetales con

más de 72 horas de progresión. La caracterización y conservación de esta bacteria se realizó en el departamento de microbiología del INPer.

Las colonias fueron raspadas suavemente mediante una aza bacteriológica y fueron re suspendidas en solución de PBS 1x. El resto de la placa de cultivo fue regresada al laboratorio de microbiología del INPer para su conservación. El manejo de las bacterias se realizó conforme al reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Procedimiento de Infección.

Las membranas fetales humanas fueron infectadas con *Escherichia coli* con 10^6 unidades formadoras de colonias/ml para lo cual se usó el tubo de referencia de turbidez No 0.5 que representa aproximadamente 10^8 UFC/ml. de la curva de MacFarland.

Los grupos experimentales fueron los siguientes: 1) grupo control (sin infección); 2) infección por la región del amnios; e 3) infección por la región de la coriodecidua. El medio de cultivo fue recuperado a las 24 horas después de la infección y en cada caso las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. A quinientos micro litros del medio de cultivo de cada uno de los diferentes tratamientos experimentales se les adicionó 500 μ l del reactivo de TRIzol (Invitrogene) y el resto fue almacenado en tubos Eppendorf y fueron almacenadas a -70 °C hasta la cuantificación de ILL- 1β mediante el método de ELISA.

Obtención del RNA

A partir de 500 µl del medio de cultivo se le adicionó el mismo volumen de TRIzol (InvitroGen; Carlsbad, CA) la mezcla fue agitada vigorosamente por 15 segundos y se incubaron por 15 min a 30°C. Posteriormente a cada muestra se les añadió 100 µl de cloroformo y se agitaron por 15 segundos, se incubaron por 3 min a 30°C. Al término las muestras fueron centrifugadas a 4 000 rpm por 15 min y la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le agregó 1 µl de isopropanol. Las muestras fueron incubadas por 1 hora a -20°C. Al término de éste tiempo las muestras fueron centrifugadas a 4 000rpm por 30 min. Al pellet se le adicionó 1 ml de etanol al 100% y se agito vigorosamente por 15 segundos y fue centrifugado nuevamente 4 000 rpm por 15 min. El procedimiento se repitió una vez más con etanol al 75%. El RNA fue evaporado toda la noche a temperatura ambiente. El RNA fue hidratado con 20 µl de dietilpircarbonato (DEPC) y cuantificado por espectrofotometría mediante la relación de absorbencia 260/280.

Condiciones para estandarizar las condiciones de RT-PCR de los microRNAs

Las temperaturas de alineamiento para la amplificación de PCR de los microRNAs-21, 106, -126, y -146 se realizaron a 56, 58 y 60°C para el alineamiento de PCR usando como control de expresión tejido de neural (microRNA-21 y -106), células leucémicas (microRNA-126) y tejido cardiaco (microRNA-146). Una porción de cada tejido fue macerado con TRIzol y centrifugado a 12 000 rpm por 10 minutos. La extracción y cuantificación del RNA fue realizado mediante el procedimiento antes descrito.

Síntesis del cDNA

En tubos eppendorf independientes se adicionaron 2.5 µL del RNA de cada una de las muestras y se calentaron a 65°C durante 15 minutos e inmediatamente enfriados en hielo por 5 min. Posteriormente, se adicionó 1µL de iniciadores específicos (Tabla 1), 10 µL de dNTPs 10 mM (InvitroGen) y 6.5 µL de agua inyectable por cada iniciador la mezcla fue calentada a 65°C por 5 min. Finalmente, a las muestras se les agregó 0.5 µL de enzima retrotranscriptasa (RT; cat A1250; Promega Madison WI, USA) y 4 µL de buffer 5X para obtener un volumen de 20 µL. La mezcla anterior se incubó durante 1 hora a 50°C y finalmente la reacción se inactivó a 70°C.

Expresión de los microRNA mediante PCR

A partir del cDNA obtenido se amplificaron los cuatro microRNA y el microRNA constitutivo mediante PCR. Para la amplificación de dichas secuencias se empleó la siguiente mezcla de reacción: 200 ng de cDNA molde, 2.5µL de de buffer 10X, 2 mM de MgCl₂, 2.5 mM de cada uno de los dNTP, 10pM de cada iniciador, 2U de Taq polimerasa, ajustando la reacción a 25 µL con agua para PCR. La secuencia de los iniciadores se muestra en la tabla 2. Los amplificados sometidos en geles de agarosa al 4% a voltaje constante por 40 minutos y las bandas fueron visualizadas en luz UV y las imágenes fueron capturadas usando el sistema foto documentador (Gel Doc 2000. Bio-Rad, USA). El perfil de las bandas de los diferentes microRNA fueron determinadas mediante la densidad óptico a utilizando el programa ImageJ (NIH; USA).

Cuantificación de IL-1 β

Para la determinación de la concentración de IL-1 β (Duoset DY201, R&D Systems) en el plasma se utilizó el ensayo inmuno enzimático tipo sándwich (ELISA) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial. Para la curva estándar se incluyeron siete puntos con un rango de 250 a 3.90 pg/mL. Se determinó la densidad óptica a una longitud de 450nm.

Análisis estadístico

Los grupos fueron comparados usando el análisis de ANOVA seguida de la prueba de Dunnet. Los valores son presentados como la media \pm error estándar con una diferencia significativa menor al 0.05.

RESULTADOS

Características de las pacientes

Se obtuvieron un total de 30 membranas fetales de las cuales se eliminaron 13 (43%) por presentarse *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Ureaplasma Urealyticum* las cuales han sido asociadas con la ruptura de las membranas fetales. De las 17 membranas fetales fueron a término con 38.8 (18; femeninos) y de 37.6 (12; masculinos), con un peso promedio de (3080gr), Capurro (38.1), Agar 8/9, Silverman 1, perímetro cefálico (35cm) la edad materna fue en promedio de 25 años (min 17-máx 44). Leucocitos promedio de 10.5 miles / mm³ neutrófilos 77%, urocultivo y cultivo cervico vaginal negativos, así como cultivos especiales para Mycoplasma y *Ureaplasmaurealyticum* negativos.

Efecto en la expresión de los microRNAs después de la infección con Escherichia coli.

Para demostrar nuestra hipótesis que indica que *Escherichia coli* modula la expresión de cuatro microRNAs asociados con la respuesta inflamatoria en las dos principales regiones de las membranas fetales humanas a continuación se muestran los resultados obtenidos

Expresión del microRNA-21

La figura 1 muestra el perfil de expresión en la zona de la coriodecidea y del amnios (fig. 1A). El análisis de la densidad óptica muestra un aumento 1.3 ($p = 0.016$) y 1.7-veces ($p \leq 0.001$) la expresión del microRNA-21 con respecto a sus controles respectivos (fig. 1B). *Escherichia coli* aumenta

significativamente 0.77-veces la expresión del microRNA en el epitelio amniótico con respecto al tejido de la decidua ($p \leq 0.001$; fig.1B).

Expresión del microRNA-106

La figura 2 muestra el perfil de expresión en la zona de la coriodecidua y del amnios (fig. 1A). El análisis de la densidad óptica muestra un aumento 1.0 ($p = 0.161$) y 1.2-veces ($p = 0.006$) la expresión del microRNA-21 con respecto a sus controles respectivos (fig. 1B). *Escherichia coli* aumenta significativamente 1.0-veces la expresión del microRNA en el epitelio amniótico con respecto al tejido de la coriodecidua ($p = 0.045$; fig. 2B).

Expresión del microRNA-126

La figura 3 muestra el perfil de expresión en la zona de la coriodecidua y del amnios (fig. 3A). El análisis de la densidad óptica muestra una reducción significativamente 1.2 ($p = 0.025$) y 1.1- veces ($p = 0.001$) la expresión del microRNA-126 con respecto a sus controles respectivos (fig. 3B). *Escherichia coli* aumenta significativamente 1.2-veces la expresión del microRNA en el epitelio amniótico con respecto al tejido de la coriodecidua ($p \leq 0.001$; fig. 3B).

Expresión del microRNA-146

La figura 4 muestra el perfil de expresión en la zona de la coriodecidua y del amnios (fig. 4A). El análisis de la densidad óptica muestra la expresión diferencial reduciendo 1.6 ($p \leq 0.001$) y aumentando 1.3- veces ($p \leq 0.001$) la expresión del microRNA-146 con respecto a sus controles respectivos (fig. 4B). *Escherichia coli* aumenta significativamente 1.5-veces la expresión del

microRNA en el epitelio amniótico con respecto al tejido de la coriodeciduala ($p \leq 0.001$; fig. 4B).

Cuantificación de IL-1 β

Al evaluar la concentración de IL-1 β en las dos regiones de infección encontramos un aumento de 12.6 ($p = 0.008$) y de 4.6-veces ($p = 0.008$) con respecto a sus controles respectivamente. (fig. 5).

DISCUSION

Hasta este momento no se han realizado experimentos que indique la modulación de diversos microRNAs en las membranas fetales humanas durante un proceso infeccioso. Los principales resultados de nuestro estudio demuestran: 1) el tejido de la coriodecidua aumenta la expresión del microRNA-21 y una disminución en la expresión del microRNA-126 y -146; 2) en el epitelio amniótico se aumentaron la expresión de los microRNA-21, -106 y -146 y una reducción del microRNA-126; y 3) tanto el tejido de la coriodecidua como el epitelio amniótico se dio el aumento significativo de la IL-1 β .

La infección con *Escherichia coli* induce en el tejido de la coriodecidua modula la regulación de los factores implicados con la respuesta inflamatoria tanto por el aumento del microRNA-21 el cual está implicado con la secreción del factor mieloide involucrado con el reclutamiento y diferenciación de los linfocitos de tipo B lo que estaría condicionando el arribo en la región de la coriodecidua de las células profesionales (monocitos, macrófagos y células NK) del sistema inmunológico materno hacia la zona de infección. (23). En tanto que los microRNA-126 y el -146 son reguladores importantes de la respuesta inmunológica al inhibir a la proteína del factor nuclear de tipo kappa-beta (NF κ β). (24) Nuestros resultados sugieren que éste sistema de regulación mediado por estos microRNAs esta inhibido. Nuestros resultados sugieren que el proceso infeccioso reduce de manera significativa la expresión del microRNA-126 y -146 lo que estaría explicando la secreción de la IL-1 β .

La primer barrera por la cual las bacterias patógenas contactan a las

membranas fetales humanas es a través del tejido de la coriodecidua la cual monta la respuesta inflamatoria mediada por la IL-1 β que tiene como función eliminar el proceso infeccioso que la activa. La reducción de la expresión de los microRNA-126 y -146 sugieren que estos sistemas de silenciamiento están implicados con la regulación de la IL-1 β . (25)

La expresión de estos microRNAs aumenta de manera importante en el epitelio amniótico favoreciendo el incremento en la secreción de la IL-1 β . En condiciones intrauterinas estos biomarcadores son responsables del daño neurológico fetal.

Recientemente, nuestro grupo de investigación de mostramos que el microRNA-126 y -146 aumentaron de manera significativa en pacientes con signos y síntomas de corioamnioítis. (26)

CONCLUSIÓN

Escherichia coli aumenta de manera importante la secreción de la respuesta inflamatoria mediada por la IL-1 β e inhibiendo su regulación mediante la expresión de los microRNA-126 y -146 y aumentando la diferenciación de la respuesta inmunológica celular mediada por el microRNA-21.

Actualmente en nuestro grupo de investigación pretendemos demostrar el mecanismo así como el sistema de regulación tanto en el tejido de la coriodecidua como en el epitelio amniótico.

AAGRADECIMIENTOS

A mis padres, que siempre me han apoyado en cada una de mis decisiones y son mi mayor ejemplo a seguir.

A mis hermanas, que son mi mayor fuerza motivacional, siempre intentando ser un ejemplo para ellas.

A todos mis maestros, que siempre mostraron dedicación y paciencia para poder realizar mi especialidad.

A mi tutor, por su ayuda y su apoyo para lograr este trabajo final

A la BECA Carlos Slim de Salud 2014 del programa impulso a la investigación así como a los fondos otorgados al Instituto Nacional de Perinatología INPer mediante el proyecto con número de registro 212250-19051 (otorgado a HFH) para el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Goldenberg, R.L., J.C. Hauth, and W.W. Andrews, *Intrauterine infection and preterm delivery*. N Engl J Med, 2000. **342**(20): p. 1500-7.
2. Parry, S. and J.F. Strauss, 3rd, *Premature rupture of the fetal membranes*. N Engl J Med, 1998. **338**(10): p. 663-70.
3. Romero, R., et al., *Infection and prematurity and the role of preventive strategies*. Semin Neonatol, 2002. **7**(4): p. 259-74.
4. Romero, R., et al., *Intraamniotic infection and the onset of labor in preterm premature rupture of the membranes*. Am J Obstet Gynecol, 1988. **159**(3): p. 661-6.
5. Gomez-Lopez, N., et al., *The role of chemokines in term and premature rupture of the fetal membranes: a review*. Biol Reprod, 2010. **82**(5): p. 809-14.
6. Holst, R.M., et al., *Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical fluid in a population of Swedish women in preterm labor: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2005. **84**(6): p. 551-7.
7. Hunt, J.S., J.L. Pace, and R.M. Gill, *Immunoregulatory molecules in human placentas: potential for diverse roles in pregnancy*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(2-3): p. 457-67.
8. Kelly, R.W., *Inflammatory mediators and parturition*. Rev Reprod, 1996. **1**(2): p. 89-96.
9. Romero, R., et al., *Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion*. Prostaglandins, 1989. **37**(1): p. 13-22.

10. Splichal, I. and I. Trebichavsky, *Cytokines and other important inflammatory mediators in gestation and bacterial intraamniotic infections*. Folia Microbiol (Praha), 2001. **46**(4): p. 345-51.
11. Lockwood, C.J., et al., *Matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase inhibitor expression in endometrial stromal cells during progestin-initiated decidualization and menstruation-related progestin withdrawal*. Endocrinology, 1998. **139**(11): p. 4607-13.
12. Menon, R. and S.J. Fortunato, *The role of matrix degrading enzymes and apoptosis in rupture of membranes*. J Soc Gynecol Investig, 2004. **11**(7): p. 427-37.
13. Vadillo-Ortega, F., et al., *92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 148-56.
14. Weiss, A., S. Goldman, and E. Shalev, *The matrix metalloproteinases (MMPS) in the decidua and fetal membranes*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 649-59.
15. DiGiulio, D.B., et al., *Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e3056.
16. Goldman, A.S. and F.C. Schmalstieg, *The pathogenesis of chorioamnionitis*. J Pediatr, 2008. **153**(1): p. 3-4.
17. Jacobsson, B., et al., *Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women with preterm prelabor rupture of membranes*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2003. **82**(5): p. 423-31.

18. Zaga-Clavellina, V., et al., *In vitro* secretion and activity profiles of matrix metalloproteinases, MMP-9 and MMP-2, in human term extra-placental membranes after exposure to *Escherichia coli*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011. **9**: p. 13.
19. Flores-Herrera, H., et al., *An experimental mixed bacterial infection induced differential secretion of proinflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha) and proMMP-9 in human fetal membranes*. *Placenta*, 2012. **33**(4): p. 271-7.
20. Cortez, M.A. and G.A. Calin, *MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases*. *Expert Opin Biol Ther*, 2009. **9**(6): p. 703-711.
21. O'Connell, R.M., et al., *Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(2): p. 111-22.
22. Oglesby, I.K., N.G. McElvaney, and C.M. Greene, *MicroRNAs in inflammatory lung disease--master regulators or target practice?* *Respir Res*, 2010. **11**: p. 148.
23. Lindsay MA. *microRNAs and the immune response*. *Trends immunol*, 2008. **29**:p.343.
24. Perry MM. , et al. *Rapid Changes in MicroRNA-146a Expression Negatively Regulate the IL-1- β . -Induced Inflammatory response in Human Lung Alveolar Epithelial Cells*. *J Immunol* 2008; 180;5689-5698.
25. Montenegro D. et al., *Differential expression of microRNAs with progression of gestation and inflammation in the human*

chorioamniotic membranes *Am J Obstet Gynecol.* 2007 September ;
197(3): 289.e1–289.

26. Barrientos-Galeana E., Ortega-Gonzalez DK., García-Rodríguez AM.,
Díaz NF., Molina-Hernández A., Flores-Herrera H. *Perfil de secreción
de cuatro miRNAs en el desarrollo de corioamnioitis*. Cartel #133. 38°
Congreso Nacional de Microbiología. Asoc. Mexicana de
Microbiología. Guanajuato., México. Junio 23-26 , 2013.

FIGURAS

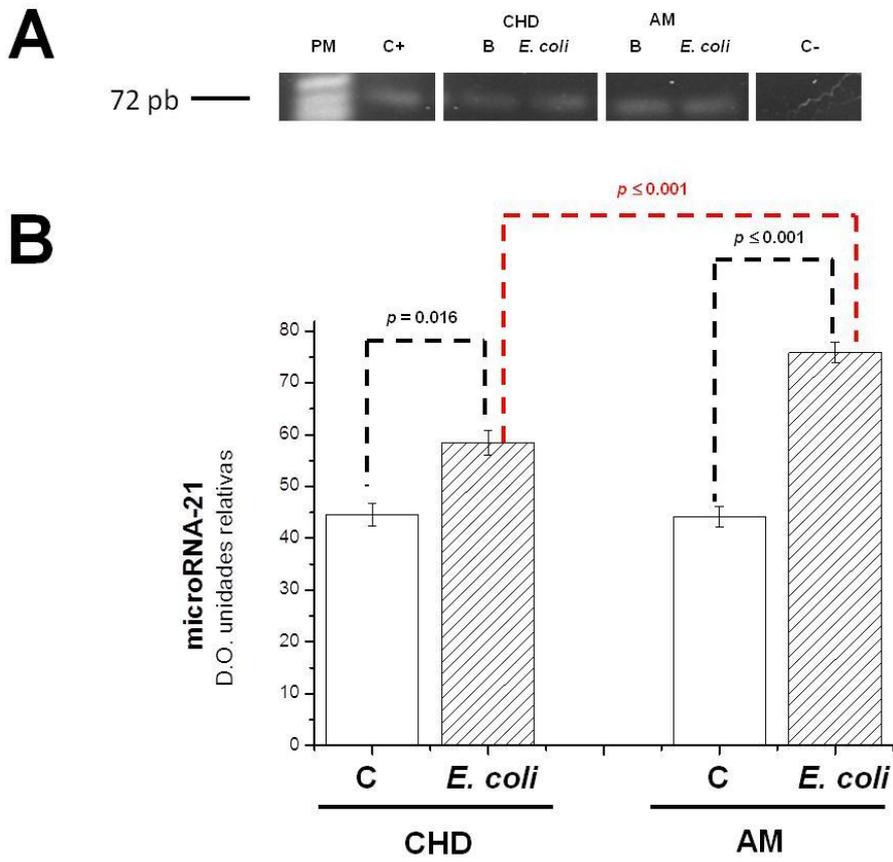


Figura 1

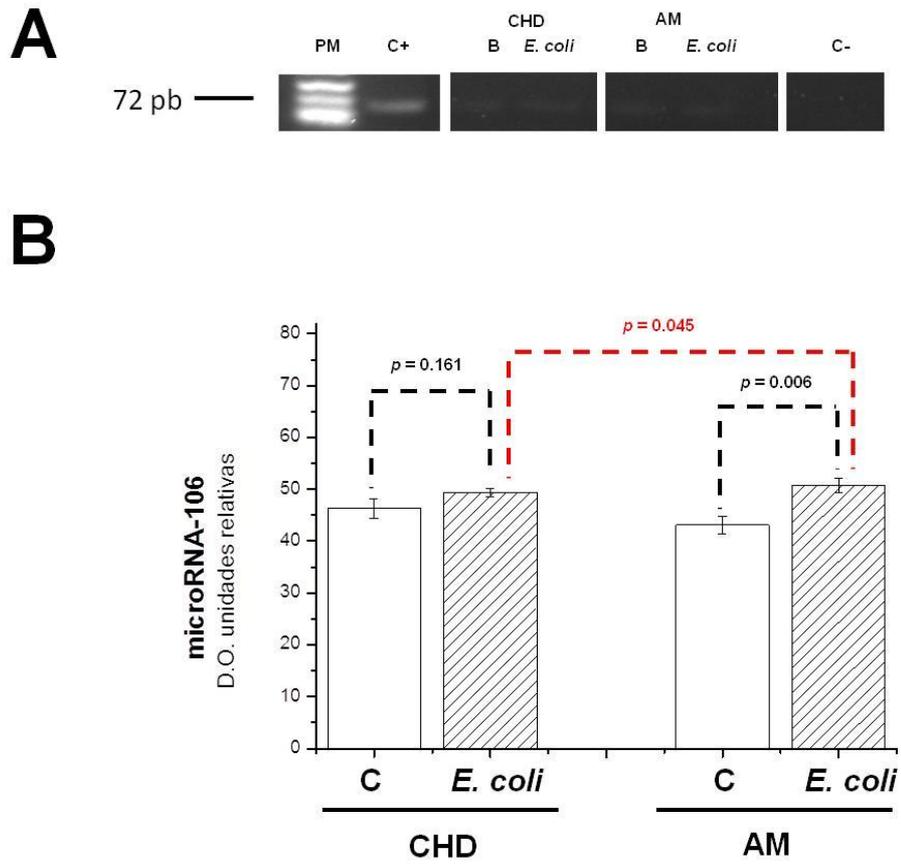
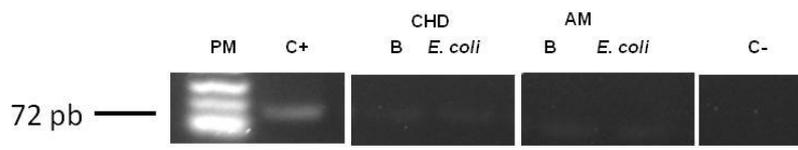
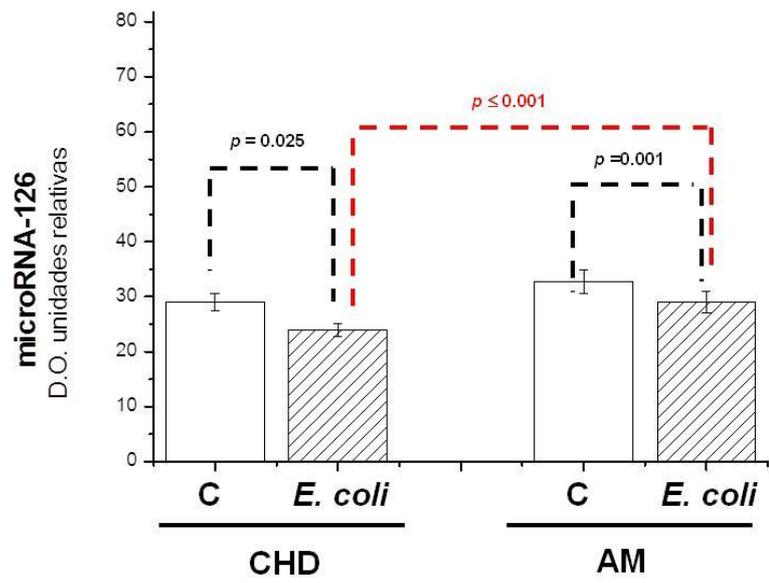


Figura 2

A**B****Figura 3**

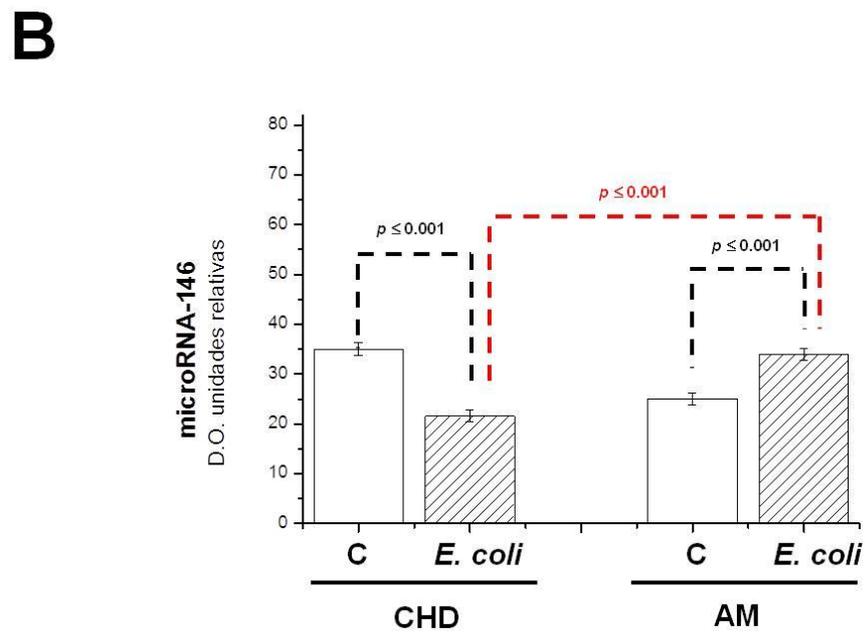
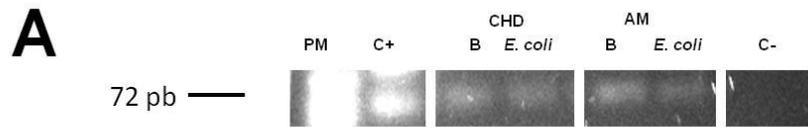


Figura 4

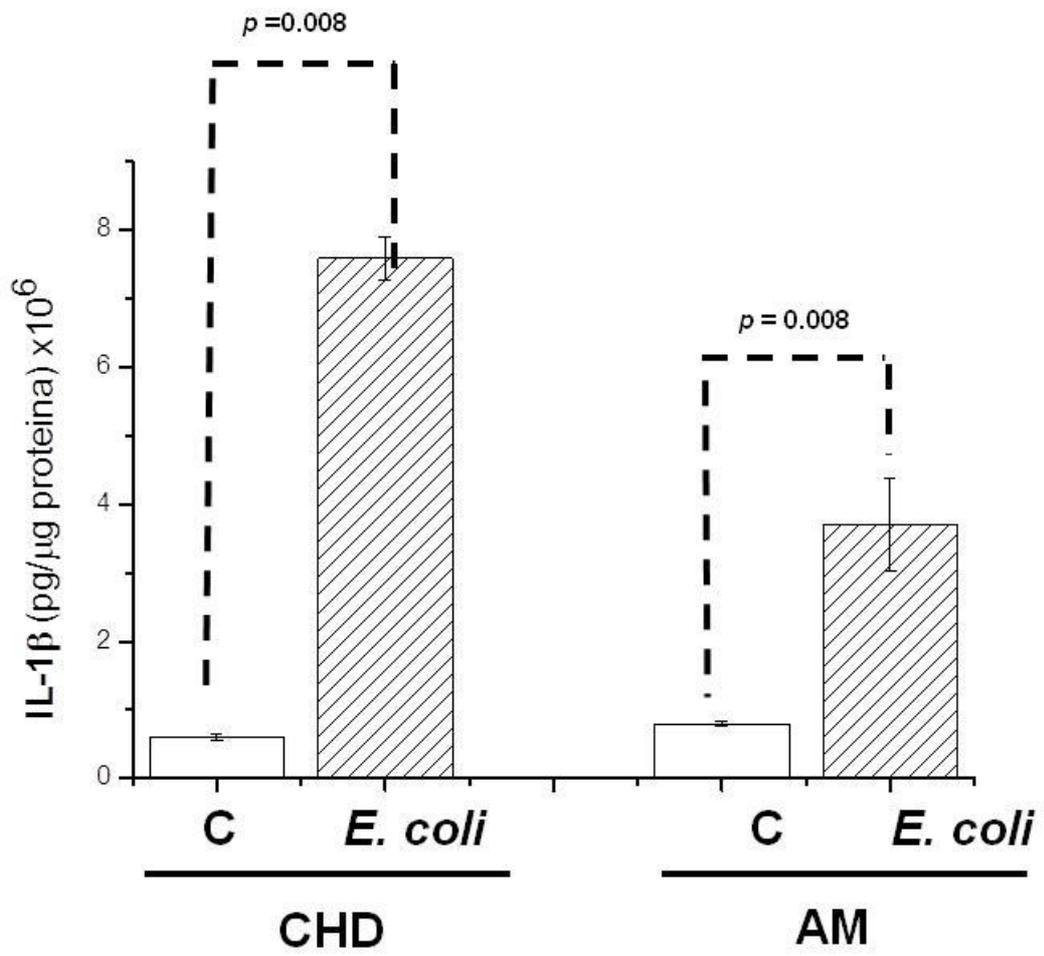


Figura 5

PIES DE FIGURAS

Figura 1. Determinación del microRNA-21 en las membranas fetales humanas. Expresión diferencial (**A**) y a las 24-horas de infección con *Escherichia coli* en el tejido de la coriodecidua (CHD) y del epitelio amniótico (AM) determinado mediante la densidad óptica (O.D; **B**). Los datos fueron obtenidos de 17 ensayos independientes y se muestran en media \pm error estándar.

Figura 2. Determinación del microRNA-106 en las membranas fetales humanas. Expresión diferencial (**A**) y a las 24-horas de infección con *Escherichia coli* en el tejido de la coriodecidua (CHD) y del epitelio amniótico (AM) determinado mediante la densidad óptica (O.D; **B**). Los datos fueron obtenidos de 17 ensayos independientes y se muestran en media \pm error estándar.

Figura 3. Determinación del microRNA-126 en las membranas fetales humanas. Expresión diferencial (**A**) y a las 24-horas de infección con *Escherichia coli* en el tejido de la coriodecidua (CHD) y del epitelio amniótico (AM) determinado mediante la densidad óptica (O.D; **B**). Los datos fueron obtenidos de 17 ensayos independientes y se muestran en media \pm error estándar.

Figura 4. Determinación del microRNA-146 en las membranas fetales humanas. Expresión diferencial (**A**) y a las 24-horas de infección con *Escherichia coli* en el tejido de la coriodecidua (CHD) y del epitelio amniótico (AM) determinado mediante la densidad óptica (O.D; **B**). Los datos fueron obtenidos de 17 ensayos independientes y se muestran en media \pm error estándar.

Figura 5. Determinación de la IL-1 β en las membranas fetales humanas.

Secreción de la IL-1 β en el grupo control (C) y después de 24-horas de infección con *Escherichia coli* en el tejido de la coriodecidua (CHD) y del epitelio amniótico (AM) determinado mediante la densidad óptica (O.D; **B**). Los datos fueron obtenidos de 17 ensayos independientes y se muestran en media \pm error estándar.