



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

ENTIDAD: INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
CAMPO DE CONOCIMIENTO: CIENCIAS MÉDICAS.

**SECRECIÓN DIFERENCIAL DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E  
INTERLEUCINA TIPO 1- $\beta$  INDUCIDAS POR *ESCHERICHIA COLI* EN LAS  
MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS HUMANAS EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL DE INFECCIÓN**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

**MAURICIO OSORIO CABALLERO**

TUTOR PRINCIPAL

M en C. Héctor Flores Herrera  
Entidad: Instituto Nacional de Perinatología

CDMX., MAYO 2016



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.

## AUTORIZACIÓN DE TESIS

TÍTULO DE LA TESIS Secreción diferencial de las proteínas de choque térmico e interleucina tipo 1- $\beta$  inducidas por *Escherichia coli* en las membranas corioamnióticas humanas en un modelo experimental de infección

---

M. en C. Héctor Flores Herrera  
Tutor de Tesis

---

Dr. Ricardo Figueroa Damián  
Responsable de la entidad

## ÍNDICE

|  | <i>Página</i> |
|--|---------------|
| <b>ABREVIACIONES</b> .....   | 7             |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....   | 8             |
| <b>APOYOS Y RECONOCIMIENTOS</b> .....  | 9             |
| <b>RESUMEN</b> .....   | 10            |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | 12            |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>  |               |
| <b>Tabla 1.</b> Características de las pacientes.....  | 30            |
| <b>Tabla 2.</b> Características neonatales.....  | 30            |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>   |               |
| <b>Figura 1</b> Modelo de tres pasos de infección intrauterina.....  | 16            |
| <b>Figura 2</b> Estructura de las Hsp pequeñas.....  | 18            |
| <b>Figura 3</b> Estructura de las Hsp grandes.....   | 19            |
| <b>Figura 4</b> Procedimiento general del estudio.....   | 23            |
| <b>Figura 5</b> Sistema de Transwell.....  | 25            |
| <b>Figura 6</b> Ensayo de viabilidad metabólica de las membranas fetales.....  | 32            |
| <b>Figura 7.</b> Determinación de la viabilidad en la región de la coriodecidea después de la estimulación con <i>Escherichia coli</i> ..... | 33            |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 8.</b> Determinación de la viabilidad en la región del amnios después de la estimulación con <i>Escherichia coli</i> .....                 | 34 |
| <b>Figura 9.</b> Cinética de secreción de Hsp-60 y -70 en la región de la coriodecidual después de la estimulación con <i>Escherichia coli</i> ..... | 35 |
| <b>Figura 10.</b> Cinética de secreción de Hsp-60 y -70 en la región del amnios después de la estimulación con <i>Escherichia coli</i> .....         | 37 |
| <b>Figura 11.</b> Cinética de secreción de la IL-1 $\beta$ después de la estimulación con <i>Escherichia coli</i> .....                              | 38 |
| <b>1.0 INTRODUCCION</b> .....  | 13 |
| <b>2.0 ANTECEDENTES</b> .....  | 14 |
| <b>3.0 JUSTIFICACIÓN</b> .....   | 21 |
| <b>4.0 OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....   | 22 |
| 4.1 Objetivo general.....  | 22 |
| 4.1.1 Objetivos particulares.....  | 22 |
| 4.2 Hipótesis.....   | 22 |
| <b>5.0 MATERIAL Y METODOS</b> .....  | 23 |
| 5.1 Aspectos éticos.....   | 23 |
| 5.2 Características de las pacientes.....  | 24 |
| 5.3 Unidad de tococirugía.....   | 24 |
| 5.4 Procedimiento de las membranas fetales humanas.....  | 24 |
| 5.5 Caracterización de <i>Escherichia coli</i> .....   | 26 |

|   | <i>Página</i> |
|---|---------------|
| 5.6 Procedimiento de estimulación.....  | 26            |
| 5.7 Viabilidad de las membranas fetales humanas después<br>de la estimulación con <i>Escherichia coli</i> ..... | 27            |
| 5.8 Determinación de la Hsp-60 y -70 mediante el método de ELISA.....   | 27            |
| 5.9 Determinación de la IL-1 $\beta$ mediante el método de ELISA.....   | 28            |
| 6.10 Análisis estadístico.....  | 29            |
| <b>6.0 RESULTADOS</b> .....   | <b>30</b>     |
| 6.1 Características de la población de estudio.....   | 30            |
| 6.2 Sensibilidad de <i>E. coli</i> a antimicrobianos.....   | 31            |
| 6.3 Ensayo de viabilidad de las membranas fetales humanas.....  | 31            |
| 6.3.1 Viabilidad en la región de la coriodecidua.....   | 32            |
| 6.3.2 Viabilidad en la región del amnios.....   | 33            |
| 6.4 Secreción de la Hsp-60 y -70 en las membranas fetales humanas.....  | 35            |
| 6.4.1 Región de la coriodecidua.....  | 35            |
| 6.4.2 Región del amnios.....  | 36            |
| 6.5 Secreción de la IL-1 $\beta$ .....  | 38            |
| 6.5.1 Región de la coriodecidua.....  | 38            |
| 6.5.2 Región del amnios.....  | 39            |

|  | <i>Página</i> |
|--|---------------|
| <b>7.0 DISCUSION.....</b>                            | <b>40</b>     |
| <b>8.0 PERSPECTIVAS.....</b>                         | <b>42</b>     |
| <b>9.0 BILBLIOGRAFÍA.....</b>                        | <b>43</b>     |
| <b>10.0 ANEXO</b>                                    |               |
| 10.1 Carta de registro institucional.....            | 48            |
| 10.2 Carta de consentimiento informado.....          | 49            |
| <b>11.0 PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTE TRABAJO.....</b> | <b>50</b>     |

## ABREVIACIONES

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona  | <b>CCCP</b>                   |
| ensayo inmuno enzimático tipo sándwich  | <b>ELISA</b>                  |
| Factor de Necrosis Tumoral alfa   | <b>TNF<math>\alpha</math></b> |
| Hidrolisado de lactoalbúmina  | <b>HLA</b>                    |
| Interleucina 1-beta   | <b>IL-1<math>\beta</math></b> |
| Kilo Daltones   | <b>KDa</b>                    |
| Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco   | <b>D-MEM</b>                  |
| Membranas fetales humanas   | <b>MFH</b>                    |
| Metaloproteasas de Matriz extracelular  | <b>MMP</b>                    |
| Microlitro  | <b><math>\mu</math>l</b>      |
| Proteína de choque térmico  | <b>Hsp</b>                    |
| Suero Bovino Fetal  | <b>SBF</b>                    |
| tetrazol (2,3)-bis-(2-metoxi-4nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamin-carbonil-2H-tetazol hidróxido) | <b>XXT</b>                    |
| Unidad Formadora de colonias  | <b>UFC</b>                    |



## **AGRADECIMIENTOS**

Al M. en C. Héctor Flores Herrera por su apoyo incondicional, e impulso para poder lograr mi desarrollo profesional y académico.

## **APOYOS Y RECONOCIMIENTOS**

El presente trabajo se realizó en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” bajo la dirección del M. en C. Héctor Flores Herrera, mediante fondos federales a través del protocolo de investigación denominado “Determinación de biomarcadores inflamatorios, colagenolíticos y proteínas de fase aguda tisular y su efecto sobre la expresión de las proteínas de unión epitelial en las membranas fetales humanas después de la infección con *Escherichia coli* ” (212250-19051 otorgado a HFH). Mauricio Osorio Caballero alumno del programa de Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud; UNAM (82306359) fue becario del programa de CONACYT.

## RESUMEN

**Antecedentes:** *Escherichia coli* es una bacteria gram negativa la cual ha sido asociada con el desarrollo de corioamnionitis y la ruptura prematura de membranas fetales. Estas condiciones patológicas inducen la secreción de citocinas proinflamatorias y metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs, por sus siglas en inglés: Matrix Metalloproteinases) las cuales son consideradas como marcadores biológicos secretadas durante la fase aguda de la infección. Las proteínas de choque térmico (Hsp; por sus siglas en inglés: Heat Shock Protein) son un componente importante de activación y regulación de la respuesta inmunológica y han sido detectadas en diferentes condiciones patológicas; sin embargo, no se ha determinado su perfil de secreción en las membranas fetales humanas (MFH) en respuesta al desarrollo de un proceso infeccioso. En el presente estudio evaluamos mediante un modelo experimental de infección la secreción espacio-temporal de la Hsp-60, Hsp-70 y de la interleucina de tipo 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) inducidas por la estimulación de *E. coli* sobre el epitelio amniótico y el tejido de la coriodecidua dos de las principales regiones que conforman a las MFH.

**Material y Métodos:** Las MFH fueron montadas en el sistema de Transwell lo que permite evaluar de manera independiente tanto el epitelio amniótico y el tejido de la coriodecidua. Cada región fue estimulada con diferentes unidades formadoras de colonias (CFU; por sus siglas en inglés Colony Forming Unit) de *E. coli* ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , y  $10^6$ ; CFU/ml) y a diferentes intervalos de tiempo (3, 6, y 24 horas). En cada condición experimental se determinó la viabilidad metabólica mediante el método colorimétrico de la conversión de sal de tetrazol (XTT; 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide). El medio de cultivo fue recuperado y se determinó la secreción de la Hsp-60, Hsp-70 e IL-1 $\beta$  mediante el ensayo inmunoenzimático de ELISA.

**Resultados:** En las diferentes condiciones experimentales de estimulación con *E. coli* no observamos cambios significativos en la viabilidad de la coriodecidua (Fig. 4;  $p=0.33$ ) y del amnios (Fig. 5;  $p=0.33$ ) con respecto al grupo control. Al determinar los diferentes marcadores bioquímicos propuestos, encontramos que en la región de la coriodecidua a las 3 y 6 horas después de la estimulación con *E. coli* observamos un aumento significativo en la secreción de Hsp-60 (Fig. 6A) y -70 (Fig. 6B) con respecto al grupo control ( $p\leq 0.05$ ); sin embargo, después de 24 horas de estimulación la secreción de Hsp-70 y -60 se reduce significativamente. En estos mismos ensayos encontramos que la secreción de IL-1 $\beta$  aumento significativamente a las 24 horas (Fig. 8A;  $p\leq 0.05$ ) con respecto al grupo control. Por otro lado, en la región del epitelio amniótico no encontramos un incremento en la secreción de la Hsp-60 (Fig. 7A) con respecto al grupo control; en tanto que la secreción de la Hsp-70 aumento

significativamente a las 3 y 6 horas con  $10^4$  UFC/mL (Fig. 7B;  $p \leq 0.05$ ) con respecto al grupo control; en tanto que la secreción de IL-1 $\beta$  aumento significativamente a las 24 horas (Fig. 8B;  $p \leq 0.05$ ) con respecto al grupo control.

**Discusión:** Estos resultados demuestran que las membranas fetales humanas responden de manera espacio-temporal a la estimulación con *E. coli* mediante la secreción de Hsp-60, -70 e IL-1 $\beta$ . En las primeras seis horas de estimulación la respuesta es principalmente de tipo Hsp en tanto que a las 24 horas cambia su perfil de secreción siendo de tipo IL-1 $\beta$ . Estos resultados indican que la región de la coriodecidua secreta tanto la Hsp-60 y -70 en tanto que la secreción en el epitelio amniótico es de tipo Hsp-70. La secreción diferencial entre las Hsp/IL-1 $\beta$  sugiere un mecanismo de regulación común promovido por las HSP lo cual deberá de ser demostrado en futuros experimentos.

**Palabras clave:** Corioamnioítis, *Escherichia coli*, interleucina-1 $\beta$ , membranas fetales humanas, proteínas de choque térmico.

## ABSTRACT

**Background:** *Escherichia coli* is recognized as an etiological bacterial associated with chorioamnionitis and preterm premature rupture of fetal membranes. This pathological condition induces proinflammatory cytokines and degradatives matrix metalloproteinases (MMPs), which are considered biological markers secreted in an acute stage of infection. Heat-shock proteins (HSPs) are an important component of the innate immunity response and are found in different pathological conditions. They have not been previously measured in human fetal membranes in response to infectious conditions. In the present study we evaluated in the choriondecidual tissues and amniotic epithelium secreted temporal and differential Hsp-60, -70 and interleukin (IL)-1 $\beta$  mediated by *E. coli*.

**Objective:** To assess the secretion of heat-shock protein and interleukin type 1- $\beta$  after stimulation with *Escherichia coli* in an experimental model of infection.

**Material and Methods:** Fetal membranes were mounted in a two-compartment culture system and infection with *E. coli* at different doses ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , and  $10^6$  colony-forming (CFU/mL) and intervals of incubation (3, 6, and 24 hours). The culture medium was collected, and Hsp-60, Hsp-70 and IL-1 $\beta$  were assessed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods.

**Results:** After 3, and 6 hours of infections, *E. coli* induced an increases in Hsp-70 secretion in the choriondecidual tissues. However, after 24 of incubation, Hsp-70 of incubation was down-regulated and we observed an increase in IL-1 $\beta$  secretion. By contrast, *E. coli* induced a lower Hsp-60 secretion in the amnion compared to Hsp-70.

**Discussion:** Human fetal membranes responded actively to *E. coli* infection, with an increase in HSp-70 during the first hours of infection. After 24 hours, there was increase in the liberation of IL-1 $\beta$ .

**Keywords:** Chorioamnionitis, *Escherichia coli*, human fetal membranes, heat-shock protein.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Las infecciones intrauterinas son un factor de riesgo comúnmente asociada con la ruptura prematura de las membranas fetales humanas (MFH) [1-3]. Los microorganismos patógenos aislados frecuentemente en ésta patología son *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Ureaplasma urealyticum* los cuales al contactar con las MFH inducen la secreción de diferentes citocinas inflamatorias, quimiocinas, factores uterotónicos y metaloproteasas de matriz extracelular [4]. Estos marcadores bioquímicos han sido asociados tanto con la activación prematura del trabajo de parto y/o con la ruptura de las MFH. A pesar de que se tienen evidencias de las moléculas implicadas en el desarrollo infeccioso no se cuenta aún con un perfil de secreción en sus fases iniciales.

Recientemente se ha demostrado que en las fases iniciales del proceso infeccioso se activan diversas vías de señalización en las que están involucrados genes de respuesta rápida como son péptidos antimicrobianos [5, 6], especies reactivas de oxígeno [7] y las proteínas de choque térmico [8-10].

Las proteínas de choque térmico (Hsp), juegan un importante papel como moléculas de protección, plegamiento y evitando la formación de complejos agregados entre proteínas [11]. Recientemente se ha demostrado su participación en la regulación y activación del sistema inmunológico [10, 12]. Las Hsp han sido detectadas en las células de la decidua, placenta, y en líquido amniótico y su expresión permanece constante a lo largo de la gestación [8, 13, 14].

Se ha demostrado que *E. coli* induce la secreción de las Hsp [15, 16]; sin embargo, no se ha demostrado el perfil de secreción espacio-temporal de las Hsp en las MFH durante un proceso infeccioso. En el presente estudio nos propusimos evaluar la secreción de la Hsp-60, -70 e IL-1 $\beta$  en las MFH después de su estimulación con *E. coli* mediante un modelo experimental de infección, el cual ha sido validado previamente por nuestro grupo de investigación [17, 18].

## 2.0 ANTECEDENTES

### 2.1 Infección intrauterina

Los nacimientos prematuros se definen como aquellos que ocurren antes de las 37 semanas de edad gestacional. Las causas que explican los nacimientos prematuros se encuentran el estado nutricional y salud materno (5.0%), hemorragias producidas por desprendimientos de la decidua (15.0%), distensiones uterinas (7.0%), causas desconocidas o idiopáticas (3.0%) y las infecciones intrauterinas (70.0%) [19]. Las infecciones durante el embarazo activan prematuramente tanto la ruptura de las membranas fetales humanas (MFH; 30.0%) [3, 20-22] como la activación del trabajo de parto (40.0%) [19, 23, 24].

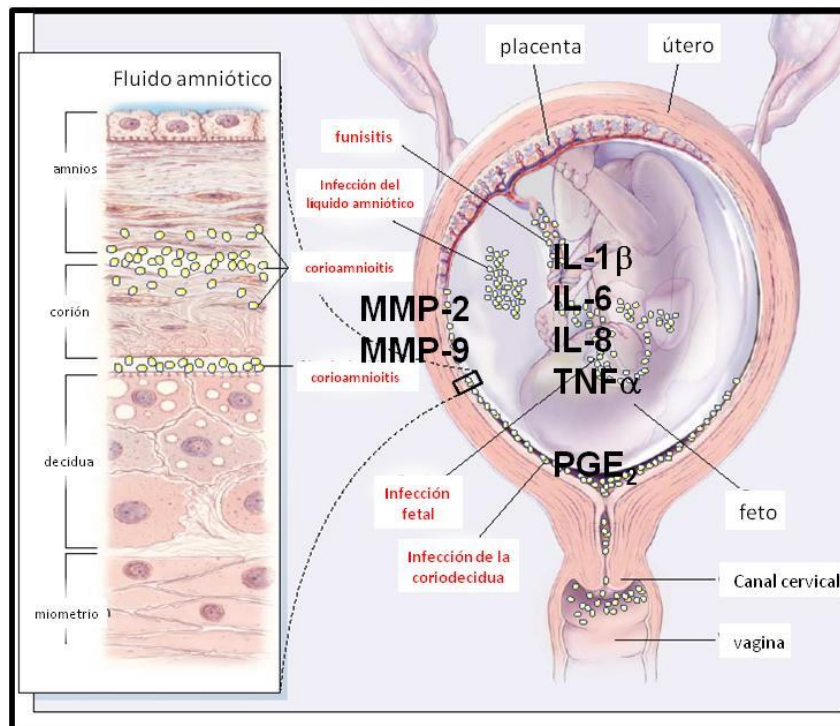
La figura 1 se describe el modelo de infección intrauterina propuesto por Romero y colaboradores [24] en el cual se sugiere como los patógenos ascienden desde el canal cérvico-vaginal hasta la cavidad uterina en donde al contactar con las MFH activan la respuesta inmunológica [24]. En este modelo de tres etapas se propone que de manera inicial existe modificaciones en la flora microbiana del tracto genital externo de la vagina, la cual se caracteriza por la disminución de las especies de *Lactobacilos* y el establecimiento de bacterias patógenas anaerobias facultativas (vaginosis bacteriana; Etapa I) [23]. En la segunda etapa de la infección, los patógenos ingresan a la cavidad uterina contactando con el tejido de la coriodecidua lo que activa la respuesta de las membranas fetales [19, 25] así como de las células profesionales del sistema inmunológico [26-28].

Entre las bacterias comúnmente asociadas a la ruptura prematura de las membranas fetales y a la activación del trabajo de parto se encuentran *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Ureaplasma urealyticum* [1]. Se ha reportado que *E. coli* presenta una incidencia del 25% detectándose en líquido amniótico de pacientes con ruptura prematura de las membranas fetales humanas [29-31]. *E. coli* inducen la producción y secreción de diferentes mediadores inflamatorios como la interleucina tipo 1-beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8 y el factor de

necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) los cuales son producidos y secretados por las células profesionales del sistema inmunológico (macrófagos, neutrófilos, linfocitos) y por las células que componen a las MFH (tejido de la coriodecidua y el epitelio amniótico) [10, 25, 32, 33]. La respuesta inflamatoria activa en la siguiente fase de la infección tanto a la producción de factores uterotónicos (prostaglandinas; PGE) responsables de la activación del trabajo de parto [34] como la producción de un grupo de enzimas con capacidad de hidrolizar diferentes componentes estructurales de soporte de las MFH como son las MMPs de tipo 2 y 9 (Fig. 1) [18].

Estos mediadores inflamatorios, uterotónicos y degradativos han sido determinados en fases agudas del proceso infeccioso. Recientemente se han identificado proteínas de choque térmico (Hsp) involucradas en las fases iniciales en diferentes patologías humanas [8, 35-37].





**Figura 1 Modelo de tres pasos de infección intrauterina.** Este modelo de infección ha sido previamente validado por Romero y colaboradores [24], el cual consiste en la disminución de *Lactobacillus* y el establecimiento y colonización de bacterias patógenas (**Etapa I**). En la fase de la infección se da el arribo de las bacterias patógenas hacia la cavidad úterina, que al contactar con las membranas fetales humanas (MFH) y con las células profesionales del sistema inmunológico (macrófagos, células NK) se estimula la secreción de los factores uterotónicos (PGE, prostaglandina), y de las MMP-2, -9 (**Etapa II**). Las bacterias al evadir la respuesta de las MFH logran invadir el líquido amniótico activando la secreción de las citocinas inflamatorias y de las MMP-2 y -9 [CITAS] y posteriormente al producto (**Etapa III**). Imagen modificada de Goldenberg [38].

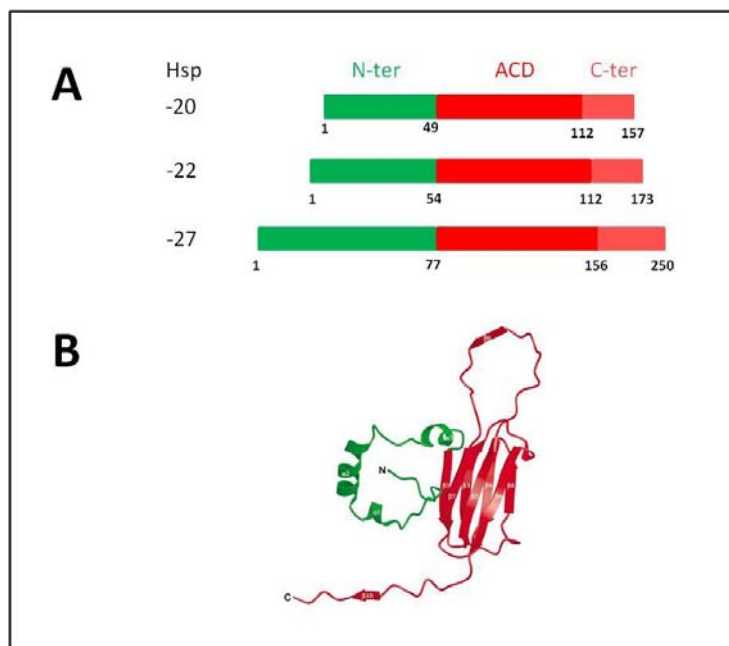
## 2.2 Proteínas de choque térmico.

Las proteínas del choque térmico (Hsp) fueron descritas por primera vez en *Drosophila melanogaster* a la cual se le expuso a incrementos en la temperatura y se observó un aumento en la expresión de las Hsp [39]. Las Hsp comprenden una familia de proteínas que se encuentra en forma constitutiva en

diferentes tipos celulares [35, 40, 41] y están involucradas con el plegamiento, degradación y reparación de proteínas [41], regulan la proliferación y diferenciación de las células inmunológicas [42-44], y funcionan como sistemas de alarma celular en diferentes patologías [8, 40, 45, 46].

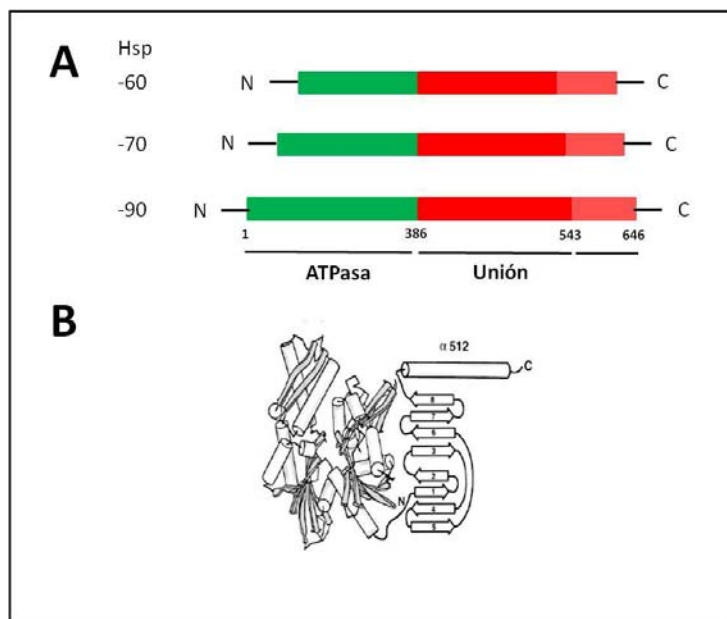
Las Hsp han sido clasificadas de acuerdo a su peso molecular en proteínas pequeñas (Hsp-20, -22 y -27 KDa) y grandes (Hsp-60, -70 y -90 KDa) [40]. La composición estructural de las Hsp ha sido determinada mediante cristalografía de rayos-X e indica que están compuestas de tres dominios [41, 47].

Las Hsp pequeñas tienen un peso molecular de entre 15 a 30 KDa (150 a 250 aminoácidos). El dominio amino-terminal presenta tres estructuras alfa ( $\alpha$ 1-3) que están poco conservadas y contiene regiones ricas en metionina. Este dominio funciona como molécula acompañante “*chaperona*”, no depende de la hidrólisis de ATP y su capacidad de unión a proteínas es reversible y previene la agregación parcial de las proteínas (Fig. 2) [48]. El siguiente dominio contiene aproximadamente 90 residuos de aminoácidos que forman estructuras de tipo  $\alpha$ -cristalinas (ACD; *alpha-crystallin domain*) similar a la proteína del cristalino. Este dominio consiste de estructuras de tipo  $\beta$  compuesta por dos láminas antiparalelas con cuatro ( $\beta$ 2, ( $\beta$ 3,  $\beta$ 9,  $\beta$ 8) y tres ( $\beta$ 7,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5) hojas (Fig. 2B) [49]. El dominio carboxilo-terminal presenta una hoja de tipo  $\beta$ . Éste dominio es una región conservada que está implicada con la interacción entre monómeros y cambios en su secuencia reduce la capacidad de unión con el DNA y con otras proteínas (Fig. 2) [50].



**Figura 2 Estructura de las Hsp pequeñas. (A)** Dominios N-terminal (N-ter; verde),  $\alpha$ -cristalino (ACD; rojo), C-terminal (C-ter; rosa). **(B)** Estructura secundaria se observa los diferentes dominios de las hojas alfa y beta. Imagen tomada de van Montfort y cols., [50].

Las Hsp grandes contiene 646 aminoácidos, en la porción del amino-terminal está compuesta por 386 aa (44 KDa) y constituyen el dominio de tipo ATPasa el cual hidroliza ATP. Este dominio, tiene la función de distinguir diferentes conformaciones de las proteínas. El segundo dominio está ubicado entre la posición 387-543 aa (18 KDa) y constituye el sitio de unión el cual está involucrado con la capacidad de interactuar con otras proteínas y con receptores específicos (TLRs, por sus siglas en inglés Toll Like Receptos; CD36, CD40). El tercer dominio, está comprendido entre la posición 543-646 aa (10 KDa) representa la porción del dominio carboxilo terminal (Fig. 3) [41, 47, 51].



**Figura 3 Estructura de las Hsp grandes.** (A) Dominios amino-terminal de hidrólisis de ATP (N-; verde), dominio de unión (rojo), dominio carboxilo-terminal (-C; rosa). (B) Estructura secundaria se observa los diferentes dominios de las hojas alfa y beta. Imagen tomada de Kiang y Tsokos [41].

Las Hsp son proteínas altamente conservadas y se encuentran localizadas en el núcleo, citoplasma, membrana plasmática y en diferentes fluidos biológicos [52, 53]. Diferentes evidencias han demostrado que las Hsp se encuentran en células de la decidua [14], placenta [54, 55], cordón umbilical [56], miometrio [57], líquido amniótico [8, 45] y suero materno [13].

Se ha demostrado que en las etapas iniciales del estrés celular, infección, inflamación, aumento de radicales libres, necrosis y apoptosis celular se induce

la síntesis y secreción de la Hsp-60 y Hsp-70, las cuales son las responsables de mantener la homeostasis celular y coordinar y regular la respuesta inflamatoria [40].

### 3.0 JUSTIFICACIÓN

*E. coli* ha sido asociada con la ruptura prematura de las membranas fetales humanas, al contactar las diferentes regiones que conforman a las membranas fetales humanas (amnios, corión y decidua) [2]; activan la secreción masiva de citocinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , y TNF $\alpha$ ) [58] y metaloproteasas de matriz extracelular (MMP-9 y MMP-2) [59]. Se ha demostrado en otros modelos que en la fase inicial del proceso infeccioso/inflamatorio se produce la síntesis y secreción de las proteínas de fase aguda tisular denominadas de choque térmico (Hsp), las cuales favorecen la respuesta inmunológica y mantienen la homeostasis celular [40].

Existen diversas evidencias que demuestran, que la concentración de Hsp-70 se incrementa hasta 7-veces en las pacientes con trabajo de parto prematuro [8, 16]. El incremento de la Hsp-70 ha sido asociado con el incremento en la concentración de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  [14, 46]. A pesar de estos hallazgos, no se cuenta con evidencias experimentales que demuestren que región de las membranas fetales es la responsable de la secreción de las Hsp, por lo que nos propusimos responder cuál de las dos regiones responde más activamente ante un proceso infeccioso.

#### Pregunta de investigación

1. Las distintas regiones de las membranas fetales humanas al ser estimuladas con *Escherichia coli* secretarán Hsp-60, -70 e IL-1 $\beta$  de manera diferencial con respecto al tiempo de infección.
2. La secreción de la Hsp-60, -70 e IL-1 $\beta$  dependerá de las unidades formadoras de colonias utilizadas de *Escherichia coli*.

Para responder a éstas preguntas nos propusimos desarrollar el siguiente objetivo e hipótesis experimentales.

## 4.0 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 4.1 Objetivo general

Determinar la cinética de secreción de las proteínas de choque térmico y de la IL-1 $\beta$  producidas por las membranas fetales humanas después de la estimulación con *Escherichia coli* en condiciones in vitro.

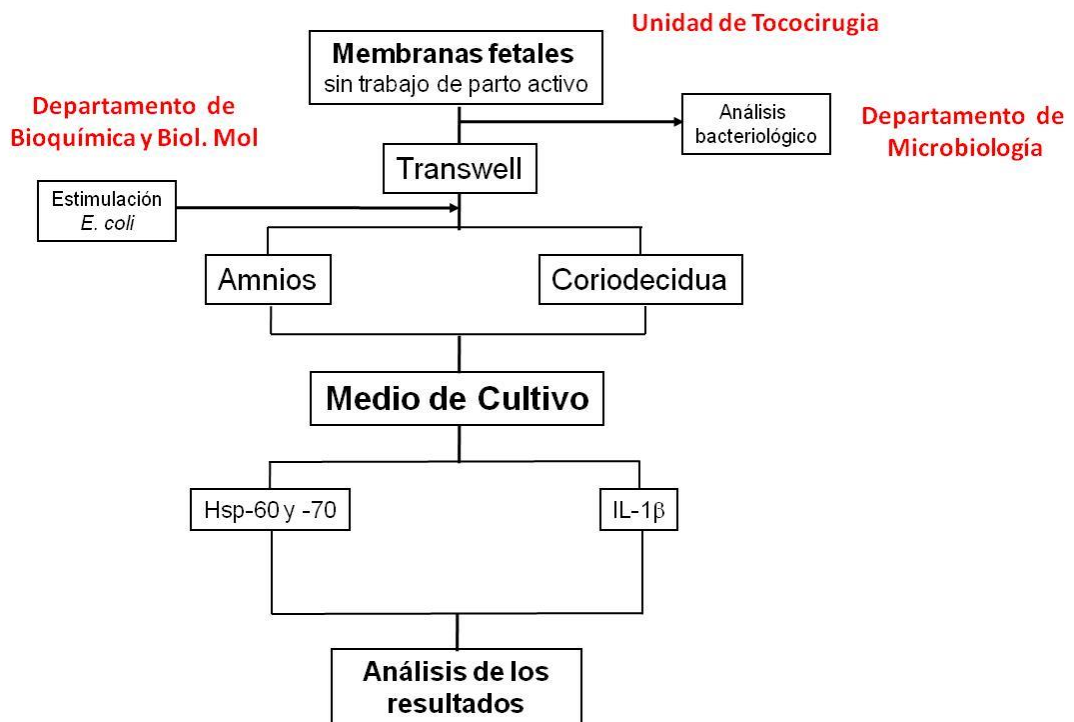
#### 4.1.1 Objetivos particulares

1. Determinar la viabilidad de las membranas fetales a las 3, 6 y 24 horas después de la estimulación con *E. coli* mediante el ensayo colorimétrico de XTT.
2. Cuantificar la secreción de las proteínas de choque térmico (Hsp)-60, -70 e IL-1 $\beta$  en el medio de cultivo a las 3, 6 y 24 horas después de la estimulación con *E. coli* mediante el ensayo de ELISA.
3. Comparar los valores de secreción de la Hsp-60, -70 e IL-1 $\beta$  de las distintas regiones de las membranas fetales humanas estimuladas con *E. coli* con respecto al grupo control.

### 4.2 HIPÓTESIS

La estimulación de las distintas regiones de las membranas fetales humanas con *Escherichia coli* aumentará la secreción de la Hsp-60, -70 e IL-1 $\beta$  de manera dosis dependiente.

## 5.0 MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura 4 Procedimiento general del estudio.** La toma de las membranas fetales se efectuó en la *unidad de tococirugía*, el análisis microbiológico se determinó en el *departamento de Microbiología* y el desarrollo experimental se realizó en el departamento de *Bioquímica y Biología Molecular*.

### 5.1 Aspectos éticos

Previo al manejo experimental de las MFH se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes en donde se les explicó la finalidad del proyecto de investigación, el cual fue aprobado por los comités de investigación y ética institucionales y cuenta con número de registro institucional 212250-19051 (*anexo 1*). Se les informó que la obtención de las MFH sería tomada por el médico especialista (MOC) después del nacimiento de su bebé y que este procedimiento no afectaría con el bienestar de ella ni el de su bebé.



Finalmente, se le entregó la carta de consentimiento informado para que la paciente firmará de manera libre (*anexo 2*).

### *5.2 Características de las pacientes*

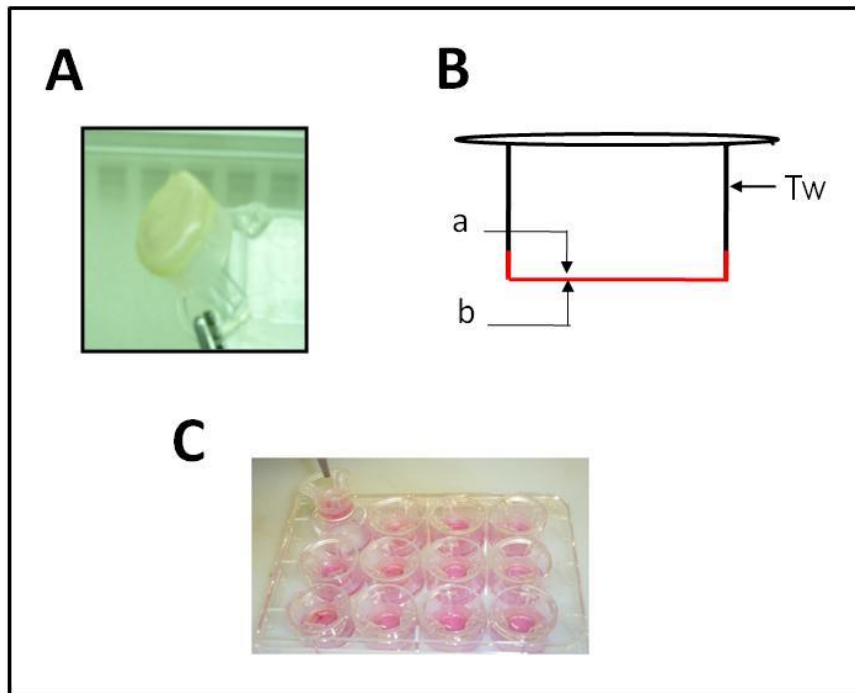
Las pacientes contaban con embarazos a término ( $\geq 37$  semanas de gestación), y fueron intervenidas quirúrgicamente por cesárea. En todos los casos, no presentaron trabajo de parto activo, así como signos y síntomas evidentes de infección u otras patologías obstétricas asociadas a la respuesta inflamatoria.

### *5.3 Unidad de tococirugía*

Las MFH y la placenta después de ser desprendida de la madre y del feto fueron depositadas en un contenedor quirúrgico. Con bisturí las MFH, fueron separadas de la placenta y colocadas en el contenedor estéril para muestras biológicas, el cual contenía medio D-MEM estéril y fueron inmediatamente transportadas al tercer piso de la torre de investigación para su procesamiento.

### *5.4 Procesamiento de las membranas fetales humanas*

En condiciones de esterilidad, las MFH fueron lavadas con solución salina estéril para remover restos de sangre. Las MFH fueron cortadas en porciones de 2 cm<sup>2</sup> y los explantes fueron montados en el sistema de Transwell como ha sido previamente reportado por nuestro grupo de investigación [17, 18] (figura 5). Este sistema permite tener dos regiones (amnios y coriodecidua) independientes, pero manteniendo la estructura y comunicación celular.



**Figura 5 Sistema de Transwell.** Membranas fetales humanas montadas en el sistema de Transwell (2 cm<sup>2</sup> de diámetro; **A**) Compartimientos independientes amnios y coriodecidua separados entre sí, pero manteniendo la comunicación celular (**B**). Explantes incubados en medio DMEM suplementado con SBF (**C**). Este modelo de estimulación ha sido previamente validado por Flores-Herrera y cols., [17].

Una porción de las MFH fue analizada en el departamento de Infectología del INPer para la detección de microorganismos patógenos. Después de éste análisis se excluyeron tres MFH, ya que fueron positivas a *Staphylococcus coagulasa* negativa, *E. coli*, *Streptococcus* del grupo B, *Streptococcus epidermidis*, *Gardnerella vaginalis* y cocos Gram-positivos, por lo que éstas no fueron incluidas en el estudio.

Nueve MFH fueron incubadas en cajas independientes de 12 pozos, se les adicionó 1 ml de medio de cultivo DMEM a cada región (Figura 3C) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SBF) y 1% de penicilina/estreptomina (100 U/mL y 100 µg/mL respectivamente; Gibco, Bethesda, MD, USA). Los explantes se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Al termino de este periodo, se les retiró el medio de cultivo, a cada región se le adicionó PBS (1x), con la finalidad de eliminar el SBF éste

procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, a cada región se le adicionó 1 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con 0.2% de hidrolizado de lactoalbúmina (DMEM-HLA; Gibco) e incubados en las condiciones arriba descritas.

### 5.5 Caracterización de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una bacteria Gram-negativa, la cual fue aislada de canal cérvico-vaginal de paciente con datos clínicos de corioamnioítis que presentó ruptura prematura de membranas fetales con más de 72-horas de progresión. La identificación de *E. coli* se realizó mediante el lector automatizado VITEC a partir del crecimiento en medio McConkey (lactosa positiva) así como por la sensibilidad a antimicrobianos por el método de difusión en disco. Dada las características patogénicas de *E. coli* se utilizó campana de bioseguridad nivel II con el siguiente equipo de seguridad personal: cubre bocas, guantes de látex los cuales serán desechados en bolsa de polietileno color roja. Para la protección de los ojos se usarán lentes los cuales fueron limpiados con una gasa roseada de alcohol que fue eliminada en bolsa roja.

### 5.6 Procedimiento de Estimulación.

Para determinar el tiempo y la cantidad de unidades formadoras de colonias de *E. coli* ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/ml) necesarias para observar la secreción de la Hsp-60, -70 e IL-1 $\beta$  por parte de las MFH realizamos una cinética de estimulación a diferentes intervalos de tiempo (3, 6 y 24-horas). Para obtener la concentración de requerida de *E. coli* se utilizó como referencia de turbidez el tubo número 0.5 de MacFarland que representa aproximadamente  $10^8$  UFC/mL. Se realizaron diferentes diluciones hasta obtener la concentración de bacterias requeridas.

Los grupos experimentales fueron los siguientes: 1) control (sin estimulación); 2) estimulación por la región del amnios con *E. coli* a diferentes unidades formadoras de colonias ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL); 3) estimulación por la región de la coriodecidua con *E. coli* a diferentes unidades formadoras de

colonias ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL). El medio de cultivo fue recuperado a las 3, 6 y 24 horas después de la estimulación y en cada caso las muestras fueron centrifugadas a 5 000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado en tubo Eppendorf y almacenados a  $-70$  °C hasta la cuantificación de la Hsp-60, -70 e IL-1 $\beta$ , mediante el método de ELISA. En estos mismos ensayos y en pozos independientes se determinó la viabilidad celular el cual se describe a continuación.

### *5.7 Viabilidad de las membranas fetales humanas después de la estimulación con Escherichia coli.*

La determinación de viabilidad de las MFH en las diferentes condiciones experimentales de infección, se realizó mediante el ensayo metabólico mitocondrial, el cual está basado en la conversión colorimétrica de la sal de tetrazol (2,3)-bis-(2-metoxi-4nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamin-carbonil-2H-tetrazol hidróxido) (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany) [60]. A cada pozo del cultivo celular se le agregó 0.5  $\mu$ l del reactivo de XXT y 10  $\mu$ l del catalizador de electrones el N-metilfenacina metosulfato (PMS; Roche). El medio de cultivo fue recuperado y centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se analizó por espectrofotometría a 475 nm. Como control negativo utilizamos 80  $\mu$ M del inhibidor carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP; Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) el cual es un desacoplante mitocondrial por lo que la sal de tetrazolium no es convertida [61].

### *5.8 Determinación de la Hsp-60 y -70 mediante el método de ELISA.*

La determinación de la Hsp-60 (DYC1800-2) y Hsp-70 (DYC-1663-2) se realizó mediante las recomendaciones de la casa comercial (R&D System) y en cajas independientes. La preparación de las microplacas (Nunc-Immuno Brand products, Denmark) consistió en la adición del anticuerpo de captura para la Hsp-60 (2.0 $\mu$ g/mL) y de la Hsp-70 (2.0 $\mu$ g/mL) la cual es sellada con membrana adhesiva (SealPleat; EXCEL Scientific) y fueron incubadas toda la noche a 4°C. Al finalizar la incubación la placa fue lavada tres veces con solución de lavado que contiene Tween-20 al 0.05% en PBS (TPBS, pH 7.2).

A cada pozo de la placa se le añadieron 300  $\mu\text{L}$  de solución bloqueadora (0.1% BSA, 0.05 %  $\text{NaN}_3$ , PBS pH 7.2) y fue incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Al terminar la incubación, la placa fue lavada nuevamente con la solución de PBS.

La curva estándar para cada placa fue de 7 puntos con diluciones seriadas (2-veces) teniendo la concentración más alta de 40 ng/mL para la Hsp-60 y de 10,000 pg/mL para la Hsp-70. En el resto de los pozos de la placa se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras de los diferentes procedimientos experimentales. La placa fue incubada por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  por pozo del anticuerpo de detección Hsp-60 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y Hsp-70 (100 ng/mL), se incubó nuevamente por dos horas a temperatura ambiente. La placa fue lavada dos veces, y posteriormente se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  por pozo de estreptavidina-HRP e incubadas nuevamente a temperatura ambiente por 20 minutos y en oscuridad. La placa fue lavada con TPBSA, se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  por pozo de la mezcla 1:1 del sustrato colorimétrico (R&D; DY999) que consiste en el reactivo A ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y B (tetrametilbenzidina), la placa fue incubada por 20 minutos. La reacción fue detenida mediante la adición de 50  $\mu\text{L}$  por pozo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. La microplaca fue leída a 450 nm (Dynatech MR5000). Los resultados fueron corregidos considerando la concentración de proteína de cada muestra y fueron expresadas en unidades de pg/ $\mu\text{g}$  de proteína.

### *5.9 Determinación de la IL-1 $\beta$ mediante el método de ELISA.*

Para determinar la concentración de IL-1 $\beta$  (DY201; R&D Systems) en el medio de cultivo de los diferentes grupos experimentales se utilizó el ensayo inmuno enzimático tipo sándwich (ELISA) como ha sido reportado previamente por nuestro grupo de investigación [17]. Las mediciones fueron realizadas en placas de 96 pozos (Nunc-Immuno Brand products, Denmark) a la cual se le añadió 4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  del anticuerpo de captura diluido en PBS (1X; pH 7.4) la placa fue sellada con membrana adhesiva (SealPleat; EXCEL Scientific) e incubada toda la noche a 4°C. Al término de esta incubación la placa fue lavada tres veces con

0.05% Tween-20 en PBS (1X), bloqueada por 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se le adicionaron 300  $\mu$ l del reactivo Diluent (1% BSA-PBS 1X). Al término de éste periodo la placa fue lavada tres veces con PBS y se le añadió 100  $\mu$ l del anticuerpo específico IL-1 $\beta$  (4.0 to 260 pg/mL) con diluciones (2x) seriadas de cada una.

La placa fue sellada e incubada por dos horas a temperatura ambiente. Al término de éste periodo, la placa fue lavada y se añadieron 100  $\mu$ l del anticuerpo específico diluido en 1% BSA-PBS (pH 7.4). La placa fue sellada con la membrana adhesiva y fue incubada por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente la placa fue nuevamente lavada y se añadieron a cada pozo 100  $\mu$ l del cromógeno de estreptavidina-HRP (R&D) la placa fue mantenida en oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y se añadieron a cada pozo 100  $\mu$ l de la mezcla de la solución de sustrato (1:1 reactivo A y reactivo B; R&D, DY999) y se incubó por 20 minutos en oscuridad. Finalmente se añadieron a cada pozo 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) para detener la reacción. Se determinó la densidad óptica a una longitud de 450 nm. Los resultados fueron corregidos considerando la concentración de proteína total (ver sección 5.5) de cada muestra y fueron expresadas en pg/ $\mu$ g de proteína.

#### *5.10 Análisis estadístico.*

Los datos de cada zona de infección fueron analizados mediante la prueba de varianza (ANOVA). La comparación post hoc fue realizada mediante la medición de Tukey's. Se usó el software de SigmaPlot versión 11.0. Todos los valores son presentados como la media  $\pm$  error estándar. Se tomó como diferencia estadísticamente significativa el valor menor a p=0.05. En cada caso las mediciones se realizaron por duplicado.

## 6.0 RESULTADOS

### 6.1 Características de la población de estudio.

Las características maternas (tabla 1) y neonatales (tabla 2) se obtuvieron mediante el archivo clínico de las 9 MFH que fueron incluidas en el presente estudio.

**Tabla 1 Características de las pacientes.**

| Variable                            | Embarazo a término (n=9) |
|-------------------------------------|--------------------------|
| Edad materna años, media (min, max) | 25 (17,44)               |
| Número de gestas                    |                          |
| 1 n (%)                             | 4 (44)                   |
| 2 n (%)                             | 2 (22)                   |
| 3 n (%)                             | 2 (22)                   |
| 4 n (%)                             | 1 (11)                   |

Número de muestras (n), porcentaje (%).

**Tabla 2 Características neonatales.**

| Variable                          | Niñas (n=5) | Niños (n=4) |
|-----------------------------------|-------------|-------------|
| Edad gestacional semanas promedio | 38.8        | 37.6        |
| (min, max)                        | (37-40)     | (37.5-39.5) |
| Peso Kg, promedio                 | 2989        | 2735        |
| (min, max)                        | (2265-3480) | (2520-3130) |
| Talla cm, promedio                | 48.6        | 48.0        |
| (min, max)                        | (47-50)     | (47-49)     |

número de muestras (n), valor mínimo (min), valor máximo (max).

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al sexo, peso y talla de los recién nacidos (Tabla 2).

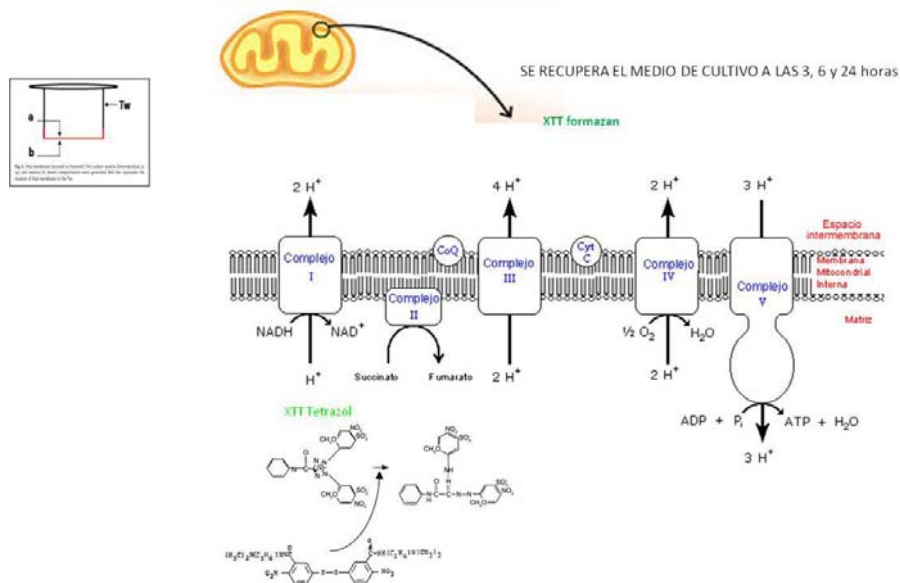
### 6.2 Sensibilidad de *E. coli* a antimicrobianos.

La cepa de *E. coli* utilizada en éste estudio mostró resistencia a ampicilina (10 µg), piperacilina (100 µg), carbenicilina (100 µg), amox-ácido clavulanico (10 µg), cefozolina (30 µg), cefalotin (30 µg), cefamandol (30 µg), furoxime (30 µg), aztreonam (30 µg), kanamicina (30 µg), estreptomycin (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) y sensible a mecilanam (10 µg), cefoxitin (30 µg), meropenem (10 µg), gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg), cloranfenicol (30 µg).

### 6.3 Ensayo de viabilidad de las membranas fetales humanas.

Para determinar si las diferentes condiciones experimentales de incubación (3, 6, y 24 horas) y las unidades formadoras de colonias de *E. coli* ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL; *ver material y métodos 5.7*) producían efectos sobre las MFH se realizó el ensayo de viabilidad tanto en el tejido de la coriodecidua como en el epitelio amniótico, mediante la prueba metabólica usando el reactivo de tetrazol (2,3)-bis-(2-metoxi-4nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamin-carbonil-2H-tetrazol hidróxido; XTT) el cual se fundamenta por la ruptura del anillo de tetrazol por las mitocondrias activas usando como catalizador el N-metilfenacina metosulfato (PMS; Fig. 6).





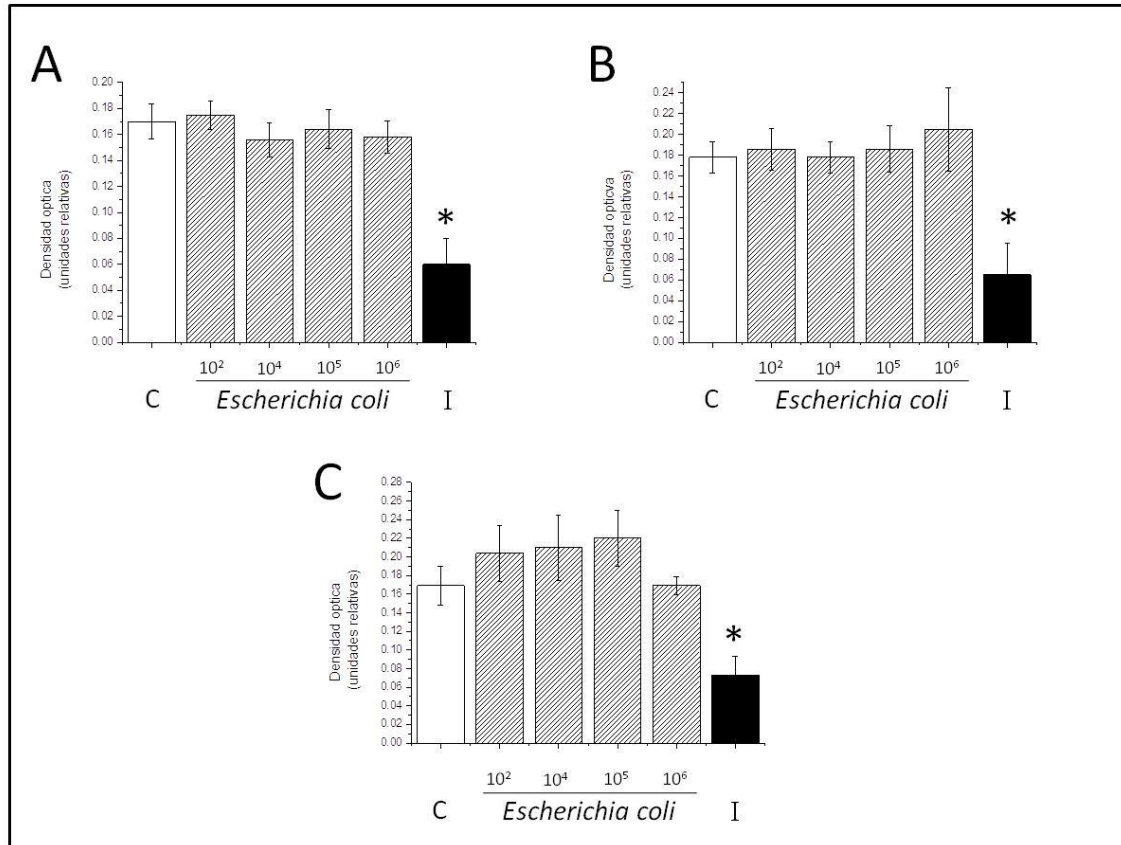
**Figura 6 Ensayo de viabilidad metabólica de las membranas fetales.** El ensayo se basa en el movimiento de protones por parte del complejo mitocondrial (I-IV) y la formación de ATP (complejo V). El complejo II favorece la ruptura del anillo de tetrazol (XTT) y la formación de formazan. Como control se utilizó clorofenilhidrazona (CCCP).

El XTT (amarillo) es reducido enzimáticamente produciendo la sal de formazan (anaranjado) soluble y colorimétrica la cual es medida a 475 nm. En estos ensayos se utilizó como control negativo el compuesto carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) el cual actúa como agente protonofórico, atravesando la membrana mitocondrial interna en forma protonada, promoviendo la disipación del gradiente electroquímico formado durante la respiración [61].

### 6.3.1 Viabilidad en la región de la coriodecidua.

La lectura obtenida en el grupo control a las 3, 6 y 24-horas fue de  $0.17 \pm 0.013$ ;  $0.178 \pm 0.02$ ; y de  $0.169 \pm 0.04$  respectivamente (Figura 7). Después de la estimulación con *E. coli* encontramos cambios en la densidad óptica a las 3 ( $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL; Fig. 4A), 6 ( $10^6$  UFC/mL; Fig. 4B) y 24 ( $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^5$  UFC/mL; Fig. 7C); sin embargo, no se encontramos diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ( $p=0.33$ ). Al incubar a las MFH con el inhibidor metabólico CCCP observamos una disminución significativa en la actividad metabólica mitocondrial de las células

que conforman al tejido de la coriodecidua con respecto al grupo basal ( $p \leq 0.001$ ; Fig. 7).

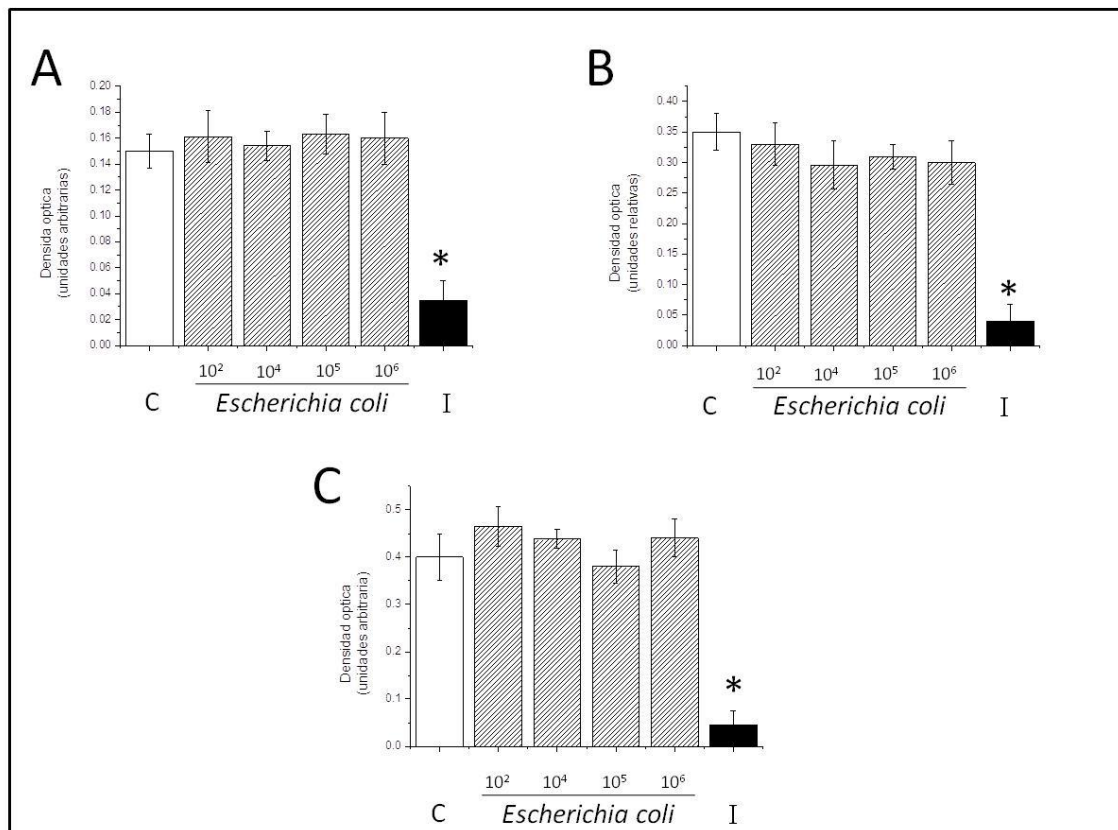


**Figura 7. Determinación de la viabilidad en la región de la coriodecidua después de la estimulación con *Escherichia coli*.** 3(A), 6 (B) y 24 (C) horas. Grupo control (barra blanca) e infectadas con diferentes unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* (barra achurada), inhibidor metabólico (80  $\mu$ M; barra negra). La viabilidad se determinó mediante el ensayo de XTT (ver *material y métodos*). Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. Se realizaron 3 experimentos independientes y por duplicado. \*Diferencia estadística entre el inhibidor versus control e infección  $p \leq 0.001$ .

### 6.3.2 Viabilidad en la región del amnios.

La lectura obtenida en el grupo control a las 3, 6 y 24-horas fue de  $0.15 \pm 0.013$ ,  $0.350 \pm 0.03$  y de  $0.4 \pm 0.015$  respectivamente (Figura 8). Después de la

estimulación con *E. coli* encontramos cambios en la densidad óptica a las 3 ( $10^2$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL; Fig. 8A), 6 ( $10^2$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL; Fig. 7B) y 24 ( $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$  UFC/mL; Fig. 8C); sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ( $p=0.33$ ). Al incubar a las MFH con el inhibidor metabólico CCCP observamos una disminución significativa en la actividad metabólica mitocondrial de las células que conforman al tejido de la coriodecidua con respecto al grupo basal ( $p\leq 0.001$ ; Fig. 8).



**Figura 8. Determinación de la viabilidad en la región del amnios después de la estimulación con *Escherichia coli*.** 3(A), 6 (B) y 24 (C) horas. Grupo control (barra blanca) e infectadas con diferentes unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* (barra achurada), inhibidor metabólico (80  $\mu$ M; barra negra). La viabilidad se determinó mediante el ensayo de XTT (*ver material y métodos*). Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. Se realizaron 3 experimentos independientes y por duplicado. \*Diferencia estadística entre el inhibidor versus control e infección  $p \leq 0.001$ .

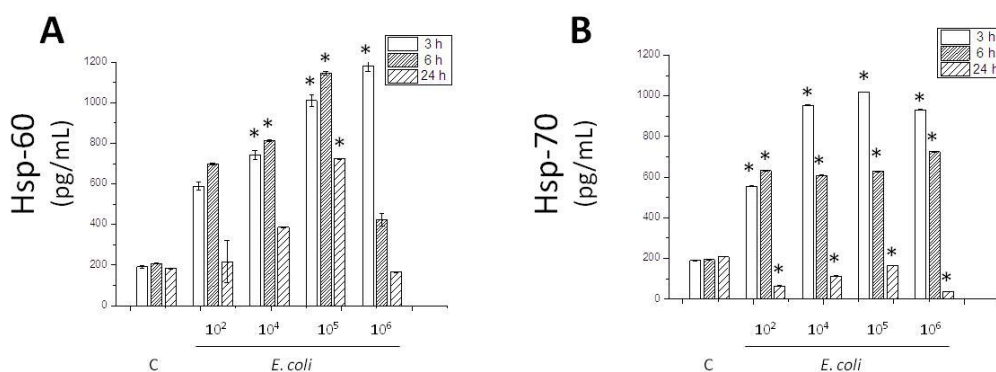
Estos resultados demuestran que las condiciones experimentales espacio-temporales de estimulación con *E. coli* no afectan con la viabilidad de las MFH, por lo que se prosiguió a analizar el perfil de secreción de las proteínas de choque térmico de 60 y 70 Kilo Daltones tanto en el tejido de la coriodecidua como del epitelio amniótico.

#### 6.4 Secreción de la Hsp-60 y -70 en las membranas fetales humanas.

Para determinar el perfil de secreción de la Hsp-60 y -70 en la región de la coriodecidua y del epitelio amniótico después de las 3, 6, y 24 horas de estimulación con *E. coli* y a las diferentes unidades formadoras de colonias.

##### 6.4.1 Región de la coriodecidua

La figura 9 muestra el perfil de secreción de la Hsp-60 (A) y -70 (B) con respecto al tiempo y a la concentración de *Escherichia coli*.



**Figura 9. Cinética de secreción de Hsp-60 y -70 en la región de la coriodecidua después de la estimulación con *Escherichia coli*.** La determinación fue realizada a diferentes intervalos de tiempo 3, 6 y 24 horas y a diferentes unidades formadoras de *E. coli*. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (C; p ≤ 0.05).

En el grupo control la concentración de la Hsp-60 secretada por la región de la coriodecidua fue de 191.3±6.7; 207.3±1.9; y 184.8±2.5 a las 3, 6 y 24 horas

respectivamente (Fig. 9A). No encontramos diferencia estadísticamente significativa entre estos intervalos de tiempo.

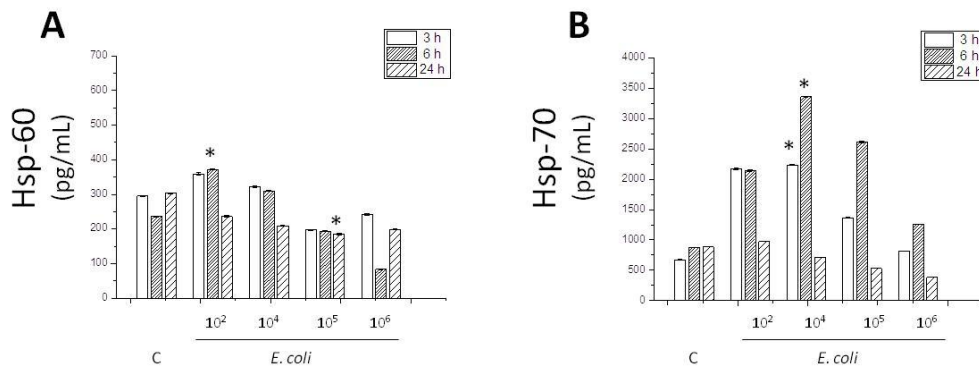
Después de 3-horas de la estimulación a las MFH con *E. coli*  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL observamos un incremento de 3.7- ( $p \leq 0.05$ ), 5.5- ( $p \leq 0.05$ ), y 5.9- veces ( $p \leq 0.05$ ) en la secreción de Hsp-60 respectivamente con respecto al basal (Fig. 9). A las 6-horas de estimulación con  $10^4$  y  $10^6$  UFC/mL detectamos un incremento de 3.9- ( $p \leq 0.05$ ) y 5.5-veces ( $p \leq 0.05$ ) la secreción de la Hsp-60 respectivamente con respecto al basal. Finalmente, a las 24-horas de estimulación, observamos un aumento con 105 UFC/mL de 3.9-veces con respecto al basal ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 9).

En el grupo control la concentración de la Hsp-70 secretada por la región de la coriodecidea fue de  $191.4 \pm 1.41$ ;  $194. \pm 1.43$ ; y  $209.2 \pm 1.34$  a las 3, 6 y 24 horas respectivamente (Fig. 9B). No encontramos diferencia estadísticamente significativa entre estos intervalos de tiempo.

Después de 3-horas de la estimulación a las MFH con *E. coli*  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL observamos un incremento de 2.9- ( $p \leq 0.05$ ), 4.9- ( $p \leq 0.05$ ), 5.3- ( $p \leq 0.05$ ), y 4.8-veces ( $p \leq 0.05$ ) la secreción de Hsp-70 respectivamente con respecto al basal (Fig. 9B). A las 6-horas de infección con las mismas UFC/mL detectamos un incremento de 3.2- ( $p \leq 0.05$ ), 3.1 ( $p \leq 0.05$ ), 3.2 ( $p \leq 0.05$ ), y 3.7- veces ( $p \leq 0.05$ ) la secreción de la Hsp-70 respectivamente con respecto al basal. Finalmente, a las 24-horas de infección, observamos un decremento en la secreción de la Hsp-70 a cualquier concentración de las UFC/mL de *E. coli* utilizadas (Fig. 9B).

#### 6.4.2 Región del amnios

La figura 10 muestra el perfil de secreción de la Hsp-60 (A) y -70 (B) con respecto al tiempo y a la concentración de *Escherichia coli*.



**Figura 10. Cinética de secreción de Hsp-60 y -70 en la región del amnios después de la estimulación con *Escherichia coli*.** La determinación fue realizada a diferentes intervalos de tiempo 3, 6 y 24 horas y a diferentes unidades formadoras de *E. coli*. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (C;  $p \leq 0.05$ ).

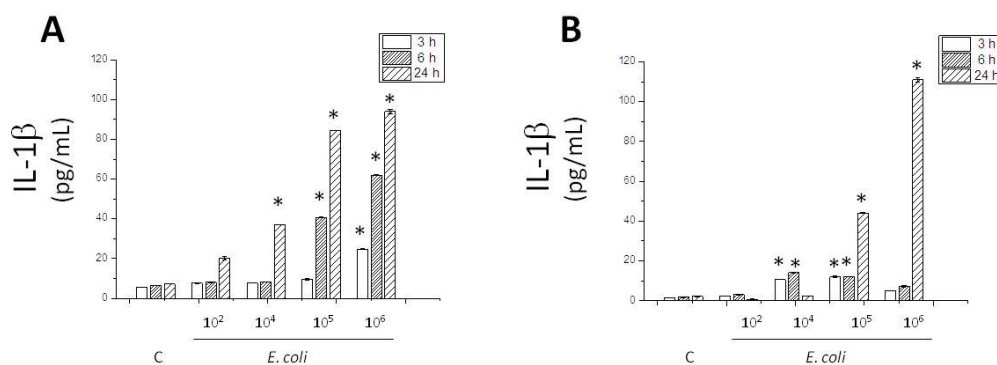
En el grupo control, la concentración de la Hsp-60 secretada por la región del amnios fue de  $296.7 \pm 1.22$ ;  $236.6 \pm 1.3$ ; y  $303.7 \pm 1.8$  a las 3, 6 y 24 horas respectivamente (Fig. 10A). No encontramos diferencia estadísticamente significativa entre estos intervalos de tiempo.

Observamos un incremento de 3.3-veces en la secreción de Hsp-70 con respecto al basal, después de 3-horas de estimulación de las MFH con *E. coli*  $10^4$  UFC/mL ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 10B). A las 6-horas de estimulación con  $10^4$  UFC/mL se indujo 3.8-veces más secreción de Hsp-70 con respecto al grupo basal ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 10B). Finalmente, a las 24-horas de estimulación, observamos un decremento en la secreción de la Hsp-70 a cualquier concentración de las UFC/mL de *E. coli* (Fig. 10B).

Después de determinar la secreción de las proteínas de choque térmico se prosiguió a evaluar el perfil de secreción de la interleucina tipo 1-beta tanto en el tejido de la coriodecidua como del epitelio amniótico.

### 6.5 Secreción de la IL-1 $\beta$

La figura 11 muestra el perfil de secreción de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidua (A) y del epitelio amniótico (B) con respecto al tiempo y a la concentración de *Escherichia coli*.



**Figura 11 Cinética de secreción de IL-1 $\beta$  después de la estimulación con *Escherichia coli*.** Región de la coriodecidua (A) y en el epitelio amniótico (B). La determinación fue realizada a diferentes intervalos de tiempo 3, 6 y 24 horas y a diferentes unidades formadoras de *E. coli*. \*Diferencia estadísticamente significativa de  $p \leq 0.05$  con respecto al grupo control.

#### 6.5.1 Región de la coriodecidua

En el grupo control la concentración de la IL-1 $\beta$  en la región de la coriodecidua fue de  $5.62 \pm 0.13$ ;  $6.35 \pm 0.08$ ; y  $7.29 \pm 0.09$  a las 3, 6 y 24 horas respectivamente (Fig. 11A). No encontramos diferencia estadísticamente significativa entre estos intervalos de tiempo.

Después de 3-horas, *E. coli* con  $10^6$  UFC/mL incrementa 4.7-veces la secreción de la IL-1 $\beta$  con respecto al grupo basal ( $p \leq 0.05$ ). A las 6-horas de estimulación con  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL induce 6.4- ( $p \leq 0.05$ ) y 9.8-veces ( $p \leq 0.05$ ) la concentración de IL-1 $\beta$  con respecto al grupo basal (Fig.11A). Finalmente, a las 24-horas de estimulación *E. coli*  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL induce 5.1- ( $p \leq 0.05$ ), 11.6 ( $p \leq 0.05$ ), y 12.95 ( $p \leq 0.05$ ) la secreción de IL-1 $\beta$  con respecto al grupo control (Fig. 11A).

### 6.5.2 Región del amnios

En el grupo control la concentración de la IL-1 $\beta$  en la región de la coriodecidua fue de  $1.44 \pm 0.007$ ;  $1.78 \pm 0.07$ ; y  $116 \pm 0.06$  a las 3, 6 y 24 horas respectivamente (Fig. 11B). No encontramos diferencia estadísticamente significativa entre estos intervalos de tiempo.

Después de 3-horas *E. coli* con  $10^4$  y  $10^5$  UFC/mL incrementa 7.3- ( $p \leq 0.05$ ) y 8.37-veces ( $p \leq 0.05$ ) la secreción de IL-1 $\beta$  con respecto al grupo basal (Fig. 11B). A las 6-horas de infección con  $10^4$  y  $10^5$  UFC/mL induce 8.0- ( $p \leq 0.05$ ) y 6.8-veces ( $p \leq 0.05$ ) la concentración de IL-1 $\beta$  con respecto al grupo basal (Fig.10A). Finalmente, a las 24-horas de estimulación con *E. coli*  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL induce 20.6- ( $p \leq 0.05$ ), 51.7-veces ( $p \leq 0.05$ ) la secreción de IL-1 $\beta$  con respecto al grupo control (Fig. 11B).



## 7.0 DISCUSIÓN

Las proteínas de choque térmico (Hsp) han sido consideradas como moléculas intracelulares involucradas en la protección celular [24]; sin embargo, recientemente se les ha relacionado con la respuesta inmunológica en diferentes sistemas celulares [40, 62].

En las células de la decidua y en la placenta se han detectado a las proteínas Hsp-27, -60, -70 y -90 durante el desarrollo normal del embarazo [63]. Actualmente no se conoce cómo es la secreción de las Hsp en las membranas fetales humanas (MFH) durante un proceso infeccioso. En éste estudio, demostramos el perfil de secreción espacio-temporal de las Hsp-60 y -70 en las MFH después de la infección con *Escherichia coli*. Nuestros resultados demuestran 1) durante las fases iniciales de estimulación (3 y 6 horas) en la región de la coriodecidua se presentó la secreción principalmente de la Hsp-60; 2) en el mismo intervalo de tiempo en la región del amnios la secreción es de tipo Hsp-70; 3) la expresión de la Hsp-60 y -70 en las fases tardías de la estimulación (24 horas) se reduce su secreción; y 4) la secreción de la IL-1 $\beta$  aumenta en la fase tardía (24-horas) de infección.

Diversas evidencias sugieren que las Hsp pueden estar involucradas como sistema de alarma contra la estimulación bacteriana activando a los macrófagos y células dendríticas para la secreción de la respuesta inflamatoria [64-66].

Nuestros resultados demuestran que la secreción de la Hsp-60 en los eventos iniciales de la infección puede estar asociados con el reclutamiento y activación de las células profesionales de la respuesta inmunológica como previamente ha sido reportada [65-67]. Flohe et al., [65] han demostrado que la activación y maduración de las células dendríticas esta mediada por la Hsp-60, vía la activación del factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B). La Hsp-60 extracelular se une a su receptor localizado en la membrana plasmática de las células amplificando su respuesta celular [67].

La Hsp-70 es secretada en el tejido de la coriodecidua en las fases iniciales (3 y 6-horas) después de la estimulación con *E. coli*. Menon et al. [16] demostraron

que las membranas fetales humanas expuestas con el lipolisacarido (LPS) el cual es un componente estructural de la *Escherichia coli* induce un incremento de 10-veces la expresión del RNA mensajero de la Hsp-70 y esta expresión se incrementa en pacientes con infecciones intra-amniótica [46].

La estimulación de las distintas regiones de las MFH; coriodecidua y epitelio amniótico aumenta la secreción de la Hsp-60 y Hsp-70 son consistentes con otras moléculas antimicrobianas como las  $\beta$ -defensinas involucradas con la respuesta infecciosa. Al estimular al epitelio amniótico por 12 horas con IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> y con LPS-*E. coli* se incrementa la expresión de  $\beta$ -defensinas tipo -1 y -2 [68, 69].

Diferentes evidencias sugieren que las Hsp juegan un importante papel como mediadores de la respuesta innata [70], induciendo la secreción de IL-1 $\beta$  y del TNF $\alpha$  [64, 66]. A pesar de que se tienen evidencias del mecanismo molecular por el cual las Hsp activan la síntesis y secreción de la IL-1 $\beta$  en las membranas fetales humanas no ha sido totalmente dilucidado; sin embargo, se ha sugerido que la molécula clave es el NF $\kappa$ B el cual modula la secreción de IL-1 $\beta$ , -6 y TNF $\alpha$  en monocitos después de su estimulación con LPS-*E. coli* [71]. Nuestros resultados demuestran que en la fase tardía (24-horas) de infección las HSP's reducen su secreción y paralelamente aumenta la secreción de la IL-1 $\beta$  de manera dosis dependiente tanto en el tejido de la coriodecidua como en el epitelio amniótico. Jean-Pierre et. al., [46] correlacionaron la presencia de la Hsp-70 con el incremento de TNF $\alpha$ , no así con la secreción de IL-1 $\beta$  e IL-6 [30]. Esto pudiera deberse a que en las fases iniciales en el líquido amniótico se produce principalmente IL-1 $\beta$  que en la siguiente fase de la respuesta se estimula la secreción de la TNF $\alpha$  [17, 33]. Hsp-60 induce la secreción de TNF $\alpha$  en macrófagos de manera dosis dependiente y este proceso se inhibe a las 25-horas después de la estimulación [64].

La interacción molecular por la cual *E. coli* induce la secreción de la Hsp-70 e IL-1 $\beta$  se da a través de los receptores tipo Toll (TLR). Estos receptores han sido localizados en células de la decidua, células del sincitiotrofoblasto y membranas

fetales con corioamnioítis [72-74]. *Escherichia coli* presenta moléculas asociadas con patógenos (PAMPs) las cuales son reconocidas por el TLR-2 (lipopeptido, Pam3Cys), TLR-4 (LPS) y TLR-9 (islas de CpG) [75, 76]. Estos PAMPs inducen la fosforilación del complejo MD-88/TLR-4 el cual activa la señal de traducción que inducirá la formación del NF $\kappa$ B [12, 42, 77, 78]. Se ha demostrado que la expresión del NF $\kappa$ B en las células del amnios y de la coriodecidua asociados con la secreción de IL-6, IL-8 y del TNF $\alpha$  [79]. La proteína NF $\kappa$ B es una importante molécula activadora para la Hsp-70/IL-1 $\beta$  [80, 81].

La principal conclusión en éste estudio fue que *E. coli* induce la secreción de la Hsp-60 y -70 de manera espacio-temporal en las membranas fetales humanas. La Hsp-60 es secretada principalmente en la zona de la coriodecidua (Fig. 9A) en tanto que la Hsp-70 es secretada en la región del epitelio amniótico (Fig. 10B).

## 8.0 PERSPECTIVAS

Actualmente, en nuestro grupo de investigación estamos interesados en evaluar el mecanismo de regulación entre las proteínas de choque térmico y la secreción de la IL-1 $\beta$  HSP/IL-1 $\beta$  en las membranas fetales humanas el mecanismo de regulación entre las proteínas de choque térmico y la secreción de la IL-1 $\beta$  HSP/IL-1 $\beta$  mediante la incubación con progesterona y estradiol.

## 9.0 BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Hecht, J.L., et al., *Characterization of chorioamnionitis in 2nd-trimester C-section placentas and correlation with microorganism recovery from subamniotic tissues*. Pediatr Dev Pathol, 2008. **11**(1): p. 15-22.
3. Hillier, S.L., et al., *Microbiologic causes and neonatal outcomes associated with chorioamnion infection*. Am J Obstet Gynecol, 1991. **165**(4 Pt 1): p. 955-61.
4. Kelly, R.W., *Inflammatory mediators and parturition*. Rev Reprod, 1996. **1**(2): p. 89-96.
5. Bals, R., *Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection*. Respir Res, 2000. **1**(3): p. 141-50.
6. Patgaonkar, M., et al., *Identification and characterization of anti-microbial peptides from rabbit vaginal fluid*. Vet Immunol Immunopathol, 2011. **139**(2-4): p. 176-86.
7. Chakraborty, S.P. and S. Roy, *In vitro Staphylococcus aureus-induced oxidative stress in mice murine peritoneal macrophages: a duration-dependent approach*. Asian Pac J Trop Biomed, 2014. **4**(Suppl 1): p. S298-304.
8. Chaiworapongsa, T., et al., *Amniotic fluid heat shock protein 70 concentration in histologic chorioamnionitis, term and preterm parturition*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2008. **21**(7): p. 449-61.
9. Hightower, L.E., *Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity*. Cell, 1991. **66**(2): p. 191-7.
10. Wallin, R.P., et al., *Heat-shock proteins as activators of the innate immune system*. Trends Immunol, 2002. **23**(3): p. 130-5.
11. Fink, A.L., *Chaperone-mediated protein folding*. Physiol Rev, 1999. **79**(2): p. 425-49.
12. Srivastava, P., *Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 185-94.
13. Molvarec, A., et al., *Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies*. Cell Stress Chaperones, 2010. **15**(3): p. 237-47.
14. Shah, M., J. Stanek, and S. Handwerger, *Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy*. Histochem J, 1998. **30**(7): p. 509-18.
15. Bernardini, C., et al., *Heat shock protein 70, heat shock protein 32, and vascular endothelial growth factor production and their effects on lipopolysaccharide-induced apoptosis in porcine aortic endothelial cells*. Cell Stress Chaperones, 2005. **10**(4): p. 340-8.
16. Menon, R., et al., *Lipopolysaccharide stimulation of 70 kilo Dalton heat shock protein messenger ribonucleic acid production in cultured human fetal membranes*. J Perinat Med, 2001. **29**(2): p. 133-6.
17. 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.
18. Garcia-Lopez, G., et al., *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): p. 409-18.

19. Romero, R., S.K. Dey, and S.J. Fisher, *Preterm labor: one syndrome, many causes*. Science, 2014. **345**(6198): p. 760-5.
20. Discacciati, M.G., et al., *Microbiological characteristics and inflammatory cytokines associated with preterm labor*. Arch Gynecol Obstet, 2011. **283**(3): p. 501-8.
21. Keelan, J.A., et al., *Cytokine abundance in placental tissues: evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition*. Am J Obstet Gynecol, 1999. **181**(6): p. 1530-6.
22. Menon, R., et al., *Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **201**(3): p. 306 e1-6.
23. McDonald, H.M., et al., *Changes in vaginal flora during pregnancy and association with preterm birth*. J Infect Dis, 1994. **170**(3): p. 724-8.
24. 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.
25. Gomez-Lopez, N., et al., *Fetal membranes exhibit selective leukocyte chemotactic activity during human labor*. J Reprod Immunol, 2009. **80**(1-2): p. 122-31.
26. 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.
27. Hersh, D., J. Weiss, and A. Zychlinsky, *How bacteria initiate inflammation: aspects of the emerging story*. Curr Opin Microbiol, 1998. **1**(1): p. 43-8.
28. Svanborg, C., G. Godaly, and M. Hedlund, *Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence*. Curr Opin Microbiol, 1999. **2**(1): p. 99-105.
29. Romero, R., et al., *Infection and labor. VIII. Microbial invasion of the amniotic cavity in patients with suspected cervical incompetence: prevalence and clinical significance*. Am J Obstet Gynecol, 1992. **167**(4 Pt 1): p. 1086-91.
30. Roussis, P., et al., *Preterm premature rupture of membranes: detection of infection*. Am J Obstet Gynecol, 1991. **165**(4 Pt 1): p. 1099-104.
31. Shields, A.D., et al., *Progesterone modulation of inflammatory cytokine production in a fetoplacental artery explant model*. Am J Obstet Gynecol, 2005. **193**(3 Pt 2): p. 1144-8.
32. Mitchell, M.D., et al., *Mechanism of interleukin-1 beta stimulation of human amnion prostaglandin biosynthesis: mediation via a novel inducible cyclooxygenase*. Placenta, 1993. **14**(6): p. 615-25.
33. Zaga-Clavellina, V., et al., *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**: p. 46.
34. Thiex, N.W., M.C. Chames, and R.K. Loch-Caruso, *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): p. 1120-9.
35. Asea, A., *Stress proteins and initiation of immune response: chaperone activity of hsp72*. Exerc Immunol Rev, 2005. **11**: p. 34-45.
36. Pockley, A.G., *Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **105**(8): p. 1012-7.

37. Pope, R.M., R.M. Lovis, and R.S. Gupta, *Activation of synovial fluid T lymphocytes by 60-kd heat-shock proteins in patients with inflammatory synovitis*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(1): p. 43-8.
38. 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.
39. Kregel, K.C., *Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance*. *J Appl Physiol* (1985), 2002. **92**(5): p. 2177-86.
40. Bangen, J.M., F.U. Schade, and S.B. Flohe, *Diverse regulatory activity of human heat shock proteins 60 and 70 on endotoxin-induced inflammation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **359**(3): p. 709-15.
41. Kiang, J.G. and G.C. Tsokos, *Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology*. *Pharmacol Ther*, 1998. **80**(2): p. 183-201.
42. Bausinger, H., D. Lipsker, and D. Hanau, *Heat-shock proteins as activators of the innate immune system*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(7): p. 342-3.
43. Stocki, P., X.N. Wang, and A.M. Dickinson, *Inducible heat shock protein 70 reduces T cell responses and stimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(15): p. 12387-94.
44. Tsan, M.F. and B. Gao, *Heat shock protein and innate immunity*. *Cell Mol Immunol*, 2004. **1**(4): p. 274-9.
45. Gelber, S.E., et al., *Antibodies to the 70 kDa heat shock protein in midtrimester amniotic fluid and intraamniotic immunity*. *Am J Obstet Gynecol*, 2007. **197**(3): p. 278 e1-4.
46. Jean-Pierre, C., et al., *Extracellular 70-kd heat shock protein in mid-trimester amniotic fluid and its effect on cytokine production by ex vivo-cultured amniotic fluid cells*. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. **194**(3): p. 694-8.
47. Velten, M., et al., *Domain structure of the HSC70 cochaperone, HIP*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(1): p. 259-66.
48. Haslbeck, M., et al., *Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(10): p. 842-6.
49. Basha, E., H. O'Neill, and E. Vierling, *Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions*. *Trends Biochem Sci*, 2012. **37**(3): p. 106-17.
50. van Montfort, R.L., et al., *Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein*. *Nat Struct Biol*, 2001. **8**(12): p. 1025-30.
51. Callebaut, I., et al., *Structural similarities between chaperone molecules of the HSP60 and HSP70 families deduced from hydrophobic cluster analysis*. *FEBS Lett*, 1994. **342**(3): p. 242-8.
52. Pockley, A.G., B. Henderson, and G. Multhoff, *Extracellular cell stress proteins as biomarkers of human disease*. *Biochem Soc Trans*, 2014. **42**(6): p. 1744-51.
53. Schmitt, E., et al., *Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 15-27.
54. Abdulsid, A., A. Fletcher, and F. Lyall, *Heat shock protein 27 is spatially distributed in the human placenta and decreased during labor*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e71127.
55. Hnat, M.D., et al., *Heat shock protein-70 and 4-hydroxy-2-nonenal adducts in human placental villous tissue of normotensive, preeclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies*. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. **193**(3 Pt 1): p. 836-40.


56. Chang, A., et al., *Alteration of heat shock protein 70 expression levels in term and preterm delivery*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013. **26**(16): p. 1581-5.
57. MacIntyre, D.A., et al., *Contraction in human myometrium is associated with changes in small heat shock proteins*. Endocrinology, 2008. **149**(1): p. 245-52.
58. 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.
59. Gomez Lopez, N., et al., *[Extracellular matrix metalloproteases profile identification in chorioamniotic membranes of term and preterm pregnancies through soluble microarrays]*. Ginecol Obstet Mex, 2008. **76**(1): p. 32-7.
60. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
61. Chaudhari, A.A., et al., *Mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species generation regulate the enhanced effect of CCCP on TRAIL-induced SNU-638 cell apoptosis*. J Vet Med Sci, 2008. **70**(6): p. 537-42.
62. Young, J.C., *Mechanisms of the Hsp70 chaperone system*. Biochem Cell Biol, 2010. **88**(2): p. 291-300.
63. Ziegert, M., et al., *Heat shock proteins and heat shock protein-antibody complexes in placental tissues*. Infect Dis Obstet Gynecol, 1999. **7**(4): p. 180-5.
64. Chen, W., et al., *Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3212-9.
65. Flohe, S.B., et al., *Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype*. J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2340-8.
66. Kol, A., et al., *Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages*. J Clin Invest, 1999. **103**(4): p. 571-7.
67. Belles, C., et al., *Plasma membrane expression of heat shock protein 60 in vivo in response to infection*. Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 4191-200.
68. Buhimschi, I.A., et al., *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): p. 1678-87.
69. Stock, S.J., et al., *Natural antimicrobial production by the amnion*. Am J Obstet Gynecol, 2007. **196**(3): p. 255 e1-6.
70. De Maio, A., *Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa*. Cell Stress Chaperones, 2011. **16**(3): p. 235-49.
71. Asea, A., et al., *HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 435-42.
72. Canavan, T.P. and H.N. Simhan, *Innate immune function of the human decidual cell at the maternal-fetal interface*. J Reprod Immunol, 2007. **74**(1-2): p. 46-52.
73. Himes, K.P., et al., *Comprehensive analysis of the transcriptional response of human decidual cells to lipopolysaccharide stimulation*. J Reprod Immunol, 2012. **93**(1): p. 17-27.
74. Kim, Y.M., et al., *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**(4): p. 1346-55.

75. Dobrovolskaia, M.A., et al., *Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components.* J Immunol, 2003. **170**(1): p. 508-19.
76. Poth, J.M., et al., *Monocyte-mediated inhibition of TLR9-dependent IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells questions bacterial DNA as the active ingredient of bacterial lysates.* J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7367-73.
77. Becker, J. and E.A. Craig, *Heat-shock proteins as molecular chaperones.* Eur J Biochem, 1994. **219**(1-2): p. 11-23.
78. Prohaszka, Z. and G. Fust, *Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life.* Mol Immunol, 2004. **41**(1): p. 29-44.
79. Lappas, M., et al., *Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro.* Biol Reprod, 2002. **67**(2): p. 668-73.
80. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *NF-kappaB in immunobiology.* Cell Res, 2011. **21**(2): p. 223-44.
81. Vallabhapurapu, S. and M. Karin, *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 693-733.



## 10.0 ANEXO

### 10.1 Carta de registro institucional



Instituto Nacional de Perinatología  
Isidro Espinosa de los Reyes

Dirección General

"2011, Año del Turismo en México"

Ref. 1000.2011.  
México, D.F. 30 de septiembre de 2011

**M. EN C. HÉCTOR FLORES HERRERA**  
Investigador en Ciencias Médicas "C"  
Adscrito al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Me es grato informar a usted, y a su grupo de colaboradores, que las Comisiones de Investigación y Ética en Investigación han revisado y emitido el dictamen correspondiente a su proyecto:

**Determinación de biomarcadores inflamatorios colagenolíticos y proteínas de fase aguda tisular y su efecto sobre la expresión de las proteínas de unión epitelial en las membranas fetales humanas después de la infección con *Escherichia coli***

**ACEPTADO**

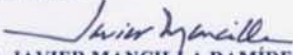
**Registro: 212250-19051**

En cuanto al monto económico solicitado por usted para desarrollar el proyecto mencionado, la asignación dependerá estrictamente de la disponibilidad de los recursos federales correspondientes y, en su caso, de la disponibilidad de los recursos entregados por agencias financiadoras externas.

Me permito hacer de su conocimiento que al término del desarrollo de este proyecto usted deberá entregar un **informe técnico final**, (según el formato institucional) disponible en [www.inper.mx/investigacion.html](http://www.inper.mx/investigacion.html), para la presentación de productos de investigación, acompañado de los documentos probatorios del mismo.

Le felicito por su desempeño y compromiso institucional y me es grato enviarle un saludo cordial.

Atentamente,

  
**DR. JAVIER MANCILLA RAMÍREZ**  
DIRECTOR GENERAL

JMR/\*phg

Montes Lirales 800, Lomas Virreyes, México, DF 11000. Tel: (55) 8320 8565. Fax (55) 5520 1593. [dirgen@inper.mx](mailto:dirgen@inper.mx)

## 10.2 Carta de consentimiento informado



INSTITUTO  
NACIONAL DE  
PERINATOLOGÍA  
Isidro Espinosa de los Reyes

### DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN SOLICITUD DE EVALUACIÓN Y REGISTRO DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

---

#### TEXTO DECLARATORIO

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimada señora:

Queremos informarle que en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de este Instituto se está llevando a cabo el estudio denominado

**Determinación de biomarcadores inflamatorios, colagenolíticos y proteínas de fase aguda tisular y su efecto sobre la expresión de las proteínas de unión epitelial en las membranas fetales humanas, después de la infección con *Escherichia coli*.**

Las infecciones durante el embarazo son una de las condicionantes que producen los nacimientos prematuros. Actualmente no se cuentan con evidencias bioquímicas que indiquen el proceso de la infección en fase temprana, por lo que estamos desarrollando en nuestro laboratorio la búsqueda de diferentes marcadores de infección temprana, los cuales podrán ser de ayuda para la aplicación terapéutica para otras mujeres embarazadas.

El objetivo de este estudio es el de analizar la respuesta de las membranas fetales humanas ante la infección con *Escherichia coli* la cual esta asociadas a los nacimientos prematuros.

El estudio básicamente consiste en lo siguiente:

1. Al momento del nacimiento de su bebe y después de que sea cortado el cordón umbilical, se tomarán las membranas fetales, por el personal médico adscritos a este Instituto. Las cuales serán utilizadas en laboratorio.
2. Este procedimiento no representa ningún riesgo para su bebe ni para usted.
3. En el laboratorio de Investigación se procederá a evaluar la respuesta de las membranas fetales en un proceso de infección.

Su participación en este estudio permitiría contribuir en forma importante a la comprensión de la respuesta de las membranas fetales ante un estímulo infeccioso así como de la adquisición de marcadores biológicos de fase temprana de infección. Al término del estudio las membranas fetales serán desechadas con el procedimiento Institucional.

Nos permitimos invitarla a usted a participar en este estudio, aclarándole que en caso de que no acepta participar, **no tendrá ninguna repercusión** en la atención de usted o de su hijo(a) en el Instituto, ni en el costo de la atención médica que ambos reciban.

La información que se obtenga del estudio será estrictamente confidencial y será utilizada sólo para fines de investigación.

Las preguntas que considere necesarias para aclarar todas sus dudas las puede externar con el M en C

## **11.0 PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTE TRABAJO**



## *Escherichia coli*-induced temporal and differential secretion of heat-shock protein 70 and interleukin-1 $\beta$ by human fetal membranes in a two-compartment culture system



M. Osorio-Caballero <sup>a</sup>, C. Perdigón-Palacio <sup>b</sup>, G. García-López <sup>c</sup>, O. Flores-Herrera <sup>d</sup>, S. Olvera-Sánchez <sup>d</sup>, I. Morales-Méndez <sup>e</sup>, I. Sosa-González <sup>e</sup>, J.F. Acevedo <sup>f</sup>, A.M. Guzmán-Grenfell <sup>b</sup>, A. Molina-Hernández <sup>c</sup>, N.F. Díaz <sup>c</sup>, H. Flores-Herrera <sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, National Institute of Perinatology "Isidro Espinosa de los Reyes", Montes Urales #800, Col. Lomas de Virreyes cp, 11000 Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, National Institute of Perinatology "Isidro Espinosa de los Reyes", Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Department of Cellular Biology, National Institute of Perinatology "Isidro Espinosa de los Reyes", Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> Department of Biochemistry, School of Medicine, UNAM. Apdo. Postal 70-159, Copilco, Coyoacán, Mexico City, Mexico

<sup>e</sup> Department of Infectology and Immunology, National Institute of Perinatology "Isidro Espinosa de los Reyes", Mexico City, Mexico

<sup>f</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, University of Texas SouthWestern Medical Center, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX 75235, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 15 December 2014

#### Keywords:

Amnion  
Choriodecidual  
Chorioamnionitis  
*Escherichia coli*  
Heat-shock protein  
Interleukin-1 $\beta$

### ABSTRACT

**Introduction:** *Escherichia coli* is recognized as an etiological bacteria associated with chorioamnionitis and the preterm premature rupture of fetal membranes. This pathological condition induces pro-inflammatory cytokines and degradative metalloproteinases, which are considered biological markers secreted in an acute stage of infection. Heat-shock proteins (HSPs) are an important component of the innate immunity response and are found in different pathological conditions. They have not been previously measured in human fetal membranes in response to infectious conditions. We hypothesized that the choriodecidual tissue and amniotic epithelium secreted temporal and differential Hsp-60, Hsp-70, and interleukin (IL)-1 $\beta$  mediated by *E. coli* infection.

**Methods:** Fetal membranes were mounted in a two-compartment culture system and infected with two passes of live *E. coli* at different doses ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , and  $10^6$  colony-forming units (CFU)/mL) and intervals of incubation (3, 6, and 24 h). The culture medium was collected, and Hsp-60, Hsp-70, and IL-1 $\beta$  were assessed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method.

**Results:** After 3 and 6 h of infection, *E. coli* induced an increase in Hsp-70 secretion in the choriodecidual tissue. However, after 24 h of incubation, Hsp-70 was downregulated and we observed an increase in IL-1 $\beta$  secretion. By contrast, *E. coli* induced a lower Hsp-60 secretion in the amnion compared to Hsp-70.

**Discussion:** Human fetal membranes responded actively to *E. coli* infection, with an increase in Hsp-70 during the first hours of infection. After 24 h, there was an increase in the liberation of IL-1 $\beta$ .

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Intrauterine infections are major etiological factors associated with preterm delivery (PTD) and premature rupture of the fetal

membranes (PROM), and they predispose the neonate to a higher risk of intra-amniotic infection [1]. The early pathogenesis stages of intrauterine infections are not completely understood. However, much evidence has shown that fetal membranes actively respond to acute infection by secreting pro-inflammatory cytokines (interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-8); tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ); chemokines (IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and macrophage inflammatory protein-1) [2–4]; and degradative matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-3, and MMP-9 [5,6]. These molecules are considered biological markers. Through these pro-inflammatory/degradative processes, the structure, stability, and

\* Corresponding author. Department of Biochemistry and Molecular Biology, National Institute of Perinatology "Isidro Espinosa de los Reyes", Montes Urales #800, Col. Lomas de Virreyes cp, 11000 Mexico City, Mexico. Tel./fax: +52 55 55209705.

E-mail address: [h.flores@inper.mx](mailto:h.flores@inper.mx) (H. Flores-Herrera).

tensile force components of the extracellular matrix are modified, inducing PROM [2,6,7]. These biological markers are secreted by human fetal membranes in response to acute infections [8,9], and they cannot be used as markers in the initial stages of the infection.

Several lines of evidence suggest that heat-shock proteins (HSP) play an important role in normal and pathological human pregnancy [7,10]. Hsp-60, Hsp-70, and Hsp-90 have been detected by immunocytochemistry in the decidua and placenta during normal and preterm pregnancy [11,12]. HSPs are considered early signal molecules that lead to a cell danger response. This sensor system activates the professional cells (macrophages, monocytes, and dendritic cells) that trigger the immunological system response [13,14].

*Escherichia coli* (*E. coli*) is a gram-negative pathogenic bacteria associated with intra-amniotic infection and chorioamnionitis in pregnant women [15–17]. Hsp-70 is upregulated in response to vaginal and intra-amniotic infections associated with bacterial vaginosis [7,18,19]. Lipopolysaccharides (LPSs) induce the expression of Hsp-70 in human fetal membranes [20]. Additionally, Hsp-60 is upregulated during cellular stress and it induces the secretion of immunological cytokines [21,22].

However, the differential secretion of Hsp-60 and Hsp-70 by human fetal membranes in response to *E. coli* infection has not been studied. We postulate that Hsp-60, Hsp-70, and IL-1 $\beta$  are secreted by human fetal membranes in the initial stages of infection. The main objective of this study was to determine the *E. coli*-induced temporal profile secretion of Hsp-60, Hsp-70, and IL-1 $\beta$  by human fetal membranes in response to *E. coli* infection, using an in vitro two-compartment culture system model.

## 2. Material and methods

### 2.1. Mounting of fetal membranes in the Transwell system

Nine fetal membranes were collected after elective cesarean delivery. Patient consent and ethical approval were obtained before tissue collection, in accordance with the National Institute of Perinatology "Isidro Espinosa de los Reyes" guidelines. Women with uncomplicated, single, full-term (37–40 weeks) pregnancies who did not experience activation of labor, uterine contractions, or rupture of membranes were included in this study. All women underwent cesarean section. No evidence of microbiological signs of chorioamnionitis or lower genital tract infection was found.

Fetal membranes were transported to the laboratory in a sterile Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco, Bethesda, MD, USA) and rinsed in sterile Hank's balanced salt solution (Gibco) to remove adherent blood clots. Similar-sized samples (18 mm in diameter) were dissected and mounted in the Transwell culture system (Costar, New York, NY, USA). In this model, two compartments were created, choriodecidual (CHD; up face) and amnion (AM; down face). This model allows assessing the response simultaneously in the infection zone and in the opposite zone. A detailed description and validation of this model have been published previously [5]. The Transwell–fetal membrane was incubated in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (DMEM–FCS; Gibco) and an antibiotic–antimycotic solution (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100  $\mu$ g/mL; Gibco). Tissues were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air for 18 h.

After the incubation period, the explants were washed twice with a sterile saline solution to remove DMEM–FCS. To each compartment, 1 mL of DMEM with 0.2% lactalbumin hydrolysate (DMEM–LHA; Gibco) was added.

### 2.2. Bacterial strain and preparation

*E. coli* clinical strain was isolated from the blood of a newborn whose mother had signs and symptoms of chorioamnionitis, and was diagnosed with PROM (<35 weeks). This strain was characterized at the Infectology Department of the National Institute of Perinatology. Bacteria were grown in 5% sheep blood agar (DIBICO, Mexico City, Mexico) supplemented with 10% base tryptic soy agar (DIBICO) for 2 days. Bacterial colonies were selected with bacteriological instruments and deposited in sterile phosphate-buffered saline (PBS) (1 $\times$ ) solution.

### 2.3. Human fetal membrane infection

The explants were infected in duplicate, and three approaches were followed: (1) control (basal conditions), (2) CHD, and (3) AM. In each case, the membranes were infected after a second pass with live *E. coli* in serial dilutions (10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, and 10<sup>6</sup> colony-forming units (CFU)/mL). The CFU was based on a turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard. The explants were infected at intervals of 3, 6, and 24 h.

After this time, medium from each compartment was collected using sterile transfer pipettes (Falcon, Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The samples were immediately centrifuged at 5000 rpm for 3 min at 4 °C. The bacterial sediment was discarded and the supernatants stored at –70 °C until assayed.

### 2.4. Viability of the human fetal membranes

All explants were washed twice with sterile saline solution to remove DMEM–LHA and *E. coli*. The CHD and AM compartments were treated with 200  $\mu$ L of a 5-mg/mL XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany) labeling reagent and 50  $\mu$ L of electron-coupling reagent (PMS; N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) for a 1-h incubation period.

Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP; Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA), a mitochondrial uncoupler, was used as a positive control. CCCP was dissolved in dimethyl sulfoxide at a concentration of 80  $\mu$ M [23]. The spectrophotometrical absorbance of the samples was measured by a Benchmark plus (model 550; BioRad, Hercules, CA, USA) microplate reader. The wavelength to measure the absorbance of the formazan product was 475 nm.

### 2.5. Measurement of HSP and IL-1 $\beta$ in conditioned medium

Hsp-60, Hsp-70, and IL-1 $\beta$  secreted from either the CHD or AM compartments were quantified using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using a specific Douset (R&D system, Minneapolis, MN, USA) kit, as previously described by Flores-Herrera et al. [5].

For Hsp-60 (Cat. No. DYC1800-2) and Hsp-70 (Cat. No. DYC1663-2), a standard curve was developed from 1.25 to 80 ng/mL and from 312.5 to 20,000 pg/mL, respectively. In the case of IL-1 $\beta$  (Cat. No. DY201), a standard curve was developed from 4 to 260 pg/mL. The sensitivity was 2.0 pg/mL [5]. The values were reported as picograms per milliliter.

### 2.6. Statistical analysis

The data for each infection zone were analyzed using Friedman repeated measures analysis of variance (5 (concentration of bacteria)  $\times$  3 (exposure time)). Post hoc comparisons were performed with pairwise multiple comparison procedures (Tukey's test). The software used was SigmaPlot for Windows Version 11.0. All values are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## 3. Results

### 3.1. Human fetal membrane viability assay

#### 3.1.1. CHD viability

The viability in the CHD compartment was determined at 3 (Fig. 1A), 6 (Fig. 1B), and 24 h (Fig. 1C) postinfection, as well as at basal condition (Fig. 1). In all experimental conditions, no statistical difference was observed between basal groups in comparison with *E. coli* postinfection groups. As we expected, the metabolic activity of CHD explants was reduced by the proton translocator (CCCP), as compared with the control (Fig. 1).

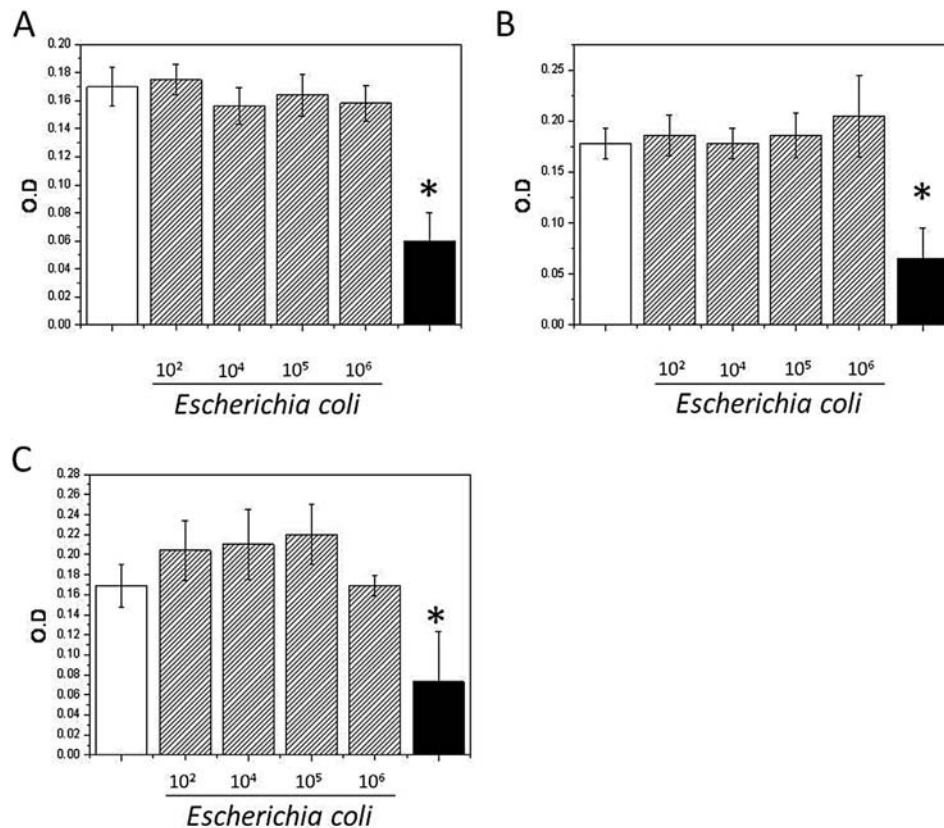
#### 3.1.2. Amniotic viability

As in the CHD compartment, the viability of the AM compartment was determined at 3 (Fig. 2A), 6 (Fig. 2B), and 24 h (Fig. 2C) postinfection and at basal condition. As in the CHD compartment, no statistical difference was observed between the basal groups and *E. coli* postinfection groups ( $p = 0.33$ ). Furthermore, CCCP reduced the metabolic activity of fetal membranes compared to the control group (Fig. 2).

These results indicate that temporal infection has no effect on the viability of human fetal membranes. We then investigated the secretion of HSPs by fetal membrane compartments exposed to *E. coli*.

### 3.2. *E. coli*-induced production of HSP in human fetal membranes

We determined the secretion profile of Hsp-60 and Hsp-70 in the CHD or AM compartments after 3, 6, and 24 h of infection in in vitro conditions.



**Fig. 1.** CHD compartment viability. After different concentrations of *E. coli* at different intervals of time (3 (A), 6 (B), and 24 (C) hours), the viability was evaluated with XTT assay. One hundred microliters were placed in a 96-well cell culture and were read at 475 nm as described in [Material and methods](#). Choriodecidual basal (white bar), *E. coli* (dashed bar) and carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP, black bar) groups were made. Data represent the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). Statistical difference was observed with respect to choriodecidual basal (\* $p \leq 0.001$ ).

### 3.2.1. CHD compartment infection

After 3 h of infection with *E. coli* concentrations of  $10^4$ ,  $10^5$ , and  $10^6$  CFU/mL, we observed 3.7- ( $p \leq 0.05$ ), 5.5- ( $p \leq 0.05$ ), and 5.9-fold ( $p \leq 0.05$ ) increases in Hsp-60 secretion, respectively, with respect to the control. During the 6-h period, the incubation with bacteria concentrations of  $10^4$  and  $10^5$  CFU/mL induced 3.9- ( $p \leq 0.05$ ) and 5.5-fold ( $p \leq 0.05$ ) increases in Hsp-60 secretion, respectively, compared to the control. After 24 h of infection, only the  $10^5$  CFU/mL concentration increased the Hsp-60 secretion to 3.9-fold ( $p \leq 0.05$ ), in comparison with the control (Fig. 3A).

On the other hand, after a 6-h incubation with *E. coli* concentrations of  $10^4$  and  $10^5$  CFU/mL in the AM opposite infection zone, we observed 1.5- ( $p \leq 0.05$ ) and 2.5-fold ( $p \leq 0.05$ ) increases in Hsp-60 secretion, respectively, compared with the control. After 24 h of infection, only the highest concentrations of bacteria showed a decrease in the secretion of Hsp-60 (Fig. 3B).

Concerning the Hsp-70 profile, 3 h of infection with *E. coli* concentrations of  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , and  $10^6$  CFU/mL induced 2.9- ( $p \leq 0.05$ ), 4.9- ( $p \leq 0.05$ ), 5.3- ( $p \leq 0.05$ ) and 4.8-fold ( $p \leq 0.05$ ) increases in Hsp-70 secretion, respectively, in comparison with the control. Six hours of infection with the above concentrations induced 3.2- ( $p \leq 0.05$ ), 3.1- ( $p \leq 0.05$ ), 3.2- ( $p \leq 0.05$ ), and 3.7-fold ( $p \leq 0.05$ ) increases in Hsp-70 secretion, respectively. By contrast, after a 24-h period of *E. coli* infection, we found a decrease in Hsp-70 secretion at any concentration of bacteria (Fig. 3C).

In the AM opposite infection zone, 3 h of infection with an *E. coli* concentration of  $10^4$  CFU/mL induced a 3.6-fold ( $p \leq 0.05$ ) increase in Hsp-70 secretion, compared to the control. Similarly, 6 h of

infection with a concentration of  $10^5$  bacteria induced a 4.9-fold ( $p \leq 0.05$ ) increase in Hsp-70 secretion (Fig. 3D).

### 3.2.2. Amniotic compartment infection

After 6 h of infection, the *E. coli* concentration of  $10^2$  CFU/mL induced a 1.13-fold ( $p \leq 0.05$ ) increase in Hsp-60 secretion, in comparison with the control. After 24 h of infection, the *E. coli* concentration of  $10^5$  CFU/mL decreased the secretion of Hsp-60, compared to the control (Fig. 4A).

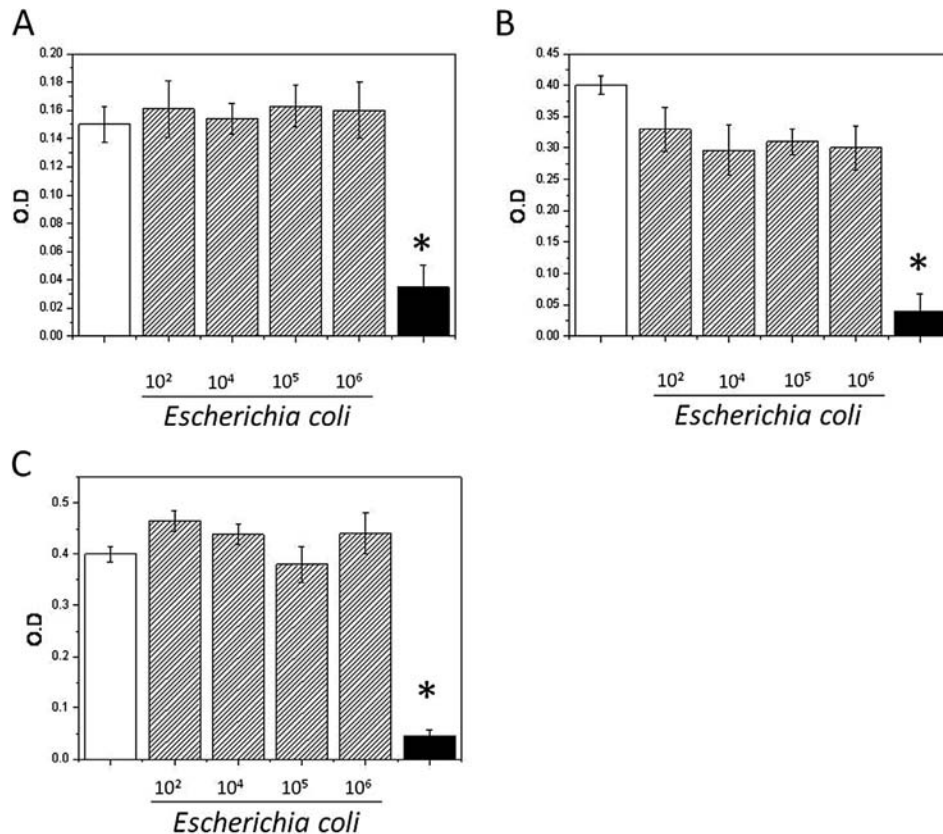
In the opposite zone, 3 h of infection with *E. coli* concentrations of  $10^2$  and  $10^4$  CFU/mL induced 2.7- ( $p \leq 0.05$ ) and 2.2-fold ( $p \leq 0.05$ ) increases in Hsp-60 secretion, respectively, in comparison with the control. As for the 6-h period, the incubation with a  $10^2$  concentration of bacteria induced a 1.8-fold ( $p \leq 0.05$ ) increase, with respect to the control (Fig. 4B).

In the case of Hsp-70 secretion, we found that an incubation period of 3 h with an *E. coli* concentration of  $10^4$  CFU/mL induced a 3.3-fold ( $p \leq 0.05$ ) increase in the secretion of HSP, in comparison with the control, whereas after 6 h of infection the same concentration of bacteria induced a 3.8-fold ( $p \leq 0.05$ ) increase (Fig. 4C).

In the opposite zone, we observed that 3 h of infection with an *E. coli* concentration of  $10^5$  CFU/mL induced a 4.1-fold ( $p \leq 0.05$ ) increase in Hsp-70 secretion, with respect to the control (Fig. 4D).

### 3.3. *E. coli*-induced production of IL-1 $\beta$ in human fetal membranes

We also determined the production of IL-1 $\beta$  in the CHD and AM compartments.



**Fig. 2.** AM compartment viability. After different concentrations of *E. coli* at different intervals of time (3 (A), 6 (B), and 24 (C) hours), the viability was evaluated with XTT assay. One hundred microliters were placed in a 96-well cell culture and were read at 475 nm as described in Material and methods. Amniotic basal (white bar), *E. coli* (dashed bar) and carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP, black bar) groups were made. Data represent the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). Statistical difference was observed with respect to amnion basal (\* $p \leq 0.001$ ).

### 3.3.1. CHD compartment

After 3 h of *E. coli* infection, the highest concentration of bacteria induced a 4.7-fold ( $p \leq 0.05$ ) increase in the secretion of IL-1 $\beta$ , in comparison to the control. On the other hand, after 6 h of infection, *E. coli* concentrations of 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup> CFU/mL induced 6.4- ( $p \leq 0.05$ ) and 9.8-fold ( $p \leq 0.05$ ) increases in the secretion of IL-1 $\beta$ , respectively, compared to the control. Finally, a 24-h period of infection with bacterial concentrations of 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, and 10<sup>6</sup> CFU/mL induced 5.1- ( $p \leq 0.05$ ), 11.6- ( $p \leq 0.05$ ), and 12.95-fold ( $p \leq 0.05$ ) increases in the secretion of IL-1 $\beta$ , respectively (Fig. 5A).

### 3.3.2. Amniotic compartment

After 3 h of infection with *E. coli* concentrations of 10<sup>4</sup> and 10<sup>5</sup> CFU/mL, we found 7.3- ( $p \leq 0.05$ ) and 8.37-fold ( $p \leq 0.05$ ) increases in the secretion of IL-1 $\beta$ . The 6-h incubation period with *E. coli* concentrations of 10<sup>4</sup> and 10<sup>5</sup> CFU/mL induced 8.0- ( $p \leq 0.05$ ) and 6.8-fold ( $p \leq 0.05$ ) increases, respectively, in comparison with the control. Finally, a 24-h incubation period with bacterial concentrations of 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup> CFU/mL induced 20.6- ( $p \leq 0.05$ ) and 51.7-fold ( $p \leq 0.05$ ) increases, compared to the control (Fig. 5B).

## 4. Discussion

HSPs have traditionally been considered as intracellular molecules involved in protection [24]. However, in recent years, they have been reported as molecules related to different components of the immune response [25,26].

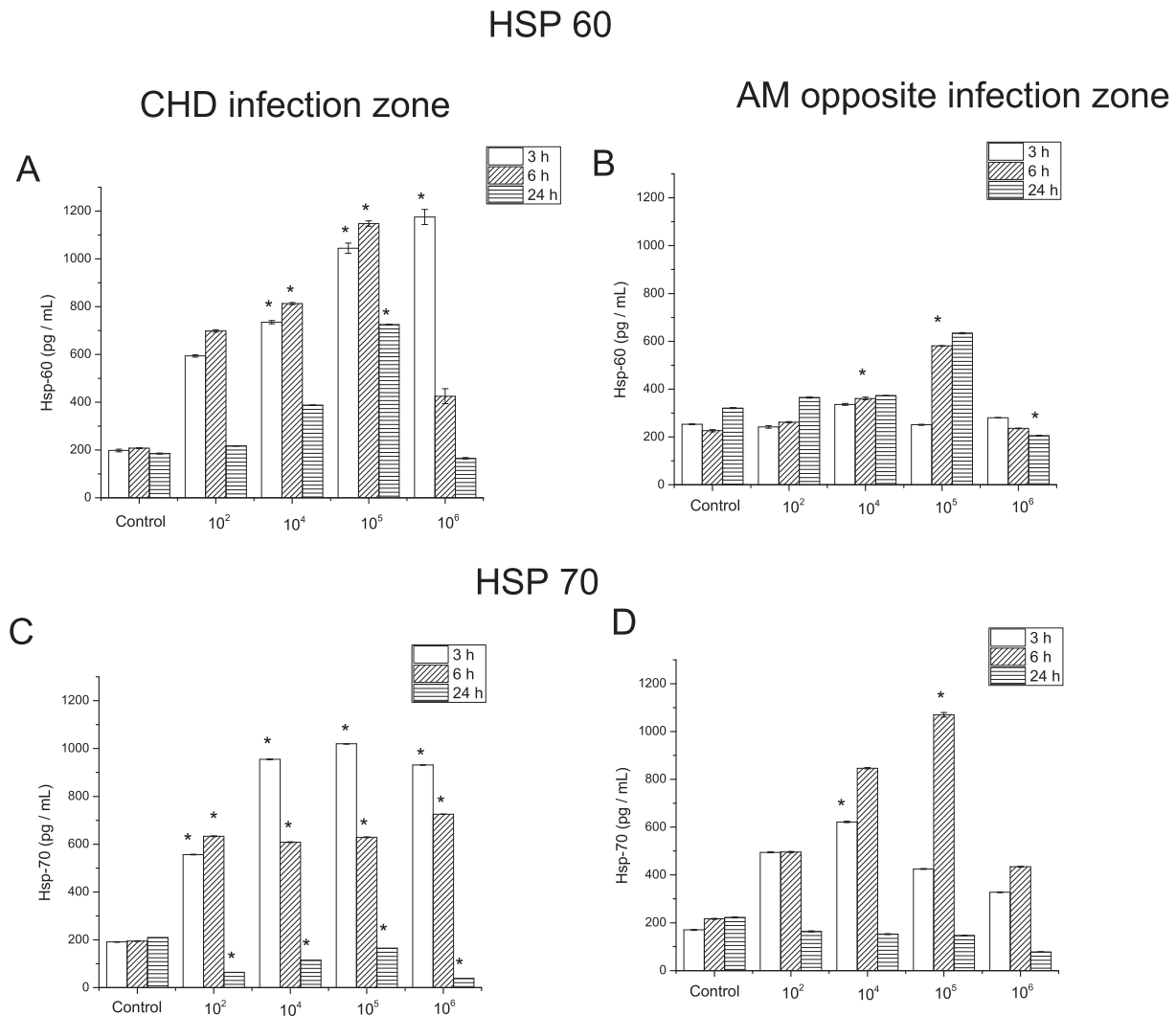
To our knowledge, this is the first study to provide evidence for a temporal and differential secretion pattern of Hsp-60, Hsp-70, and

IL-1 $\beta$  by human fetal membranes after *E. coli* infection. The main findings of the present study are as follows: (1) during early infection (3 and 6 h) in the region of the CHD, Hsp-60 was mainly secreted; (2) at the same time of infection in the region of AM, Hsp-70 was secreted; (3) direct infection in one of the compartments can be coordinated with the HSP response on the opposite side of the tissue; (4) in the late stage of infection (24 h), Hsp-60 and Hsp-70 secretion was downregulated; and (5) secretion of IL-1 $\beta$  was increased in both compartments.

Hsp-27, Hsp-60, Hsp-70, and Hsp-90 have been previously found in decidual stromal cells [11] and placenta during normal pregnancy [12]. The role of Hsp-60 in intrauterine infections has not been reported in human fetal membranes. However, several reports suggest that this protein acts as a “danger signal” against bacterial insult and induces pro-inflammatory secretion by macrophages and dendritic cells [21,22,27,28].

In this study, we showed an increase of Hsp-60 secretion mainly in the CHD compartment, as opposed to the AM compartment. The secretion of Hsp-60 in the early stage of infection (3 and 6 h) is probably related to the recruitment, activation, and maturation of professional cells of the immune response, as previously reported [21,27,29]. Flohe et al. [27] have shown that maturation and activation of dendritic cells are mediated by Hsp-60, via activation of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B). This signaling pathway is amplified by expression of the Hsp-60 receptor located on the plasma membrane, which is stimulated by the infectious process [29].

Our results demonstrate that Hsp-70 is primarily secreted in the CHD tissue, as opposed to the AM tissue, in the early stage of *E. coli*



**Fig. 3.** Secretion of Hsp-60 and Hsp-70 from choriodecidual compartment directly infected with *E. coli*. Different concentrations of *E. coli* were probed at different intervals of incubation (3, 6 and 24 h) of choriodecidual tissue (A, C) and opposite amniotic epithelium zone of infection (B, D). Concentration of Hsp-60 (A, B) and Hsp-70 (C, D) was expressed as pg/mL for each sample. Data represent the mean  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ). Statistical difference was observed with respect to the control group ( $*p \leq 0.05$ ).

infection (3 and 6 h). The secretion of Hsp-70 increases as a result of the infection and inflammatory process. The expression of Hsp-70 messenger RNA in human fetal membranes increased 10-fold after stimulation of *E. coli* with LPS [20], and its secretion was increased in patients with intra-amniotic infection [30].

The results of Hsp-60 and Hsp-70 secretion by CHD and AM compartments is consistent with other antimicrobial human  $\beta$ -defensins involved in the amniotic infection response. It has been reported that human amniotic epithelium cells stimulated with IL-1 $\beta$ , *E. coli* LPS, and prostaglandin induced an increase in the secretion of  $\beta$ -defensin type 1 and 2 after 12 h of incubation [31,32]. Recently, evidence has shown an increase by 1.5-fold of Hsp-70 secretion in patients with intra-amniotic infection [7]. However, no significant difference was detected in patients with PROM [33].

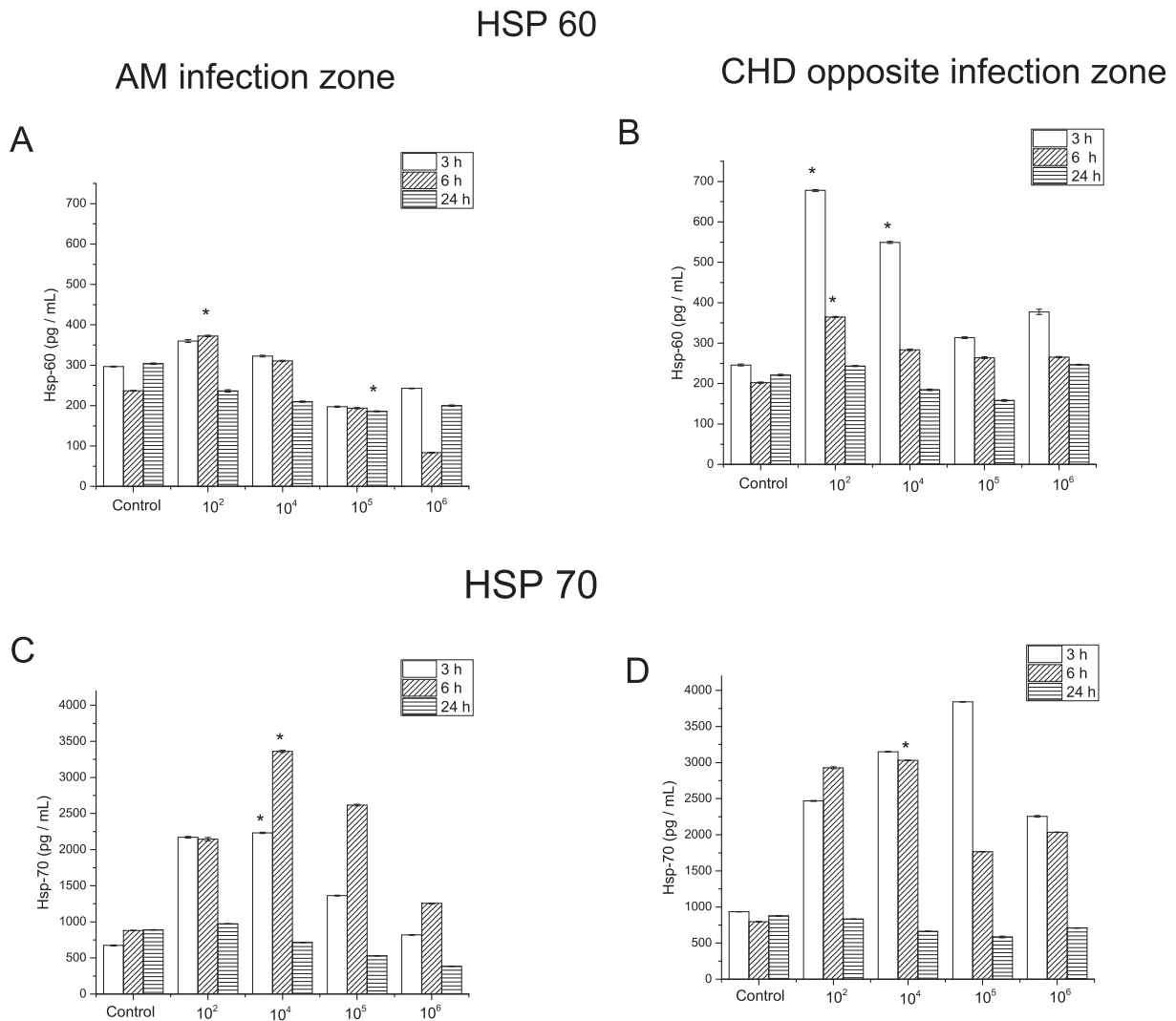
The use of the two-compartment infection system has been reported previously [5,34]. This model allows detection of the response both in the infection zone and in the opposite zone, and assessment of molecular interactions between both compartments. The strengths of our study include the following: (a) the use of tissues from normal pregnancies prior to labor, (b) a cell culture

system that distinguishes the response to different compartments, (c) multiple time points and doses of bacteria, and (d) the use of live pathogens. Some points to be considered in future studies are as follows: (a) most intrauterine infections are due to pathogens that do not have LPS, such as *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis* [35,36]; (b) we did not include amniotic fluid on the amnion side, which could have immunomodulatory properties [37]; and (c) general limitations of the cell culture system, such as determining how cells or hormones migrate from other tissues, may have affected our results.

Our findings show communication between compartments of the fetal membrane in the secretion of Hsp-60 and Hsp-70. It has been reported that HSPs are important intermediaries in different metabolic activities, as well as in cellular communication and homeostasis [38]. The potential mobility mechanism of HSP between the CHD and AM compartments has not been elucidated. However, it could be mediated by an endosome system that allows cell communication between both compartments [38].

Considerable evidence suggests that HSPs play an important role in innate response [39] and induce pro-inflammatory





**Fig. 4.** Secretion of Hsp-60 and Hsp-70 by the amniotic compartment directly infected with *E. coli*. Different concentrations of *E. coli* were tested at different intervals of incubation (3, 6 and 24 h) of the amniotic epithelium zone of infected choriodecidual tissue (A, C) and opposite choriodecidual tissue (B, D). Concentration of Hsp-60 (A, B) and Hsp-70 (C, D) was expressed as pg/mL. Data represent the mean  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ). Statistical difference was observed with respect to the control group (\* $p \leq 0.05$ ).

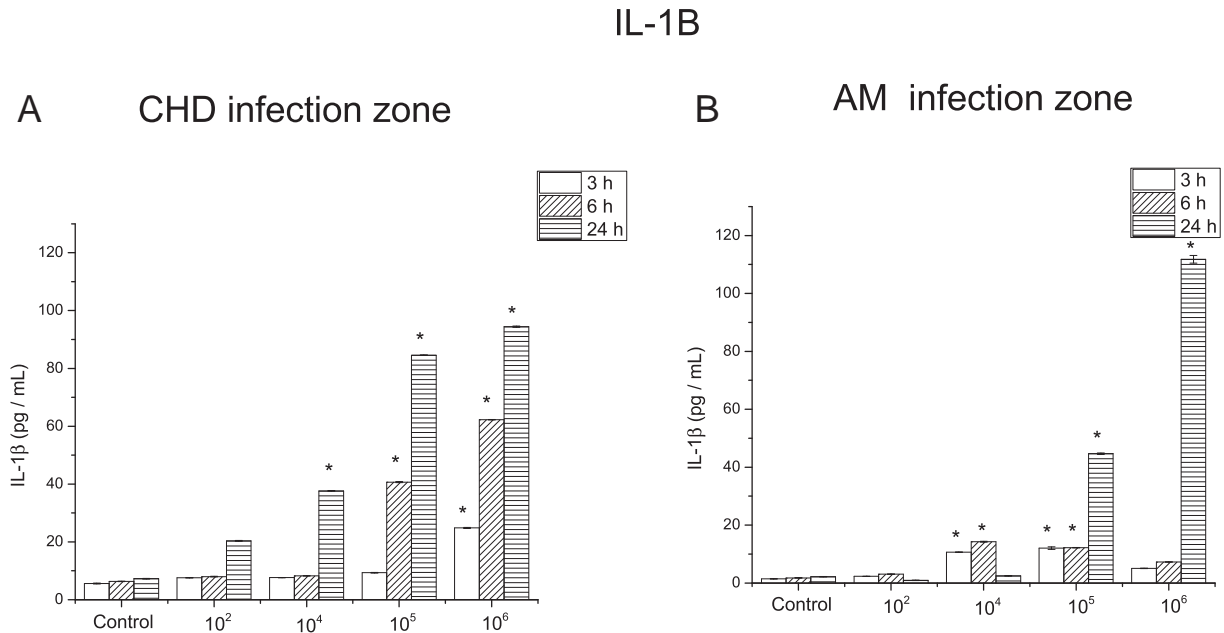
cytokines, namely, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  [21,26,27]. The molecular mechanism by which HSPs activate the synthesis and secretion of IL-1 $\beta$  in human fetal membranes has not been clarified, but it has been reported that HSP activate NF- $\kappa$ B and increase the secretion of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  in human monocytes when stimulated with LPS [40]. Our results show that, after a decrease in the concentration of Hsp-70 in the late stage (24 h) of infection, a parallel increase in the concentration of IL-1 $\beta$ , in a dose manner, occurs in the CHD tissue and AM compartment. Jean-Pierre et al. [30] have shown that, in amniotic fluid with infection, the presence of Hsp-70 is correlated positively with a TNF- $\alpha$  increase, but not with IL-1 $\beta$  and IL-6 [30]. This discrepancy could be due to the fact that amniotic fluid produced in the initial hours released IL-1 $\beta$ , and this cytokine stimulated the production of TNF- $\alpha$ , while the amniotic epithelium required 24 h for synthesizing and secreting IL-1 $\beta$ , according to previous studies [5,41]. On the other hand, Hsp-60 induced the secretion of TNF- $\alpha$  in macrophage cells in a dose-dependent manner, but after 25 h this cytokine was down-regulated [21]. This pro-inflammatory milieu is associated with the IL-1 receptor antagonist [19].

IL-1 $\beta$  is a potent pro-inflammatory cytokine that plays an important role in the progression of the inflammatory response

[42], stimulating the secretion of IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  [43] mediated by the binding of NF- $\kappa$ B [44].

The molecular mechanism between *E. coli*-induced secretion of Hsp-70 and IL-1 $\beta$  is mediated via the Toll-like receptor (TLR). This receptor has been localized in the decidual cells of fetal membranes, the syncytiotrophoblasts of term placentas, and in fetal membranes with chorioamnionitis [45–47]. *E. coli* has structural pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are recognized by TLR-2 (lipopeptide, Pam3Cys), TLR-4 (LPS) and TLR-9 (unmethylated DNA CpG dinucleotides) [48,49]. These PAMPs induce a phosphorylation MD-88–TLR-4 complex that activates intracellular signal transduction pathways leading to activation of NF- $\kappa$ B and protein kinases [13,50–53]. The expression of NF- $\kappa$ B was previously demonstrated in amnion and choriodecidual cells associated with IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  secretions [54]. NF- $\kappa$ B is an important regulator of intracellular signaling activated by Hsp-70/IL-1 $\beta$  [55,56], and it has been reported that selective p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) antagonists inhibit IL production induced by Hsp-60 [28].

In conclusion, the results of this study provide evidence for a spatiotemporal and tissue-specific secretion of HSP/IL-1 $\beta$  in fetal membranes upon *E. coli* infection.



**Fig. 5.** Secretion of IL-1 $\beta$  by fetal membranes infected with *E. coli*. Direct infection of choriodecidual tissue (A) and amniotic epithelium (B) compartments. The concentration of IL-1 $\beta$  was expressed as pg/mL. Data represent the mean  $\pm$  SEM (n = 9). Statistical difference was observed with respect to the control group (\*p  $\leq$  0.05).

### Conflict of interest

None.

### Acknowledgments

This study was supported by the National Institute of Perinatology "Isidro Espinosa de los Reyes," Mexico Grant (No 212250-19051 to HFH). This paper is part of the experimental work of Mauricio Osorio-Caballero (number 82306359) for obtaining the degree of master of science under the UNAM Postgraduate Program on Medicine, Odontology, and Health Sciences. We thank CONACYT for supporting his studies. We are grateful to Kathryn Kovacic and David Connolly for language editing, and to Larisa Diaz-Esparza for editorial assistance.

### References

- [1] Hillier SL, Krohn MA, Kiviat NB, Watts DH, Eschenbach DA. Microbiological causes and neonatal outcomes associated with chorioamnion infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165(4 Pt 1):955–61.
- [2] Discacciati MG, Simoes JA, Silva MG, Marconi C, Brolazo E, Costa ML, et al. Microbiological characteristics and inflammatory cytokines associated with preterm labor. *Arch Gynecol Obstet* 2011;283(3):501–8.
- [3] Keelan JA, Marvin KW, Sato TA, Coleman M, McCowan LM, Mitchell MD. Cytokine abundance in placental tissues: evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181(6):1530–6.
- [4] 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(3):306:e1–6.
- [5] Flores-Herrera H, Garcia-Lopez G, Diaz NF, Molina-Hernandez A, Osorio-Caballero M, Soriano-Becerril D, et al. An experimental mixed bacterial infection induced differential secretion of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) and proMMP-9 in human fetal membranes. *Placenta* 2012;33(4):271–7.
- [6] Park KH, Chaiworapongsa T, Kim YM, Espinoza J, Yoshimatsu J, Edwin S, et al. Matrix metalloproteinase 3 in parturition, premature rupture of the membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity. *J Perinat Med* 2003;31(1):12–22.
- [7] Chaiworapongsa T, Erez O, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Gotsch F, et al. Amniotic fluid heat shock protein 70 concentration in histologic chorioamnionitis, term and preterm parturition. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;21(7):449–61.
- [8] Cziik MJ, McCarthy FP, Murphy KE. Chorioamnionitis: from pathogenesis to treatment. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(9):1304–11.
- [9] Tita AT, Andrews WW. Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis. *Clin Perinatol* 2010;37(2):339–54.
- [10] Molvarec A, Tamasi L, Losonczy G, Madach K, Prohaszka Z, Rigo Jr J. Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. *Cell Stress Chaperones* 2010;15(3):237–47.
- [11] Shah M, Stanek J, Handwerker S. Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. *Histochem J* 1998;30(7):509–18.
- [12] Ziegert M, Witkin SS, Sziller I, Alexander H, Brylla E, Hartig W. Heat shock proteins and heat shock protein-antibody complexes in placental tissues. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999;7(4):180–5.
- [13] Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2(3):185–94.
- [14] Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 2002;23(3):130–5.
- [15] Daoud GA, Suzuki Y, Yamamoto T, Suzuki T, Suzumori N, Tanemura M. Establishment of a polymerase chain reaction method for detection of *Escherichia coli* in amniotic fluid in patients with chorioamnionitis. *Fetal Diagn Ther* 2008;24(2):132–9.
- [16] Hecht JL, Onderdonk A, Delaney M, Allred EN, Kliman HJ, Zambrano E, et al. Characterization of chorioamnionitis in 2nd-trimester C-section placentas and correlation with microorganism recovery from subamniotic tissues. *Pediatr Dev Pathol* 2008;11(1):15–22.
- [17] Sherman DJ, Tovbin J, Lazarovich T, Avrech O, Reif R, Hoffmann S, et al. Chorioamnionitis caused by gram-negative bacteria as an etiologic factor in preterm birth. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16(6):417–23.
- [18] Gelber SE, Bongiovanni AM, Jean-Pierre C, Linhares IM, Skupski DW, Witkin SS. Antibodies to the 70 kDa heat shock protein in midtrimester amniotic fluid and intraamniotic immunity. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197(3):278 e1–4.
- [19] Genc MR, Karasahin E, Onderdonk AB, Bongiovanni AM, Delaney ML, Witkin SS. Association between vaginal 70-kd heat shock protein, interleukin-1 receptor antagonist, and microbial flora in mid trimester pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192(3):916–21.
- [20] Menon R, Gerber S, Fortunato SJ, Witkin SS. Lipopolysaccharide stimulation of 70 kilo Dalton heat shock protein messenger ribonucleic acid production in cultured human fetal membranes. *J Perinat Med* 2001;29(2):133–6.
- [21] Chen W, Sylidath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 1999;162(6):3212–9.
- [22] Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 1999;103(4):571–7.
- [23] Chaudhari AA, Seol JW, Kang SJ, Park SY. Mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species generation regulate the enhanced effect of CCCP on TRAIL-induced SNU-638 cell apoptosis. *J Vet Med Sci* 2008;70(6):537–42.

- [24] Young JC. Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol* 2010;88(2):291–300.
- [25] Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002;277(17):15028–34.
- [26] Bangen JM, Schade FU, Flohe SB. Diverse regulatory activity of human heat shock proteins 60 and 70 on endotoxin-induced inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359(3):709–15.
- [27] Flohe SB, Bruggemann J, Lendemans S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohe S, et al. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol* 2003;170(5):2340–8.
- [28] Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* 2000;164(1):13–7.
- [29] Belles C, Kuhl A, Nosheny R, Carding SR. Plasma membrane expression of heat shock protein 60 in vivo in response to infection. *Infect Immun* 1999;67(8):4191–200.
- [30] Jean-Pierre C, Perni SC, Bongiovanni AM, Kalish RB, Karasahan E, Ravich M, et al. Extracellular 70-kd heat shock protein in mid-trimester amniotic fluid and its effect on cytokine production by ex vivo-cultured amniotic fluid cells. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194(3):694–8.
- [31] 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.
- [32] Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA. Natural antimicrobial production by the amnion. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(3):255 e1–6.
- [33] Kacerovsky M, Tosner J, Andrys C, Drahosova M, Pliskova L, Forstl M, et al. Amniotic fluid heat shock protein 70 concentration in preterm premature rupture of membranes. *Ceska Gynecol* 2009;74(2):85–91.
- [34] Thiex NW, Chames MC, Loch-Carusio 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.
- [35] Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(4):757–89.
- [36] Waites KB, Schelonka RL, Xiao L, Grigsby PL, Novy MJ. Congenital and opportunistic infections: ureaplasma species and mycoplasma hominis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;14(4):190–9.
- [37] Peltier MR, Drobek CO, Bhat G, Saade G, Fortunato SJ, Menon R. Amniotic fluid and maternal race influence responsiveness of fetal membranes to bacteria. *J Reprod Immunol* 2012;96(1–2):68–78.
- [38] De Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the stress observation system: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones* 2011;16(3):235–49.
- [39] Tsan MF, Gao B. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol* 2004;1(4):274–9.
- [40] Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000;6(4):435–42.
- [41] Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, Espejel-Nunez A, Flores-Pliego A, Soriano-Becerril D, et al. 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.
- [42] Suwara MI, Green NJ, Borthwick LA, Mann J, Mayer-Barber KD, Barron L, et al. IL-1alpha released from damaged epithelial cells is sufficient and essential to trigger inflammatory responses in human lung fibroblasts. *Mucosal Immunol* 2014;7(3):684–93.
- [43] Jalbert E, Crawford TQ, D'Antoni ML, Keating SM, Norris PJ, Nakamoto BK, et al. IL-1Beta enriched monocytes mount massive IL-6 responses to common inflammatory triggers among chronically HIV-1 infected adults on stable antiretroviral therapy at risk for cardiovascular disease. *PLoS One* 2013;8(9):e75500.
- [44] Kang DW, Park MK, Oh HJ, Lee DG, Park SH, Choi KY, et al. Phospholipase D1 has a pivotal role in interleukin-1beta-driven chronic autoimmune arthritis through regulation of NF-kappaB, hypoxia-inducible factor 1alpha, and FoxO3a. *Mol Cell Biol* 2013;33(14):2760–72.
- [45] Canavan TP, Simhan HN. Innate immune function of the human decidual cell at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol* 2007;74(1–2):46–52.
- [46] Himes KP, Handley D, Chu T, Burke B, Bunce K, Simhan HN, et al. Comprehensive analysis of the transcriptional response of human decidual cells to lipopolysaccharide stimulation. *J Reprod Immunol* 2012;93(1):17–27.
- [47] Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim GJ, Kim MR, Kuivaniemi H, et al. 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(4):1346–55.
- [48] Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, et al. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J Immunol* 2003;170(1):508–19.
- [49] Poth JM, Coch C, Busch N, Boehm O, Schlee M, Janke M, et al. Monocyte-mediated inhibition of TLR9-dependent IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells questions bacterial DNA as the active ingredient of bacterial lysates. *J Immunol* 2010;185(12):7367–73.
- [50] Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 2011;13(1):11–22.
- [51] Bausinger H, Lipsker D, Hanau D. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 2002;23(7):342–3.
- [52] Becker J, Craig EA. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 1994;219(1–2):11–23.
- [53] Prohaszka Z, Fust G. Immunological aspects of heat-shock proteins—the optimum stress of life. *Mol Immunol* 2004;41(1):29–44.
- [54] Lappas M, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE. Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro. *Biol Reprod* 2002;67(2):668–73.
- [55] Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res* 2011;21(2):223–44.
- [56] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009;27:693–733.