



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PROGESTERONA
(P4) SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE
SANGRE PLACENTARIA HUMANA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNOSTICA

PRESENTA:

EDUARDO AXEL PRECIADO MARTÍNEZ

ASESOR:

Dra. en C. CLAUDIA VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA

CO-ASESOR:

M.V.Z. ANGEL GERMÁN MARTÍNEZ SOSA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación del efecto de la Progesterona (P4) sobre células mononucleares de sangre placentaria humana.

Que presenta el pasante: Eduardo Axel Preciado Martínez
Con número de cuenta: 307516220 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Febrero de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	
VOCAL	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
SECRETARIO	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
1er. SUPLENTE	M en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Ma. de Lourdes Galván Ruiz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos

A mi directora de tesis la Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina por aceptarme en su grupo de trabajo sin saber en lo que se metía, por ayudarme a ampliar mis horizontes académicos e intelectuales y por cambiar de una forma tan positiva mi percepción del mundo.

A Pily por tu paciencia, amistad, por la ayuda incondicional que brindas a los que te rodean y sobre todo por guiar a alguien tan despistado como yo.

A mis compañeros de laboratorio, Ara, Gaby, Guido, Luisa, Dany y Mon por todas las risas que compartimos, por su amistad, la confianza y por ser parte de mi formación.

A mis hermanos y hermanas de otras madres: Iván, Uli, Maca, Polo y Rocha por todas las locuras, discusiones, parrandas y porque nunca me voy a quedar sin historias que contar gracias a ustedes. A Moncho, Bibi, Kary y Pichi por ser las personas más sabías que conozco, aunque nuestros caminos sean tan diferentes ustedes enriquecen mi vida.

A mi profesor el M.V.Z Angel Germán Martínez Sosa por ser mi asesor, parte del jurado y por su contribución tan grande en mi formación académica, gracias por despertar en mí el gusto por la inmunología.

Al Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes por permitir la realización de este proyecto y a todas las personas que laboran en el departamento de inmunobioquímica.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por brindarme el honor de ser parte de una de las instituciones más respetables del país.

Dedicatorias

A mi madre y a mi padre, por su amor incondicional y su presencia a lo largo de mi vida, ustedes han ayudado a forjar el ser que soy ahora y les estaré siempre infinitamente agradecido, aun me queda mucho camino por recorrer pero gracias a ustedes me siento capaz de enfrentar cualquier reto. Los amo.

A mi madre, por tu fortaleza y por el esfuerzo tan grande que has hecho todos estos años por nosotros, gracias mama, mis logros siempre van a ser tuyos.

A mi padre, por estar ahí para escucharme y por estar siempre pendiente de nosotros, gracias papa, por ser mi mejor amigo y porque sé que siempre puedo contar contigo.

A Guille, porque fuiste el ángel más grande de mi vida, siempre te voy a recordar con dicha.



El presente proyecto de tesis y el trabajo de investigación derivado de el fue realizado en el departamento de inmunobioquímica del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” bajo la dirección de la Dra. en C. Claudia Verónica Zaga Clavellina.

ÍNDICE

CONTENIDO	PAGINAS
Índice de abreviaturas.....	I
Índice de figuras.....	III
Índice de Tablas.....	IV
Índice de Gráficas.....	V
RESUMEN.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Establecimiento del privilegio inmunológico durante el embarazo.....	2
1.1.1. Tejidos extra-embriónicos.....	2
1.1.2. Cambios en las poblaciones celulares inmunes del útero.....	3
1.1.3. Expresión de HLA-G.....	3
1.1.4. Expresión de indolamina 2,3-dioxygenasa (IDO).....	4
1.1.5. Balance Th1/ Th2.....	5
1.1.6. Progesterona (P4).....	6
1.2. Formación de la placenta.....	7
1.2.1. Fase pre-vellosa.....	8
1.2.2. Fase vellosa.....	9
1.3. Células inmunes en la sangre placentaria.....	12
1.4. Trabajo de parto normal.....	13
1.5. Los efectos de la P4 en células del sistema inmune materno.....	13
1.6. Trabajo de parto pretérmino.....	14
1.7. Infección intrauterina durante el embarazo.....	15
1.8. CMSI y parto prematuro.....	18
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1. Células inmunes específicas en los compartimientos feto-placentarios.....	18
2.2. Efecto modulador de P4 sobre células de sangre placentaria.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVO GENERAL.....	23
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
6. METODOLOGÍA.....	24
6.1. Reactivos.....	24
6.2. Obtención de muestras biológicas.....	24

6.3. Obtención de sangre placentaria.....	24
6.4. Separación de CMSI.....	25
6.5. Conteo de células y viabilidad.....	26
6.6. Biometría Hemática.....	26
6.7. Técnica de (Hibridación fluorescente <i>in situ</i>) FISH.....	26
6.8. Cultivo de células mononucleares de sangre periférica de placenta.....	27
6.9. Estimulación con P4, RU486 y LPS.....	27
6.10. Lisados celulares y obtención de medios.....	28
6.11. Cuantificación de proteínas.....	28
6.12. Cuantificación de citocinas por ELISA	29
7. RESULTADOS.....	30
7.1. Validación del modelo.....	30
7.2. Biometría Hemática.....	30
7.3. Porcentaje de células maternas en la sangre intervillosa.....	31
7.4. Secreción de IL-1 β , TNF- α e IL-6.....	31
7.5. Secreción de IL-8 y de Mip-1 α	35
7.6. Secreción de IL-10.....	38
7.7. Secreción de MMP-9 en medios y lisados celulares.....	40
8. DISCUSIÓN.....	43
9. CONCLUSIONES.....	59
10. REFERENCIAS.....	57

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C: Grados centígrados
CD: Cumulo de diferenciación
CMSI: Celulas mononucleares de sangre intervellosa
COX2: Ciclo-oxigenasa 2
DNA: Ácido desoxiribonucleico
E2: Estradiol
EIF2: Factor de iniciación eucariótico
ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FISH: Fluorescencia de hibridación *in situ*
GCN2: Control general no suprimible
GR: Receptores de glucocorticoides
HLA: Antígeno leucocitario humano
IDO: indolamina 2,3-dioxygenasa
IFN: Interferon
IL-: Interleucina
kDa: Kilodaltones
LILRB: Receptor inhibidor de leucocitos
LPS: Lipopolisacarido
MIP-: Proteina inflamatoria de macrófagos
mM: Milimolar
MMP-: Metaloproteasas de matriz
Myd88: Factor de diferenciación mieloide 88
NF- κ B: Factor Nuclear kappa beta
Ng: Nanogramo
NK: Asesinas naturales
P4: Progesterona
PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica
PG: Prostaglandinas

Pg: Picogramo

PIBF: Factor bloqueador inducido por progesterona

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones

RANTES: del ingles *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*

RNA: Ácido ribonucleico

RP: Receptores de progesterona

RPm: Receptores de progesterona de membrana

RPM: Ruptura prematura de membranas

TGF: Factor de crecimiento tumoral

Th: Linfocito T cooperador

TLR: Receptores tipo Toll

TNF: Factor de necrosis tumoral

μ L: Microlitro

μ M: Micromolar

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Biosíntesis de P4 a partir del colesterol

Figura 2: Esquema representando la concentración de hormonas a lo largo del embarazo

Figura 3: Esquema de la placenta en el primer trimestre de embarazo

Figura 4: Esquema del segundo mes del embarazo mostrando

Figura 5: Diagrama de varios tipos de vellosidades y su relación topográfica

Figura 6: Representación esquemática de una placenta a término

Figura 7: Esquema de las diferencias entre las CMSI y las células mononucleares de sangre periférica.

Figura 8: Los cuatro pasos de la teoría ascendente

Figura 9: Placenta después de su obtención

Figura 10: Placenta en bolsa de polietileno

Figura 11: Separación de CMSC utilizando el método de Ficoll-Histopaque

Figura 12: Pozos para el cultivo de CMSI

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Kits de ELISA con su curva estándar

Tabla 2. Biometría de leucocitos en sangre periférica y en sangre intervellosa

Tabla 3. Comparación de células maternas (XX) contra células fetales (XY)

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1: Viabilidad celular desde el momento de la incubación hasta 72 horas después

Grafica 2: Secreción in-vitro de IL-1 β determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos

Grafica 3: Secreción in-vitro de TNF- α determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos

Grafica 4: Secreción in-vitro de IL-6 determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos

Grafica 5: Secreción in-vitro de IL-8 determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos

Grafica 6: Secreción in-vitro de Mip-1 α determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos

Grafica 7: Secreción in-vitro de IL-10 determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos

Gráfica 8: Secreción de MMP-9 in-vitro de lisado celular determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos

Gráfica 9: Secreción in-vitro de MMP-9 determinado por ELISA en un cultivo de CMSI de sangre de placenta sometidas a diferentes tratamientos

RESUMEN

Una de las causas que dirigen el parto pre-término es el desarrollo de un proceso infeccioso intrauterino causado por patógenos que alteran el equilibrio inmunológico, induciendo la acción de distintos elementos inflamatorios que modifican profundamente la estructura y función de tejidos maternos y fetales comprometiendo la continuidad del embarazo promoviendo el inicio del trabajo de parto antes de la semana 37, por lo que constituyen un serio problema en términos de morbilidad y mortalidad neonatal, discapacidad y costo social.

Se ha demostrado que subpoblaciones de leucocitos son atraídos a los tejidos fetoplacentarios, condicionando de esta forma el microambiente local e incrementando la secreción de moduladores pro-inflamatorios que actúan sobre los tejidos gestacionales.

Por otro lado se ha demostrado que la hormona esteroide progesterona (P4) es capaz de inducir efectos inmuno-protectores que pueden atenuar los efectos de moléculas pro-inflamatorias, el mecanismo mediante el cual esto sucede no ha sido completamente dilucidado.

En esta investigación el objetivo fue caracterizar la secreción de citocinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y degradativas en cultivos de células mononucleares de sangre intervellosa (CMSI) estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) y co-tratadas con diferentes concentraciones de P4.

A las 48 horas los medios fueron recuperados y centrifugados para separar a las células centrifugación, las citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, MIP-1 α , IL-10 y MMP-9 fueron medidas usando ELISA

Para aislar a las CMSI se utilizó sangre de la placenta obtenida por cesárea de mujeres con edad gestacional a término (37-39 semanas) sin evidencia de trabajo de parto y sin antecedentes de infección o padecimientos crónicos. Las células fueron pre-tratadas con P4 (1, 0.1, 0.01 μ M) durante 24 horas y posteriormente co-tratadas con LPS durante otras 24 horas (500ng/mL).

El co-tratamiento con 1 μ M de P4 logro inhibir de forma significativa el nivel de IL-1 β (54%) mientras que P4 0.1 μ M fue el más efectivo al inhibir TNF- α de forma significativa (68.1%), P4 0.01 μ M fue el más efectivo para IL-6 (35.7%).

En el caso de quimiocinas IL-8 fue inhibido de forma significativa por las 3 concentraciones de P4 (media de 37.51%) y P4 0.01 μ M fue la concentración más efectiva para inhibir MIP-1 α (44.5%).

P4 no altero de forma significativa a IL-10 sin embargo se observó un incremento de 70% con P4 1 μ M comparado con el control.

Los pre-tratamientos de P4 no afectaron de forma significativa a MMP-9, sin embargo se observó que la concentración de 0.01 μ M logró inhibir el efecto del LPS (51%).

En un futuro, la caracterización del mecanismo de reconocimiento específico de los patógenos y el efecto de la P4 sobre este, permitirá comprender parte de las competencias inmunológicas de los tejidos gestacionales y las células profesionales del sistema inmune que permiten la coexistencia entre los mecanismos de defensa y los de compensación inmunoendocrina que permiten continuar con el embarazo.

1. INTRODUCCIÓN

En el embarazo el sistema inmune de la madre se encuentra en contacto con antígenos fetales por lo que es indispensable que se establezcan una serie de mecanismos conjuntos que permitan crear un ambiente de tolerancia inmunológica sin comprometer los mecanismos de defensa maternos que garanticen el desarrollo del producto (Thellin, 2003).

A principios del siglo XX el genetista Clarence Cook Little (1924) propuso que para evitar el rechazo del embrión, este “debía” carecer de características fisiológicas definitivas (Kjersti et al., 2006).

En 1953 Peter Medawar planteó una serie de 4 hipótesis que sentaron las bases iniciales para explicar la relación inmunológica de la madre y el producto:

- 1) La “inmadurez antigénica” de los tejidos fetales
- 2) Una respuesta inmune materna “debilitada”
- 3) El útero como sitio inmuno-privilegiado, y
- 4) La creación de una barrera inmunológica por parte de la placenta (Billington W, 2003)

Actualmente, las evidencias clínicas y experimentales con las que contamos han permitido comprender de manera más integral la profunda y estrecha relación que se establece entre la madre y el producto, entendiendo, que el embarazo no equivale a un estado “inerte” del sistema inmune de la madre si no a un estado alterado de su competencia inmune. (Pavón et al., 2016).

La estrecha relación entre los sistemas inmunes del binomio madre-feto sustentan la teoría de que su coexistencia no puede ser explicada por un mecanismo aislado, sino que es el resultado de varias adaptaciones como la formación de la placenta, un órgano altamente especializado que se constituye como la interfase entre la madre y el embrión/feto y que

realiza una serie de funciones tales como el anclaje del feto a la pared uterina, el intercambio O₂/CO₂, aporte de nutrientes y remoción de los productos de desecho, síntesis y secreción de hormonas esteroides, factores de crecimiento y moduladores inmunológicos.

Una particularidad de este tejido consiste en la estrecha relación entre los diferentes tipos de trofoblastos -la unidad funcional de la placenta- que se encuentran en contacto directo con la sangre materna que este tejido alberga. Este punto de contacto supone un cambio en el perfil inmunológico de las células inmunes profesionales maternas que están radicadas en la sangre (Piccinni, 2006).

Tomando en cuenta lo anterior las características y propiedades inmunes de las células mononucleares reclutadas al espacio intervilloso de la placenta forman parte de las estrategias que el sistema materno adopta para permitir el desarrollo del embarazo. Estas poblaciones celulares son susceptibles de modulación inmunoendocrina y su respuesta a ésta es clave para la continuidad exitosa del embarazo.

1.1. ESTABLECIMIENTO DEL PRIVILEGIO INMUNOLÓGICO DURANTE EL EMBARAZO

1.1.1. Tejidos extra-embrionarios

Desde el punto de vista inmunológico el feto debe ser considerado como un semialoinjerto ya que el 50% de los antígenos que expresa son de origen paterno (Thellin et al., 2000).

Como ya se mencionó anteriormente, las adaptaciones anatómicas como las proporcionadas por los tejidos extra-embrionarios incluyen, la separación de los torrentes sanguíneos por el espacio intervilloso de la placenta y la delimitación de la cavidad amniótica por parte de las membranas fetales.

En el humano la placentación es del tipo hemocorial lo que básicamente significa que las vellosidades coriales flotan libremente en la cámara hemática en contacto con la sangre materna y el proceso de invasión de las arterias placentarias incluye la destrucción del endotelio vascular materno (Benirschke et al., 2006).

1.1.2. Cambios en las poblaciones celulares inmunes del útero.

Un cambio clave durante la gestación consiste en que el sistema inmune innato toma el control inmunológico de la cavidad uterina en el sitio de implantación y después en la decidua. Las células T y células B, claves del sistema adaptativo están presentes en una mucho menor proporción comparadas con la población de células asesinas naturales (NK del inglés “Natural Killer Cells”) del sistema innato (King et al., 1998).

En la decidua 70% de los leucocitos infiltrados (CD45+) son células NK con un fenotipo CD56^{bright} CD16⁻ esta población es preponderante durante los dos primeros trimestres (hasta la semana 25) y después desaparecen.

Las NK coexisten con macrófagos que representan entre el 10 y 20% de los leucocitos y una población mínima de células dendríticas (2-4%). La población de células T constituye el 14% del total de células inmunes y los linfocitos B están prácticamente ausentes (Moffett-King et al., 2002).

1.1.3. Expresión de HLA-G.

El trofoblasto produce factores solubles con propiedades inmunosupresoras tales como el antígeno leucocitario humano HLA-G y HLA-E clase Ib, los cuales actúan como moléculas tolerogénicas que ejercen efectos sobre el perfil de citotoxicidad de las diferentes poblaciones inmunes del útero. Los leucocitos uterinos son altamente receptivos para estas moléculas, las células asesinas naturales del útero (uNK) expresan sobre sus membranas los

receptores inhibidores LILRB (leukocyte inmuno globulin like receptors) que puede unir a HLA-G y los receptores CD94/NKG que unen a HLA-G (Hunt, 2006)

Los macrófagos, las células dendríticas y los escasos T CD8⁺ también expresan LILRB1 y LILRB2 en diferentes proporciones y perfiles y son también blanco de la acción de HLA-G (Morales et al., 2003)

La molécula HLA-C tiene la capacidad de interactuar con células NK uterinas que secretan factores de crecimiento angiogénicos para promover su invasión hacia las arterias espirales (Carter, 2011).

1.1.4. Expresión de indolamina 2,3-dioxygenasa (IDO)

Se ha demostrado que IDO tiene efectos inmunomoduladores en células T al catalizar las reservas locales de L-triptófano un aminoácido esencial para su función y proliferación además la carencia de triptófano provoca la formación de tRNA carente de triptófano lo que activa una ruta de estrés en la que el tRNA se une a una GCN2 (del inglés “General Control Non Depressible” 2) y provoca la fosforilación del factor de transcripción EIF2 α . Como resultado, se genera una activación elevada de NF- κ B, CHOP, el receptor de interferón γ (IFN- γ) y una producción disminuida de interleucina 6 (IL-6) además, IDO provocara la diferenciación de células T reguladoras (Treg) CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺. Los metabolitos de triptófano son tóxicos para CD8⁺ y células CD4 Th1, pero no para las Th2, además la kinurenina incrementa la producción de IL-6 a través del receptor EIF2 α , lo que permite a IDO mantener un equilibrio entre la activación inmune y la supresión cuando sea necesario. Existe evidencia que la expresión de IDO es mayor en el trofoblasto y membranas fetales, por lo que puede tener un efecto directo sobre las células inmunes ubicadas en la decidua (Kudo et al. 2013).

1.1.5. Balance Th1/ Th2

Una consideración clave en el establecimiento de condiciones inmunológicamente tolerogénicas para el producto es el establecimiento de un equilibrio entre los moduladores pro- y anti-inflamatorios que son secretados por los tejidos maternos y fetales.

Los conceptos iniciales sustentaban que durante el embarazo, el perfil Th1 [(IL-1 β , IL-12, IL-15, IFN- γ , factor de necrosis tumoral β (TNF- β) y (TNF- α)] era completamente suprimido; sin embargo, en el humano este concepto se ha adaptado para entender que si bien en el sistema inmune de la madre predominan los linfocitos con perfil Th2 (TGF- β , IL-4, IL-5, IL-6 IL-10, IL-13) (Saito et al., 1999; Piao et al., 2012), los Th1 son solo parcial y temporalmente suprimidos (McCracken et al., 2007).

El paradigma clásico sobre el equilibrio Th1/Th2 fue recientemente expandido por el descubrimiento de la población Th17 que tiene un perfil similar a los Th1 que incluye la de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 que son claves en los mecanismos de respuesta y protección de las mucosas durante procesos de infección con bacterias y hongos (Khader 2010).

Si bien Th1, Th2 y Th17 forman parte clave de los mecanismos de inmunidad de protección, otra población identificada con la gestación, los Treg CD4⁺ CD25⁺, son claves en la regulación de los mecanismos tolerogénicos entre otras razones porque pueden suprimir la activación y proliferación de células NK (Song and Yichao, 2014) y porque la principal citocina secretada por los Treg es IL-10, capaz de ejercer efectos autócrinos y parácrinos en toda la unidad feto-placentaria y cuya capacidad de inhibir la síntesis y secreción de IL-1 β , TNF α , IL-6 e IL-12 le confiere un papel clave en el mantenimiento del privilegio inmunológico (Sheng y Sharma, 2014).

1.1.6. Progesterona

Entre los eventos tempranos que promueven la tolerancia de la gestación está la síntesis y secreción de P4, una hormona inmunosupresora que es producida en el ovario durante la fase secretoria del ciclo menstrual y durante las primeras etapas del embarazo, representa el primer aviso para la madre de que la implantación está por suceder (Buttset al., 2007).

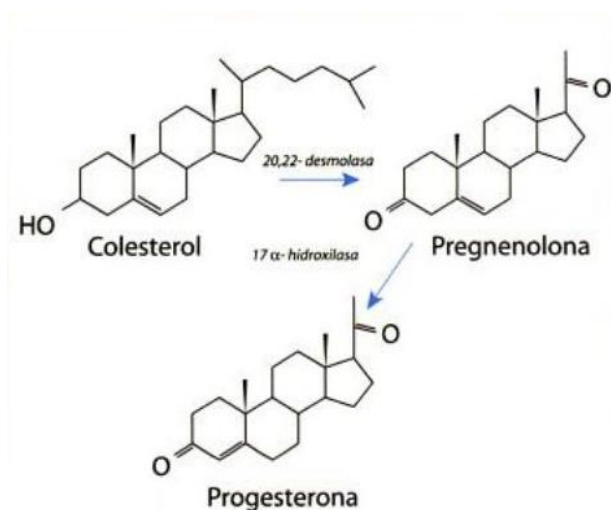


Figura 1. Biosíntesis de P4 a partir del colesterol (Patiño. 2008)

Conforme avanza la gestación la concentración de esta hormona esteroide se incrementa, pero a diferencia de la mayoría de los mamíferos en que la conclusión de la misma está asociada con una rápida caída en los niveles maternos de P4; en el humano y en primates superiores, los niveles de P4 maternos, fetales y en líquido amniótico se mantienen sin cambios significativos antes, durante y después de que el trabajo de parto normal ha iniciado.

Se ha descrito un evento denominado “retiro funcional de la P4” en el que los tejidos blancos dejan de ser sensibles al efecto de esta hormona por el cambio en el perfil de

expresión de los receptores de P4 (RP). Si bien a lo largo de todo el embarazo la isoforma que predomina es la RP-B, al final del mismo la isoforma predominante es el RP-A, lo cual ha sido asociado con efectos anti-progestacionales (Mendelson, 2009).

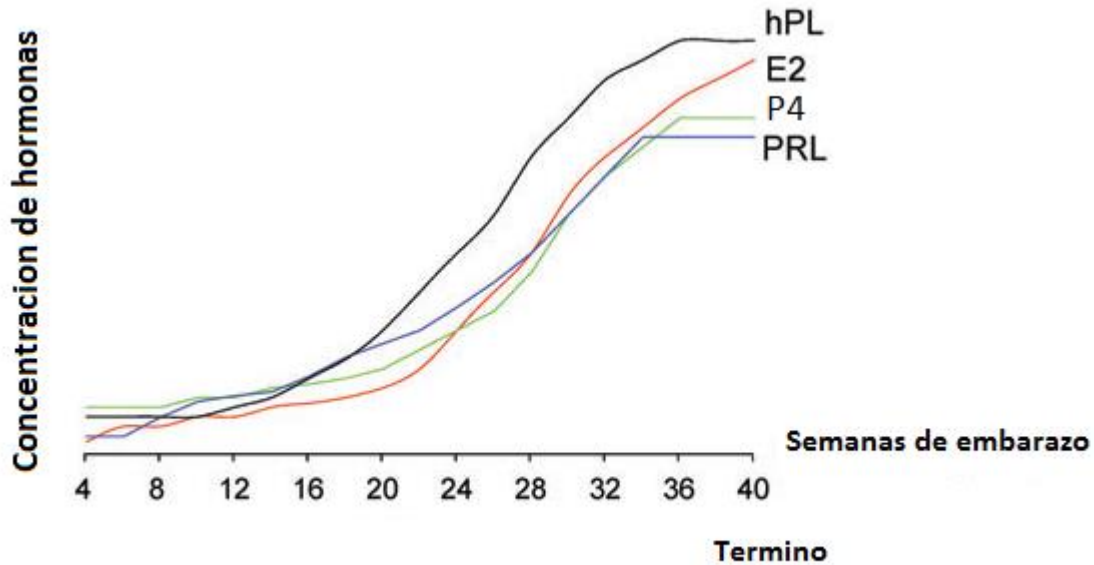


Figura 2. Esquema representando la concentración de hormonas a lo largo del embarazo, lactógeno de suero placentario (hPL), 17 β -oestradiol (E2), Progesterona (P4), Prolactina (PRL) (Modificado de Nadal et al., 2009)

1.2. FORMACIÓN DE LA PLACENTA

La formación de la placenta puede dividirse en dos Fases: La fase pre-vellosa, (que consta del periodo lagunar y el periodo pre-lagunar) y la fase vellosa (periodo de elaboración y periodo final).

1.2.1. Fase pre-vellosa

- **Periodo pre-lagunar:**

Comienza de 6 a 9 días después de la fecundación e inmediatamente después de la implantación evento que provoca que la capa de trofoblastos que rodea al blastocisto comience a proliferar y a diferenciarse en una capa interna llamada citotrofoblasto y en una capa externa multinucleada en contacto con el epitelio endometrial llamada sincitiotrofoblasto.

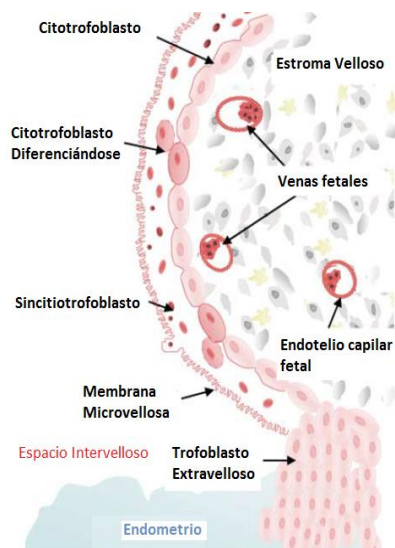


Figura 3 .Esquema de la placenta en el primer trimestre de embarazo, el citotrofoblasto prolifera formando trofoblasto extraveloso y sincitiotrofoblasto. (Modificado de Forbes y Westwood., 2010).

- **Fase lagunar**

Del día 9 al 13 el sincitiotrofoblasto forma una red de lagunas que incrementan de tamaño gradualmente por donde la sangre materna comenzará a fluir estableciendo así la circulación Úteroplacentaria (Gude, 2004).

1.2.2. Fase vellosa

- ***Periodo de formación de la placenta.***

Consta del día 13 hasta finales del cuarto mes, este periodo se caracteriza por la formación de los diferentes tipos de vellosidades que se dividen en las siguientes etapas:

Vellosidades primarias: Se originan entre el día 13 al 15 a partir de invaginaciones de sincitiotrofoblasto invadido por citotrofoblasto, estas vellosidades delimitan las lagunas en las que se encuentra la sangre materna.

Vellosidades secundarias: Su diferenciación ocurre entre el día 18 y el 20. El mesénquima extraembrionario crece dentro del citotrofoblasto penetrando las vellosidades.

Vellosidades terciarias: Aparecen a partir del día 21 cuando las venas fetales se forman a partir del mesénquimas velloso. La conexión entre las venas vellosas a la circulación embrionaria resultara en la formación de la circulación fetal.

Vellosidades mesenquimales: Son las precursoras de otros tipos de vellosidades, entre la semana 5 y la 7 son las únicas vellosidades vascularizadas. Durante la primera semana de gestación estas vellosidades proliferan generando la formación de ramas vellosas.

Vellosidades intermedias inmaduras: Aparecen en el primer y segundo trimestre del embarazo, estas vellosidades tienen un calibre mayor y permiten el paso de macrófagos fetales (células de Hofbauer). Estas vellosidades aseguran el crecimiento efectivo y rápido del árbol velloso y serán las más numerosas en las semanas 14 y 20.

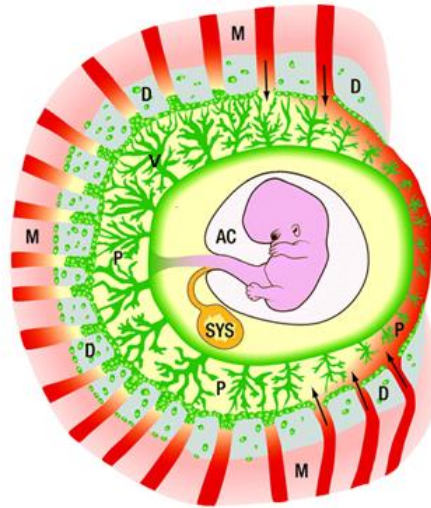


Figura 4. Esquema del segundo mes del embarazo mostrando el Miometrio (M), decidua (D), placenta (P), cavidad amniótica (AC) y las vellosidades terciarias y secundarias (V) (Jauniaux et al., 2004)

Vellosidades intermedias maduras: Durante el último trimestre del embarazo el mesénquima veloso deja de transformarse en vellosidades intermedias inmaduras y se transforma en vellosidades intermedias maduras. Esta característica es mediada por la angiogénesis que ya no provocara la formación de ramas invasivas si no que comenzara a formar venas que aumentarían de tamaño.

Vellosidades terminales: Representan las ramificaciones finales del árbol veloso, en el tercer trimestre del embarazo, tienen un aspecto alveolar, las vellosidades terminales serán formadas por el trofoblasto y un eje con capilares con dilatación sinusoidal. La localización periférica de estos capilares hace que estas vellosidades sean el sitio principal de intercambio materno-fetal.

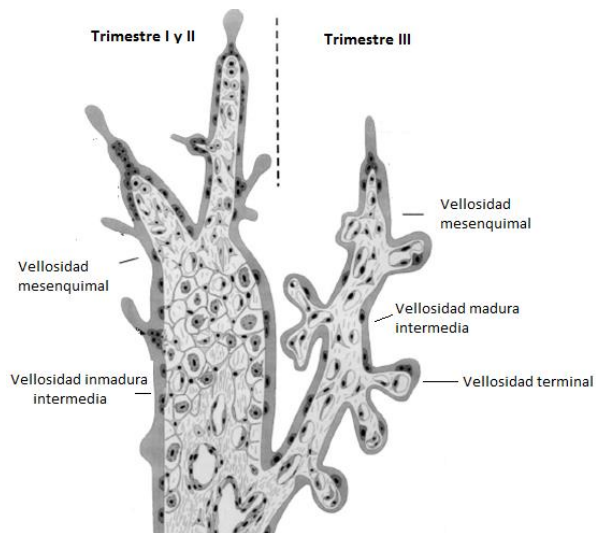


Figura 5. Diagrama de varios tipos de vellosidades y su relación topográfica. La porción izquierda representa el primer y segundo trimestre, la porción derecha representa el tercer trimestre. (Modificado de Castelluci, 2000)

- ***Periodo final***

En el que la placenta está completamente formada del quinto mes de gestación hasta el parto. La formación definitiva de la placenta (día 13 del cuarto mes) lleva a los siguientes cambios: la formación de cotiledones y de septas intercotiledonarias; la desaparición progresiva del citotrofoblasto; y la formación de sincitios. Al final del cuarto mes la placenta es completamente formada pero los cotiledones siguen creciendo y el sistema vascular veloso se sigue desarrollando (Mihaela et al., 2009).

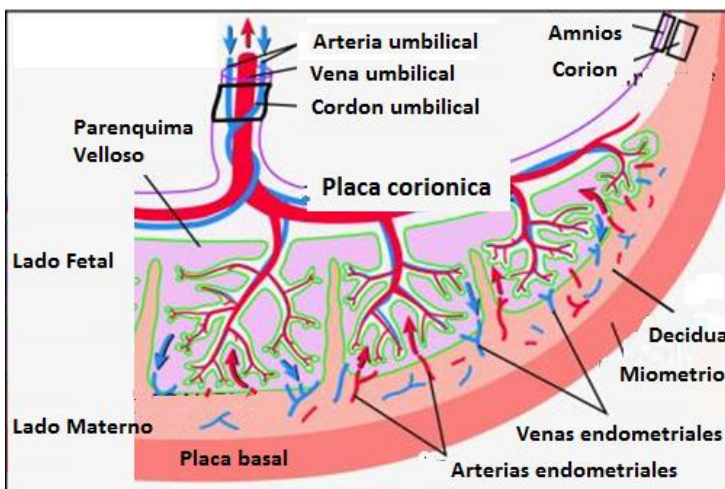


Figura 6. Representación esquemática de una placenta a término (Modificado de Sood et al., 2005)

1.3. CÉLULAS INMUNES EN LA SANGRE PLACENTARIA

Uno de los factores que favorece el ambiente inflamatorio al final del embarazo es el reclutamiento de leucocitos a compartimientos feto-placentarios los cuales son capaces de mediar la síntesis de distintas moléculas responsables de los eventos locales que llevan al trabajo de parto. Existen evidencias que sugieren que las células reclutadas a estos compartimientos son alteradas funcional y fenotípicamente por el ambiente local (Moore, 2003).

Comparado con la sangre periférica materna de pacientes con periodos gestacionales a término sin trabajo de parto, en la sangre placentaria de pacientes con trabajo de parto existe un mayor número de células CD14⁺ (monocitos y macrófagos) (Vega-Sanchez et al., 2010); también circulan 15 veces más células NK que en la sangre periférica materna (Roussev et al., 1993) y la población de células B, CD4⁺ y CD8⁺ permanecen sin cambios y con una elevada expresión del marcador CD69⁺ involucrado en su activación y proliferación.

También se ha demostrado que los leucocitos circulando en la sangre placentaria aumentan la expresión de IL-1 β al momento del parto, secretan altas concentraciones de TNF- α , IL-1 β e IL-6 y son más sensibles estímulos externos. (Vega et al., 2010)

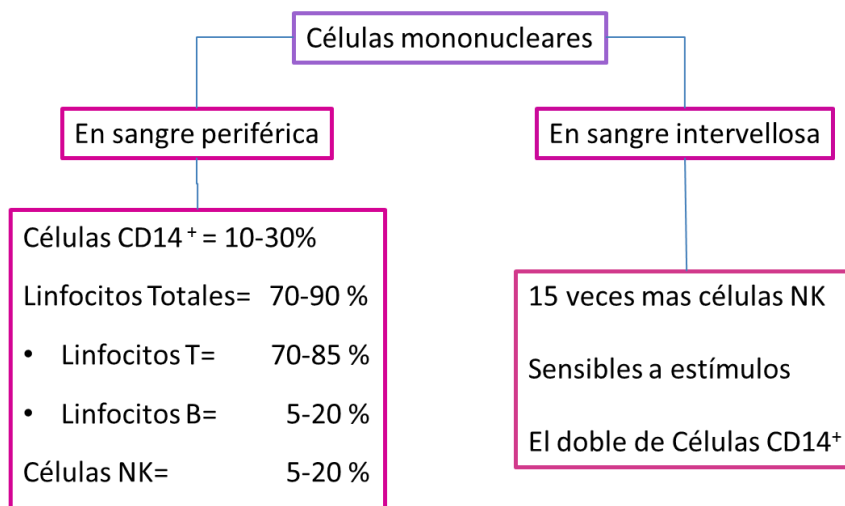


Figura 7.

Esquema de las diferencias entre las CMSI y las células mononucleares de sangre periférica (Esquema de elaboración propia con datos de Gomez-Lopez et al., 2011)

1.4. TRABAJO DE PARTO

NORMAL

El trabajo de parto es considerado como una cadena de eventos fisiológicos que permiten la expulsión del feto, un proceso multifactorial e inflamatorio que inicia alrededor de la semana 37 de la gestación y consta de tres procesos claves: 1) la activación del miometrio y el establecimiento de contracciones uterinas, 2) la maduración cervical que implica la degradación y la dilatación del cérvix, 3) la ruptura de las membranas corioamnióticas.

El inicio de esta cascada de eventos es precedido por la eliminación del efecto inmunomodulador del embarazo en el miometrio provocado entre otros factores por el retiro funcional de P4, lo que favorece el incremento en los niveles de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , TNF α , Il-6, Il-8. Este cambio hacia un perfil pro-inflamatorio es incompatible con la continuidad de la gestación e induce cambios locales en la cavidad uterina. Estas citocinas pro-inflamatorias inducen la síntesis, secreción y actividad de otros moduladores efectores tales como MMPs (MMP-9, MMP2, MMP13) que pueden degradar los distintos componentes de la densa matriz extracelular de membranas corioamnióticas y cérvix. La inflamación también favorece el aumento en el número de receptores para oxitocina y los niveles de prostaglandinas (PG) (PGE2, PGF2- α) cuyas capacidades uterotónicas son claves para el establecimiento de contracciones efectivas que finalmente llevarán a la dilatación cervical (Cabero, 2007).

1.5. LOS EFECTOS DE LA P4 EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE MATERNO

La P4 participa en el mantenimiento de la gestación pues controla la receptividad del endometrio, la implantación del blastocisto, el desarrollo de la placenta y el reclutamiento de células NK de la decidua, regula el reconocimiento de MHC paternos, la sensibilidad de células presentadoras de antígenos y suprime la actividad de macrófagos todo lo anterior se

lleva acabo induciendo una regulación a través de citocinas tipo Th2 (Rico-Rosillo, Vega-Robledo, 2012)

Existe evidencia que demuestra que la P4 es capaz de cambiar el perfil de células inmunes para promover un estado de tolerancia necesario para el mantenimiento del embarazo estos efectos han sido demostrados *in vitro* en varios tipos de células inmunes como monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos así como su capacidad de promover cambios a favor del mantenimiento del embarazo (Muzzioet al., 2014).

Durante el embarazo,P4 inhibe la actividad de las células NK e incrementa la producción de anticuerpos asimétricos generados por células B. Además la P4coopera en la diferenciación de células Th1 a Th2. Varios experimentos demuestran los efectos no genómicos de P4 sobre células T humanas al bloquear señales de calcio que ocurren después de la activación de células T, bloqueando la activación del factor nuclear de células T activadas (NF-AT) (Dressinget al., 2011).

Existe evidencia que sustenta que la P4 actúa como inmuno-modulador en linfocitos, sin embargo, no se han identificado de forma absoluta la presencia de los receptores clásicos de P4 (PR), tampoco se han logrado demostrar efectos reguladores en experimentos realizados sobre receptores de glucocorticoides (GRs). Los efectos inmuno-reguladores de la P4 parecen activarse gracias a receptores de progesterona de membrana (RPm).

1.6. TRABAJO DE PARTO PRETÉRMINO

1 de cada 10 bebés en el mundo nace prematuramente (antes de la semana 37 de la gestación) lo que da como resultado el nacimiento de aproximadamente 14.9 millones de bebés pre-termino, más de un millón de estos neonatos morirán como resultado de su nacimiento pretérmino (Howsonet al., 2013)

Los abortos y nacimientos prematuros se han relacionado con el fallo de uno o más mecanismos de tolerancia, o bien, a la temprana activación de un estado pro-inflamatorio; ambas condiciones pueden ser provocados por factores internos (maternos y fetales) y/o externos (ambientales) (Goldenberg et al., 2008).

Las infecciones intrauterinas se encuentran presentes en la mayor parte de los nacimientos pre-termino, por lo que han sido asociadas a la activación de una respuesta inflamatoria cuyo resultado puede ser un parto prematuro, Existe evidencia de que estas infecciones pueden ascender desde el tracto genital y llegar a colonizar la corio-decidual desde donde las bacterias serán capaces de colonizar el líquido amniótico (Gomez-Lopez et al., 2011).

El estudio de los eventos que anteceden a las infecciones intrauterinas puede ayudar a determinar un tratamiento terapéutico que ayude a prevenir un embarazo pre-termino (Gomez-Lopez et al., 2011)

1.7. INFECCIÓN INTRAUTERINA DURANTE EL EMBARAZO

Se ha planteado que los microorganismos pueden tener acceso a la cavidad amniótica y al feto por las siguientes vías: ascendiendo desde la vagina hasta el cérvix; por diseminación hematológica por la placenta; implantación en la cavidad peritoneal a través de la trompa uterina y una infección accidental por una técnica invasiva. Se considera que una infección intrauterina ascendente tiene 4 pasos:

- I) Un cambio en la flora vaginal y cervical o bien la presencia de microorganismos patológicos en el cérvix.
- II) Una vez que los microorganismos obtienen acceso a la cavidad intrauterina, infectan a la decidua.
- III) Una reacción inflamatoria localizada provoca deciduitis, los microorganismos pueden infectar el corion y el amnios. Pueden llegar a infectar las venas fetales o avanzar a través del amnios hasta la cavidad amniótica, lo que llevara a una infección amniótica.

IV) Una vez en la cavidad amniótica el microorganismo podrá atacar al feto por diferentes vías de entrada (Romero et al., 1989).

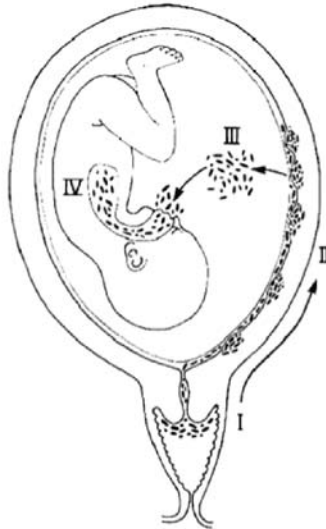


Figura 8. Los cuatro pasos de la teoría ascendente (Romero et al., 1991)

Una vez que los microorganismos han entrado en el cérvix el útero o el amnios, existen varias rutas de señalización que serán activadas ya sea individualmente o en conjunto para promover un estado inflamatorio. Las bacterias o productos de estas como lipopolisacáridos (LPS) son detectadas por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) específicamente los receptores tipo toll (TLR) 2 y 4. Cuando el LPS es reconocido por TLR, se activan varias rutas inmunológicas que estimularán la liberación de citocinas proinflamatorias y otros mediadores inflamatorios (Bastek, 2011).

Además de las infecciones intrauterinas, existen otros eventos que pueden desencadenar un estado de inflamación perjudicial para el embarazo como el estrés, alergias o preeclampsia (Gomez-Lopez et al., 2011).

1.8. CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE INTERVELLOSA (CMSI) Y PARTO PREMATURO

Se ha demostrado que los agentes infecciosos estimulan a las células inmunes de la madre y células de las membranas fetales (Peltier et al., 2003), lo que lleva a la producción de citocinas pro-inflamatorias, metaloproteasas y prostaglandinas (Vega-Sánchez et al., 2010), dicha activación prematura de señales pro-inflamatorias ha sido asociada con el desequilibrio en la tolerancia inmune contra el feto lo que puede inducir la ruptura temprana de las membranas fetales y otros eventos fisiológicos que llevan como resultado a un aborto o a un parto prematuro (Castro-Leyva et al., 2012)

El trabajo de parto pre-término representa el fin anticipado del privilegio inmunológico ya la síntesis de moduladores pro-inflamatorias y de las señales que favorecen su progresión son encendidos de manera prematura y descontrolada. En un escenario de infección existe un tráfico aumentado de leucocitos maternos que son reclutados por las quimiocinas secretadas por los tejidos maternos y fetales como parte de la respuesta inmune (Peltier et al., 2010).

En este escenarios, células del sistema inmune innato y del sistema inmune adaptativo como neutrófilos, macrófagos y células CD14 son también reclutadas a los compartimientos placentarios, cérvix, miometrio y membranas fetales, en donde exacerbando la inflamación y contribuyen a la secreción de moduladores como las MMPs que degradan tejido conectivo y vulneran la viabilidad de los tejidos creando un ambiente incompatible con la continuidad de la gestación (Kristina, 2013).

2. ANTECEDENTES

2.1. CÉLULAS INMUNES ESPECÍFICAS EN LOS COMPARTIMIENTOS FETO-PLACENTARIOS

Existe evidencia clínica y experimental de que la P4 es capaz de favorecer la gestación a través de la inhibición de diferentes moduladores pro-inflamatorios (Miyaura e Iwata, 2002) y aunque existen estudios que sustentan la posibilidad de que este efecto sea a través de la modulación directa de las células profesionales del sistema inmune (Butts et al., 2007) el mecanismo a través del cual esto sucede es aún poco claro.

Evidencia clínica y experimental sustenta que las poblaciones de células profesionales del sistema inmune que “radican” en la sangre placentaria tienen características específicas y son diferentes a los tipos celulares circulantes en la sangre materna.

Específicamente se sabe que antes de que inicie el trabajo de parto la población de Linfocitos T CD3+ es significativamente menor en sangre placentaria, mientras que los Monocitos/macrófagos CD14+ en la placenta duplican a los presentes en sangre materna; por otro lado, la sangre placentaria proveniente de pacientes con trabajo de parto activo contiene el doble de células CD14+ en comparación las presentes en la sangre materna de las mismas donadoras. Un aspecto importante de este trabajo es que en comparación con la sangre periférica, los leucocitos totales de origen placentario secretan significativamente más citocinas como IL-6, IL-1 β , TNF- α y MMP-9 en respuesta al estímulo con LPS (Vega-Sanchez et al., 2010).

Por otro lado se ha demostrado que monocitos aislados de sangre de cordón umbilical de neonatos a término y pre-término sintetizan IL-6, IL-8 e IL-12 en respuesta a la estimulación con bacterias como *Escherichiacoli*, *Lactobacillusplantarum* y *Estreptococo* del grupo B, además de secretar niveles significativamente bajos de IL-10 (Lydon, 1995).

Leucocitos aislados de sangre periférica de mujeres con historial de parto pretérmino y de mujeres control presentaron un patrón similar de secreción de citocinas como TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-1 β estimulados con *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* (Peltier et al., 2010)

En un análisis del perfil de expresión y secreción de diferentes citocinas en PBMC se pudo demostrar que los niveles de IFN-gamma son más altos en mujeres con historial de pérdida recurrente en comparación con mujeres no embarazadas o con embarazos normales, mientras que los niveles más altos de IL-10 fueron encontrados en mujeres con embarazos normales (Bates, 2002)

Por otro lado monocitos M1 aislados de mujeres con pre-eclampsia fue identificada como la sub-población cuyo perfil de secreción de TNF α , IL-12 e IL-23 fue correlacionado con los niveles de expresión de CD14 y TLR-4, todos ellos incrementados de manera significativa en comparación con la misma subpoblación en mujeres embarazadas normo-tensas control. Además esta subpoblación M1 secretó significativamente menos IL-10 (Medeiros et al., 2012).

2.2. EFECTO MODULADOR DE P4 SOBRE CÉLULAS DE SANGRE PLACENTARIA

Evidencia reciente de nuestro laboratorio ha permitido demostrar que la P4 ejerce un efecto anti-inflamatorio en epitelio amniótico humano en cultivo inhibiendo la síntesis y secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF α y favoreciendo la síntesis de IL-10 (Flores-Espinosa et al., 2013), adicionalmente, utilizando un modelo de cultivo de membranas corioamnióticas humanas hemos demostrado que la P4 puede ejercer un efecto inmuno-protector cuando estos tejidos son estimulados con endotoxina bacteriana (Pineda-Torres et al., 2014).

Se ha demostrado que el Estradiol pero no la P4 tiene la capacidad in vitro de incrementar significativamente los niveles de secreción de IL-12, INF- γ e IL-10 de sangre total (Matalka, 2003).

Por otro lado evidencia experimental en PBMCs de mujeres con pérdida gestacional recurrente (Bates, M. 2002) demostró que la estimulación con dihidrogesterona disminuye los niveles secreción de citocinas Th1 tales como TNF- α e INF- γ y favorece la síntesis de citocinas de perfil Th2 tales como IL-4 e IL-6, además, el efecto del progestágeno fue revertido por la co-estimulación con el anti-progestágeno mifepristona (Raghupathy et al., 2005a); evidencia similar ha sido reportada en PBMC de mujeres con parto pretérmino (Raghupathy et al., 2007).

PBMC provenientes de mujeres con trabajo de parto pretérmino o aborto espontáneo cambian su perfil de secreción TH1/TH2 cuando son estimuladas in vitro con el factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) cuyas propiedades inmuno-moduladoras favorecen la secreción de citocinas de perfil TH2 tales como IL-4, IL-6 e IL-10 (Raghupathy et al., 2009).

En un estudio clínico/experimental en el que se midieron los niveles séricos de P4, Estradiol (E2), IL-6, TNF- α e IFN- γ así como PIBF en mujeres con amenaza de parto pretermino suplementadas con P4, demostró que el tratamiento con P4 indujo el incremento significativo de los niveles de PIBF e IL-10 y la disminución de INF- γ lo que fue asociado con el incremento significativo en el tiempo de mantenimiento exitoso de la gestación (Hudić et al., 2011)

3. JUSTIFICACIÓN

Está demostrado que la P4 tiene la capacidad de inducir efectos anti-inflamatorios en diferentes tipos de tejidos, el mecanismo por el cual P4 ejerce este efecto en células inmunes aún no es completamente descrito y es un tema relativamente nuevo. Evidencias clínicas y experimentales indican que esta hormona juega un papel inmuno-modulador al regular la síntesis de proteínas pro-inflamatorias lo que condiciona el ambiente materno-fetal a un estado de tolerancia,

El estudio de los mecanismos que condicionan el inicio de trabajo de parto y la ruptura de membranas asociadas a infección involucra a todos los tejidos ubicados en los compartimientos feto-maternales por lo que en el presente estudio se tiene la intención de evaluar el efecto de la P4 sobre CMSP estimuladas con LPS.

4. HIPÓTESIS

Si la P4 tiene la capacidad de inducir/mantener un perfil anti-inflamatorio entonces el pre-tratamiento de CMSI con P4 regulara la síntesis de citocinas pro-inflamatorias inducidas por la estimulación con LPS.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad anti-inflamatoria de P4 en cultivos de CMSI estimuladas con LPS por medio de la cuantificación de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y MMP9 .

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar mediante la técnica de ELISA los niveles de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 secretadas al medio de cultivo por cultivos de CMSI en condiciones basales y después del co-tratamiento con 500ng/mL de LPS y diferentes concentraciones de P4 (0.01, 0.1 y 1 μ M).
- Cuantificar mediante ELISA los niveles de las quimiocinas IL-8 y Mip-1 α secretadas al medio de cultivo por cultivos de CMSI en condiciones basales y después del co-tratamiento con 500ng/mL de LPS y diferentes concentraciones de P4 (0.01, 0.1, 1 μ M).
- Cuantificar mediante ELISA los niveles de la citocina anti-inflamatoria IL-10 secretada al medio de cultivo por CMSI en condiciones basales y después del co-tratamiento con 500ng/mL de LPS y diferentes concentraciones de P4 (0.01, 0.1, 1 μ M).
- Cuantificar mediante ELISA los niveles del factor pro-degradativo MMP-9 secretada al medio de cultivo por CMSI en condiciones basales y después del co-tratamiento con 500ng/mL de LPS y diferentes concentraciones de P4 (0.01, 0.1, 1 μ M).

6. METODOLOGÍA

6.1. REACTIVOS

Se utilizó LPS de E.coli (055:B5), P4 (4-Prenona-3-20 diona) y anti-prostageno RU486 (Mifepristone) adquiridos por medio de Sigma Aldrich (St. Louis, MO) con la debida carta responsiva de uso.

6.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras utilizadas en este proyecto fueron tomadas con el consentimiento de las pacientes que presentaron una gestación a término (37-39 semanas de gestación) resuelta por cesárea y que no presentaran trabajo de parto o alguna condición que pudiera afectar al estudio. En la Unidad de Tococirugía del instituto, inmediatamente después del alumbramiento, las placentas fueron colocadas en un contenedor metálico estéril con el lado fetal (cordón umbilical) viendo hacia abajo, agregando solución salina estéril calentada a 37°C para evitar la coagulación de la sangre; de esta manera fueron transportadas al laboratorio donde se trabajaron en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad.

6.3. OBTENCIÓN DE SANGRE PLACENTARIA

Una vez en la campana, las placentas fueron colocadas en una charola metálica (Figura 1), con la parte fetal hacia arriba y la parte materna (cotiledones) hacia abajo para lograr la acumulación de sangre del lado de los espacios intervillosos, después fueron colocadas dentro de una bolsa de polietileno estéril y se realizaron varios cortes en los cotiledones de al menos 1 cm de profundidad, la placenta se dejó sangrar por 5 minutos, tras los cuales, la sangre obtenida en la bolsa fue recuperada en tubos con heparina. (Figura 2)



Figura 9: Placenta después de su obtención



Figura 10: Placenta en bolsa de polietileno

6.4. SEPARACIÓN DE CMSC.

La sangre obtenida fue transferida a tubos para centrifuga y diluida en proporción 1:1 con solución fisiológica (NaCl, 0.9%), se colocó la sangre diluida sobre el Histopaque en un tubo diferente (la proporción Sangre-Histopaque debe de ser 1:2 respectivamente). Los tubos fueron centrifugados y el anillo celular de la fase intermedia fue recuperado en un nuevo tubo.

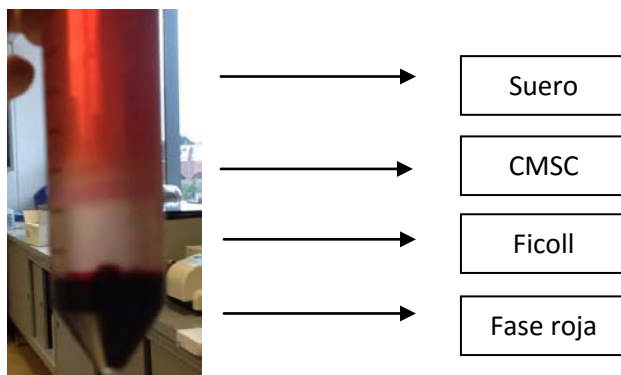


Figura 11. Separación de CMSC utilizando el método de Ficoll-Histopaque

Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con solución fisiológica y 1 vez con solución amortiguadora de lisis de eritrocitos. Una vez terminados los lavados el sobrenadante fue desechado y el botón resuspendido en 1mL de medio de cultivo RPMI sin

rojo de fenol suplementado con suero fetal bovino libre de hormonas e inactivado por calor (10% v/v) y Antibiótico antimicótico (1% v/v).

6.5. CONTEO DE CÉLULAS Y VIABILIDAD

La viabilidad de las células obtenidas fue determinada por exclusión con el colorante azul de Tripán realizando una dilución 1:10. (Células – Azul de Tripán 0.4%) en una cámara de Neubauer donde el total de células fueron contadas y su concentración fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Numero total de celulas}}{4\text{nm}(0.1\text{mm de profundidad})(\text{dilucion } 1:10)}$$

Después el porcentaje de células muertas fue calculado. Dichas células fueron cultivadas en Medio RPMI suplementado con suero fetal bovino, utilizando únicamente células cuya viabilidad fuera mayor o igual al 90%.

6.6. BIOMETRÍA HEMÁTICA

Se obtuvo sangre periférica de la madre justo antes de la cirugía y sangre placentaria de la misma madre para llevar a cabo una biometría hemática realizada en el laboratorio de Infectología e inmunología del Instituto de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

6.7. TÉCNICA DE (HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU) FISH

Se enviaron muestras de al menos 5mL para ser enviadas al Departamento de Genética del Instituto de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes donde fue procesada para llevar a cabo la técnica.

Se colocan 10 gotas de sangre en un tubo Falcón con 15mL de KCl al 0.75M para dejarlo incubar por 25 minutos a una temperatura de 37°, para después centrifugar por 10 minutos a 1500rpm. Una vez terminada la centrifugación se decanta el tubo y se conserva el botón al cual se le agregan 10mL de solución fijadora mientras el tubo se agita en un vortex. Una vez que se agrega la solución fijadora, se vuelve a centrifugar 1500rpm a 10 minutos y se decanta dejando un volumen de 0.5mL para re-suspender el botón al cual se le agrega la sonda para marcar los cromosomas X y Y

6.8. CULTIVO DE CMSI

Los cultivos fueron realizados en placas de cultivo de 48 pozos, una vez conocida la concentración de células en la suspensión, la cantidad de volumen necesaria para obtener 1.8 millones de células fue calculada para ser re-suspendidas en 800µL de medio de cultivo RPMI suplementado.

6.9. ESTIMULACIÓN CON P4, RU486 Y LPS

El diseño experimental consto de 8 tratamientos y un control los cuales fueron realizados por triplicado. El control únicamente contuvo el vehículo en el cual fue preparado el LPS y la P4. Durante las primeras 24 horas de cultivo las células fueron pre-tratadas con P4 a diferentes concentraciones y/o RU486. Posteriormente se realizó el estímulo con 500ng/mL de LPS. Los tratamientos fueron realizados de la siguiente manera: 1) estímulo con LPS a las 24 horas de cultivo 2) pre-tratamiento con 1µM de P4 y estímulo LPS, 3) pre-tratamiento con 0.1 µM y estímulo con LPS, 4) pre-tratamiento con 0.01µM de P4 mas LPS 5) co-tratamiento con RU486 10µM y P4 1µM mas LPS, 6) co-tratamiento con RU486 10µM y estímulo con LPS. 7) tratamiento con P4 1µM durante todo el periodo de cultivo, 8) tratamiento con RU486 1 µM durante todo el periodo de cultivo. (Figura3)

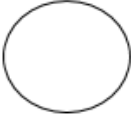
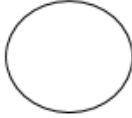
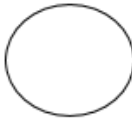
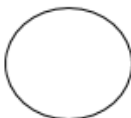
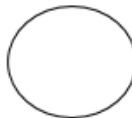
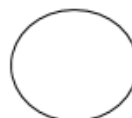



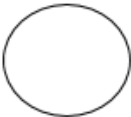
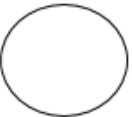
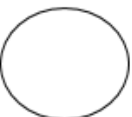
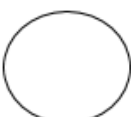
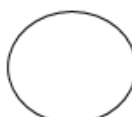
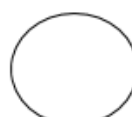



Control	LPS 500ng/mL	P4 0.01 M + LPS 500ng/mL	P4 0.1 M + LPS 500ng/mL	P4 1 M + LPS 500ng/mL	RU486 0.1M + P4 0.01M + LPS 500ng/mL	RU486 0.1M + LPS 500ng/mL	RU486 0.1M	P4 0.01 M
								
								

Figura 12. Pozos para el cultivo de CMSI.

Las células fueron incubadas durante 48 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y humedad controlada al 90%. (HEPA Class 100, ThermoScientific, USA).

6.10. LISADOS CELULARES Y OBTENCIÓN DE MEDIOS

Las placas fueron retiradas de incubación después de 48 horas de su primer estímulo, los medios de cultivo fueron recuperados en tubos para microcentrifuga de 1.5mL y centrifugados durante 10 segundos a 10,000 rpm, el sobrenadante de cada muestra fue recuperado, y se dividió en 3 alícuotas, las cuales fueron guardadas a -20° o -40°C hasta su uso posterior. Los botones celulares fueron resuspendidos en 100µL de buffer de lisis adicionado con inhibidor de proteasas P8340 (Sigma-Aldrich), marcado y congelado a -20 o -40°C durante al menos una hora, posteriormente fue centrifugado a 14,000rpm durante 15 minutos, para obtener el extracto de proteínas citosólicas en el sobrenadante. Tanto medios como lisados fueron colocados en hielo para la cuantificación de proteínas.

6.11. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cantidad de proteínas en medios y en lisados celulares fue determinada utilizando el método de Bradford para el cual se utilizó una curva estándar de concentraciones conocidas

de albumina sérica bovina. La concentración de proteínas en cada una de las muestras fue determinada mediante una reacción colorimétrica que se leyó a una longitud de onda de 595 nanómetros en un espectrofotómetro.

6.12. CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS POR ELISA

Para la cuantificación de las citocinas secretadas al medio por las CMSI, se utilizaron kits de ELISA tipo sándwich comerciales. La cuantificación de las citocinas TNF- α e IL-1 β y la metaloproteasa MMP-9 total en medios y lisados celulares se realizó mediante kits de ELISA de la marca R&D systems. Para la determinación de IL-6, IL-8, Mip-1 α , e IL-10 se utilizaron kits de la marca Peprotech. Para los ensayos de ELISA de manera general, se siguió el protocolo indicado para cada uno de sus insertos, se utilizaron microplacas de 96 pozos (Nalgene Nunc, Dinamarca), un lavador de placas de la marca BioRad y se leyeron en un espectrofotómetro BioRad X-Mark.

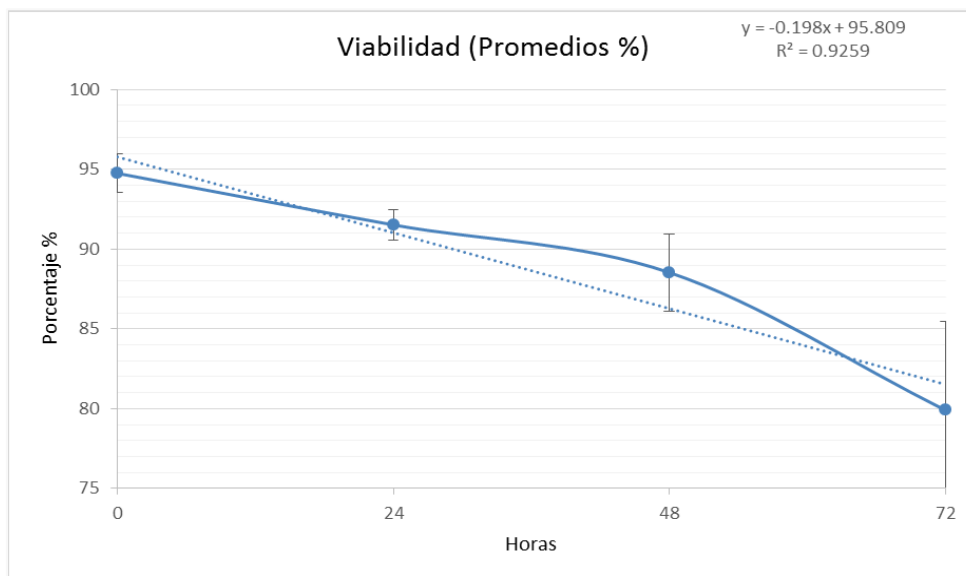
Citocina	Marca	Ab de captura	Ab de detección	Conjugado	Sustrato	Curva Estandar
IL-1 β	R&D	4 μ g/mL	200 ng/mL	Streptavidina-HRP	H ₂ O ₂ / TMB	31.25-2000 pg/mL
TNF- α	R&D	4 μ g/mL	250 ng/mL	Streptavidina-HRP	H ₂ O ₂ / TMB	31.25-1000 pg/mL
Mip-1 α	Peprotech	0.5 μ g/mL	0.5 μ g/mL	Avidina - HRP	ABTS	32.5- 2000 pg/mL
IL-6	Peprotech	1 μ g/mL	0.5 μ g/mL	Avidina - HRP	ABTS	32.5-2000 pg/mL
IL-8	Peprotech	0.5 μ g/mL	0.5 μ g/mL	Avidina - HRP	ABTS	32.5-2000 pg/mL
IL-10	Peprotech	1 μ g/mL	0.5 μ g/mL	Avidina - HRP	ABTS	16.25-1000 pg/mL
MMP-9	R&D	1 μ g/mL	100ng/mL	Streptavidina-HRP	H ₂ O ₂ / TMB	16.25-1000 pg/mL

Tabla 1. Kits de ELISA con su curva estándar ABTS: 2,2' Azino-bis (3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfúrico); Ab: anticuerpo

7. RESULTADOS

7.1. VALIDACIÓN DEL MODELO.

Las pruebas de viabilidad realizadas en cultivos celulares de 0 a 72 horas demostraron que los cultivos se mantienen sin cambios significativos en su viabilidad funcional hasta las 48 horas.



Grafica 1: Viabilidad celular desde el momento de la incubación hasta 72 horas después.

7.2. BIOMETRÍA HEMÁTICA

Tipo de leucocitos	Sangre periférica	Sangre placentaria
Leucocitos Totales	$8.64 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$5.225 \times 10^3 / \mu\text{L}$
Neutrófilos	$4.625 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (54.00%)	$1.52 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (38.80%)
Linfocitos	$3.25 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (37.60%)	$2.505 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (52.90%)
Monocitos	$0.605 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (6.60%)	$0.21 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (4.00%)
Eosinófilos	$0.07 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (0.90%)	$0.04 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (3.10%)
Basófilos	$0.075 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (0.90%)	$0.14 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (3.10%)

Tabla 2. Biometría de leucocitos en sangre periférica y en sangre intervellosa

7.3. PORCENTAJE DE CÉLULAS MATERNAS EN LA SANGRE INTERVELLOSA.

Se realizaron pruebas de Hibridación fluorescente *in situ* en las que se aseguró que se está trabajando mayoritariamente con células mononucleares provenientes de la madre.

	Células XX (%)	Células XY (%)	Totales
Muestra 1	145 células (73%)	55 células (27%)	200
Muestra 2	437 células (87%)	63 células (13%)	500
Muestra 3	408 células (82%)	92 células (18%)	500

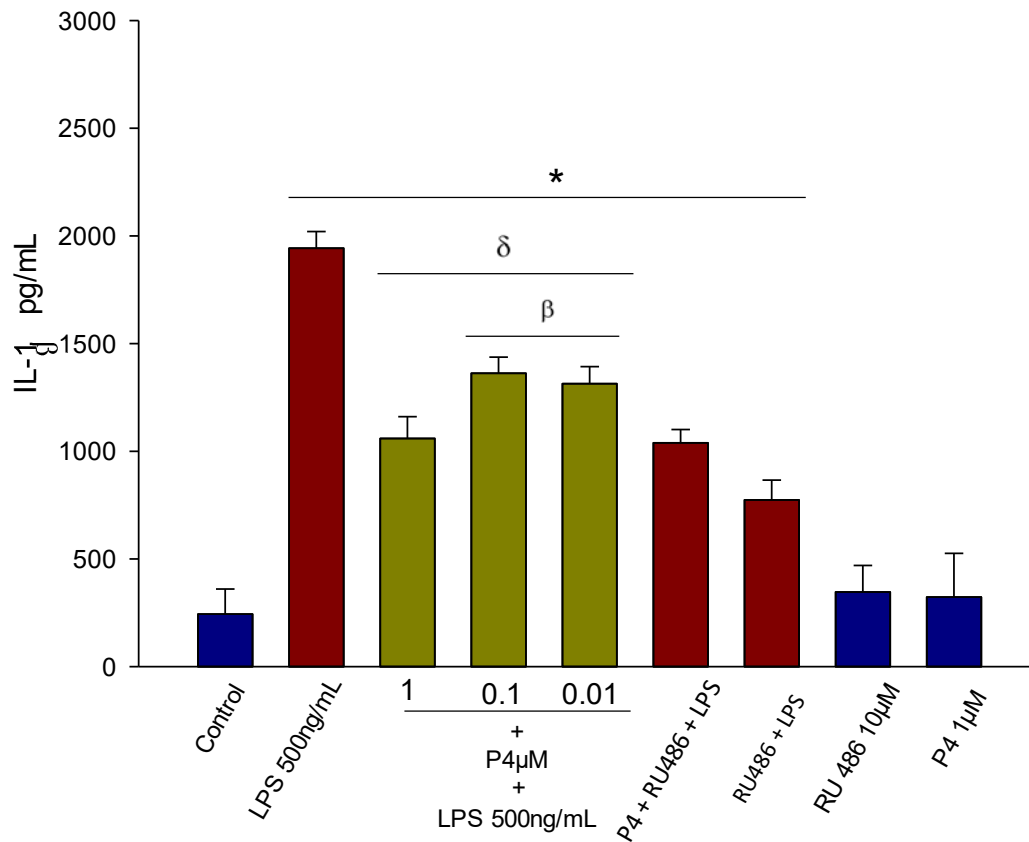
Tabla 3. Comparación de células maternas (XX) contra células fetales (XY)

7.4. SECRECIÓN DE IL-1 β , TNF- α E IL-6

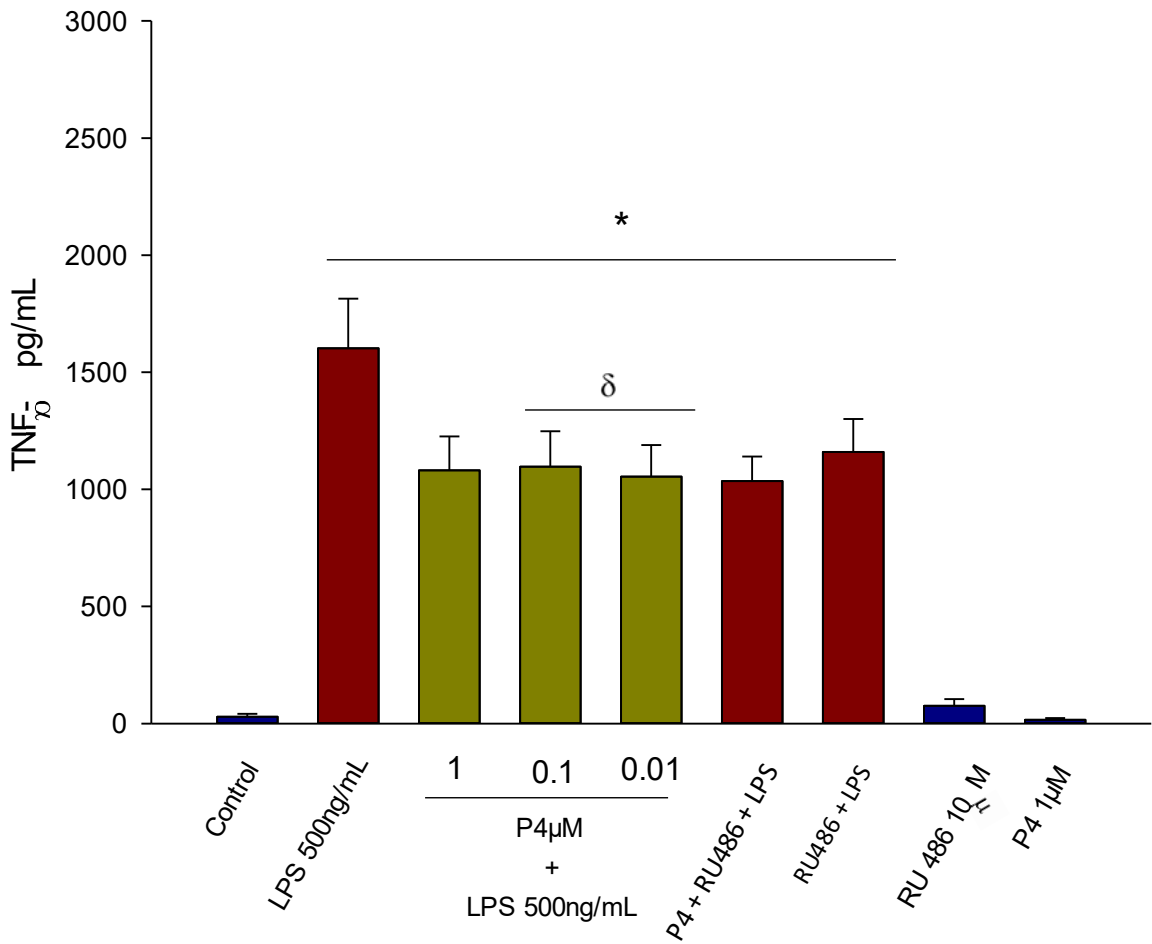
La secreción basal de IL-1 β fue de 243 ± 11.6 pg/mL por cada 1×10^6 células, al ser estimuladas con LPS 500ng/mL se detectó un incremento de 8 veces más (1943 ± 77 pg/mL por cada 1×10^6 células). El efecto del tratamiento de P4 sobre la secreción de IL-1 β resulto ser significativo con las 3 concentraciones utilizadas (1,0.1 y 0.01 μ M) siendo la concentración de 1 μ M la más efectiva al disminuir la concentración un 54%.

En contraste con los valores basales de TNF- α (29 ± 12 pg/mL por cada 1×10^6 células), los cultivos celulares estimulados con 500ng/mL secretaron una cantidad significativamente mayor (1602 ± 211 pg/mL por cada 1×10^6 células) de esta citocina (55.24 veces más). El co-tratamiento de P4 0.1 μ M provocó la disminución de TNF- α en un 68.1% y en el de un 67.7% en el co-tratamiento con 0.01 μ M de P4.

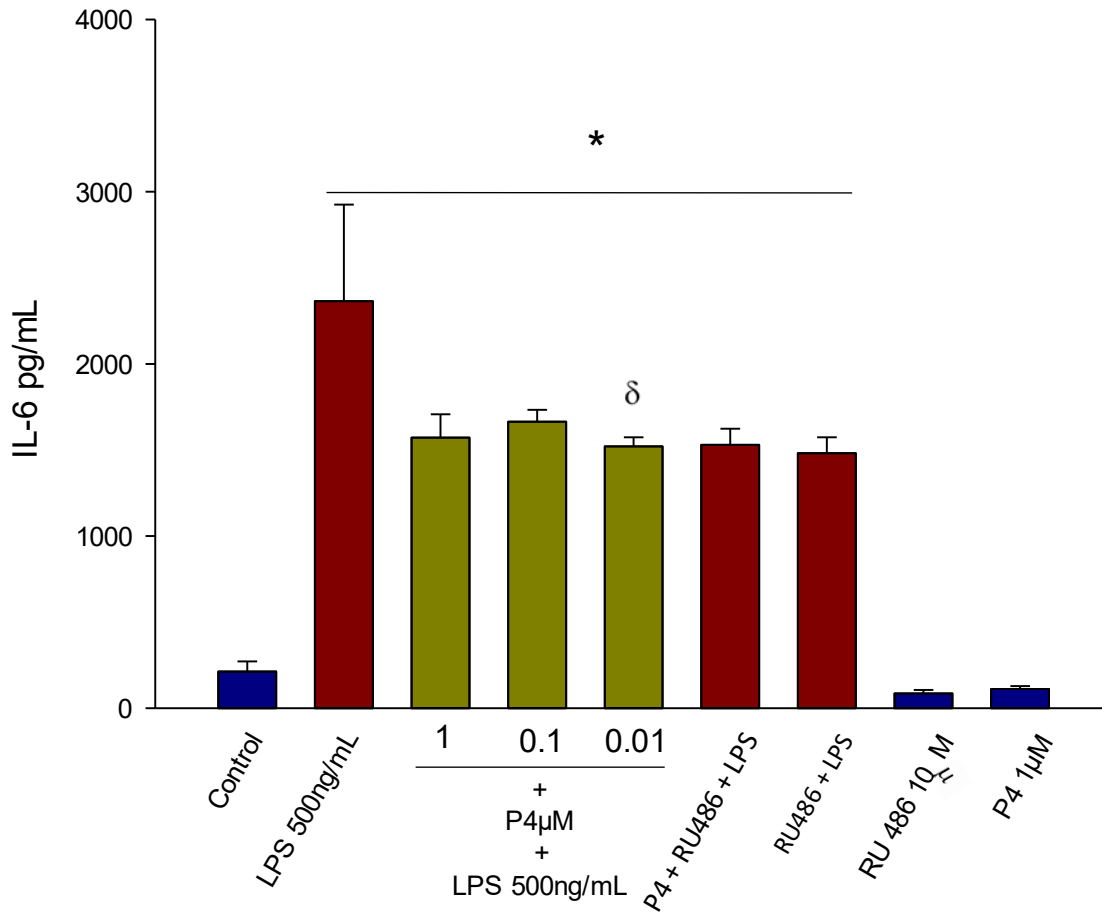
El perfil de secreción basal de IL-6 en el medio de cultivo fue de 212 ± 58 pg/mL por cada 1×10^6 células cuando el cultivo es estimulado con LPS 500ng/mL la secreción de IL-6 aumenta 11 veces (1796 ± 115 pg/mL por cada 1×10^6 células). El tratamiento con P4 0.01 μ M es estadísticamente significativo al reducir la expresión de IL-6 en un 35.7%.



Gráfica 2. Secreción in-vitro de IL-1 β determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos. La grafica representa el promedio \pm el error estándar, n=9. * p<0.05 vs. Control, δ p<0.05 vs LPS, β p<0.05 vs. P4 + LPS + RU486.



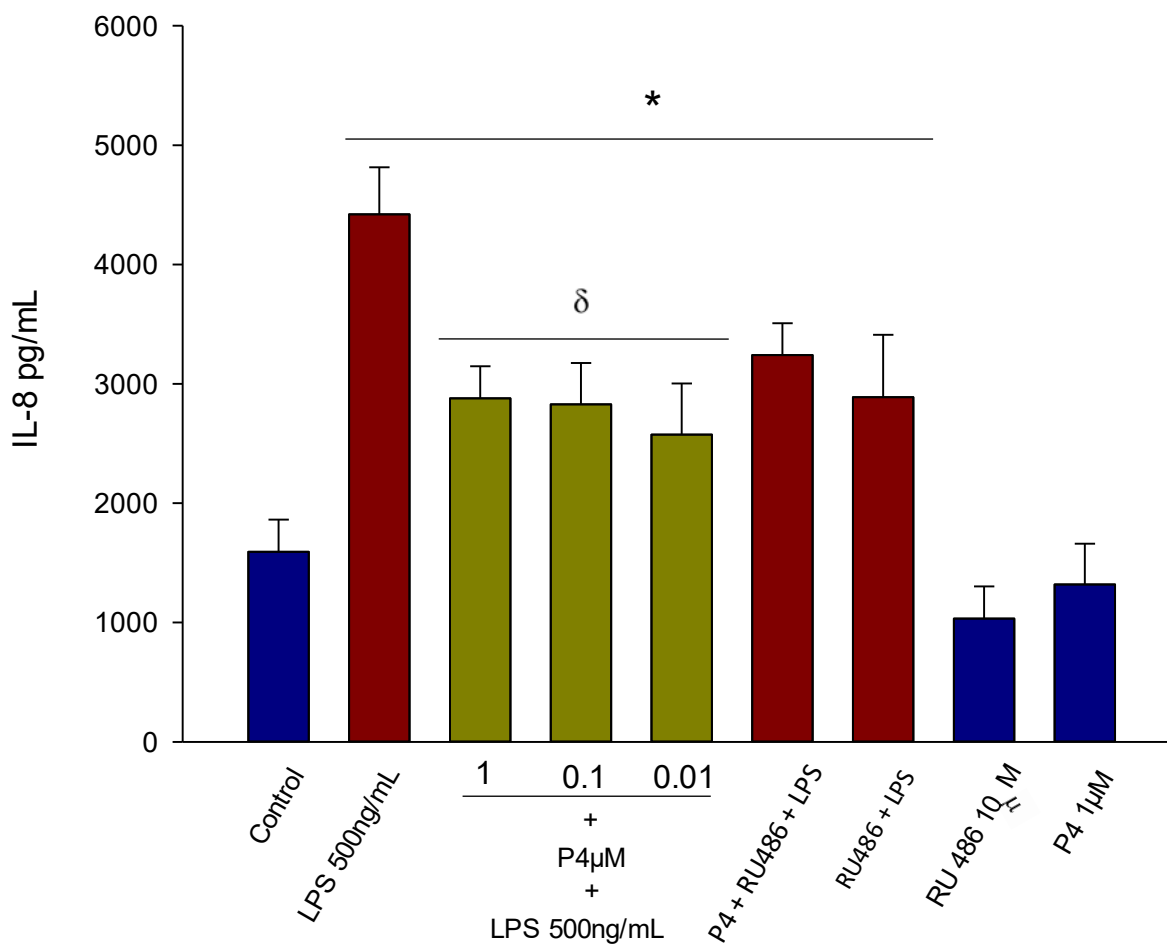
Gráfica 3. Secreción in-vitro de TNF- α determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos. La grafica representa el promedio \pm el error estándar, n=9. * p<0.05 vs Control, δ p<0.05 vs LPS.



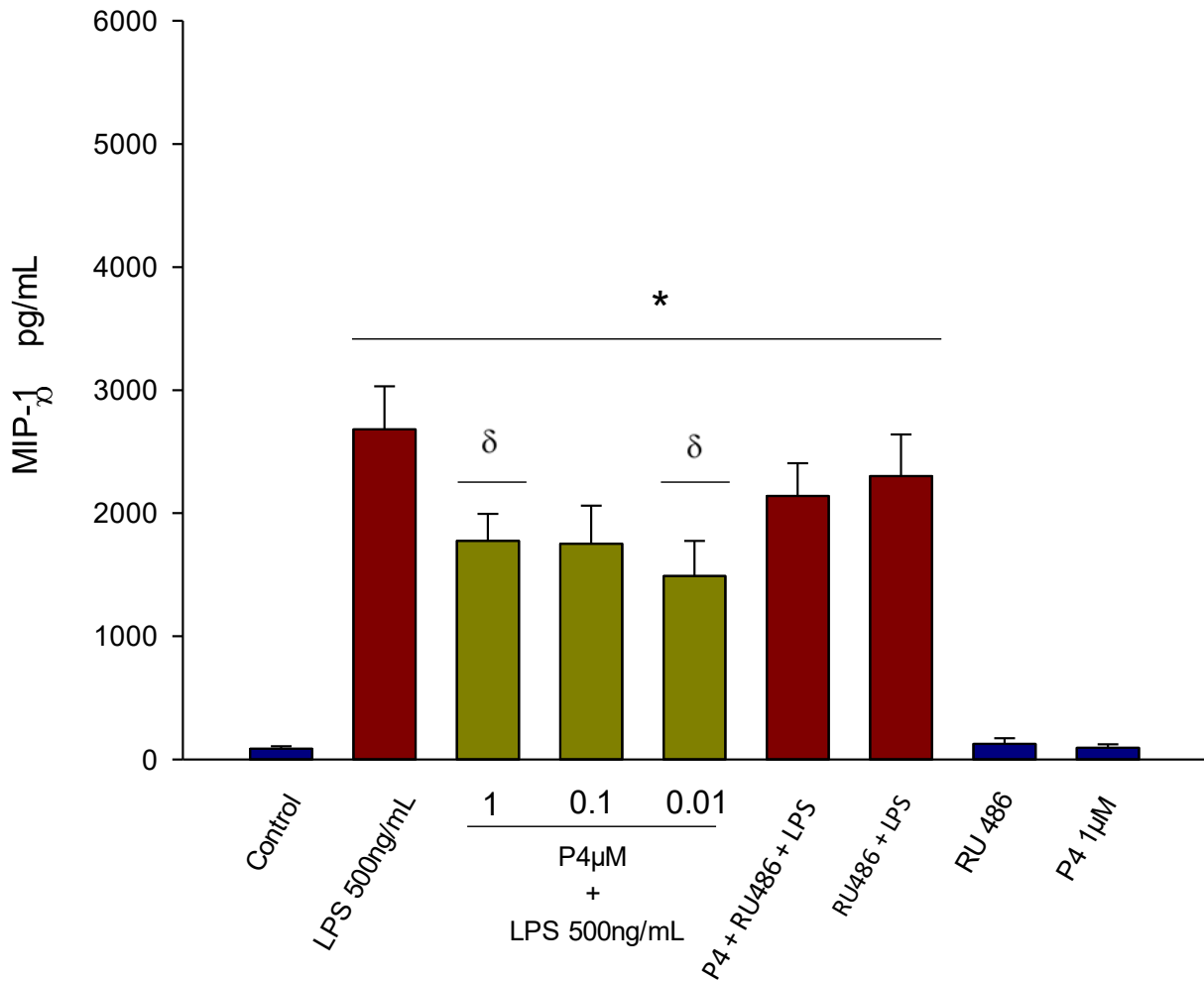
Grafica 4. Secreción in-vitro de IL-6 determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos. La grafica representa el promedio \pm el error estándar, n=9. * $p < 0.05$ vs. Control, δ $p < 0.05$ vs. LPS.

7.8. SECRECIÓN DE IL-8 Y DE MIP-1 α

La concentración basal de IL-8 fue de 1592 ± 269 pg/mL por cada 1×10^6 células al ser estimulado con la endotoxina LPS 500ng/mL la concentración aumento hasta 2.7 veces (4427 ± 393 pg/mL por cada 1×10^6 células). Las 3 concentraciones de P4 resultaron tener un efecto inhibitorio en la expresión de IL-8 al disminuir el efecto en una media de 37.51%. La concentración control de MIP-1 α fue de 86 ± 20 por cada 1×10^6 células e incremento hasta 31 veces (2682 ± 350 por cada 1×10^6 células) al ser estimuladas con LPS 500 ng/mL. La P4 0.01 μ M resulto ser la concentración más efectiva al inhibir un 44.5% su secreción



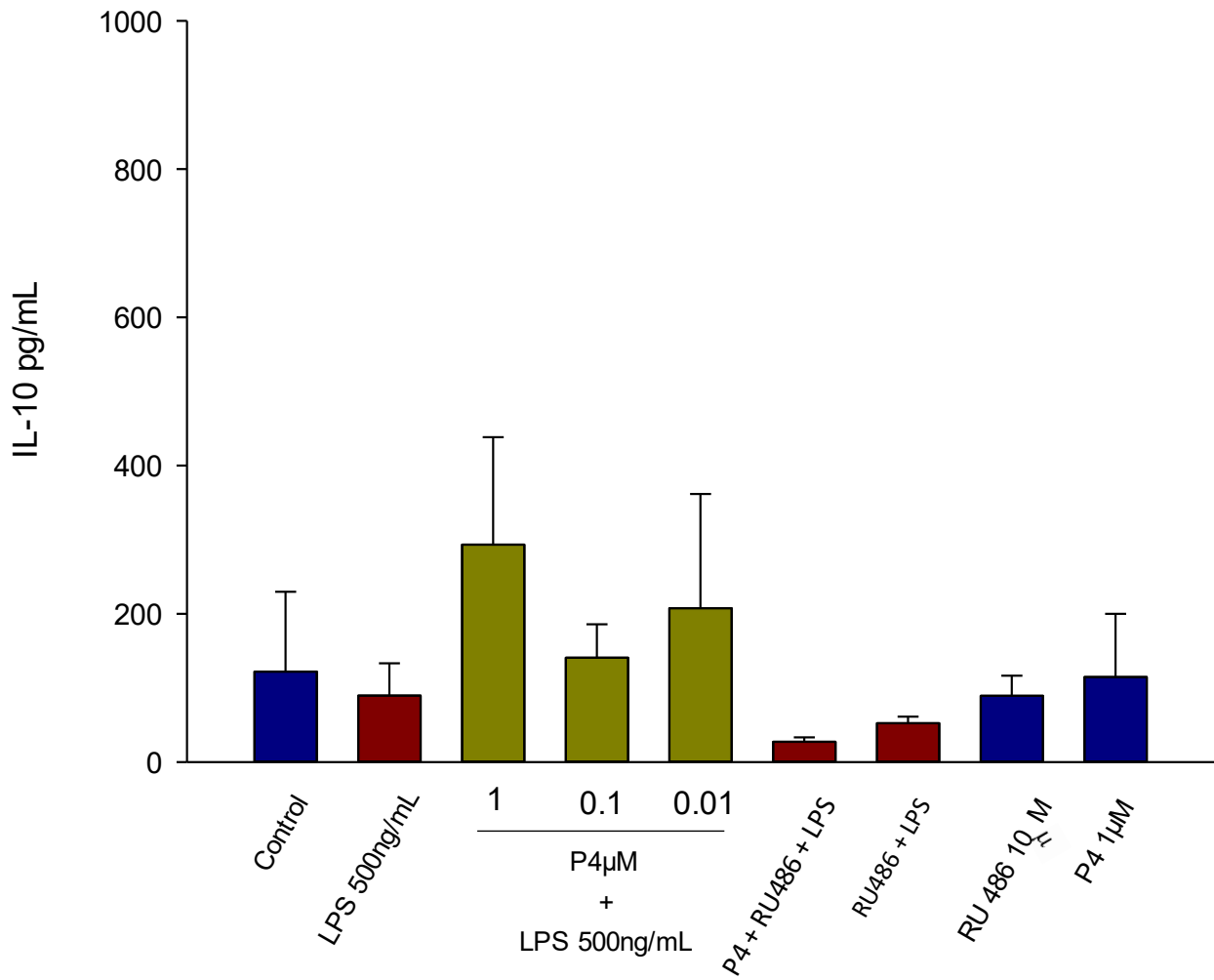
Grafica 5. Secreción in-vitro de IL-8 determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos. La grafica representa el promedio \pm el error estándar, n=9. * $p < 0.05$ vs. Control, δ $p < 0.05$ vs LPS.



Grafica 6. Secreción in-vitro de Mip-1 α determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos. La grafica representa el promedio \pm el error estándar, n=9. * p<0.05 vs Control, δ p<0.05 vs LPS.

7.6. SECRECIÓN DE IL-10

No se observaron cambios significativos en la expresión de IL-10 estimulados con LPS, pero cabe mencionar que hubo una disminución de 0.71 veces en la secreción de IL-10 en cultivos estimulados con LPS (89.68 ± 43.56 pg/mL por cada 1×10^6 células) contra la concentración basal (121.96 ± 107.61 pg/mL por cada 1×10^6 células). También se observó un incremento no significativo en la secreción de IL-10 en las células co-tratadas con P4, siendo la concentración de 1μ M la más efectiva al provocar el incremento de IL-10 en un 69.63%

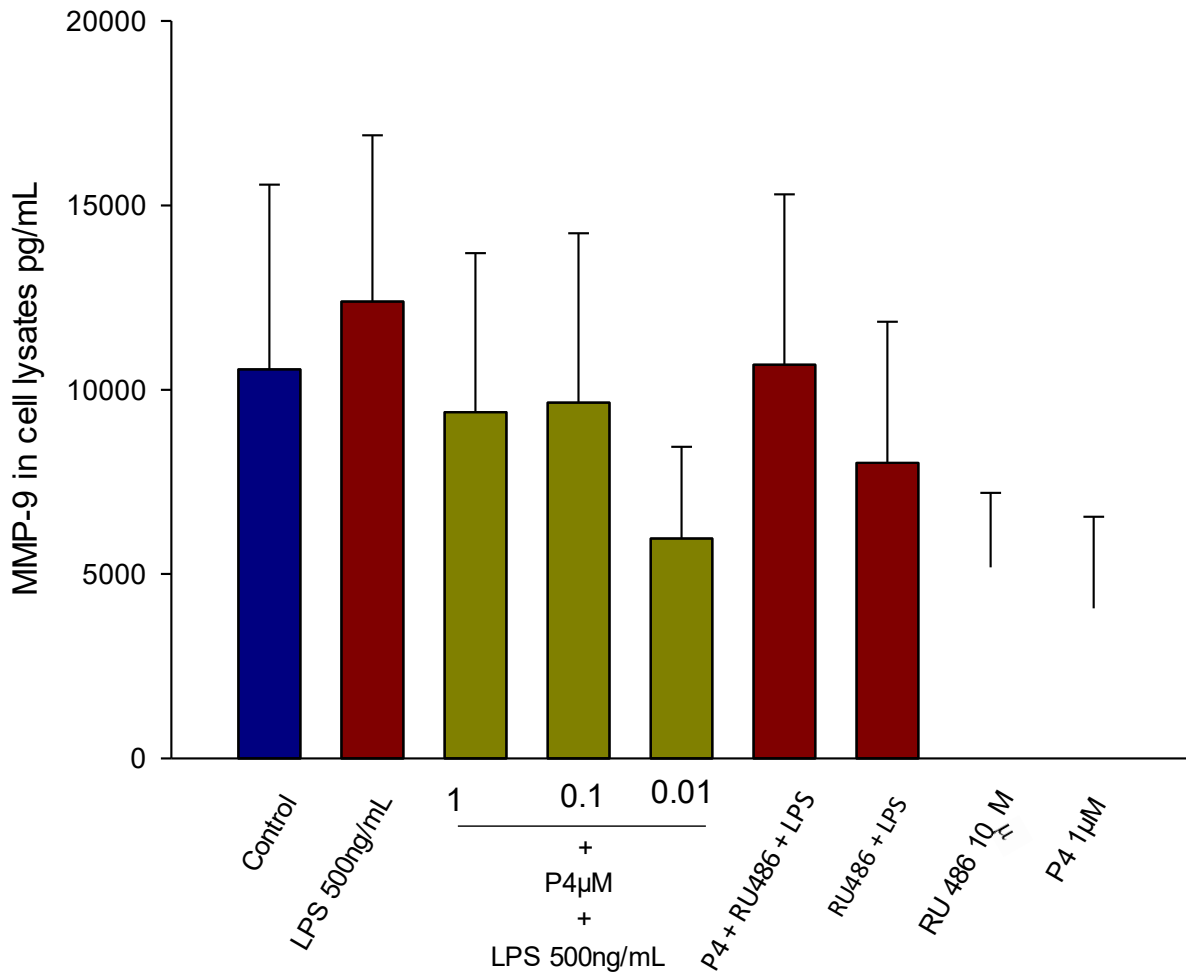


Grafica 7. Secreción in-vitro de IL-10 determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos. La grafica representa el promedio \pm el error estándar, no se encontraron cambios significativos en la expresión de la citocina. n=9.

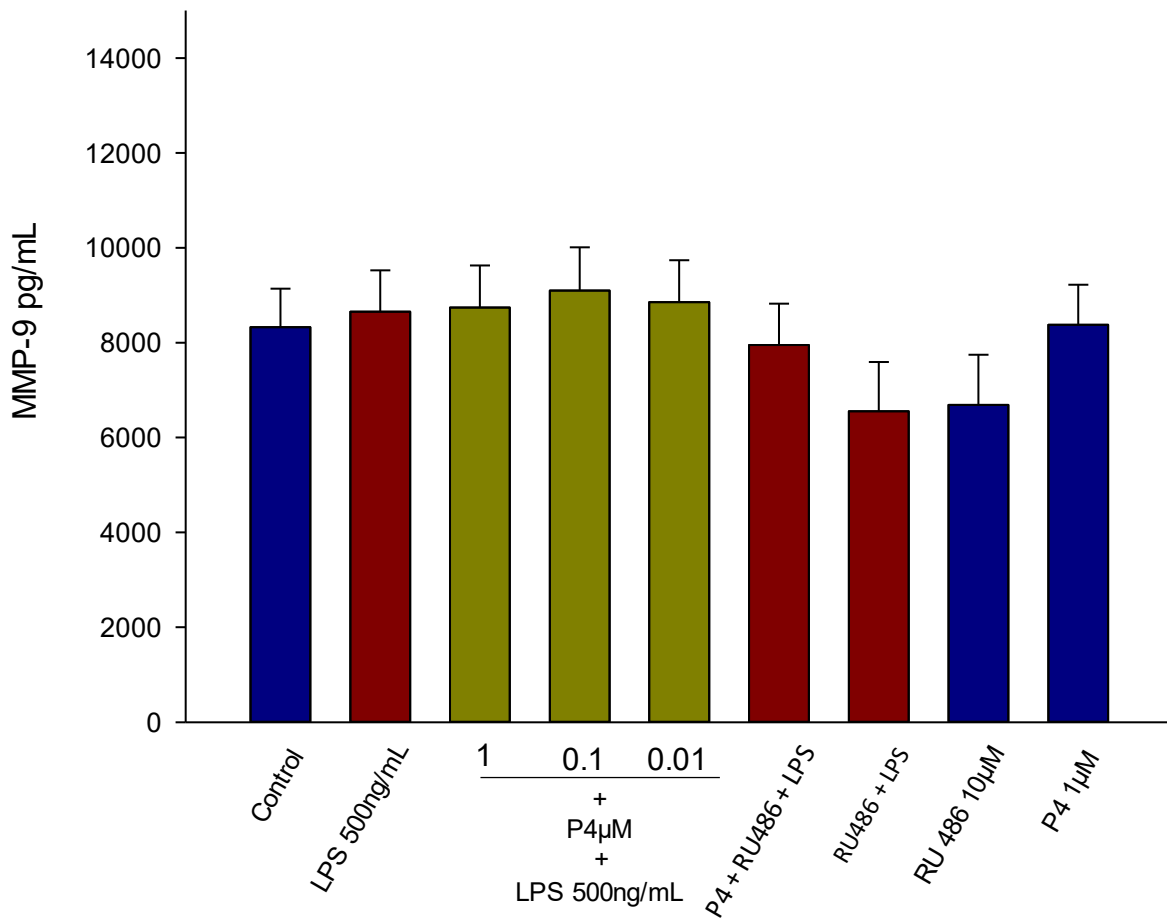
M7.7. SECRECIÓN DE MMP-9 EN MEDIOS Y LISADOS CELULARES

Al comparar los valores basales (10554 ± 5007 pg/mL por cada 1×10^6 células) contra los estimulados con LPS (12392 ± 4511 pg/mL por cada 1×10^6 células) se puede observar un aumento de 1.7 veces. Las concentraciones de P4 lograron detener la secreción de MMP-9, siendo la concentración de $0.01 \mu\text{M}$ la más efectiva al bajar la concentración en un 51%.

Los valores de MMP-9 secretadas al medio se mantienen constantes en la mayoría de los estímulos, no hubo un cambio significativo entre los valores basales de MMP-9 contra el estímulo con LPS.



Gráfica 8. Secreción de MMP-9 in-vitro de lisado celular determinado por ELISA en un cultivo de CMSI sometidas a diferentes tratamientos. La grafica representa el promedio \pm el error estándar, n=9.



Gráfica 9. Secreción in-vitro de MMP-9 determinado por ELISA en un cultivo de CMSI de sangre de placenta sometidas a diferentes tratamientos. La grafica representa el promedio \pm el error estándar, n=9.

8. DISCUSIÓN

En el humano, el mantenimiento del equilibrio inmuno-endócrino de la unidad feto-placentaria es clave para el éxito del proceso gestacional, en este sentido el desarrollo de un proceso inflamatorio en respuesta a una infección a nivel intrauterino vulnera irremediablemente dicho equilibrio y es incompatible con la continuidad del embarazo.

En este escenario, la placenta y las células inmunes maternas y fetales que radican en ella son claves en el establecimiento de una respuesta inmune contra la infección, que si bien tiene como objetivo la defensa, los moduladores pro-inflamatorios que son secretados alteran el ambiente tolerogénico que la unidad feto-placentaria tenía hasta antes de la infección.

Si bien la inflamación es una condición desfavorable durante el embarazo, existen una serie de mecanismos compensatorios cuyo objetivo es tratar de proteger al producto el mayor tiempo posible para garantizar su viabilidad. Existe evidencia de que la P4 puede, a través de sus múltiples propiedades inmunomodulatorias, inhibir parcialmente la respuesta inflamatoria; sin embargo, el mecanismo a través del cual esto sucede es poco entendido.

Experimentos en modelos animales indican que células inmunes pueden migrar de sitios periféricos al endometrio durante el embarazo (Chantakru et al., 2002). También se ha demostrado que la P4 induce la secreción de CXCL10 y CXCL11 que regulan la migración de células inmune al endometrio humano (Sentman et al., 2004).

En este proyecto de investigación se evaluó la capacidad in vitro de la P4 para regular la respuesta inflamatoria de las CMSI humanas estimuladas con lipopolisacárido de *Escherichiacoli*. Con la finalidad de caracterizar las poblaciones celulares que componen a las CMSI se determinó mediante la técnica de FISH que la sangre intervellosa está constituida por 81% de células de origen materno y 19% de origen fetal.

Adicionalmente pudimos caracterizar, mediante ensayos de biometría hemática las diferentes poblaciones celulares, destacando la ausencia de neutrófilos y eosinófilos. Este perfil puede ser explicado, al menos parcialmente, por el hecho de que la presencia de ambas poblaciones puede resultar en un ambiente altamente hostil desde el punto de vista inmunológico ya que ambos tipos celulares están asociados a respuestas pro-inflamatorias severas.

Existen estudios en los que se ha demostrado que los neutrófilos secretan altas concentraciones de MMP-8 para iniciar el trabajo de parto (Junqueira et al., 1980) y aunque las evidencias aún son controversiales, existen estudios en donde se asocia la presencia de neutrófilos en tejidos maternos con ruptura prematura de membranas (Maymon et al., 2000).

Las proteínas que secretan los eosinófilos son casi exclusivas de estas células y aunque no se observan cambios en la población de eosinófilos durante el embarazo se ha observado que la concentración de MBP (proteína básica principal por sus siglas en inglés) en mujeres embarazadas aumenta hasta 20 veces en comparación con mujeres no embarazadas (Wasmoen et al., 1987) además, está asociada a trabajo de parto (Wasmoen, 1989). Algunos estudios demostraron la expresión de MBP en trofoblastos intersticiales por lo que se ha propuesto que estas proteínas pueden tener un papel importante en trabajo de parto por su proximidad con el endometrio (Wagner et al., 1994).

En este trabajo pudimos demostrar que la estimulación de las CMSI con LPS indujo el incremento significativo de IL-1 β , vinculada con el inicio y progresión del trabajo de parto normal (Romero et al., 1992) y patológico (Saini et al., 2011). Esta citocina *per se* puede inducir profundos cambios en la unidad materno fetal creando condiciones adversas para la gestación, ya que favorece el inicio y progresión de trabajo de parto (Kallapur et al., 2013; Sadowsky et al., 2006).

A nivel clínico existe evidencia que demuestra que los niveles de IL-1 β en líquido amniótico de pacientes con trabajo de parto y ruptura prematura de membranas pretérmino son significativamente altas en comparación con pacientes normales. Incluso se ha logrado establecer una asociación entre los niveles de IL-1 β y la concentración de PGs cuyos efectos uterotónicos son claves en el establecimiento de contracciones sincrónicas y efectivas en el trabajo de parto (Romero., et al 1992).

Estos resultados son también sustentados por evidencia generada en nuestro laboratorio que demuestra que IL-1 β forma parte clave de la inflamación de explantes membranas fetales humanas estimuladas con diferentes patógenos asociados a parto pre-término tales como *Escherichiacoli* (Zaga-Clavellina et al., 2007), *Streptococcusagalactiae* (Zaga-Clavellina et al., 2004) y *Gardnerellavaginallis* (Menon et al., 2009).

Recientemente pudimos demostrar que la estimulación con LPS de explantes de placentas humanas a término induce la secreción de esta citocina (Garcia-Ruíz et al., 2015), este efecto también fue documentado en placentas humanas a término y pretérminoperfundidas con esta endotoxina (Holcberg et al., 2008).

En nuestros ensayos la co-estimulación de las CMSIs con P4 demostró ser capaz de inhibir la síntesis y secreción de IL-1 β inducida por LPS. Este resultado resulta muy interesante ya que se ha demostrado que IL-1 β es capaz de inducir piroptosis/apoptosis en membranas fetales humanas (Fortunato y Menon, 2003).

El efecto anti-IL-1 β de la P4 ha sido también descrito con anterioridad en explantes de placenta humana (Garcia-Ruíz et al., 2015) y en el epitelio amniótico en donde se demostró que dicha inhibición requiere de una baja en la expresión del TLR-4 indispensable para el reconocimiento del LPS y en la inducción de la inflamación (Adams, Waldorf & McAdams, 2013).

En PBMCs de pacientes con artritis reumatoride, la estimulación con P4 inhibe la secreción de IL-1 β pero no de IL-6 (Li et al., 1993); en cambio, en células THP-1 derivadas de monocitos humanos e infectadas con *Ureaplasmaurealyticum*, la P4 no consigue un efecto inhibitorio pues incrementa la producción de IL-1 β e IL-8 en cultivos, lo que ha sido asociado con respuestas tejido y patógeno específicas (Peltier et al., 2008).

El papel de IL-1 β en el contexto de infección/inflamación es complejo, aún más si se toma en cuenta los efectos pleiotrópicos de esta citocina, por ejemplo, se ha demostrado en epitelio amniótico que la IL-1 β puede revertir los efectos anti-inflamatorios de la P4 favoreciendo la actividad de NF- κ β y reprimiendo la actividad del PR, lo que eventualmente puede favorecer la expresión de COX2 y crear condiciones para el inicio y progresión del trabajo de parto (Allport, 2001).

Por otro lado, en un modelo en células HeLa se logró demostrar que la P4 puede bloquear la capacidad de IL-1 β para inducir o incrementar la degradación del inhibidor de NF- κ β , lo que eventualmente se traduce en la inhibición de las vías que dependen de NF- κ β , factor de transcripción clave en la transcripción de los genes asociados a inflamación (Vidaeff et al., 2007).

La concentración de más efectiva de P4 para inhibir IL-1 β fue la de 1 μ M, esto contrasta con resultados obtenidos anteriormente en tejidos maternos, en los que las concentraciones más efectivas fueron de 0.01 μ M (García-Ruíz et al., 2015, Pineda-Torres M., 2014.), sin embargo, esta citocina es producida por células del sistema inmune profesional y como ya se dijo antes, se tiene evidencia para suponer que las concentraciones efectivas de la P4 son tejido específicas.

Otra citocina clave en la creación de un ambiente pro-inflamatorio es TNF- α , que ha sido relacionado como parte de las señales que permiten el inicio y progresión del trabajo de parto en condiciones normales y patológicas (Gravet et al., 1990). Las concentraciones de

IL-1 β y TNF α en líquido amniótico son significativamente altas en mujeres con parto pretérmino y con RPM pretérmino así como con cultivos positivos de líquido amniótico (Romero et al., 1989)

En nuestro modelo experimental demostramos que la estimulación con LPS indujo el incremento significativo de los niveles de TNF- α , este efecto es consistente con trabajos previos en nuestro laboratorio (Zaga-Clavellina et al., 2007) y otros grupos de trabajo que demuestran que la estimulación de membranas fetales con LPS induce la síntesis de este modulador (Thiex et al., 2009).

TNF- α es una citocina pro-inflamatoria con propiedades pleiotrópicas indispensable para establecer una respuesta inmune contra infecciones bacterianas; los efectos citotóxicos de esta han sido documentados en diferentes modelos, siendo los de primates no humanos los que han permitido comprender con mayor claridad los efectos deletéreos de la inflamación. En estos modelos se ha demostrado que TNF- α es el primer modulador inflamatorio que se secreta después de la infección con *Estreptococo* del grupo B y que su síntesis precede a la de IL-6 e IL-1 β (Gravett et al., 1994). En un modelo similar se demostró que el parto pretérmino no requiere de la presencia de un patógeno, pues la infusión con TNF- α fue capaz de inducir dicha patología y ser asociada con daño fetal y corioamnioitis histológica (Sadowsky et al., 2006)

Por otro lado, evidencia experimental demuestra que PBMCs de mujeres con historial de parto pretérmino sintetizan más TNF- α de manera basal en comparación con mujeres control; sin embargo, estas células no son más sensibles que los controles a la estimulación con diferentes patógenos asociados a parto pretérmino (Peltier et al., 2010)

En nuestro modelo de CMSI la estimulación con P4 inhibió de manera significativa el incremento de TNF- α inducido por el estímulo con LPS, este resultado ha sido previamente documentado en linfocitos aislados de mujeres con historial de abortos recurrentes estimulados con dihidrogesteronona (Raghupathy et al., 2005b) además, se

demonstró que la P4 puede inhibir TNF- α a nivel de RNAm y proteína en macrófagos murinos (Miller and Hunt, 1997).

Así como se ha documentado el efecto de la P4 en células de sistema inmune también se ha demostrado que esta hormona puede inhibir TNF- α a nivel de proteína en explantes de arteria feto-placentaria estimulados con LPS (Shields et al., 2005). A nivel clínico existe evidencia que la suplementación con dihidrogesteona en pacientes con riesgo de parto pretérmino se traduce en la disminución de citocinas Th1 incluida TNF- α (Hudić et al., 2011b).

Desde nuestro punto de vista la inhibición de la P4 sobre TNF- α puede repercutir sobre diferentes vías moleculares, por ejemplo existe evidencia de que esta citocina puede promover la activación de la ruta de las caspasas e inducir apoptosis en membranas fetales (Menon et al., 2002), por lo tanto, se puede asumir que la P4 inhibe el proceso apoptótico. Lo anterior ha sido demostrado en membranas fetales en donde la estimulación con P4 y caproato de 17 α -hidroxiprogesterona inhibe, la apoptosis basal e inducida por TNF- α a través de la inhibición de la síntesis y actividad de la Caspasa-3, 8 y 9 (Luo et al., 2009). Las evidencias anteriores concuerdan con lo encontrado en nuestro estudio donde la concentración de P4 que inhibió TNF- α de forma más eficaz fue de 0.01 μ M.

IL-6 es una citocina con múltiples propiedades inmuno-regulatorias producida por múltiples tipos celulares tanto de sistema inmune profesional como tejidos epiteliales, fibroblastos y células endoteliales (Pirog et al., 2010).

Durante el embarazo, el incremento en los niveles de IL-6 en el líquido amniótico ha sido asociado con varias patologías, incluidas el parto pretérmino; por esa razón esta citocina es considerada por algunos como el mejor bio-marcador para parto pretérmino (Romero et al, 1993a, b; Wenstrom et al., 1998) y ruptura prematura de membranas pretérmino (Cobo et al., 2009), ambos asociados a infección. A nivel clínico los niveles de IL-6 en líquido

amniótico de mujeres con parto pretérmino asociado a infección son entre 20 y 30 veces mayores comparados con mujeres sin infección (Saito et al., 1993).

Un estudio reciente demostró que altos niveles séricos de IL-6 pueden ser asociados con un incremento en el riesgo de hemorragia intraventricular fetal y con desarrollo de nacimiento pretérmino a 32 semanas de gestación (Sorokin et al., 2010). Adicionalmente, IL-6 es parte clave de la respuesta inmune que las membranas fetales selectivamente estimuladas con endotoxina bacteriana en la región coriodecidual (Pineda-Torres et al., 2014).

También se ha demostrado que el epitelio amniótico también sintetiza IL-6 como parte del proceso inflamatorio asociado a la infección in vitro con *Mycoplasma hominis* y *Streptococcus aureus* (Reisenberger et al., 1998) resultados que coinciden con lo observado en monocitos de sangre de cordón umbilical de neonatos a término y pretérmino estimulados con diferentes patógenos (Tatad et al., 2008).

Como era de esperarse, la estimulación de las CMSIs con LPS indujo el incremento significativo de IL-6 secretada al medio de cultivo, este resultado es consistente con la información publicada recientemente por nuestro grupo en el que demostramos que explantes de placentas a término secretan IL-6 después de estimularlas con endotoxina. Otro modelo experimental también demuestra que monocitos en cultivo estimulados con plasma de mujeres preclámpticas sintetiza altos niveles de IL-6 y TNF- α (Rahardjo et al., 2014).

En nuestro modelo de estudio la co-estimulación de las CMSI con P4 inhibió de forma significativa la secreción de IL-6 inducida por LPS. La capacidad de la P4 para inhibir a esta citocina ha sido también reportada en células mononucleares obtenidas de arterias maternas y fetales (Gotkin et al., 2006). Evidencia adicional sustenta que una regulación similar ocurre en un modelo de fibroblastos uterinos humanos (Lei et al., 2012) y en un modelo de estimulación ex vivo en explantes de útero murino gestante, en el que se

demonstró que la P4 inhibe los niveles de IL-6 inducidos por la estimulación con LPS (Anbe et al., 2007).

A nivel clínico se ha documentado que pacientes con riesgo de parto pretérmino tratadas con dihidrogestrona presentan niveles significativamente bajos de varias citocinas pro-inflamatorias incluida IL-6 en comparación con mujeres que no recibieron el tratamiento hormonal (Hudić et al., 2011b). Otro ejemplo de la capacidad de la P4 para modificar el ratio TH1/TH2 fue evidenciado en un modelo in vitro en el que PBMCs de mujeres con historial de abortos recurrentes incrementan los niveles de IL-6 e IL-4 en respuesta al tratamiento con dihidrogestrona (Raghupathy., et al. 2005a).

El papel inmuno-modulador de IL-6 es complejo como demostró el trabajo de Holckberg G (2007) quien concluye que la secreción de IL-6 en placentas humanas depende de la edad gestacional, de la sensibilidad diferencial de los lados materno y fetal al estímulo con LPS y a la relación de la concentración entre IL-6 y TNF- α (Wenstrom et al., 1998).

Existen elementos de evidencia que sustentan que si bien IL-6 puede ser considerada una citocina pro-inflamatoria, su potencia y propiedades citotóxicas son menores a las descritas para IL-1 β y TNF- α . De hecho existen estudios que demuestran que a diferencia de IL-1 β y TNF- α , IL-6 no puede inducir apoptosis en membranas fetales (Fortunato y Menon, 2003) ni tampoco promover parto pretérmino en un modelo de primates no humanos (Sadowsky et al., 2006).

El co-tratamiento con P4 (0.01 μ M) logro reducir significativamente la producción de IL-6 en las CMSI, evento que concuerda con la evidencia descrita hasta el momento. (Gianonni et al., 2011).

IL-8 es una quimiocina pro-inflamatoria secretada por varios tipos celulares incluidos monocitos y células endoteliales, tiene la capacidad de reclutar y activar neutrófilos y su

papel es clave en la integración de una respuesta inmune durante un proceso infeccioso permitiendo que las células reclutadas potencien la respuesta inmune en el o los tejidos infectados (Pavón et al., 2016).

En la unidad feto placentaria IL-8 es sintetizada por tejidos maternos (decidua) y fetales (amnios y corion) de manera basal y en respuesta a estímulos inmunológicos y/o infecciosos (Trautman et al., 1992, Dudley et al., 1993), y su expresión a nivel de RNAm es constitutiva independientemente de si los tejidos son a término, pre-término o asociados a infección (Dudley et al., 1996).

Evidencia clínica y experimental sustentan que altos niveles de IL-8 están asociados con la respuesta inmune de pacientes que desarrollan corioamnioitis (Hagberg et al., 2005) y/o partopretérmino (Romero et al., 1993a) lo que sugiere que IL-8 es parte clave de las capacidades inmunes de la cavidad amniótica durante una invasión microbiana.

En el presente trabajo demostramos que la estimulación de las CMSI con LPS induce el incremento significativo de la concentración de IL-8. Este patrón de respuesta ha sido demostrado en un modelo de infección coriodecidual en membranas fetales en el que la coriodecidual resultó ser la principal fuente de esta quimiocina (Pineda-Torres et al., 2014).

Desde hace más de 30 años ha quedado demostrado que la placenta es una fuente importante de IL-8 (Shimoya., 1991) y explantes de placentas con y sin trabajo de parto parecen no mostrar diferencias en los niveles de esta quimiocina. Sin embargo, su concentración es significativamente más alta en placentas con corioamnioitis histológica (Saito et al, 1994) y se ha demostrado que IL-8 es inmunolocalizada en citotrofoblastos, sincitiotrofoblastos, células de Hofbauer, estroma decidual, en glándulas endometriales y en los linfocitos que radican en este tejido (Saito et al., 1994).

La capacidad de la placenta para responder ante retos inmunológicos secretando altos niveles de IL-8 también fue confirmada en explantes de placentas a término estimuladas con LPS (García-Ruíz et al., 2015).

En el presente trabajo demostramos que al estimular a las CMSI con diferentes concentraciones de P4, los niveles de IL-8 disminuyeron de manera significativa, este efecto fue reportado por primera vez por Kelly et al., (1992) en cultivos de células coriodeciduals y recientemente confirmado en un modelo *ex vivo* de explantes de vellosidades placentarias humanas a término (García-Ruíz et al., 2015).

Por otro lado evidencia obtenida de células THP-1 en cultivo demuestran que la P4 incrementa la producción de IL-8 inducido por el estímulo con *E. coli* o *U. urealyticum* (Vidaeff et al., 2007).

Parte de los complejos mecanismos inmunológicos de la placenta en los que convergen la inmunidad adaptiva y la inmunidad innata incluye la demostración de que los linfocitos T CD4⁺ pueden activamente migrar hacia la coriodecidua durante el trabajo de parto y secretar altos niveles de quimiocinas y citocinas incluidas IL-8 (Gomez-Lopez et al., 2013). Los co-tratamientos de P4 lograron inhibir exitosamente la secreción de IL-8 en los cultivos de células CMSI, siendo la concentración más efectiva la de 0.01 μM.

Otra molécula clave con la capacidad de quimio-atraer a poblaciones celulares del sistema inmune hacia el sitio inmunocomprometido es Mip-1α, y es parte de la respuesta inmune del hospedero ante infecciones virales, bacterianas, micóticas y parasitarias. Su mecanismo de acción incluye la regulación del tráfico y la activación de células inflamatorias específicas como macrófagos, linfocitos CD8⁺ y células NK (Pirog et al., 2010).

Por la naturaleza inmunoreguladora de la placenta, no es extraño que sea un tejido que sintetiza y secreta diferentes moléculas quimioatrayentes incluidas IL-8, RANTES

(Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted, por sus siglas en ingles) y MIP-1 α (Moussa et al., 2001). Existen reportes que indican que Mip-1 α es producida por células deciduales en cultivo y en respuesta al estímulo con IL-1 β , TNF- α , IL-4 y LPS (Dudley et al., 1995).

En este trabajo nosotros confirmarnos que Mip-1 α es secretada en respuesta al estímulo con LPS, lo cual tiene sentido ya que previamente demostramos que explantes vellosos de placenta incrementan los niveles secretados de Mip-1 α después de ser estimulados con endotoxina bacteriana. Estos resultados coinciden con lo previamente observado con células deciduales y coriónicas humanas en cultivo estimuladas con Streptococo del grupo B y/o ácido lipoteicoico (Dudley et al., 1997, 1996) y en cultivos de PBMCs humanos (Kimata et al., 1998 y Sherry et al., 1998.).

A pesar que los tejidos extraembrionarios son activos productores de MIP-1 α , esta quimiocina es prácticamente indetectable en líquido amniótico durante el 2° trimestre y 3° trimestre del embarazo (Romero et al., 1994).

Evidencia clínica sustenta que los niveles de MIP-1 α e IL-8 incrementan de manera significativa en el líquido amniótico de mujeres con parto pretérmino e invasión microbiana de la cavidad amniótica (Romero et al., 1993b). Adicionalmente se ha podido demostrar que quimiocinas como, IL-8, MCP-1 e IP-10 presentes en extractos de membranas fetales a término con trabajo de parto quimio-atraen diferentes poblaciones de leucocitos claves en el inicio y progresión del trabajo de parto (Gomez-Lopez et al., 2009).

Tomando en consideración que la placenta es un órgano inmuno-endócrino, es de suponer que factores hormonales e inmunes se auto regulen. En este sentido nosotros demostramos que concentraciones de P4 similares a las presentes en el embarazo inhibieron de manera significativa los niveles de MIP-1 α inducidos por el tratamiento con LPS.

Hasta la fecha solamente nuestro grupo ha demostrado que en placenta la estimulación con P4 puede inhibir la síntesis de Mip-1 α secretada en respuesta a LPS (Garcia-Ruíz et al., 2015), estos resultados son consistentes con el presente trabajo.

En un modelo de infección con VIH se pudo demostrar que el tratamiento de Linfocitos T CD8+ con P4 inhibe de manera significativa varias quimiocinas incluidas Mip-1 α , Mip-1 β y RANTES (Vassiliadou et al., 1999).

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en las evidencias anteriores pues los niveles de Mip-1 α fueron suprimidos por la concentración más baja de P4 (0.01 μ M).

El equilibrio entre factores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios es crucial para el éxito del embarazo. Il-10 es una citocina tipo TH2 con potentes efectos inmunosupresores cuyos efectos son ejercidos en una amplia variedad de células inmunes sobre las que destacan la inhibición de la producción de citocinas pro-inflamatorias y del proceso de presentación de antígenos, inhibe la activación de Linfocitos T citotóxicos y modula la función de las células Treg favoreciendo la creación en el útero de un ambiente inmunológicamente permisivo para el producto (Mor, 2006).

Desde el punto de vista clínico, el papel de IL-10 parece estar asociado con un cambio en el equilibrio entre factores pro y anti-inflamatorios, existe evidencia del trabajo de parto está asociado con bajos niveles de IL-10 (Simpson, 1998).

Las primeras evidencias respecto al papel de la IL-10 durante el embarazo fueron sustentadas en modelos murinos de aborto espontáneo, en los cuales se pudo demostrar que esta condición patológica está asociada con bajos niveles de IL-10 y puede ser revertida por la administración exógena de IL-10 recombinante (Chaouat et al., 2005).

A diferencia de otros estudios hechos en tejidos extraembrionarios humanos en los que se demuestra que la estimulación con LPS induce el incremento significativo de IL-10 (Flores-Espinosa et al., 2013, Pineda-Torres et al., 2014, Garcia-Ruíz et al., 2015), en el presente trabajo en el que estimulamos células inmunes de sangre placentaria de gestaciones a término, el tratamiento con endotoxina no induce cambios significativos en los niveles de IL-10 secretados in vitro. Estas diferencias pueden deberse a la naturaleza del tejido y a las capacidades inmunes de los mismos, esto se soporta por estudios que demuestran que la infección con *Streptococcus* del grupo B (SGB) de monocitos de sangre de cordón aislados de neonatos a término induce la secreción de niveles más bajas de IL-10 en células de neonatos a término comparadas con el mismo tipo celular de neonatos pretérmino (Tatad et al., 2008).

En un estudio hecho en células polimorfonucleares y PBMCs aislados de sangre de cordón umbilical de neonatos a término concluye que los niveles de IL-10 secretados in vitro por estas células no es suficiente para inhibir la liberación de IL-8 por estas células, sin embargo, cuando son tratadas con IL-10 exógena disminuyen los niveles de esta quimiocina.

Si bien en nuestro laboratorio hemos demostrado que el tratamiento con LPS induce el aumento significativo de los niveles de IL-10 en explantes vellosos de placentas a término (Garcia-Ruíz et al., 2015), otro estudio sustenta que la perfusión de placenta a término con endotoxina no modifica los niveles de esta citocina (Chaouat et al., 2005). Otro modelo que sustenta que células profesionales del sistema inmune no modifican los niveles de IL-10 después de ser activadas por LPS fue demostrado en células dendríticas de rata (Butts et al., 2007)

Respecto al papel de la P4 sobre la expresión de IL-10 hemos demostrado en un modelo ex vivo de infección coriodecidual que esta hormona puede disminuir los niveles de IL-10 secretados tanto por el amnios como la coriodecidual (Pineda-Torres et al., 2014), sin

embargo, en nuestro estudio el tratamiento con P4 (1 μ M) incrementa los niveles de IL-10 en comparación con el control y con las células tratadas únicamente con LPS. Este resultado puede concordar con los obtenidos en un modelo de explantes de arteria fetoplacentaria en el que se demostró que la P4 no modifica los niveles de IL-10 inducidos por LPS (Shields et al., 2005)

En el contexto de infección, el proceso inflamatorio es parte de una primera oleada de marcadores inmunológicos que modifican profundamente el ambiente de la unidad materno-fetal. Una vez que la inflamación se ha establecido, se favorece la síntesis y actividad de otros moduladores con propiedades efectoras entre los que destacan las MMPs. La actividad de estas enzimas es clave para mantener el equilibrio entre la síntesis y la degradación de diferentes elementos de la matriz extracelular de los diferentes tejidos (Raffetto y Khalil, 2008).

Evidencia clínica y experimental sustenta que varias citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 pueden inducir el incremento en los niveles de MMP-9, enzima con propiedades de gelatinasa a la que se le ha atribuido un papel clave en el inicio y progresión del trabajo de parto normal ya que participa en el proceso de degradación de matriz extracelular y pérdida de la continuidad estructural de las membranas fetales humanas (Butts et al., 2007, Gomez-Lopez et al., 2013).

Si bien MMP-9 participa del proceso normal de trabajo de parto también está involucrada en el mecanismo de daño tisular asociado a infección; niveles altos de esta enzima en líquido amniótico han sido relacionados con procesos de infección intra-amniótica (Harirah, 2002 y Locksmith, 1999).

En el presente trabajo nosotros demostramos que la estimulación de CMSI con LPS induce, en el tejido un incremento en los niveles de MMP-9 total (activa y pro-enzima), este incremento se explica en parte porque como ya hemos discutido, estas células respondieron

al estímulo con la endotoxina secretando cantidades significativas de IL-1 β , TNF- α e IL-6. Estos hallazgos coinciden con lo observado en membranas fetales (Pineda-Torres et al., 2014, Garcia-Lopez et al., 2007) y en explantes de placenta humana a término (Garcia-Ruíz et al., 2015).

En este contexto existe evidencia que indica que IL-10 juega un papel clave en el proceso de placentación y la invasión del trofoblasto la cual ha sido asociada con altos niveles de MMP-9 y bajos niveles de IL-10 (Steams et al., 1995, Garcia-Lopez et al., 2007).

Si bien en nuestro modelo la co-estimulación con diferentes concentraciones de P4 no disminuyó de manera significativa los niveles de MMP-9 la tendencia muestra una clara disminución siendo la menor concentración la más efectiva (0.01 μ M). La capacidad de esta hormona para inhibir la expresión MMP-9 ha sido previamente reportado en fibroblastos cervicales de coneja (Locksmith, et al., 1999), además que se ha demostrado que la P4 también inhibe la expresión de MMP-1 y MMP-3 en células deciduales a término, ambas enzimas están involucradas en el proceso de ruptura de membranas fisiológico y patológico (Oner et al., 2008).

En tejidos gestaciones como membranas fetales y explantes placentarios humanos se ha podido demostrar que la P4 ejerce efectos anti-inflamatorios a través de la unión de ésta con el RP y lo cual está soportado por el hecho de que los efectos asociados a la P4 fueron inhibidos por el anti-progestágeno RU486 que ejerce sus efectos a través de la unión específico con el RP y el receptor de glucocorticoides (GR)(García-Ruíz et al.; 2015,Pineda-Torres M., 2014; Flores-Espinosa et al., 2013).

En el presente trabajo los efectos inmuno-moduladores de la P4 no son revertidos por el mismo anti-progestágeno, por la tanto asumimos que la P4 está ejerciendo sus efectos a través de un mecanismo independiente del RP nuclear (RPn) clásico.

Estos resultados concuerdan con el hecho de que las células del sistema inmune (específicamente leucocitos) no expresan el RNAm del RPn y que existe evidencia que sustenta que la P4 inmunomodula la respuesta inflamatoria de células como monocitos y macrófagos a través de su unión con el RP membranaral (RPm) el cual está acoplado a la vía de proteínas G (Thomas et al., 2014).

Además, si bien en este estudio no analizamos el perfil de unión de la P4 a otros receptores de hormonas esteroides, no podemos descartar que esta hormona esté ejerciendo efectos anti-inflamatorios a través del RG el cual es altamente expresado en los PBMCs.

P4 inhibe la inflamación a través de NF- κ B hace falta hacer más estudios para caracterizar el mecanismo de acción

9. CONCLUSIONES

- 1.- En el presente trabajo se estandarizaron los procedimientos para la obtención y cultivo de células mononucleares viables y metabólicamente activas provenientes del espacio intervilloso de la placenta las cuales fueron usadas como modelo experimental.
- 2.- Se demostró que las CMSI están constituidas en un 80% por células de origen materno y 20% de origen fetal.
- 4.- Al ser estimuladas con LPS se observó que las CMSI en cultivo son capaces de montar una respuesta inflamatoria al secretar citocinas y factores pro-degradativos al medio de forma similar en la que ocurriría en un escenario *in vivo*.
- 5.- Se concluyó que en este modelo experimental la P4 tiene la capacidad de modular la producción de citocinas pro-inflamatorias y factores degradativos generados por el estímulo con LPS.
- 6.- El anti-progestágeno RU486 no inhibe los efectos inmuno-moduladores de la P4 en CMSI como lo haría en tejidos placentarios por lo que se podría indagar que poseen diferentes mecanismos de acción.

10. REFERENCIAS

- **Adams Waldorf K. y McAdams R.** (2013). Influence of infection during pregnancy on fetal development. *Reproduction*, 146(5): R151-R162.
- **Allport V.** (2001). Human labour is associated with nuclear factor-kappaB activity which mediates cyclo-oxygenase-2 expression and is involved with the 'functional progesterone withdrawal'. *Molecular Human Reproduction*, 7(6): 581-586.
- **Anbe H., Okawa T., Sugawara N., Takahashi H., Sato A., Vedernikov Y., Saade G. y Garfield R.** (2007). Influence of progesterone on myometrial contractility in pregnant mice treated with lipopolysaccharide. *J ObstetGynaecolRes*, 33(6): 765-771.
- **Bastek J., Gómez L., y Elovitz M.** (2011). The Role of Inflammation and Infection in Preterm Birth. *Clinics In Perinatology*, 38(3): 385-406.
- **Bates M.** (2002). Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss?. *Human Reproduction*, 17(9): 2439-2444.
- **Beagley K., y Gockel C.** (2003). Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 38(1):13-22.
- **Benirschke, K., Kaufmann, P., y Baergen, R.** (2006). Pathology of the human placenta. New York: Springer. pp. 42-46
- **Billington W.** (2003). The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar. *Journal Of Reproductive Immunology*, 60(1): 1-11.
- **Butts C., Shukair S., Duncan K., Bowers E., Horn C., Belyavskaya E., Tonelli L. y Sternberg, E.** (2007). Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *International Immunology*, 19(3): 287-296.

- **Cabero, L.** (2007). *Obstetricia y medicina materno-fetal*. Madrid: Editorial Medica Panamericana. pp. 447.
- **Carter A.** (2011). Comparative studies of placentation and immunology in non-human primates suggest a scenario for the evolution of deep trophoblast invasion and an explanation for human pregnancy disorders. *Reproduction*, 141(4): 391-396.
- **Castellucci M.** (2000). Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Human Reproduction Update*, 6(5): 485-494.
- **Castro-Leyva V., Espejel-Nuñez A., Barroso G., Zaga-Clavellina V., Flores-Pliego, A., Morales-Mendez, I., Giono-Cerezo S., Walsh SW y Estrada-Gutierrez, G.** (2012). Preserved Ex Vivo Inflammatory Status in Decidual Cells from Women with Preterm Labor and Subclinical Intrauterine Infection. *PLoS ONE*, 7(8). doi:10.1371/journal.pone.0043605
- **Cobo T., Palacio M., Navarro-Sastre A., Ribes A., Bosch J., Filella X. y Gratacós E.** (2009). Predictive value of combined amniotic fluid proteomic biomarkers and interleukin-6 in preterm labor with intact membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 200(5): 499.
- **Dressing G., Goldberg J., Charles N., Schwertfeger K., y Lange C.** (2011). Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: A review of regulation and physiological implications. *Steroids*, 76(1-2), 11-17.
- **Dudley D.** (1993). Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio- decidual interface. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 76(2): 404-410.
- **Dudley D., Collmer D., Mitchell M. y Trautman M.** (1996). Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissues: Implications for term and preterm labor. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 3(6): 328-335.
- **Dudley D., Edwin S., Dangerfield A., Jackson K. y Trautman M.** (1997). Regulation of Decidual Cell and Chorion Cell Production of Interleukin-10 by Purified Bacterial Products. *American Journal of Reproductive Immunology*, 38(4): 246-251.

- **Dudley D., Edwin S., Dangerfield A., Waggoner J. y Mitchell M.** (1996). Regulation of Cultured Human Chorion Cell Chemokine Production by Group B Streptococci and Purified Bacterial Products. *American Journal of Reproductive Immunology*, 36(5): 264-268.
- **Dudley D., Spencer S., Edwin S. y Mitchell M.** (1995). Regulation of Human Decidual Cell Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α) Production by Inflammatory Cytokines. *American Journal of Reproductive Immunology*, 34(4): 231-235.
- **Flores-Espinosa P., Pineda-Torres M., Vega-Sánchez R., Estrada-Gutiérrez G., Espejel-Nuñez A., Flores-Pliego A., Maida-Claros R., Paredes-Vivas Y., Morales-Méndez I., Sosa-González I., Chávez-Mendoza A. y Zaga-Clavellina V.** (2013). Progesterone Elicits an Inhibitory Effect upon LPS-Induced Innate Immune Response in Pre-Labor Human Amniotic Epithelium. *Am J Reprod Immunol*, 71(1): 61-72.
- **Forbes K. y Westwood M.** (2010). Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth. *Journal of Endocrinology*, 207(1), pp.1-16.
- **Fortunato S. y Menon R.** (2003). IL-1 β is a Better Inducer of Apoptosis in Human Fetal Membranes than IL-6. *Placenta*, 24(10): 922-928.
- **Garcia-Lopez G., Vadillo-Ortega F., Merchant-Larios H., Maida-Claros R., Osorio M., Soriano-Becerril D., Flores-Herrera H., Beltran-Montoya J., Garfias-Becerra Y. y Zaga-Clavellina V.** (2007). Evidence of in vitro differential secretion of 72 and 92 kDa type IV collagenases after selective exposure to lipopolysaccharide in human fetal membranes. *Molecular Human Reproduction*, 13(6): 409-418.
- **Garcia-Ruíz G., Flores-Espinosa P., Preciado-Martínez E., Bermejo-Martínez L., Espejel-Nuñez A., Estrada-Gutierrez G., Maida-Claros R., Flores-Pliego A. y Zaga-Clavellina V.** (2015). In vitro progesterone modulation on bacterial endotoxin-induced production of IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1 α , and MMP-9 in pre-labor human term placenta. *Reprod Biol Endocrinol*, 13(1).

- **Giannoni, E., Guignard, L., KnaupReymond, M., Perreau, M., Roth-Kleiner, M., Calandra, T., y Roger, T.** (2011). Estradiol and Progesterone Strongly Inhibit the Innate Immune Response of Mononuclear Cells in Newborns. *Infection And Immunity*, 79(7): 2690-2698.
- **Goldenberg R., Culhane J., Iams J. y Romero R.** (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet*, 371(9606): 75-84.
- **Gomez-Lopez N., Estrada-Gutierrez G., Jimenez-Zamudio L., Vega-Sanchez R. y Vadillo-Ortega F.** (2009). Fetal membranes exhibit selective leukocyte chemotactic activity during human labor. *Journal of Reproductive Immunology*, 80(1-2): 122-131.
- **Gomez-Lopez N., StLouis D., Lehr M., Sanchez-Rodriguez E., y Arenas-Hernandez M.** (2011). Immune cells in term and preterm labor. *Cell Mol Immunol*, 11(6): 571-581.
- **Gomez-Lopez N., Vega-Sanchez R., Castillo-Castrejon M., Romero R., Cubeiro-Arreola K. y Vadillo-Ortega F.** (2013). Evidence for a Role for the Adaptive Immune Response in Human Term Parturition. *Am J Reprod Immunol*, 69(3): 212-230.
- **Gotkin J., Celver J., McNutt P., Shields A., Howard B., Paonessa D. y Napolitano P.** (2006) "Progestosterone reduces lipopolysaccharide induced interleukin-6 secretion in fetoplacental chorionic arteries, fractionated cord blood, and maternal mononuclear cells." *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195: 1015-1019.
- **Gravett M., Witkin S. y Novy M.** (1994). A Nonhuman Primate Model for Chorioamnionitis and Preterm Labor. *Seminars in Reproductive Medicine*, 12(04): 246-262.
- **Gude N., Roberts C., Kalionis B. y King R.** (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*, 114(5-6): 397-407.

- **Hagberg H., Mallard C. y Jacobsson B.** (2005). Role of cytokines in preterm labour and brain injury. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 112: 16-18.
- **Harirah, H.** (2002). Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 and interleukin-6 in predicting intra-amniotic infection. *Obstetrics & Gynecology*, 99(1), pp.80-84.
- **Holcberg G., Amash A., Sapir O., Sheiner E., Levy S., Myatt L. y Huleihel M.** (2008). Perfusion with lipopolysaccharide differently affects the secretion of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist by term and preterm human placentae. *Placenta*, 29(7): 593-601.
- **Howson C., Kinney M., McDougall L. y Lawn J.** (2013). Born Too Soon: Preterm birth matters. *Reproductive Health*, 10(Suppl 1), p.S1.
- **Hudić I., Szekeres-Bartho J., Fatušić Z., Stray-Pedersen B., Dizdarević-Hudić L., Latifagić, A., Hotić N., Kamerić L. y Mandžić A.** (2011). Dydrogesterone supplementation in women with threatened preterm delivery—the impact on cytokine profile, hormone profile, and progesterone-induced blocking factor. *Journal of Reproductive Immunology*, 92(1-2): 103-107.
- **Hunt J.** (2006). Stranger in a strange land. *Immunol Rev*, 213(1): 36-47
- **Jauniaux E., Cindrova-Davies T., Johns J., Dunster C., Hempstock J., Kelly F. y Burton G.** (2004). Distribution and Transfer Pathways of Antioxidant Molecules inside the First Trimester Human Gestational Sac. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(3): 1452-1458.
- **Junqueira LC, Zugaib M, Montes GS, Toledo OM, Krisztan RM y Shighihara KM.** (1980). Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. *American Journal of Obstetric Gynecology*. 138: 273–281.
- **Kallapur SG., Presicce P., Rueda CM., Jobe AH. Y Chougnet CA.** (2014). Fetal immune response to chorioamnionitis. *Seminaries Of Reproductive Medicine*, 32(1): 56-67

- **Kelly R., Leask R. y Calder A.** (1992).Choriodecidual production of interleukin-8 and mechanism of parturition.The Lancet, 339(8796): 776-777.
- **Kimata M., Shichijo M., Daikoku M., Inagaki N., Mori H. y Nagai H.** (1998).Pharmacological Modulation of LPS-Induced MIP-1 & alpha; Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells.Pharmacology, 56(5): 230-236.
- **King A.** (2000). Uterine leukocytes and decidualization.HumanReproductionUpdate, 6(1): 28-36.
- **King A., Burrows T., Verma S., Hiby S. y Loke Y.W.** (1998). Human uterine lymphocytes. European Society of Human Reproduction and Embryology, 5(4): 480-485.
- **Kjersti M., Tillery A., Silver R y Dalton J.** (2006).Immunology of normal pregnancy, 11, 279-295.
- **Kolls J. yKhader S.** (2010). The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. Cytokine & Growth Factor Reviews, 21(6): 443-448.
- **Kudo Y.** (2013). The role of placental indoleamine 2,3-dioxygenase in human pregnancy. Obstetrics & Gynecology Science, 56(4): 209.
- **Lei K., Chen L., Georgiou E., Sooranna S., Khanjani S., Brosens J., Bennett P. y Johnson M.** (2012). Progesterone Acts via the Nuclear Glucocorticoid Receptor to Suppress IL-1 β -Induced COX-2 Expression in Human Term Myometrial Cells. PLoS ONE, 7(11), p.e50167.
- **Li X. y O'Malley B.** (2003).Unfolding the Action of Progesterone Receptors. Journal Of Biological Chemistry, 278(41): 39261-39264.
- **Locksmith G.** (1999). Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 levels in women with preterm labor and suspected intra-amniotic infection. Obstetrics & Gynecology, 94(1): 1-6.
- **Luo G., Abrahams V., Tadesse S., Funai E., Hodgson E., Gao J. y Norwitz E.** (2009). 467: Progesterone inhibits basal and TNF- induced apoptosis in fetal membranes: a novel mechanism to explain progesterone-mediated prevention ofpreterm birth. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 201(6), p.S176.

- **Lydon J., DeMayo F., Funk C., Mani S., Hughes A. y Montgomery C.**(1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Development*, 9(18): 2266-2278.
- **Matalka KZ.** (2003). The effect of estradiol, but not progesterone, on the production of cytokines in stimulated whole blood, is concentration-dependent. *Neuro Endocrinology Letter*, 24(3-4): 185-91.
- **Maymon E., Romero R., Pacora P., Gomez R., Athayde N., Edwin S. y Yoon B.** (2000). Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 183(1): 94-99.
- **McCracken S., Hadfield K., Rahimi Z., Gallery E. y Morris J.** (2007). NF- κ B-regulated suppression of T-bet in T cells represses Th1 immune responses in pregnancy. *European Journal of Immunology*, 37(5): 1386-1396.
- **Medeiros L., Peracoli J., Romao M., Bannwart-Castro C., Golim M., Borges V. y Peracoli M.** (2012). PP064. M1 Monocyte subpopulation is associated with pro-inflammatory cytokine production in pregnant women with preeclampsia. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, 2(3): 276-277.
- **Mendoza Patiño N** (2008). *Farmacología médica*. Buenos Aires: Editorial MedicaPanamericana, pp. 422.
- **Menon R., Lombardi SJ. y Fortunato SJ.**(2002). TNF- α promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 19(4): 201-204.
- **Menon R., Peltier M., Eckardt J. y Fortunato S.** (2009). Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 201(3): 306
- **Mihaela M., Susman S., Rus-Ciuca D., Mihu. y N, Costin.**(2009). Aspects of placental morphogenesis and angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 50(4): 549-557.

- **Miller L. y Hunt J.** (1997). TNF- α production is reduced and I κ B α mRNA synthesis is enhanced by LPS-activated mouse macrophages exposed to progesterone in vitro. *Journal of Reproductive Immunology*, 34(1): 84-85.
- **Moffett-King A.** (2002). Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*, 2(12): 975-975.
- **Moore J., Shi Y., Othoro C., Nahlen B., Lal A. y Udhayakumar V.** (2003). Comparative Flow Cytometric Analysis of Term Placental Intervillous and Peripheral Blood from Immediate Postpartum Women in Western Kenya. *Placenta*, 24(7): 779-785.
- **Mor, G.** (2006). *Immunology of pregnancy*. Georgetown, Tex. pp.
- **Morales P., Pace J., Platt J., Phillips T., Morgan K., Fazleabas A. y Hunt J.** (2003). Placental Cell Expression of HLA-G2 Isoforms Is Limited to the Invasive Trophoblast Phenotype. *The Journal of Immunology*, 171(11): 6215-6224.
- **Moussa M., Mognetti B., Dubanchet S., Menu E., Chaouat G., Barre-sinoussi F., Mognetti B., Roques P. y Dormont D.** (2001). Expression of beta Chemokines in Explants and Trophoblasts from Early and Term Human Placentae. *Am J Reprod Immunol*, 46(5): 309-317.
- **Muzzio D., Zygmunt M. y Jensen F.** (2014). The Role of Pregnancy-Associated Hormones in the Development and Function of Regulatory B Cells. *Frontiers In Endocrinology*, 5.
- **Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Roperro, A. y Quesada, I.** (2009). The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *The Journal Of Physiology*, 587(21): 5031-5037.
- **Oner C., Schatz F., Kizilay G., Murk, W., Buchwalder L., Kayisli U., Arici A. y Lockwood C.** (2008). Progesterone-Inflammatory Cytokine Interactions Affect Matrix Metalloproteinase-1 and -3 Expression in Term Decidual Cells: Implications for Treatment of Chorioamnionitis-Induced Preterm Delivery. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(1): 252-259.

- **Pavón L., Jimenez M. y Garces M.** (2016). *Inmunología Molecular, Celular y Traslacional*. Mexico. Ed. Wolters-Kluwer.
- **Peltier M., Faux D., Hamblin S., Silver R. y Esplin M.** (2010). Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells of women with a history of preterm birth. *Journal of Reproductive Immunology*, 84(1): 111-116.
- **Peltier M., Tee S. y Smulian J.** (2008). ORIGINAL ARTICLE: Effect of Progesterone on Proinflammatory Cytokine Production by Monocytes Stimulated with Pathogens Associated with Preterm birth. *American Journal of Reproductive Immunology*, 60(4): 346-353.
- **Piccinni M.** (2006). T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. *Reproductive Biomedicine Online*, 13(6): 840-844.
- **Pineda-Torres M., Flores-Espinosa P., Espejel-Nunez A., Estrada-Gutierrez G., Flores-Pliego A., Maida-Claros R. y Zaga-Clavellina V.** (2014). Evidence of an immunosuppressive effect of progesterone upon in vitro secretion of proinflammatory and prodegradative factors in a model of choriodecidual infection. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 122(13): 1798-1807.
- **Pirog K., Stabinsky, Y. y Goldman R.** (2010). Cytokine index. Rocky Hill, N.J.: PeptoTech. p.p. 134.
- **Raffetto, J., & Khalil, R.** (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 75(2): 346-359.
- **Raghupathy R., Al Mutawa E., Makhseed M., Al-Azemi M. y Azizieh F.** (2007). Redirection of Cytokine Production By Lymphocytes From Women with Pre-Term Delivery By Dydrogesterone. *Am J Reprod Immunol*, 58(1): 31-38.
- **Raghupathy R., Al Mutawa E., Makhseed M., Azizieh F. y Szekeres-Bartho J.** (2005a). Modulation of cytokine production by dydrogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 112(8): 1096-1101.

- **Raghupathy R., Al Mutawa E., Makhseed M., Azizieh F. y Szekeres-Bartho J.** (2005b). Modulation of cytokine production by dydrogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 112(8): 1096-1101.
- **Raghupathy R., Al-Mutawa E., Al-Azemi M., Makhseed M., Azizieh F. y Szekeres-Bartho J.** (2009). Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *Journal of Reproductive Immunology*, 80(1-2): 91-99.
- **Rahardjo B., Widjajanto E., Sujuti H. y Keman K.** (2014). Different levels of IL-1 α , IL-6, TNF- α , NF- κ B and PPAR- γ in monocyte cultures exposed by plasma preeclampsia and normotensive pregnancy. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, 4(3): 187-193.
- **Reisenberger K., Egarter C., Knöfler M., Schiebela I., Gregor H., Hirschl A., Heinze G. y Husslein P.** (1998). Cytokine and prostaglandin production by amnion cells in response to the addition of different bacteria. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 178(1): 50-53.
- **Romero R., Brody D. y Oyarzun E.** (1989). Infection and labor. III. Interleukin-1: A signal for the onset of parturition. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 160: 1117-1123.
- **Romero R., Ceska M., Avila C., Mazor M., Behnke E. y Lindley I.** (1991). Neutrophil attractant/activating peptide-1 / interleukin-8 in term and preterm parturition. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 165(4): 813-820.
- **Romero R., Gomez R., Galasso M., Munoz H., Acosta L., Yoon B., Svinarich D. y Cotton D.** (1994). Macrophage Inflammatory Protein-1 α in Term and Preterm Parturition: Effect of Microbial Invasion of the Amniotic Cavity. *American Journal of Reproductive Immunology*, 32(2): 108-113.

- **Romero R., Mazor M., Brandt F., Sepulveda W., Avila C., Cotton D. y Dinarello C.** (1992). Interleukin-1 α and Interleukin-1 β in Preterm and Term Human Parturition. *American Journal of Reproductive Immunology*, 27(3-4): 117-123.
- **Romero R., Yoon B., Mazor M., Gomez R., Diamond M., Kenney J., Ramirez M., Fidel P., Sorokin Y., Cotton D. y Sehgal P.** (1993a). The diagnostic and prognostic value of amniotic fluid white blood cell count, glucose, interleukin-6, and Gram stain in patients with preterm labor and intact membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 169(4): 805-816.
- **Romero R., Yoon B., Mazor M., Gomez R., Gonzalez R., Diamond M., Baumann P., Araneda H., Kenney J., Cotton D. y Sehgal P.** (1993b). A comparative study of the diagnostic performance of amniotic fluid glucose, white blood cell count, interleukin-6, and Gram stain in the detection of microbial invasion in patients with preterm premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 169(4): 839-851.
- **Roussev R., Higgins N. y McIntyre J.** (1993). Phenotypic characterization of normal human placental mononuclear cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 25(1): 15-29.
- **Sadowsky D., Adams K., Gravett M., Witkin S. y Novy M.** (2006). Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(6): 1578-1589.
- **Saini S., Arora S., Yadav A. y Bhattacharjee J.** (2011). Cytokines in recurrent pregnancy loss. *Clinical Chimica Acta*, 412: 702-708.
- **Saito S., Kasahara T., Kato Y., Ishihara Y. y Ichijo M.** (1993). Elevation of amniotic fluid interleukin 6 (IL-6), IL-8 and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term and preterm parturition. *Cytokine*, 5(1): 81-88.
- **Saito S., Kasahara T., Sakakura S., Umekage H., Harada, N. y Ichijo, M.** (1994). Detection and localization of interleukin-8 mRNA and protein in human placenta and decidua tissues. *Journal of Reproductive Immunology*, 27(3): 161-172.

- **Saito S., Tsukaguchi N., Hasegawa T., Michimata T., Tsuda H. y Narita N.** (1999). Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 Cell Ratios in Human Peripheral and Endometrial T Cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, 42(4): 240-245.
- **Sentman C., Meadows S., Wira C. y Eriksson M.** (2004). Recruitment of Uterine NK Cells: Induction of CXC Chemokine Ligands 10 and 11 in Human Endometrium by Estradiol and Progesterone. *The Journal of Immunology*, 173(11): 6760-6766.
- **Sherry B., Espinoza M., Manogue KR. y Cerami A.** (1998). Induction of the chemokine beta peptides, MIP-1 alpha and MIP-1 beta, by lipopolysaccharide is differentially regulated by immunomodulatory cytokines gamma-IFN, IL-10, IL-4, and TGF-beta. *Molecular Medicine*. 4(10): 648-657.
- **Shields A., Wright J., Paonessa D., Gotkin, J., Howard B., Hoeldtke N. y Napolitano P.** (2005). Progesterone modulation of inflammatory cytokine production in a fetoplacental artery explant model. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 193(3): 1144-1148.
- **Shimoya K.** (1992). Human placenta constitutively produces interleukin-8 during pregnancy and enhances its production in intrauterine infection. *Biology of Reproduction*, 47(2): 220-226.
- **Simpson K.** (1998). Labor-Associated Changes in Interleukin-10 Production and Its Regulation by Immunomodulators in Human Choriondecidua. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(12): 4332-4337.
- **Sood R., Zehnder J., Druzin M. y Brown, P.** (2006). Gene expression patterns in human placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(14): 5478-5483.
- **Sorokin Y., Romero R., Mele L., Wapner R., Iams J., Dudley D., Spong C., Peaceman A., Leveno K., Harper M., Caritis S., Miodovnik M., Mercer B., Thorp J., O'Sullivan M., Ramin S., Carpenter M., Rouse D. y Sibai B.** (2010). Maternal Serum Interleukin-6, C-Reactive Protein, and Matrix Metalloproteinase-9

Concentrations as Risk Factors for Preterm Birth <32 Weeks and Adverse Neonatal Outcomes. *Amer J Perinatol*, 27(08): 631-640.

- **Stearns ME., Wang M. y Stearns M.** (1995). IL-10 blocks collagen IV invasion by "invasion stimulating factor" activated PC-3 ML cells: upregulation of TIMP-1 expression. *Oncology Research*. 7(3-4). pp. 157-163.
- **Sykes L., MacIntyre D., Yap X., Teoh T., y Bennett P.** (2012). The Th1:Th2 Dichotomy of Pregnancy and Preterm Labour. *Mediators Of Inflammation*, 2012, 1-12.
- **Tatad A., NesinM., Peoples J., Cheung S., Lin H., Sison C., Perlman, J. y Cunningham-Rundles S.** (2008). Cytokine Expression in Response to Bacterial Antigens in Preterm and Term Infant Cord Blood Monocytes. *Neonatology*, 94(1), pp.8-15.
- **Thellin O.** (2003). Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicology*, 185(3), 179-184.
- **Thellin O., Coumans B., Zorzi W., Igout A. y Heinen E.** (2000). Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Current Opinion In Immunology*, 12(6), 731-737.
- **Thiex N., Chames M. y Loch-Carusio R.** (2009). Tissue-specific cytokine release from human extra-placental membranes stimulated by lipopolysaccharide in a two-compartment tissue culture system. *ReprodBiolEndocrinol*, 7(1): 117.
- **Thomas P., Pang Y. y Dong J.** (2014). Enhancement of Cell Surface Expression and Receptor Functions of Membrane Progesterin Receptor α (mPR α) by Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1): Evidence for a Role of PGRMC1 as an Adaptor Protein for Steroid Receptors. *Endocrinology*, 155(3): 1107-1119.
- **Trautman M.** (1997). Expression of Interleukin-10 in Human Gestational Tissues. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 4(5): 247-253.
- **Vega-Sanchez R., Gomez-Lopez N., Flores-Pliego A., Clemente-Galvan S., Estrada-Gutierrez G., y Zentella-Dehesa A.** (2010). Placental blood leukocytes

are functional and phenotypically different than peripheral leukocytes during human labor. *Journal Of Reproductive Immunology*, 84(1): 100-110.

- **Vidaeff A., Ramin S., Gilstrap L., Bishop K. y Alcorn J.** (2007). Impact of progesterone on cytokine-stimulated nuclear factor-kappaB signaling in HeLa cells. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 20(1): 23-28.
- **Wagner J., Hustin J., Bonno M., Kephart G., Gurian K. y Gleich G.** (1994). Pregnancy-associated major basic protein: Deposition of protein and expression of mRNA at the maternal-fetal junction in early and late gestation. *Placenta*, 15(6): 625-640.
- **Wasmoen T.** (1989). Evidence of eosinophil granule major basic protein in human placenta. *Journal of Experimental Medicine*, 170(6): 2051-2063.
- **Wasmoen T., Coulam C., Leiferman K. y Gleich G.** (1987). Increases of plasma eosinophil major basic protein levels late in pregnancy predict onset of labor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(9): 3029-3032.
- **Wenstrom K., Andrews W., Hauth J., Goldenberg R., DuBard M. y Cliver S.** (1998). Elevated second-trimester amniotic fluid interleukin-6 levels predict preterm delivery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 178(3): 546-550.
- **Zaga V., Estrada-Gutierrez G, Beltran-Montoya J, Maida-Claros P, Lopez-Vancell R. y Vadillo Ortega F.** (2004). Secretions of Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or choriodecidua with lipopolysaccharides or group B streptococci. *BiolReprod.* 71:1296-302.
- **Zaga-Clavellina V., Garcia-Lopez G., Flores-Herrera H., Espejel-Nunez A., Flores-Pliego A., Soriano-Becerril D., Maida-Claros R., Merchant-Larios H. y Vadillo-Ortega F.** (2007). 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. *ReprodBiolEndocrinol*, 5(1): 46.