



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Caracterización del microambiente coriodecidual en el  
trabajo de parto humano.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

YASSER EMMANUEL REYES MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. NOEMÍ MERAZ CRUZ  
2017

CD.MX.



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.

*A mis padres, Marina y Antonio  
y a mis hermanos, Quique, Alan y Andrea.*

## Agradecimientos

Agradezco el invaluable apoyo y sobre todo la paciencia infinita que me brindó mi tutora la Dra. Noemí Meraz Cruz para planear, realizar, corregir y concluir ésta tesis. Además de brindarme un espacio dentro de su equipo de trabajo y el acceso a los medios y materiales necesarios para los experimentos requeridos.

También quiero agradecer a la Dra. Berenice Palacios Gonzalez por sus valiosísimos comentarios y críticas, además de las clases y lecciones que me brindó de manera desinteresada y amable.

Así mismo, agradezco la confianza brindada por el Dr. Felipe Vadillo Ortega para permitir que haya formado parte del Laboratorio de vinculación científica UNAM-INMEGEN durante el tiempo en el que se llevo a cabo éste trabajo de tesis.

De igual manera, quiero agradecer a la Biol. Miriam Karina García Cid por el trabajo realizado de manera conjunta y el tiempo dedicado para compartir y discutir los resultados obtenidos. Éste trabajo no hubiera sido posible sin su valiosa participación.

Y de la FES Iztacala, agradezco en especial a *Ere* y a *Karla*. Gracias por hacer de los años en la carrera, los mejores de mi vida. Finalmente, gracias *Azucena*, tu amistad me ayudó antes del tiempo mismo.

# Índice general

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
1.1. Tejidos involucrados en el trabajo de parto. . . . .	3
1.1.1. El miometrio. . . . .	3
1.1.2. El cérvix. . . . .	3
1.1.3. Las membranas fetales y el espacio coriodecidual. . . . .	3
1.1.4. El embarazo y la respuesta inmune. . . . .	4
1.1.5. Las citocinas. . . . .	4
<b>2. Objetivo</b>	<b>6</b>
<b>3. Material y métodos</b>	<b>7</b>
3.1. Muestras biológicas. . . . .	7
3.2. Metodología. . . . .	7
3.2.1. Preparación de membranas fetales. . . . .	7
3.2.2. Aislamiento de células. . . . .	7
3.2.3. Grupos de estudio. . . . .	9
3.2.4. Colecta de medios de cultivo. . . . .	10
3.2.5. Preparación de las células para citometría de flujo. . . . .	10
3.2.6. Cuantificación de citocinas. . . . .	10
3.3. Análisis estadísticos. . . . .	11
<b>4. Resultados</b>	<b>12</b>
4.1. Morfología celular. . . . .	12
4.2. Rendimiento celular. . . . .	12
4.3. Citometría de flujo. . . . .	12
4.4. Cuantificación de citocinas. . . . .	14
4.5. Análisis de componentes principales. . . . .	14
4.6. Comparación entre tiempos de cultivo. . . . .	16

4.7. Producción de citocinas a las 48 horas. . . . .	17
4.8. Comparación entre medianas . . . . .	19
4.9. Análisis de componentes principales entre grupos celulares . . . . .	19
<b>5. Discusión</b>	<b>22</b>
<b>6. Conclusión</b>	<b>29</b>
<b>7. Referencias</b>	<b>30</b>
<b>A. Apéndice</b>	<b>32</b>
A.1. Preparación de las citocinas para el análisis por Multiplex . . . . .	32
A.1.1. Preparación de las soluciones . . . . .	32
A.1.2. Preparación de las perlas magnéticas . . . . .	32
A.1.3. Preparación de la curva estándar de citocinas . . . . .	32
A.1.4. Procedimiento de inmunoensayo . . . . .	32
<b>Abreviaturas</b>	<b>34</b>

## Índice de figuras

1.1. Etapas del parto humano . . . . .	2
3.1. Limpieza de las membranas fetales . . . . .	8
3.2. Raspado de las membranas . . . . .	8
4.1. Fotografía con microscopía óptica de las células colectadas de las membranas fetales . . . . .	13
4.2. Detalle de las células suspendidas . . . . .	13
4.3. Comparación de la producción de citocinas a las 24 y 48 h de cultivo mediante ACP . . . . .	16
4.4. Perfil de citocinas extraído mediante ACP . . . . .	18
4.5. Comparación de medianas de la producción de citocinas entre los tres grupos celulares . . . . .	20
4.6. Análisis de componentes principales en los tres grupos celulares . . . . .	21
5.1. Modelo . . . . .	27

## **Índice de tablas**

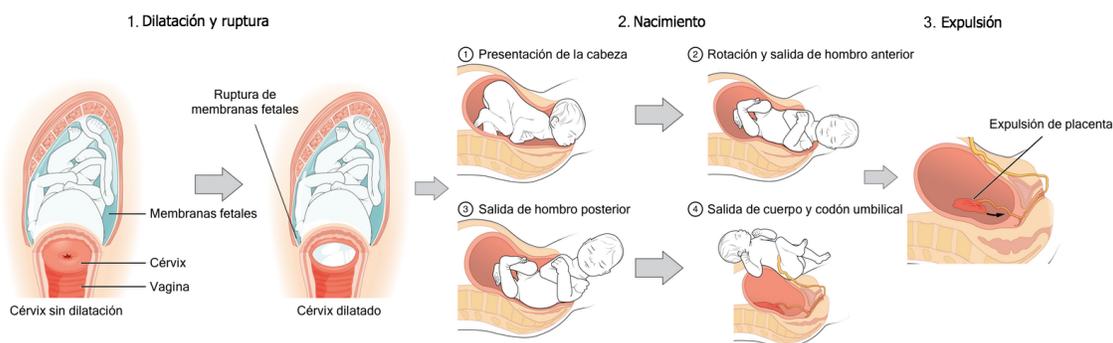
- 4.1. Composición porcentual de la población de células coriodeciudales . . . . . 14
- 4.2. Concentraciones de citocinas en pg/ml en los medios de cultivo a las 48 horas 15

## Resumen

Se ha propuesto que la ruptura de las membranas fetales durante el trabajo de parto humano requiere de una red de señalización celular que desencadena la secreción y activación de diferentes células hematopoyéticas en el microambiente coriodecidual. Estas células son capaces de producir citocinas que afectan el comportamiento de células hematopoyéticas vecinas promoviendo proliferación, maduración, migración, diferenciación y activación celular. Además, de producir y/o inducir la secreción de metaloproteinasas de matriz extracelular. El objetivo de este trabajo fue caracterizar a los diferentes tipos celulares que arriban en torno al trabajo de parto alojándose en el espacio coriodecidual, a través de la identificación por citometría de flujo y la realización de perfiles de secreción de diferentes citocinas. Para lo cual se aislaron células del microambiente coriodecidual, se identificaron y realizaron cultivos primarios de las poblaciones celulares. Diferenciándose en dos grupos. El grupo 1, se conformó por células que se precipitaron y se adhirieron a la superficie de las placas de cultivo; mientras que el grupo 2 se formó por las células que quedaron suspendidas en el medio de cultivo. Para analizar el perfil de secreción de citocinas, se incluyó un grupo más, donde se mantuvieron a las células juntas (tanto adheridas como en suspensión). Los tres grupos se cultivaron por 24 y 48 horas. Los datos obtenidos por citometría de flujo mostraron que las células que predominan en el microambiente coriodecidual son linfocitos CD3<sup>+</sup>, seguidos por CD14<sup>+</sup> y CD56<sup>+</sup>. Los perfiles de secreción de citocinas mostraron en los tres grupos de células que IL-6, TNF $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  se secretaron en mayor cantidad. Mientras que la IL-1 $\alpha$ , IL-4 e IL-10 tuvieron concentraciones muy bajas. Finalmente, dentro de las citocinas quimiotácticas la IL-8 fue la más abundante. Los resultados sugieren que al término de la gestación existe un reclutamiento específico de linfocitos que secretaron principalmente citocinas proinflamatorias, las cuales pueden ser las responsables del desenlace del trabajo de parto humano.

# 1 Introducción

El tiempo de gestación en el ser humano tiene una duración normal de 37 semanas, al término de este periodo se inicia una serie de cambios estructurales en los tejidos gestacionales denominados Trabajo de Parto (TP); este término se refiere a la secuencia de eventos sincronizados en los que intervienen al menos tres tejidos efectores uterinos distintos: el miometrio, el cérvix y las membranas corioamnióticas. Así como también distintos mecanismos fisiológicos, bioquímicos, endocrinológicos e inmunológicos (Ibrahim *et al.*, 2015). Aunque los detalles de dichos mecanismos no se conocen con exactitud se sabe que una vez concluido el período gestacional y con las primeras contracciones perceptibles de TP, la actividad uterina comienza a presentarse con mayor regularidad, intensidad y frecuencia, siendo capaz de inducir la activación y secreción de mediadores que de forma autocrina y/o paracrina, estimulan y activan al cérvix y a las membranas corioamnióticas. Todo esto desemboca en la dilatación cervical, el rompimiento de las membranas fetales, el nacimiento y la expulsión de la placenta (figura 1.1).



**Figura 1.1:** El TP inicia con la dilatación del cérvix y la ruptura de las membranas fetales (1) las cuales permiten la salida del recién nacido (2) y finalmente la expulsión de la placenta (3).

## 1.1 Tejidos involucrados en el trabajo de parto.

### 1.1.1 El miometrio.

Es la capa de tejido intermedia existente entre el endometrio y el peritoneo. Su función principal es la coordinación de las contracciones musculares durante todo el periodo de gestación. La actividad del miometrio durante el embarazo presenta cuatro fases:

Quiescencia: estado de latencia en que se encuentra el tejido uterino desde el inicio del embarazo hasta antes del TP. La característica de esta etapa es, la presencia de actividad uterina esporádica, irregular y de mínima intensidad.

Activación: fase en la que se inducen los cambios bioquímicos y el patrón de actividad miometrial.

Estimulación: durante esta fase la estimulación de la actividad uterina sigue en aumento y el ritmo de las contracciones se realiza con mayor regularidad logrando la coordinación con los cambios en el cérvix y las membranas corioamnióticas, a manera de retroalimentación positiva para inducir el TP y generar los cambios estructurales necesarios.

Y finalmente, la involución. Fase en donde el útero comienza la regeneración uterina para regresar a su estado de no gravidez (St. Louis *et al.*, 2016).

### 1.1.2 El cérvix.

Es un órgano heterogéneo que funciona como una válvula, es responsable de mantener al feto dentro del útero hasta el final de la gestación y forma una barrera de protección contra la invasión de microorganismos de la vagina hacia el útero. Durante el TP el cérvix se dilata para permitir el paso del producto hacia el mundo exterior por vía vaginal (Word *et al.*, 2007). El cérvix se compone principalmente de tejido conectivo fibroso; compuesto de una matriz extracelular que consta fundamentalmente de colágena, elastina y proteoglicanos; la porción celular se compone de músculo liso, fibroblastos, epitelio, y vasos sanguíneos (Timmons *et al.*, 2010).

### 1.1.3 Las membranas fetales y el espacio coriodecidual.

Las membranas fetales están conformadas por dos tejidos diferentes: el amnios y el corion, los cuales forman una unidad estructural y funcional. Ambos tejidos están constituidos de diferentes tipos celulares tales como células epiteliales, inmunológicas y de tro-

foblastos, embebidos en una matriz extracelular en donde el mayor constituyente es la colágena.

A lo largo del período gestacional, este tejido presenta una gran elasticidad, siendo capaz de soportar la presión intramniótica así como los movimientos fetales sin que se presente algún cambio físico estructural, sin embargo, una vez avanzado el TP, se ha documentado que existe pérdida de esa fuerza ténsil, debido al aumento en la degradación de varios de los componentes de la matriz extracelular (principalmente de los diferentes tipos de colágenas), generando con ello la ruptura de membranas

El área de contacto entre las membranas corioamnióticas y la decidua parietal forma una frontera entre el sistema inmune de la madre y los tejidos fetales. En este espacio se forma un micro ambiente influenciado por la actividad de distintos grupos celulares del sistema inmune, los cuales se encargan de iniciar, cambiar o mantener las distintas respuestas inmunológicas necesarias para el desarrollo del embarazo (Kalkunte *et al.*, 2011).

#### 1.1.4 El embarazo y la respuesta inmune.

Durante la implantación y placentación temprana la respuesta inmune materna tiene asociada una respuesta pro inflamatoria. En esta etapa del embarazo, el comportamiento del sistema inmune materno se asemeja al que ocurriría en una herida abierta, ya que en ese momento el blastocisto tiene que abrirse paso a través del epitelio del útero dañando el tejido del endometrio, además de reemplazar el tejido vascular del endotelio para poder implantarse y asegurarse un flujo constante de sangre. Es necesario que exista esta respuesta pro inflamatoria para poder reparar el epitelio uterino y remover células muertas. La segunda fase del embarazo representa un momento de estabilidad y rápido desarrollo del feto, en donde el comportamiento de sistema inmune materno está regulado por la producción de citocinas anti inflamatorias. Finalmente, durante el último trimestre, el desarrollo fetal se completa y se estimula un ambiente predominantemente inflamatorio. Este ambiente promueve las contracciones uterinas, la expulsión del infante y el rechazo de la placenta (Mor *et al.*, 2010).

#### 1.1.5 Las citocinas.

Las citocinas son un grupo complejo y pleiotrópico de proteínas que funcionan como mensajeros moleculares, las cuales afectan el comportamiento de las células hemato-

poyéticas promoviendo la proliferación, maduración, migración, diferenciación y activación celular (Chau *et al.*, 2016).

Estos mensajeros se han relacionado de manera estrecha con la gestación, ya que los mecanismos asociados a la inflamación se han propuesto como parte inicial del TP. Dichos mecanismos conllevan el arribo de células del sistema inmunológico a los tejidos gestacionales mediante la secreción de citocinas quimiotácticas (Gomez-Lopez *et al.*, 2010).

Así mismo, se ha observado en modelos de ratón que éste ambiente pro inflamatorio y quimiotáctico puede contribuir a la activación de MMPs y por tanto a la ruptura de membranas al final de la gestación (Gomez-Lopez *et al.*, 2010).

## **2 Objetivo**

Caracterizar el tipo de células que infiltran el espacio coriódécidual al finalizar trabajo de parto, así como la secreción de mediadores responsables de la ruptura de las membranas corioamnióticas al término de la gestación.

### 3 Material y métodos

#### 3.1 Muestras biológicas.

Las membranas fetales se obtuvieron de mujeres embarazadas del Hospital Materno Infantil Inguarán de la Secretaría de Salud de la Ciudad de México. Las pacientes fueron informadas y brindaron su consentimiento de participación en el estudio por escrito. Se excluyó a toda paciente que presentara alguna evidencia clínica o microbiológica de infección intrauterina o de alguna otra patología asociada. Y se seleccionaron a aquellas que hubiesen cumplido las 37 semanas de gestación y que no hubiesen tenido embarazos previos. Una vez resuelto el parto. Las membranas fueron colectadas, depositadas en frascos estériles y transportados hacia el laboratorio en un lapso no mayor a una hora.

#### 3.2 Metodología.

##### 3.2.1 Preparación de membranas fetales.

Una vez que las membranas llegaron al laboratorio se procedió a medirlas y a limpiarlas, para lo cual estas se extendieron en una charola quirúrgica en donde fueron lavadas con 300 ml de solución salina estéril (0.9%), procurando eliminar la mayor cantidad de coágulos de sangre. Aquellos coágulos que estuviesen adheridos y que no se pudiesen remover con la solución salina fueron retirados con pinzas quirúrgicas (figura 3.1).

##### 3.2.2 Aislamiento de células.

Para desprender las células adheridas se utilizó un raspador celular (Sarstedt, North Carolina, USA) con el cuál se raspó suavemente (usando únicamente el peso del raspador y sin hacer presión) la superficie coriónica de las membranas (figura 3.2); posteriormente este raspado celular fue lavado con una solución amortiguada de fosfatos PBS© (Gibco, New York, USA). Finalmente, se colocó en tubos estériles de centrifuga de 50 ml (Sarstedt, North Carolina, USA).

Para limpiar de impurezas provenientes de los tejidos fetales, el raspado celular se hizo pasar a través de una membrana de filtración de 30  $\mu\text{m}$  de poro (Milteny Biotech, Cali-



**Figura 3.1:** Las membranas fetales se limpiaron utilizando solución salina (0.9 %) y pinzas quirúrgicas. Se procuró remover la mayor cantidad de coágulos de sangre para evitar la contaminación por eritrocitos.



**Figura 3.2:** La remoción de las células adheridas a la superficie coriónica de las membranas fetales se realizó con un raspador celular. Estos raspados fueron filtrados a través de una membrana de 30  $\mu\text{m}$  de poro y concentrados mediante una centrifugación diferencial.

fornia, USA). El filtrado obtenido se centrifugó a 3,000 rpm, 10 minutos, a temperatura ambiente (TA). El sobrenadante se desechó mientras que el precipitado celular se suspendió nuevamente en 1 ml de PBS.

Este precipitado celular contenía a los grupos de estudio, sin embargo, también contenía otros grupos celulares que pudieron pasar la membrana de filtrado. Así que con el fin de separar a las células del sistema inmune de otros grupos celulares se vertió el precipitado celular sobre 3 ml del gradiente de densidad Lymphoprep© (Axis Shield PoC AS, Oslo, Noruega). Esta mezcla heterogénea se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos a TA. Después de ese tiempo se recuperó únicamente la interface que contenía a las células coriodesiduales.

Las células obtenidas se lavaron en 1 ml de PBS y se centrifugaron a 3,000 rpm, 5 minutos a TA. Se desechó nuevamente el sobrenadante y el precipitado celular se suspendió en 1 ml de medio RPMI-1640© suplementado con antibiótico-antimicótico 1 %, piruvato 1 % y suero fetal inactivado (Sigma Aldrich, Montana, USA).

El conteo se realizó con ayuda de la cámara de Neubauer y la viabilidad se determinó usando azul de tripán. Finalmente, las células se incubaron durante 2 horas en placas de cultivo Costar© (Corning Inc., Corning, New York, USA) de 12 pozos en medio RPMI, a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % aire.

### 3.2.3 Grupos de estudio.

Después de las dos horas de incubación, se observó que las células se separaban en dos grupos. Un grupo se precipitaba al fondo de la botella de cultivo y se adhería; mientras que otro grupo se quedaba flotando libremente en el medio de cultivo. De acuerdo a esto, se tomó la decisión de cultivar por separado cada uno de los grupos formados. El grupo CCDS lo formaron las células que quedaron en el medio de cultivo en suspensión. El grupo CCDA lo formaron aquellas células que se adhirieron al fondo de la botella de cultivo. Además, se decidió tener un grupo control en el que no se separó a los dos tipos celulares (CCDJ). Cada grupo se conformó con  $5 \times 10^5$  células. Y se cultivaron en 500  $\mu$ l de medio de cultivo RPMI en placas de cultivo celular de 24 pozos a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % aire durante 24 y 48 horas. Así mismo se tomaron fotografías de los grupos celulares formados.

### 3.2.4 Colecta de medios de cultivo.

Para cuantificar la producción de citocinas de las células cultivadas, se colectaron los medios de cultivo de las columnas de cada tipo celular a las 24 y 48 horas. Para esto se tomó el contenido de cada pozo y se centrifugó a 8000 rpm x 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrifuga, se etiquetó y se almacenó a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior estudio.

### 3.2.5 Preparación de las células para citometría de flujo.

Se tomaron  $7 \times 10^6$  células de la placa de cultivo del grupo celular CCDS (48 Horas), las cuales se distribuyeron en siete tubos para citometría de flujo,  $1 \times 10^6$  células por tubo. A los seis primeros tubos se les añadió  $20\ \mu\text{l}$  de los siguientes anticuerpos (un solo anticuerpo por tubo):  $\text{CD3}^+$ ,  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$ ,  $\text{CD14}^+$ ,  $\text{CD19}^+$  y  $\text{CD56}^+$  (BioLegend, USA). Al séptimo tubo se le añadió un anticuerpo inespecífico para que sirviera como patrón de conteo. Se les dejó incubar a TA por 20 minutos en oscuridad. Una vez pasado el tiempo de incubación se eliminó el exceso de anticuerpos añadiendo 1 ml de PBS y agitando ligeramente por 1 minuto. Después de esto se centrifugaron los tubos a 3000 rpm x 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se añadieron  $100\ \mu\text{l}$  de paraformaldehído al 4 %. Nuevamente se les dejó incubar por 20 minutos en oscuridad a TA. Transcurrido este tiempo se limpió el exceso de paraformaldehído añadiendo 1 ml de PBS, agitando por 1 minuto y centrifugando a 3000 rpm x 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el concentrado celular se re-suspendió en  $500\ \mu\text{l}$  de PBS. Una vez realizado este paso, las muestras se analizaron con un equipo de la serie BD-FACSCalibur© (Becton, Dickinson and Company) equipado con Cell Quest Pro© como programa de adquisición y análisis de datos.

### 3.2.6 Cuantificación de citocinas.

Las muestras almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  se descongelaron de manera gradual. Primero se pasaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, posteriormente se colocaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  listas para su uso.

El paquete de análisis de citocinas utilizado fue: Millipore MILLIPLEX MAG Human Cytokine Kit© (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). El cual contiene 20 viales con perlas magnéticas que contienen anticuerpos que reconocen a los siguientes analitos: Interleucina 1 alfa ( $\text{IL-1}\alpha$ ), Interleucina 1 beta ( $\text{IL-1}\beta$ ), Interleucina 2 ( $\text{IL-2}$ ), Interleucina 4

(IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 12p40 (IL-12p40), Interleucina 12p70 (IL-12p70), Interleucina 17 (IL-17), Factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), Interferón gamma ( $INF\gamma$ ), Proteína inductora de  $INF\gamma$  (IP-10), Antagonista de Interleucina 1 (IL-1 $\alpha$ ), Receptor soluble de Interleucina 2 (sIL-1 $\alpha$ ), Interleucina 10 (IL-10), Eotaxina (EOTAXIN), Interleucina 8 (IL-8), Proteína quimio atrayente de monocitos 1 (MCP-1), Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ), Proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP-1 $\beta$ ) y Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El procedimiento de preparación del paquete comercial se encuentra detallado en el apéndice A.

### 3.3 Análisis estadísticos.

Inicialmente se realizaron las pruebas de Anderson-Darling y Shapiro-Wilk para comprobar si los datos obtenidos tenían una distribución paramétrica. Con el fin de describir los perfiles de producción de citocinas se realizó un “Análisis de componentes principales” (ACP), el cual comparó las varianzas de los datos obtenidos de la producción de citocinas contra los tipos celulares y los tiempos de cultivo. Dado que esta prueba solamente muestra datos cualitativos se utilizó una prueba de medianas en los componentes principales hallados por el ACP para determinar si existían diferencias significativas.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS v22 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp).

## 4 Resultados

### 4.1 Morfología celular.

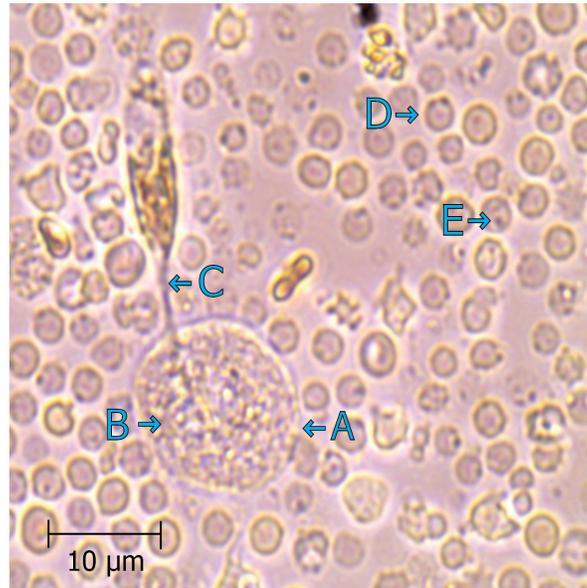
Mediante microscopía óptica se observó que los cultivos celulares no presentaron contaminación de algún tipo, y la cantidad de detritos celulares fue mínima (figura 4.1). Así mismo, se notó que después de las dos horas de incubación las células de mayor tamaño (A) empezaban a sedimentarse y finalmente adherirse al fondo de la placa de cultivo. Estas células presentaban al interior granulocitos (B), y proyecciones de la pared celular (C). Estas proyecciones facilitaban la formación de aglomeraciones de estas células o bien, las unían en largas cadenas. Por otra parte, las células de menor tamaño flotaban libremente en los medios de cultivo (D) no se aglomeraban, aunque también presentaron granulocitos y núcleos excéntricos (E). En la figura 4.2 se muestra un acercamiento a dichas células, en donde se aprecian con mejor detalle los granulocitos (a) y los núcleos (b).

### 4.2 Rendimiento celular.

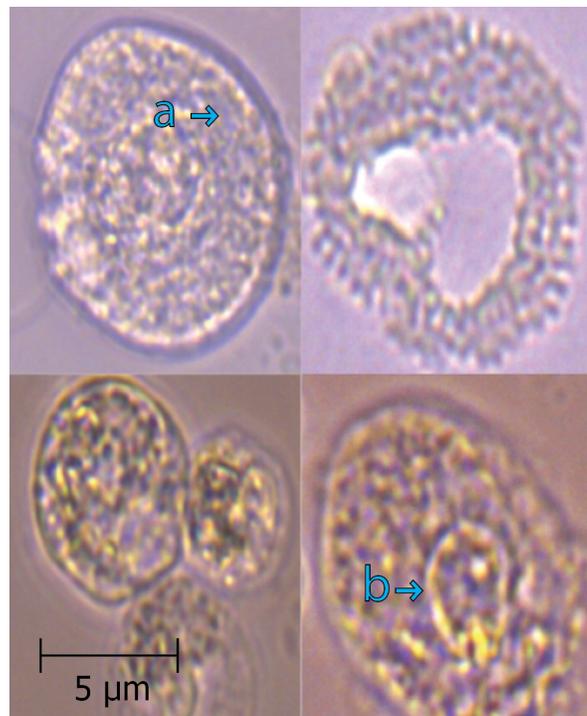
El área de cada una de las membranas fetales fue calculada para obtener el rendimiento celular, el valor que se obtuvo después de la medición en una cámara de Neubauer fue de aproximadamente  $5 \times 10^7$  células extraídas de  $300 \text{ cm}^2$  de membranas fetales. Por otro lado, la viabilidad siempre fue superior al 90 %. El rendimiento obtenido fue constante en las nueve membranas colectadas.

### 4.3 Citometría de flujo.

Después de la observación morfológica por microscopía óptica se caracterizó a las células por citometría de flujo. Para lo cual se tomó al grupo CCDS de 48 horas de cultivo como muestra representativa de la población de células cultivadas (tabla 4.1). La identificación por citometría de flujo mostró de manera cuantitativa que de las  $1 \times 10^6$  células analizadas más del 70 % eran linfocitos T y células NK, El resto estaba compuesto por monocitos y/o macrófagos, y una mínima porción de linfocitos B.



**Figura 4.1:** Población celular colectada de las membranas corioamnióticas incubada por dos horas. Se aprecian dos tipos celulares diferentes; uno de mayor tamaño (A), con granulocitos (B) y proyecciones celulares (C). Y uno de menor tamaño (D), con un núcleo excéntrico (E).



**Figura 4.2:** Acercamiento del grupo celular flotante. El cual presentaba granulocitos (a) en su interior y un núcleo excéntrico (b).

**Tabla 4.1:** Composición porcentual de la población de células coriodesciudales

<b>Tipo celular</b>	<b>Inmunofenotipo</b>	<b>Composición %</b>
Linfocitos T	CD3 <sup>+</sup>	35.80
Linfocitos T	CD4 <sup>+</sup>	11.22
Linfocitos T	CD8 <sup>+</sup>	9.70
Células NK	CD56 <sup>+</sup>	20.30
Monocitos / Macrófagos	CD14 <sup>+</sup>	22.20
Linfocitos B	CD19 <sup>+</sup>	0.78

La citometría de flujo mostró que la mayor proporción de linfocitos T identificados serían timocitos (35.8 %), el 11.2 % linfocitos T colaboradores y un 9.7 % de células citotóxicas T.

#### 4.4 Cuantificación de citocinas.

La cuantificación de por Multiplex mostró que los 20 analitos fueron producidos por los grupos celulares estudiados. La tabla 4.2 muestra las concentraciones de citocinas en los medios de cultivo a las 48 horas, tiempo en el que se detectaron las concentraciones más altas.

#### 4.5 Análisis de componentes principales.

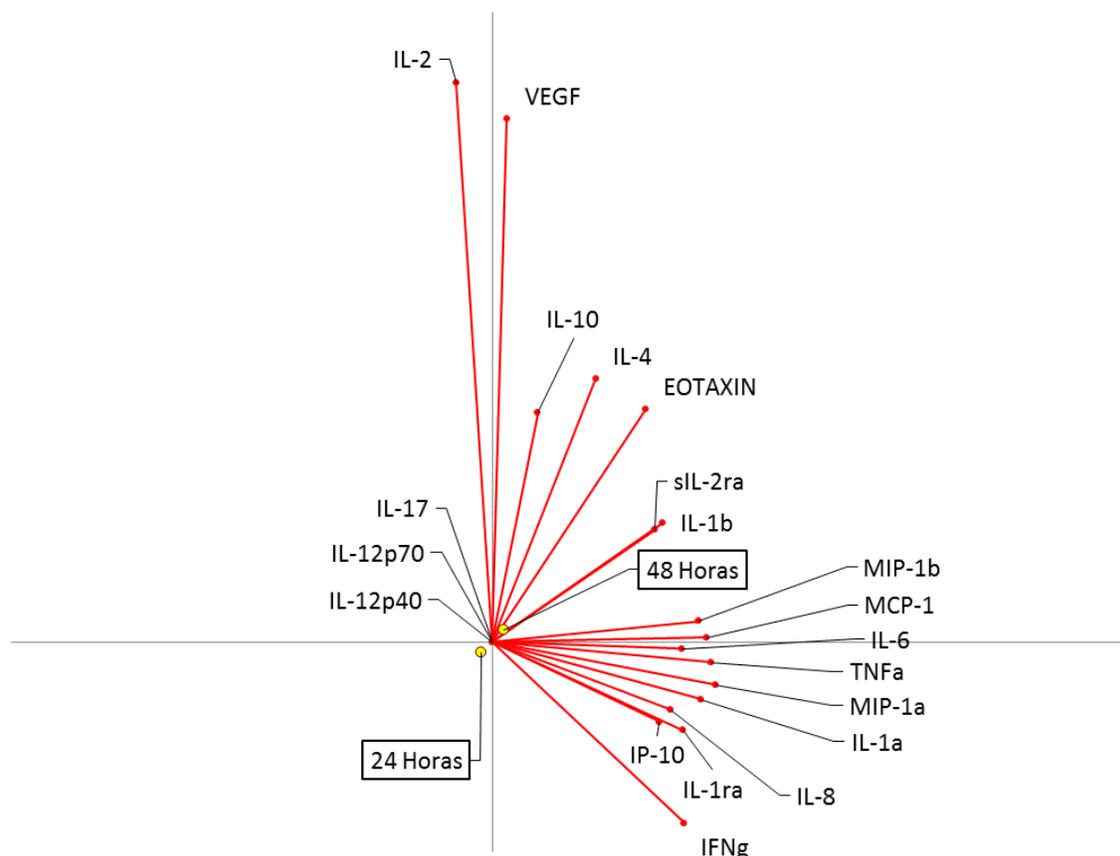
El tener secreción de las citocinas evaluadas en los tres grupos de células estudiados y en cada uno de los tiempos de cultivo, nos llevó a buscar una herramienta estadística de síntesis de la información, que fuese visual y que nos permitiera ante un banco de datos con muchas variables, reducirlas a un número menor, perdiendo la menor información posible. Por ello el análisis de los datos se hizo primeramente por ACP (Análisis de Componentes Principales). Este análisis comparó las correlaciones entre las 20 citocinas cuantificadas y los grupos celulares que se estudiaron, así mismo nos permitió visualizar si existían diferencias entre cada una de las mediciones realizadas a las 24 y 48 horas de cultivo.

**Tabla 4.2:** Concentraciones de citocinas en pg/ml en los medios de cultivo a las 48 horas

	<b>Citocinas</b>	<b>CCDJ (pg/ml)</b>	<b>CCDS (pg/ml)</b>	<b>CCDA (pg/ml)</b>
Pro inflamatorias	IL-1 $\alpha$	34.62 $\pm$ 44.04	10.32 $\pm$ 8.52	14.58 $\pm$ 17.42
	IL-1 $\beta$	3.65 $\pm$ 3.27	0.98 $\pm$ 0.01	1.17 $\pm$ 0.28
	IL-2	0.82 $\pm$ 0.20	0.63 $\pm$ 0.27	0.9
	* IL-6	4 022.53 $\pm$ 8 594.78	178.48 $\pm$ 164.97	32.54 $\pm$ 40.37
	IL-12p40	0.88 $\pm$ 0.38	0.34 $\pm$ 0.07	0.21 $\pm$ 0.09
	IL-12p70	1.07 $\pm$ 0.62	0.06 $\pm$ 0.9	0.9
	IL-17	0.60	0.60	0.60
	* TNF $\alpha$	288.31 $\pm$ 327.34	38.73 $\pm$ 10.09	58.07 $\pm$ 61.54
	INF $\gamma$	2.38 $\pm$ 2.21	4.17 $\pm$ 3.5	0.76 $\pm$ 0.41
	IP-10	51.05 $\pm$ 76.55	38.97 $\pm$ 19.11	17.99 $\pm$ 0.91
Anti inflamatorias	IL-1r $\alpha$	11.20 $\pm$ 6.41	9.65 $\pm$ 5.27	9.07 $\pm$ 4.96
	IL-4	3.74 $\pm$ 1.08	2.13	1.10 $\pm$ 0.72
	sIL-2r $\alpha$	54.27 $\pm$ 82.3	17.62 $\pm$ 6.57	4.49 $\pm$ 3.66
	IL-10	25.37 $\pm$ 54.07	0.87 $\pm$ 0.13	1.0
Quimiotáticas	* IL-8	23 860.34 $\pm$ 15 617	20 028.08 $\pm$ 5529.19	12 707.24 $\pm$ 7635.03
	Eotaxina	4.90 $\pm$ 3.05	3.9	3.9
	* MCP-1	4 187.98 $\pm$ 4 234.1	711.99 $\pm$ 305.9	972.99 $\pm$ 795.97
	* MIP-1 $\alpha$	1 116.72 $\pm$ 1 236.06	221.68 $\pm$ 116.2	185.9 $\pm$ 176.81
	* MIP-1 $\beta$	228.55 $\pm$ 308.70	77.93 $\pm$ 41.76	73.43 $\pm$ 77.83
	VEGF	29.23 $\pm$ 8.8	24.5 $\pm$ 1.7	19.16 $\pm$ 9.95

\* Las seis citocinas resaltadas son las que tuvieron una concentración superior al resto. De estas, cuatro son citocinas quimiotáticas y dos son pro inflamatorias. La producción de esas citocinas en los grupos CCDS y CCDA nunca sobrepasó al grupo control CCDJ (n=9).

### Comparativa mediante ACP de los tiempos de cultivo de los tres grupos celulares



**Figura 4.3:** La comparativa entre los dos tiempos de cultivo mediante ACP muestra que a las 48 horas existe una mayor variabilidad entre la producción de citocinas.

#### 4.6 Comparación entre tiempos de cultivo.

La comparación realizada durante los dos tiempos de cultivo mostró que a las 48 horas existía una mayor variabilidad en la concentración de citocinas, esto lo podemos observar en la figura 4.3, la cual muestra una tendencia de los vectores hacia este tiempo. Esto no significa que a las 24 horas no hubiese una concentración notoria de citocinas, simplemente señala que el mejor tiempo para poder distinguir los perfiles de secreción de citocinas es a las 48 horas de cultivo. Bajo ese principio, se decidió utilizar la producción de citocinas en ese tiempo de cultivo como la muestra representativa de este estudio.

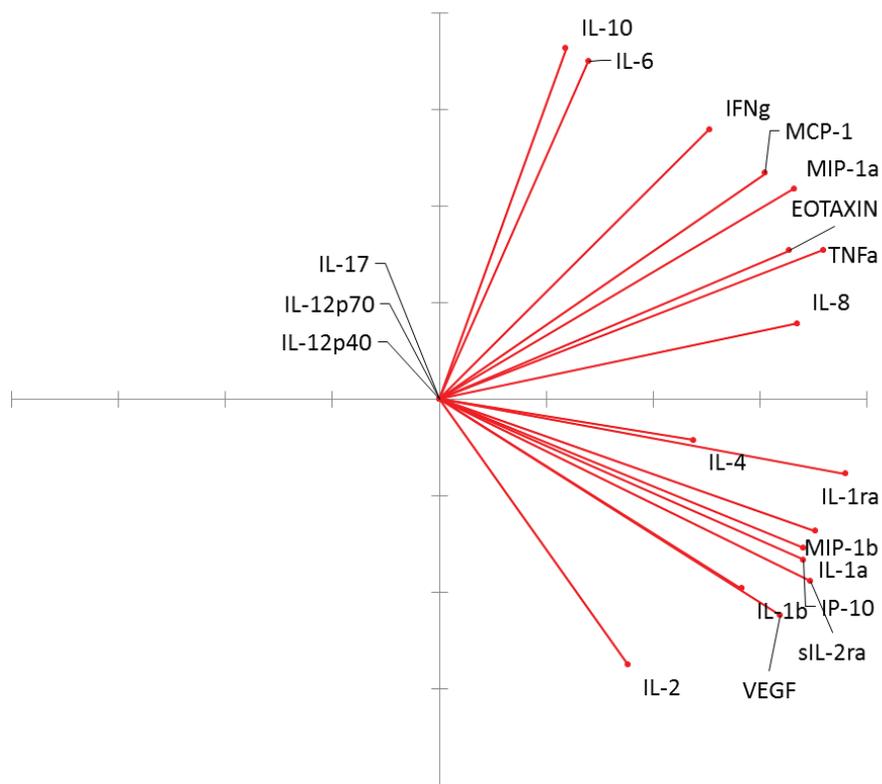
#### 4.7 Producción de citocinas a las 48 horas.

La figura 4.4 muestra 3 paneles. Cada uno mostrando el grupo de células estudiadas. Donde podemos observar que, si bien los tres grupos de células secretan las veinte citocinas, su secreción es diferente. En el ACP, cada vector representa una citocina, observando que tres citocinas: IL-12p40, IL-12p70 e IL-17 son las interleucinas que se secretan en menor cantidad (rango de 0.2 a 3.7 pg/ml) y de manera constante en los tres grupos. Por esta razón se decidió excluirlas de los análisis posteriores.

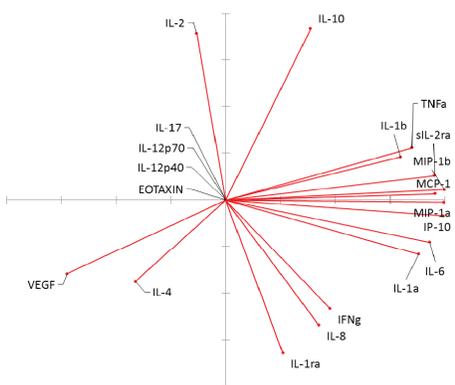
Por otro lado, la secreción de citocinas proinflamatorias por las células CCDJ fue mayor para IL-6 ( $4022.53 \pm 8594.78$  pg/ml), seguida por  $\text{TNF}\alpha$  ( $288 \pm 327.34$  pg/ml) y finalmente IL-1 $\alpha$  ( $34.62 \pm 44.04$  pg/ml). El valor para el resto de las citocinas de este grupo fue inferior a 4 pg/ml. Cuando las células son separadas y cultivadas de forma independiente (CCDS y CCDA), se observó que la concentración obtenida para cada una de ellas en el sobrenadante disminuyó hasta casi la tercera parte. Y la suma en concentración por cada una de ellas, nunca llegó a igualar el valor obtenido de manera conjunta. Lo cual demuestra que estas células requieren de su unión para producir concentraciones elevadas de citocinas proinflamatorias (tabla 4.2)

Así mismo estos datos muestran que las células a las 48 horas de cultivo se encuentran produciendo en su mayoría citocinas de fase pro inflamatoria aguda, a diferencia de la secreción de citocinas anti inflamatorias donde la IL-1 $\alpha$ , la IL-4 y la IL-10 tuvieron concentraciones a las 48 horas de  $11.20 \pm 6.41$  pg/ml,  $3.74 \pm 1.08$  pg/ml y  $25.37 \pm 54.07$  pg/ml respectivamente, viéndose disminuidas hasta en una sexta parte en el resto de los grupos estudiados. Pero, si bien es cierto que existe una producción que parece favorecer un ambiente pro inflamatorio, otras citocinas que tuvieron una mayor secreción fueron las citocinas quimiotácticas (tabla 4.2). En este grupo podemos observar que la IL-8 fue la citocina más abundante ya que tuvo una concentración de  $23860.34 \pm 15617.00$  pg/ml en el grupo CCDJ, manteniendo valores similares en el grupo CCDS y un 50 % menos en el grupo CCDA. Así mismo, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  tuvieron una secreción de  $4187.98 \pm 4234.10$  pg/ml,  $1116.72 \pm 1236.06$  pg/ml y  $228.55 \pm 308.70$  pg/ml respectivamente, en el grupo celular CCDJ a las 48 horas de cultivo. Los datos anteriores muestran que las desviaciones estándar de las medias de producción de citocinas son grandes, en algunos casos son más grandes que las mismas medias.

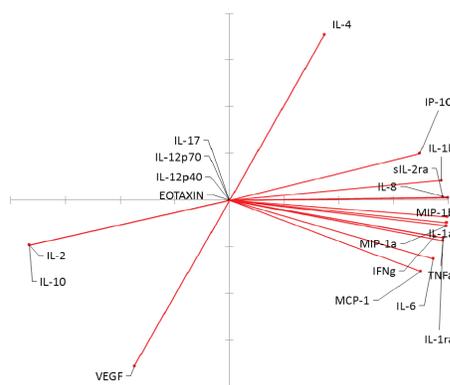
### PERFIL DE CITOCINAS DEL GRUPO CELULAR CCDJ



### PERFIL DE CITOCINAS DEL GRUPO CELULAR CCDS



### PERFIL DE CITOCINAS DEL GRUPO CELULAR CCDA



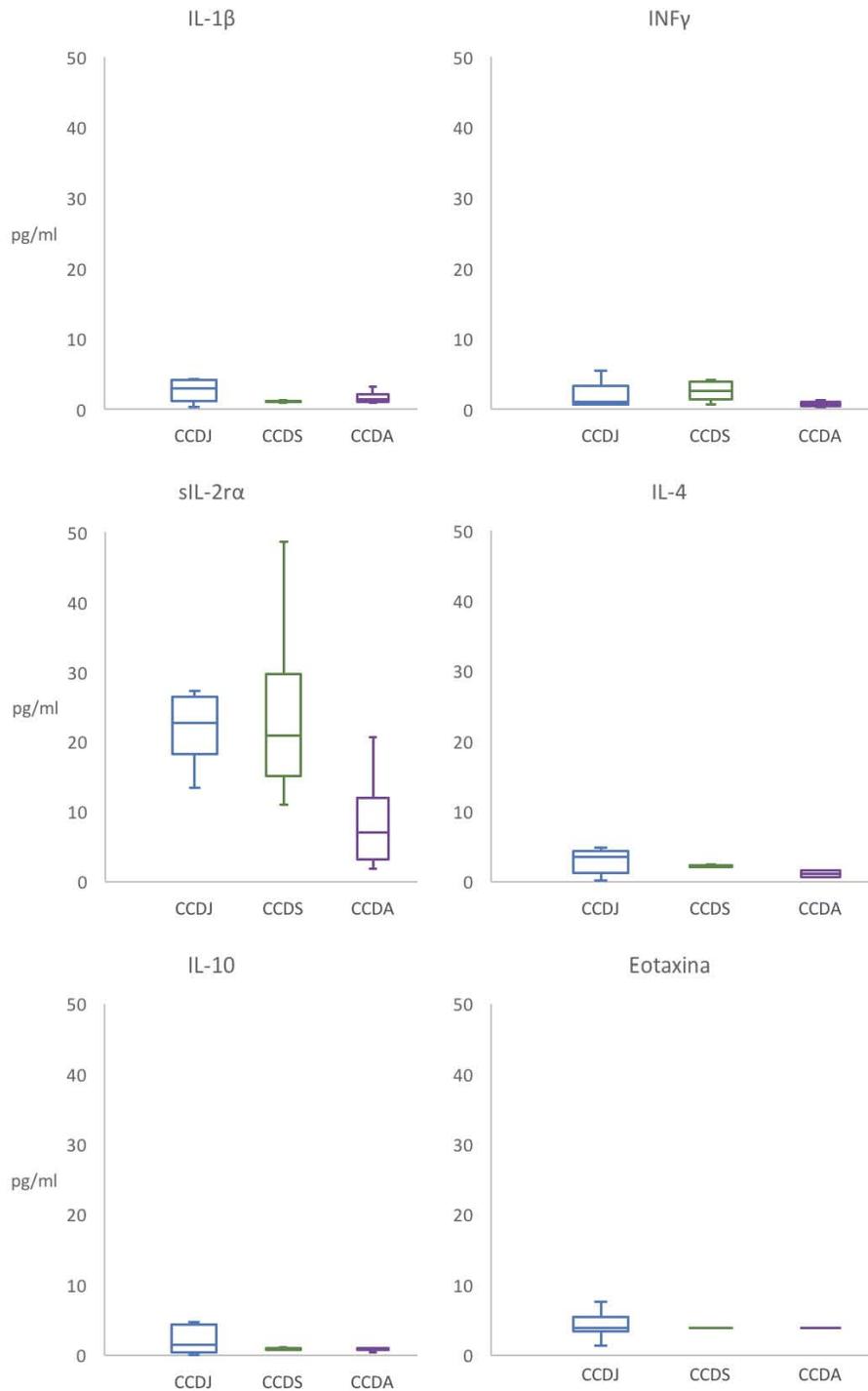
**Figura 4.4:** Perfiles de secreción de citocinas de los tres grupos celulares cultivados. Se puede observar que la IL-17, la IL-12p40 e IL-12p70 tienen vectores que convergen en el origen de los ejes, lo cual indica que sus valores no tienen influencia en la producción del resto de las citocinas (Producción constante y con valores por debajo del umbral de detección). El resto de las citocinas tiene un vector de distinto tamaño y en algunos casos, el vector está en un cuadrante distinto. Lo cual indica que tienen correlaciones positivas (vectores en el mismo cuadrante) o correlaciones negativas (vectores en cuadrantes opuestos).

#### 4.8 Comparación entre medianas

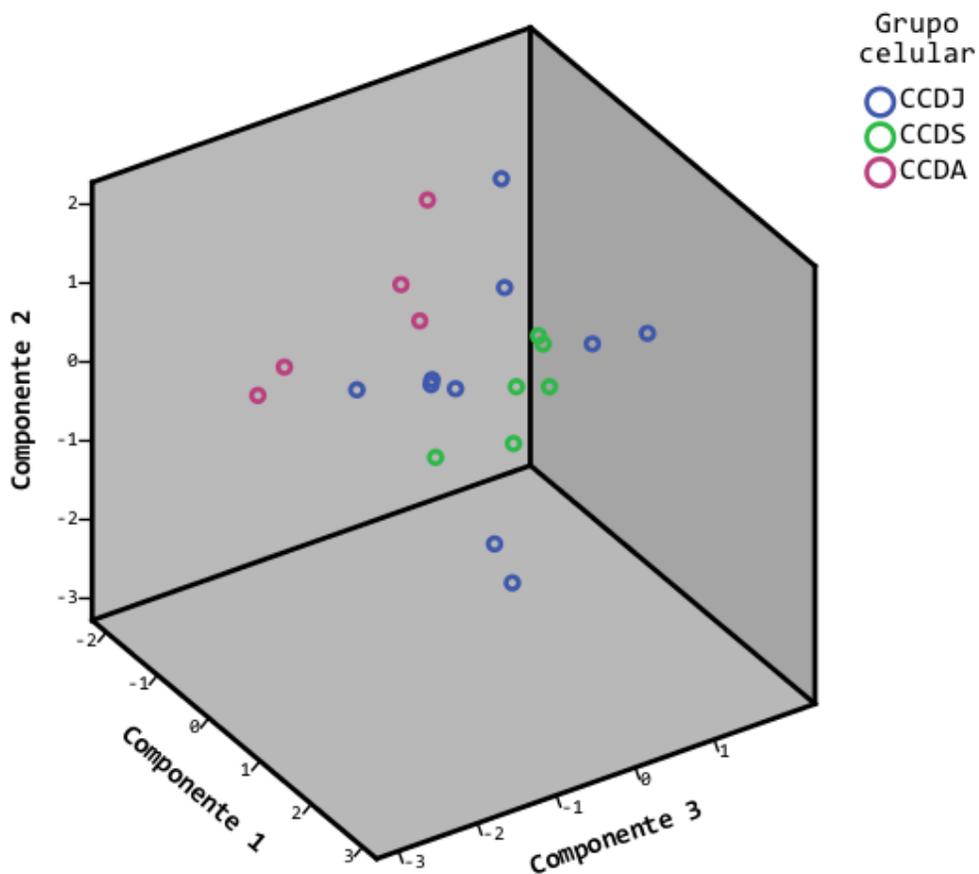
Por lo anterior, en lugar de utilizar una medida de tendencia central basada en los promedios se decidió utilizar una basada en la mediana. Además de esto, se hizo una transformación de los datos que normalizó las varianzas y facilitó la representación gráfica. Este análisis de medianas contempla como hipótesis nula que la mediana de la producción de citocinas es la misma y por tanto proviene de la misma población celular, sin embargo, si existe alguna diferencia en la producción de citocinas se asumirá que las poblaciones son distintas. El análisis de medianas se realizó en la producción de todas las citocinas cuantificadas, exceptuando IL-12p40, IL12-p70 e IL17 que como se mencionó anteriormente tuvieron una concentración baja y sin diferencias entre sí. Este análisis mostró que dentro de las citocinas pro inflamatorias producidas a las 48 horas únicamente IL-1 $\beta$  e INF $\gamma$  mostraron diferencias significativas en los tres grupos celulares. Así mismo en el grupo de citocinas anti inflamatorias sIL-2r $\alpha$ , IL-4 e IL-10 fueron las citocinas que mostraron diferencias significativas en la mediana de su producción. Finalmente, la única citocina quimiotáctica que tuvo una diferencia significativa en los tres grupos fue la Eotaxina (figura 4.5).

#### 4.9 Análisis de componentes principales entre grupos celulares

Ahora bien, para representar de una manera visual las diferencias y similitudes encontradas en los análisis realizados anteriormente se realizó un segundo análisis de componentes principales. En este nuevo ACP se decidió representar la dispersión (varianza) entre cada uno de los experimentos realizados en un espacio tridimensional. Cada eje representa un componente de las varianzas en las mediciones, mientras que los puntos representan una cuantificación realizada a un grupo celular. A mayor diferencia (mayor varianza) entre una y otra medición, más separadas estarán entre sí. Como podemos observar existen diferencias lo suficientemente significativas en la producción de citocinas entre los tres grupos celulares establecidos, sin embargo, el grupo CCDJ y CCDS parecen tener una producción similar ya que las aglomeraciones de los dos grupos se superponen. Así mismo, el grupo CCDS parece tener una producción más homogénea, en comparación de los otros dos grupos.



**Figura 4.5:** El análisis de medianas mostró que la secreción de IL-1 $\beta$ , INF $\gamma$ , sIL-1r $\alpha$ , IL-4, IL-10 y Eotaxina fue significativamente diferente en los tres grupos celulares ( $p=0.05$ ). La mediana esta representada como la línea que divide horizontalmente a los gráficos de caja.



**Figura 4.6:** En éste ACP cada punto representa una medición realizada a un pozo de cultivo. Los ejes representan un componente de las diferencias entre estas mediciones. Se puede distinguir que los grupos CCDJ y CCDS tienden a aglomerarse de manera próxima mientras que el grupo CCDA parece estar separado. Esto significa que la producción de citocinas entre los grupos CCDJ y CCDS tiene un perfil similar.

## 5 Discusión

El mecanismo por el cual se inicia el trabajo de parto es aún desconocido. Sin embargo, ahora sabemos que cuando está próximo a desencadenarse, existe el arribo de diferentes subpoblaciones de leucocitos y la secreción de mediadores que condicionan un microambiente específico en la coriodecidua. La propuesta del papel que desempeña cada una de las células que llega al espacio coriodecidual no ha sido bien identificado. La gran mayoría de trabajos de caracterización del microambiente han sido realizados en modelos animales, particularmente conejos y ratones (St Louis *et al.*, 2016). Sin embargo, sigue siendo poca la información con respecto a lo que sucede en el ser humano. Estudios provenientes de embarazos que finalizaron su curso con infección, muestran la llegada de leucocitos al miometrio, cérvix y a las membranas fetales, y se observa también el aumento en la secreción de citocinas pro inflamatorias como son IL-1, IL-6, IL-8 y  $TNF\alpha$  en estos tejidos durante el trabajo de parto (Holtan *et al.*, 2015 y Hwang *et al.*, 2010).

El objetivo de este trabajo fue realizar el estudio inicial de las células que están infiltradas en los compartimentos fetales y maternos, las cuales son obtenidas después de raspar la parte externa del corion, membrana que está muy cercana a la pared uterina, mostrando a las células que arriban a ese lugar y seguramente las responsables de la secreción de citocinas y otros mediadores involucradas en el mecanismo de ruptura de membranas fetales al momento del trabajo de parto humano. Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron membranas fetales que provinieron de mujeres que llegaron al término del embarazo y que desarrollaron trabajo de parto, representando las condiciones que prevalecen al término de la gestación.

Como podemos observar en las fotografías tomadas por microscopia óptica, las células obtenidas mediante el raspado de la membrana fetal tienen características morfológicas que concuerdan con la descripción de los leucocitos de membranas fetales, con ayuda de citometría de flujo sabemos que están constituidos principalmente por una mezcla de linfocitos T, monocitos y células NK. No se observó presencia de eritrocitos, fibroblastos o células epiteliales. Estos resultados concuerdan con las observaciones reportadas en tejidos reproductivos cercanos a trabajo de parto (Gomez-Lopez *et al.*, 2010).

Respecto a las poblaciones celulares en cultivo, observamos que las células que se adhieren a la superficie de la placa (denominadas CCDA) tuvieron mayor tamaño, en ocasiones presentaban proyecciones citoplasmáticas y parecían promover el reclutamiento de las células circundantes. Este comportamiento de atracción específica de leucocitos hacia la coriodecidua, al término de la gestación “homing”, ha sido reportado en modelos animales (Gomez-Lopez *et al.*, 2010), y esta observación se propuso hace una década como un primer paso para crear un microambiente pro inflamatorio que resulta en la producción de mediadores que inducen el trabajo de parto (Estrada-Gutierrez *et al.*, 2005). Sin embargo, no se continuó el estudio. Por otro lado, las células que quedaron en suspensión (CCDS) en los medios de cultivo, tenían menor tamaño y núcleo celular grande. Lo cual nos llevó a suponer que este grupo celular estaba compuesto en su mayoría de linfocitos, observación que fue verificada por los resultados de citometría de flujo.

Según algunos reportes, la composición celular de la coriodecidua se modifica por el arribo de subpoblaciones de leucocitos, independientemente de la edad gestacional (Gómez-López *et al.*, 2010) y la secreción de moléculas también se ve modificada. La identificación de las poblaciones celulares en nuestro estudio permitió observar que hacia el final de la gestación tuvimos una proporción mayor de células T (CD3<sup>+</sup>), seguido por linfocitos T de memoria CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en similares proporciones, lo que nos lleva a comentar que estas células parecen ser las responsables de la producción de citocinas hacia el final de la gestación y en membranas con trabajo de parto. Observando la gráfica obtenida por análisis de componentes principales podemos ver que tres citocinas se mantuvieron constantes y con una concentración mínima (IL-17, IL-12p40 e IL-12p70). Datos en la literatura para IL-17 en suero sanguíneo reportan que esta molécula es liberada en concentraciones crecientes de acuerdo a la edad en individuos sanos, llegando a valores de 110 pg/ml en edades similares a nuestro grupo (Kleiner *et al.*, 2013). Sin embargo, como podemos ver, en el ambiente coriodecidual es totalmente diferente. Lo cual marca la primera diferencia a los datos reportados, y nos revela que el compartimento coriodecidual es temporal e independiente de los niveles reportados en suero. Para la IL-12 p40 y p70 las concentraciones reportadas están por debajo de los niveles mínimos de detección (40 pg/ml), el comportamiento en estas citocinas es similar a nuestros resultados que se encontraron por debajo de los 2 pg/ml, aunque nuestros valores están un orden de magnitud abajo. Analizando la producción de citocinas pro inflamatorias, se demostró su participación durante la etapa

tardía del embarazo, llegando a el trabajo de parto. Observamos, la IL-1 $\beta$  se secretó en mayor medida en el grupo celular CCDJ, mientras que en el grupo celular CCDS y CCDA, la producción fue tres veces menor.

Segundo comentario importante, podemos notar que es muy diferente la secreción de las citocinas por la población total (CCDJ) que cuando las células son colocadas en cultivo por separado, en ocasiones, ni sumando ambas poblaciones nos da la secreción total que obtenemos por las células juntas. Lo cual sugiere que es indispensable quizás la cercanía de las poblaciones (CCDA y CCDS) y/o una interconexión de señales entre ellas para desempeñar un papel importante en la cascada de activación del trabajo de parto. A pesar de que se han realizado estudios para evaluar las concentraciones de citocinas en diferentes compartimentos tales como el cordón umbilical, líquido amniótico y sangre periférica materna recolectada en diferentes etapas del embarazo y el parto; el papel inmunobiológico de las citocinas pro inflamatorias al final de la gestación y en el trabajo de parto parece ser diferente. En este trabajo también se demostró que los leucocitos coriodeciduales tuvieron mayor secreción IL-6 y TNF $\alpha$  (citocinas pro inflamatorias), con valores dos órdenes de magnitud por arriba de los reportados en suero de sujetos sanos. De la misma manera la IL-1 $\alpha$  que fue producida por el grupo CCDJ superó el límite para individuos sanos. Esta citocina ha sido reportada en algunos estudios con valores inferiores a los 2 pg/ml, lo cual implica que normalmente esta citocina se produce en niveles por debajo del límite de detección. Subrayando, el perfil de secreción de moléculas pro inflamatorias por parte de los leucocitos coriodeciduales coincide con otros autores, respecto a su incremento conforme el progreso del trabajo de parto (Kim *et al.*, 2011), Sin embargo, los valores de secreción para estas citocinas encontrados en este trabajo, son superados por varios ordenes de magnitud.

Con respecto a las citocinas con efectos antiinflamatorios podemos mencionar que tanto la IL-4 como la sIL-2 $\alpha$  y la IL-10 fueron secretadas en concentraciones significativamente distintas. A pesar de esto, la concentración total de citocinas antiinflamatorias fue ostensiblemente inferior a las citocinas pro inflamatorias. Analizando individualmente la producción de estos mensajeros moleculares y comparando con los estándares encontrados en suero sanguíneo de personas sanas (Szarka et al. 2010) tenemos que: la IL-4 fue producida en concentraciones de hasta 3.5 pg/ml en el grupo CCDJ, mientras que el valor normal de esta se ha reportado entre los 4 y los 6 pg/ml. Las diferencias significativas en la pro-

ducción de estos mediadores entre los grupos celulares que estudiamos hacen referencia a que el grupo CCDS y CCDA tuvieron una concentración de 2 pg/ml y 1 pg/ml respectivamente, lo cual sitúa al grupo CCDS en una concentración baja y al grupo CCDA en una concentración por debajo del límite de detección. La sIL-2r $\alpha$  el antagonista de la IL-2 tuvo una producción pico en nuestros grupos celulares de 54 pg/ml, esto nuevamente en el grupo CCDJ, lo que lo ubica por debajo del valor normal encontrado en personas sanas (100 pg/ml), cabe destacar que dentro de los estudios realizados en personas sanas esta citocina ve disminuida su producción con respecto a la edad. La IL-10 reportada en niveles que oscilan entre los 9 y los 16 pg/ml en condiciones normales, no concuerda con la producción que realizaron nuestros grupos celulares, los cuales superaron esa medida (CCDJ con 25 pg/ml) o bien se quedaron por debajo del límite de detección (CCDS y CCDA con 0.8 y 1 pg/ml respectivamente). Lo cual vuelve a mostrar que la producción de las citocinas por las células de manera conjunta, es muy diferente a cuando las células son separadas. Es claro que para la producción total de la citocina se requiere de la comunicación entre ambas. Por otra parte, la producción de IL-1r $\alpha$  no mostró diferencias significativas entre los tres grupos celulares estudiados, el cual estuvo en un rango comprendido entre los 9 y los 11 pg/ml, pero quedando muy por debajo de los parámetros normales, los cuales se cuantifican entre los 200 y los 350 pg/ml.

La cuantificación de la secreción de citocinas por los dos grupos estudiados (CCDA y CCDS), nos permite enunciar que las células que fueron removidas del espacio coriodecidual y cultivadas en las condiciones descritas en este trabajo tienen una marcada tendencia pro inflamatoria. Por otra parte, las cantidades de INF $\gamma$  producidas en nuestros grupos celulares se encontraron en concentraciones que fueron de los 0.76 a los 4.17 pg/ml, siendo el grupo celular CCDS el que secretó la mayor cantidad. Pese a que esta citocina es uno de los marcadores que diferencia a los tres grupos celulares estudiados sus valores de producción no están dentro de los rangos que se presentan normalmente, ya que estos están reportados con valores que van desde los 150 a los 800 pg/ml.

Finalmente, IL-2, IP-10 e INF $\gamma$  no tuvieron diferencias significativas entre los grupos celulares estudiados y tampoco tuvieron una concentración elevada. Los valores obtenidos de la cuantificación de estas tres moléculas están por debajo de los parámetros normales. En estos parámetros los valores están considerados en un rango de 10 pg/ml para IL-2, 2200 pg/ml para IP-10 y 40 pg/ml para INF $\gamma$ . Cabe destacar que estos valores no varían con

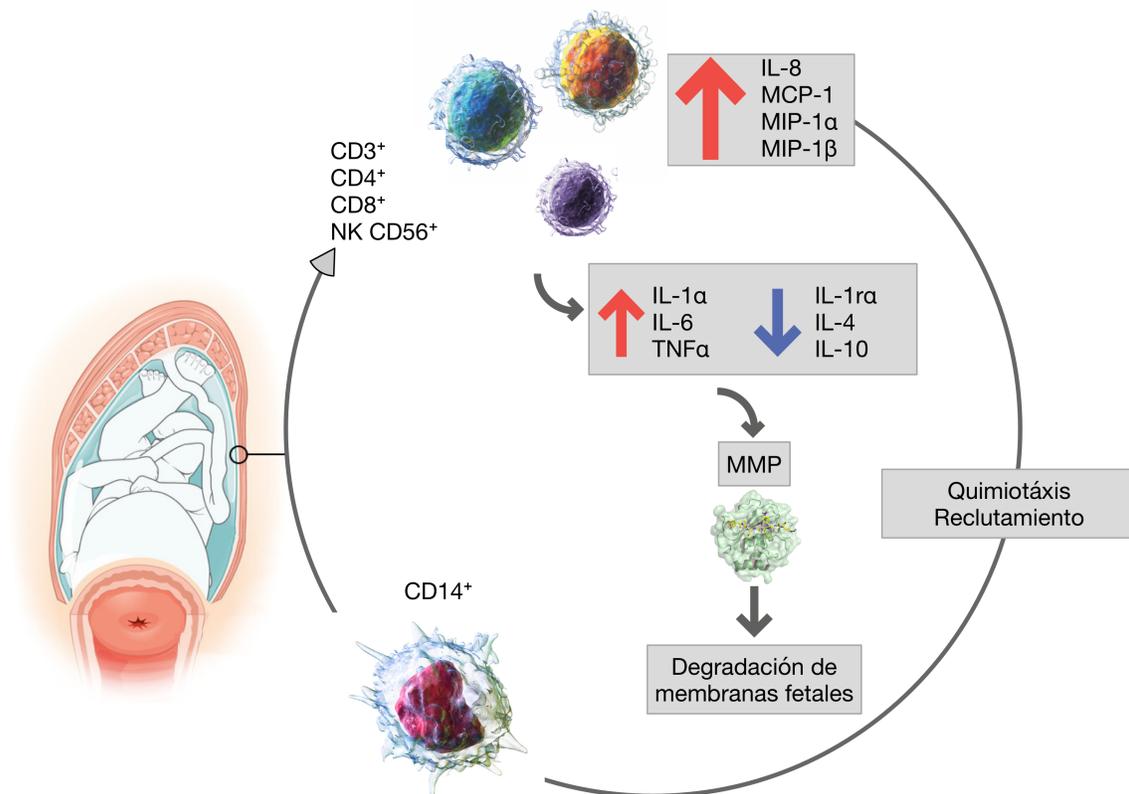
respecto a la edad de los pacientes. Respecto a la producción de citocinas quimiotácticas, superaron por un margen muy amplio la producción al resto de las moléculas. Dentro de estas citocinas, la Eotaxina fue la única citocina que se produjo en cantidades significativamente distintas entre los tres grupos y por abajo de 4 pg/ml como máximo en el grupo CCDJ. Esta citocina usualmente tiene una concentración en suero sanguíneo de 200 a 600 pg/ml. Sin embargo, en mujeres embarazadas esta citocina se ha cuantificado en rangos que van de los 9 a los 36 pg/ml, lo cual explica la secreción molecular tan disminuida en nuestros cultivos celulares. Lo contrario sucedió con la IL-8, la cual se produjo en los cultivos celulares en un rango de 5000 a 23,000 pg/ml. Siendo la citocina de mayor producción por los tres grupos celulares. Esta citocina usualmente oscila entre los 5 a 10 pg/ml en sueros de mujeres sanas y entre 10 a 50 pg/ml en mujeres embarazadas (). Incluso si se consideran casos atípicos como el de la preclamsia la concentración de IL-8 se sitúa entre 50 y 500 pg/ml (Molvarec *et al.*, 2011; Ziganshina *et al.*, 2013). Sin embargo, en nuestro estudio, llama la atención que IL-8 es la citocina quimiotáctica que se está secretando en gran cantidad en este momento de la gestación, esta citocina está reportada como molécula que puede atraer neutrófilos, basófilos y linfocitos T. También, está involucrada en la activación de neutrófilos y es liberada por algunos tipos celulares en respuesta a estímulos inflamatorios. Por ello hace relevante este hallazgo. Lo mismo sucedió con la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), la cual se secretó en cantidades que superaron los 4100 pg/ml. Cuando en sujetos sanos esta citocina se produce en cantidades que van desde los 87 a los 233 pg/ml. Y tal y como sucede con la IL-8 los niveles de MCP-1 cuantificados en los cultivos celulares estudiados superan por mucho a los que se encuentran normalmente y a los que se presentan en mujeres embarazadas con síntomas de preclamsia.

Con respecto a las dos subunidades de la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ) en estudios hechos tanto a mujeres como a hombres sanos se encontró que los niveles estándares de esta molécula se encuentran entre los 13 a 20 pg/ml para MIP-1 $\alpha$  y 190 a 200 pg/ml para MIP-1 $\beta$ . Nuevamente, los valores de concentración obtenidos en los cultivos celulares superaron ampliamente el valor de referencia de MIP-1 $\alpha$ , llegando a 1100 pg/ml. Sin embargo, en el caso de MIP-1 $\beta$  sus valores se encuentran cercanos a los reportados por la literatura.

Finalmente, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), promotor de la migración de monocitos, en nuestros cultivos lo encontramos en concentraciones bajas (19 a 29

pg/ml), de acuerdo a los valores reportados en suero sanguíneo por la literatura que es de 200 pg/ml.

En la figura 5 llama la atención que las citocinas que hemos encontrado en cantidades mayores en este estudio, citocinas pro inflamatorias y quimioatrayentes, parecen estar participando en la cascada de activación de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), como es la MMP9. Por experimentos que se están realizando actualmente en el laboratorio (estudio piloto), se observa que los leucocitos coriodeciduals incrementan exponencialmente su capacidad para secretar MMP9, tres veces más que otras líneas celulares de referencia tales como U937 (Vega-Sanchez *et al.*, 2010). Es entonces posible, que la activación



**Figura 5.1:** Durante el TP, células del sistema inmune (Leucocitos CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>; Células NK; Monocitos-Macrófagos y Linfocitos B) infiltran el espacio coriodecidual. Éstas células secretan citocinas proinflamatorias (IL-1α, IL-6 y TNFα) las cuales inhiben la secreción de citocinas anti inflamatorias ( IL-1ra, IL-4 e IL-10) mientras que promueven la secrecion de citocinas quimiotácticas (IL-8, MCP-1MIP-1α y MIP-1β). Estas quimioquinas reclutan nuevas células que incrementan el efecto inflamatorio. Este ambiente promueve la activación de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), estas enzimas se encargan de la degradación y la ruptura de las membranas fetales.

de MMPs esté dada por una red de señales, donde estén implicadas muchas de las moléculas que hemos descrito en este estudio y que esta activación se alcance hacia el final de la gestación, provocando la pérdida de la resistencia mecánica y la ruptura de las membranas fetales. Los resultados obtenidos mostraron que los leucocitos coriodeciduales aislados de membranas fetales a término son funcionalmente diferentes a los leucocitos que transitan en sangre, ya que la secreción de citocinas es diferente. Lo cual es entendible ya que los primeros pueden estar asociados en el desencadenamiento del proceso de la ruptura de la membrana fetal al término de la gestación humana. Nuestro grupo recientemente ha desarrollado un modelo de ruptura de membranas in vitro, con el cual se podrán crear diferentes microambientes, variando la composición celular de la coriodecidual, tratando de simular y modificar selectivamente las condiciones al término de la gestación, con la llegada de diferentes subgrupos de linfocitos específicos, principalmente moléculas reportadas en este trabajo. Con este modelo de ruptura, la quimiotaxis y el reclutamiento de leucocitos en la zona coriodecidual de las membranas fetales hacia el final de la gestación podrá llevarse a cabo, al condicionar un microambiente pro inflamatorio asociado al trabajo de parto.  $IL-1\beta$ ,  $TNF\alpha$  e  $IL-6$  pueden ser una fuente importante de emisión de señales. Estas citocinas se han propuesto (García-Ruíz *et al.*, 2015) como la posible señal primaria, que ejercerán un efecto sobre las células locales que podrán estimular la expresión y secreción de MMPs y ser el mecanismo responsable en condiciones experimentales.

## **6 Conclusión**

Debido a la dificultad experimental que representa, la mayoría de los estudios realizados sobre la respuesta inmune durante del embarazo y al inicio del TP se han realizado en modelos animales. Este trabajo es un estudio piloto que utilizó tejidos humanos para describir y caracterizar de manera directa el final del TP. El estudio mostró que durante el TP las membranas corioamnióticas se ven infiltradas por células hematopoyéticas provenientes de la madre. Dichas células secretan mediadores moleculares, los cuales de manera endócrina y parácrina promueven la secreción de nuevos mensajeros y la formación de un ambiente inflamatorio y quimiotáctico. Este ambiente a su vez promueve la activación de enzimas encargadas de la degradación y ruptura de las membranas fetales. Los hallazgos realizados en el presente trabajo pueden servir como un referente para posibles estudios comparativos entre partos a término y aquellos que sean pretérmino, utilizando los perfiles de secreción de mediadores inmunológicos.

## 7 Referencias

- Chau, A., Markley, J.C., Juang, J. I. y Tsen, L.C. 2016. Cytokines in the perinatal period – Part I. *International Journal of Obstetric Anesthesia*. doi:10.1016/j.ijoa.2015.12.005.
- Estrada-Gutierrez, G., Veronica-Zaga, V., Gonzalez-Jimenez, M.A., Beltran-Montoya, J., Maida-Claros, R., Giono-Cerezo, R. y Vadillo-Ortega, F. 2005. “Initial Characterization of the Microenvironment That Regulates Connective Tissue Degradation in Amniochorion during Normal Human Labor.” *Matrix Biology* 24 (4): 306–12. doi:10.1016/j.matbio.2005.05.001.
- Garcia-Ruíz, G., Flores-Espinosa, P., Preciado-Martínez, E., Bermejo-Martínez, L., Espejel-Núñez, 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 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1 $\alpha$ , and MMP-9 in Pre-Labor Human Term Placenta.” *Reproductive Biology and Endocrinology*: 13. 115. doi:10.1186/s12958-015-0111-3.
- Gomez-Lopez, N., Laresgoiti-Servitje, E., Olson, D., Estrada-Gutiérrez, G., y Vadillo-Ortega, F. 2010. “The Role of Chemokines in Term and Premature Rupture of the Fetal Membranes: A Review.” *Biology of Reproduction* 82 (5): 809–14. doi:10.1095/biolreprod.109.080432.
- Holtan, Shernan G., Chen, Y., Kaimal, R., Creedon, D. J., Enninga, E., Nevala, W. K. y Markovic, S. N. 2015. “Growth Modeling of the Maternal Cytokine Milieu throughout Normal Pregnancy: Macrophage-Derived Chemokine Decreases as Inflammation/counterregulation Increases.” *Journal of Immunology Research*. doi:10.1155/2015/952571.
- Hwang, J. H., Lee, M. J., Seok, O. S., Paek, Y. C., Cho, G. J., Seol, H. J., Lee, J. K. y Oh, M.J. 2010. “Cytokine Expression in Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients with Pre-Eclampsia and Normal Pregnancies.” *Cytokine* 49 (1). Elsevier Ltd: 95–101
- Ibrahim, S. A., Ackerman, W. E., Summerfield, T. L., Lockwood, C. J., Schatz, F. y Kniss, D. 2015. “Inflammatory Gene Networks in Term Human Decidual Cells Define a Potential Signature for Cytokine-Mediated Parturition.” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. doi:10.1016/j.ajog.2015.08.075.
- Kalkunte, S., Padbury, J. F., y Sharma, S. 2011. “Immunologic Basis of Placental Function and Diseases: The Placenta, Fetal Membranes and Umbilical Cord.” *Wiley’s Diseases of the Newborn*. doi:10.1016/B978-1-4377-0134-0.10005-8.

Kim, O. H., Kim, H. S., Youn, J. C., Shin, E. C. y Park, S. 2011. "Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays." *Journal of Translational Medicine*. 9:113.

Kleiner, G., Marcuzzi, A., Zanin, V., Monasta, L. y Zauli, G. 2013. "Cytokine Levels in the Serum of Healthy Subjects." *Mediators of Inflammation*. doi:10.1155/2013/434010.

Molvarec, A., Szarka, Y., Walentin, S., Beko, G., Karadi, I., Prohaszka, Z. y Rigó, J. 2011. "Serum Leptin Levels in Relation to Circulating Cytokines, Chemokines, Adhesion Molecules and Angiogenic Factors in Normal Pregnancy and Preeclampsia." *Reproductive Biology and Endocrinology* 9: 124. doi:10.1186/1477-7827-9-124.

Mor, G., Cárdenas, I. y Abrahams, V. 2012. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1221(1): 80–87. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x.

St. Louis, D., Romero, R., Plazyo, O., Arenas-Hernyez, M., Panaitescu, B., Xu, Y. y Milovic, T. 2016. "Invariant NKT Cell Activation Induces Late Preterm Birth That Is Attenuated by Rosiglitazone." *Journal of Immunology*. 196 (3): 1044–59. doi:10.4049/jimmunol.1501962.

Szarka, Y., Rigó, J., Lázár, L., Beko, G., y Molvarec, A. 2010. "Circulating Cytokines, Chemokines and Adhesion Molecules in Normal Pregnancy and Preeclampsia Determined by Multiplex Suspension Array." *BMC Immunology* 11: 59. doi:10.1186/1471-2172-11-59.

Timmons, B., Akins, M. y Mahendroo, M. 2010. "Cervical Remodeling during Pregnancy and Parturition." *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 21 (6): 353-61.

Vega-Sanchez, R., Gomez-Lopez, N., Flores-Pliego, A., Clemente-Galvan, S., Estrada-Gutierrez, G., Zentella-Dehesa, A., Maida-Claros, R., Beltran-Montoya, J. y Vadillo-Ortega, F. 2010. "Placental Blood Leukocytes Are Functional and Phenotypically Different than Peripheral Leukocytes during Human Labor." *Journal of Reproductive Immunology* 84 (1): 100–110. doi:10.1016/j.jri.2009.08.002.

Word, R. A., Li, X., Hnat, M. y Carrick, K. 2007. "Dynamics of Cervical Remodeling during Pregnancy and Parturition: Mechanisms and Current Concepts." *1 (212): 69–79*. doi:10.1055/s-2006-956777.

Ziganshina, M. M., Krechetova, L. V., Vanko, L. V., Nikolaeva, M. A., Khodzhaeva, Z. S. y Sukhikh, G. T. 2013. "Time Course of the Cytokine Profiles during the Early Period of Normal Pregnancy and in Patients with a History of Habitual Miscarriage" *154 (3): 385–87*.

## A Apéndice

### A.1 Preparación de las citocinas para el análisis por Multiplex

#### A.1.1 Preparación de las soluciones

Diluir 30 ml de la solución amortiguada de lavado (WB) con 270 ml de agua desionizada. Mezclar por inversión y dejar reposando por 10 minutos a TA. Reconstituir los controles de calidad (QC1) y (QC2) añadiendo 250  $\mu$ l de agua desionizada a cada vial. Mezclar por inversión, agitar en vortex por un minuto y dejar reposando por 10 minutos a TA. Reconstituir el patrón de citocinas humanas (HCS) añadiendo 250  $\mu$ l de agua desionizada. Mezclar por inversión, agitar en vórtex por un minuto y dejar reposando por 10 minutos a TA. La concentración del reconstituido es de 10,000 pg/ml. La solución amortiguada de ensayo (EB) se utiliza de manera directa.

#### A.1.2 Preparación de las perlas magnéticas

Agitar con la ayuda de un vórtex los 15 viales que contienen las perlas con los anticuerpos por un minuto. Tomar 60  $\mu$ l de cada vial y depositarlo en un frasco de polipropileno. Añadir al frasco 2.1 ml de diluyente para perlas magnéticas (BD). Mantener en agitación. Las perlas magnéticas son sensibles a la luz, por lo tanto, se deberán proteger utilizando contenedores de polipropileno oscuro.

#### A.1.3 Preparación de la curva estándar de citocinas

A partir del patrón de citocinas humanas (HCS) cuya concentración es de 10 000 pg/ml, se deberán realizar cinco diluciones seriadas hasta obtener una concentración mínima de 3.2 pg/ml. El blanco será la solución amortiguada de ensayo (AB).

#### A.1.4 Procedimiento de inmunoensayo

Se utilizó una placa de 96 pozos de lectura, en cada pozo se colocó 25  $\mu$ l de: el blanco, la curva estándar de citocinas, los controles de calidad y los medios de cultivo que contenían a las citocinas. Una vez realizado esto, se le añadió 25  $\mu$ l de la mezcla de las perlas con los

anticuerpos a cada uno de los pozos. Se selló la placa y se envolvió con papel aluminio para evitar la degradación de las perlas por efecto de la luz. La placa se quedó en incubación a 4 °C por 18 horas en agitación constante. Pasadas las 18 horas de incubación se removió el exceso de líquidos utilizando un magneto. Este se colocó debajo de la placa para que las perlas se sedimentaran y retuvieran a las células mientras se desechaban los líquidos por inversión. Inmediatamente después se le añadió 25  $\mu$ l del anticuerpo de detección, se selló nuevamente la placa, se cubrió con papel aluminio y se dejó en agitación por 1 hora a TA. Después de este tiempo se añadieron 25  $\mu$ l de estreptavidina a cada pozo, se selló de nuevo la placa y se cubrió con papel aluminio. Dejándose incubar por 30 minutos a TA en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación se utilizó nuevamente un magneto y la inversión de la placa para retirar el exceso de líquidos. Sin retirar el magneto y para evitar que quedasen residuos de los anticuerpos y la estreptavidina se añadieron 200  $\mu$ l de WB en cada pozo, se selló y se agitó nuevamente la placa. Después de 1 minuto de agitación se desechó el WB por inversión. Finalmente se añadieron 150  $\mu$ l de fluido de análisis (SF) a cada pozo, sellando y dejando en agitación durante 5 minutos.

Una vez lista la placa, se cuantificó la producción de citocinas con un Multiplex Luminescence 200, y se analizaron los datos con el software xPONENT 1.7.

## Abreviaturas

CCD	Células coriodeciduales.
MCA	Membranas corioamnióticas.
MEC	Matriz extracelular.
RPM	Ruptura prematura de membranas.
MMPs	Metaloproteinasas de matriz extracelular.
ACP	Análisis de componentes principales.
RPMI 1640©	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640.
PBS	Solución amortiguada de fosfatos.
LYMPHOPREP©	Gradiente de densidad para la separación de células mononucleares.
CD <sup>+</sup>	Cluster of differentiation.
IL	Interleucina.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
INF	Interferón.
IP	Proteína inductora de INF.
sIL	Receptor soluble de interleucina.
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos.
MIP-1	Proteína inflamatoria de macrófagos 1.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.