



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

---

**“*Escherichia coli* modula la expresión del miRNA-146a y -451  
en las membranas fetales humanas en un modelo de  
infección.”**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Biólogo

P R E S E N T A:

Mercedes Olvera Valencia

Director de tesis:

M. en C. Héctor Flores Herrera

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. De México.

Agosto, 2018.





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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunobioquímica del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer) bajo la dirección del M. en C. Héctor Flores Herrera.

Forma parte del proyecto “La progesterona modula la secreción de las proteínas de choque térmico en el tejido de la coriodecidua después de la estimulación con *Escherichia coli* en un modelo de infección” con el No. de registro: 2017-2-82 y contó con presupuesto federal otorgado a HFH.

*“Los tiempos individuales, el puesto en la clasificación, tu apariencia, o cómo te valore la gente, no son más que cosas secundarias. Para un corredor como yo, lo importante es ir superando, con sus propias piernas y con firmeza, cada una de las metas”*

**“De qué hablo cuando hablo de correr” -Haruki Murakami.**

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de formarme en la máxima casa de estudios y darme las herramientas necesarias para formarme como bióloga.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala donde pude formarme como profesionista, gracias a sus instalaciones y excelentes profesores quienes me han enseñado muchísimo, me siento muy orgullosa de los doctores que imparten clase en esta institución y el nivel de biólogos que forma.

Al Instituto Nacional de Perinatología dónde fue aceptado y elaborado el presente trabajo.

A Héctor Flores Herrera por confiar en mí al abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme desarrollar un proyecto de investigación, además de darme todos los recursos y facilidades para conseguirlo. Eres la persona quien ha dado fin a esta etapa de formación y he aprendido mucho de ti, sobre todo, a hacer de mis debilidades mis principales fortalezas. De ti me quedo con muchos aprendizajes, y sobre todo el gusto por desarrollar proyectos. A lo largo de mi vida he tenido que tomar clase con varios maestros y son muy pocos quienes me han dejado lecciones clave para culminar la licenciatura de la mejor manera, Héctor, tu eres parte de esos maestros, gracias y que nunca termine esa pasión en ti de enseñar y contagiar el gusto por lo que se hace. *“Los profesores afectan a la eternidad; nadie puede decir dónde se termina su influencia”*. - Henry Brooks Adams.

A mis sinodales los doctores Sergio Vaca, Carlos Pérez Plascencia, Eduardo Urrutia y la doctora Paniagua, por ser una parte muy importante en este proyecto, por sus consejos, observaciones y comentarios.

## DEDICATORIA

En primer lugar y de manera muy especial quiero dedicarla a Luz María Valencia quien siendo una niña indígena, salió de su pueblo desde muy pequeña en busca de mejores oportunidades, aprendió a crecer como persona y como profesionista. Gracias por recorrer este camino conmigo, por confiar siempre en mí, por nunca rendirte a pesar de las incontables veces que te fallé. Nunca olvidaré las 20 horas diarias que estuviste trabajando para cumplir mis sueños y darme una mejor vida. Espero algún día ser el nivel de mujer que tu eres y compensar todo lo que me has dado, te amo mami.

A Andrea Olvera quien ha sido mi compañera de vida, mi alma gemela. Gracias por estar a mi lado, siempre escucharme y motivarme a ser una mejor profesionista, jamás olvidaré las palabras que me decías para que me esforzara cada vez más, “no hay esfuerzo que no valga la pena”, sólo tú sabes lo mucho que nos costó llegar hasta aquí. Eres tu mi felicidad y la niña de mis ojos, gracias por estar en mi vida, no pude haber tenido una mejor hermana.

A Omar Vargas por siempre hacerme ver que podía dar un poco más y llegar lejos, por demostrarme la importancia de la responsabilidad. Gracias por entrar en mi vida y llenarla de felicidad, por todo tu apoyo y cariño, te has ganado un lugar muy especial en mi corazón.

A mi mejor amiga de carrera Fernanda Ibarra, aunque te hayas ido físicamente, te mantengo en mi corazón y pensamiento. Siempre quise disfrutar de estos momentos a tu lado y en cada logro me imagino que estás conmigo. Gracias por darme el mejor comienzo de la carrera universitaria, conocerte fue lo más increíble que me pasó, sé que pronto volveré a verte.

A mis segundas hermanas, Marilú Reyes e Ivett Valencia quienes siempre han estado en mi vida y me conocen mejor que nadie, siempre me han escuchado, apoyado, alentado y aconsejado sabiamente. Gracias por tanto amor incondicional.

A mis tías Nina Valencia, Gloria Valencia, Cira Valencia, Lilia Olvera, Gaby García y mis tíos Arturo Enríquez e Isaac Manuel, por aportar de su apoyo durante este camino, jamás olvidaré lo que hicieron por mí, a cada uno los considero mis segundos padres.

A Jesús Olvera por darme la vida y siempre estar presente en ella. Escuchar tu voz siempre ha agitado mi corazón de felicidad y sin estos pequeños momentos no hubiera llegado tan lejos.

A Adrián Valencia por motivarme cuando lo necesité y por mostrar mucho interés cuando hablaba de biología, siempre me haces sentir un genio.

A mis amigas de carrera Jessica Alanis y Rebeca Pérez Gil por su incondicional amistad y apoyo, por ayudarme a terminar bien los semestres y por transmitirme su inteligencia.

## ÍNDICE GENERAL

	Págs.
<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>2.0 ANTECEDENTES</b> .....	14
2.1 <i>Origen y estructura de las membranas fetales humanas</i> .....	14
2.2 <i>Función de las membranas fetales humanas</i> .....	18
2.3 <i>Ruptura de las membranas fetales humanas</i> .....	20
2.4 <i>Infecciones intrauterinas</i> .....	21
2.4.1 <i>Escherichia coli como agente patógeno en infecciones intrauterinas</i> .....	24
2.5 <i>MicroRNAs</i> .....	25
2.5.1 <i>Biogénesis de los miRNAs</i> .....	26
2.5.1 <i>Función de los miRNAs</i> .....	29
<b>3.0 JUSTIFICACIÓN</b> .....	32
<b>4.0 OBJETIVOS</b> .....	33
4.1 <i>Objetivo general</i> .....	33
4.2 <i>Objetivos particulares</i> .....	33
<b>6.0 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
6.1 <i>Aspectos éticos</i> .....	34
6.2 <i>Características de las pacientes</i> .....	34
6.3 <i>Obtención de las MFH</i> .....	34
6.3.1 <i>Procesamiento de las MFH en el sistema de Transwell</i> .....	34
6.4 <i>Escherichia coli</i> .....	35
6.4.1 <i>Estimulación de las MFH con E. coli</i> .....	36
6.5 <i>Extracción del RNA total</i> .....	36
6.5.1 <i>Reacción de RT-PCR</i> .....	37
6.5.2 <i>Reacción de PCR</i> .....	37

6.5.3 Expresión del miR-146a y miR-451.....	38
6.6 Análisis estadístico .....	38
<b>7.0 RESULTADOS</b> .....	39
7.1 Características de las pacientes.....	39
7.2.1. miR-146a.....	41
7.2.2 miR-451 .....	43
7.3. Expresión de miRNAs estimulando el epitelio amniótico. ....	45
7.3.1 miR-146a.....	45
7.3.2 miR-451 .....	47
<b>8.0 DISCUSIÓN</b> .....	50
9.0 CONCLUSIÓN .....	52
<b>10.0 REFERENCIAS</b> .....	53
<b>ANEXO I</b> .....	57
<b>ANEXO 2</b> .....	59

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>MFH</b>	Membranas Fetales Humanas
<b>AM</b>	Epitelio Amniótico
<b>CDH</b>	Tejido de la coriodecidua
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>CFU</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>ECM</b>	Matriz extracelular rica en colágeno.
<b>IL-4</b>	Interleucina tipo 4
<b>IL-10</b>	Interleucina tipo 10
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Factor de crecimiento tumoral alfa
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento tumoral beta
<b>P<sub>4</sub></b>	Progesterona

## ÍNDICE DE FIGURAS

	págs.
<b>FIGURA 1.</b> <i>Organogénesis de las membranas fetales</i> .....	15
<b>FIGURA 2.</b> <i>Estructura de las membranas fetales</i> .....	16
<b>FIGURA 3.</b> <i>Infección Intrauterina</i> .....	23
<b>FIGURA 4.</b> <i>Biogénesis de los microRNAs</i> .....	28
<b>FIGURA 5.</b> <i>Función del miR-146a</i> .....	30
<b>FIGURA 6.</b> <i>Función del miR-451</i> .....	31
<b>FIGURA 7.</b> <i>Perfil de expresión del miR-146a</i> .....	40
<b>FIGURA 8.</b> <i>Perfil de expresión del miR-451</i> .....	41
<b>FIGURA 9.</b> <i>Perfil de expresión del miR-146a después de la estimulación con Escherichia coli sobre el tejido de la coriodecidual</i> .....	42
<b>FIGURA 10.</b> <i>Perfil de expresión del miR-451 después de la estimulación con Escherichia coli sobre el tejido de la coriodecidual</i> .....	44
<b>FIGURA 11.</b> <i>Perfil de expresión del miR-146a después de la estimulación con Escherichia coli sobre el epitelio amniótico</i> .....	46
<b>Figura 12.</b> <i>Perfil de expresión del miR-451 después de la estimulación con Escherichia coli sobre el epitelio amniótico</i> .....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> <i>Secuencia de iniciadores específicos para RT</i> .....	37
<b>TABLA 2.</b> <i>Secuencia de iniciadores específicos para PCR</i> .....	38



## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Infections during pregnancy induce in the human fetal membranes (HFM) the secretion of different immunological mediators. Recently, the participation of a class of non-coding RNA (miRNA) involved in the regulation of the inflammatory response has been found. The main objective was to determine the expression of miR-146a and -451a in HFM during stimulation with *E. coli* in an infection model.

**METHODS:** Six HFM were processed and mounted in the Transwell system as previously [1]. Choriondecidua (CHD) or amniotic epithelium (AM) were stimulated directly with *E. coli* ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  CFU / mL) for 3, 6 and 24 hours. Subsequently, the culture medium was recovered both from the stimulation zone and from the opposite zone. The RNA was obtained by the TRIzol reagent. The retrotranscription and the amplification to the final point were carried out with their specific primers. The expression bands were determined by the optical density with the ImageJ program. The data are shown as the mean  $\pm$  standard deviation and a significant difference less than 0.05 is considered

**RESULTS:** *E. coli* for 3, 6 and 24 hours, observing an increase in the expression profile of miR-146a and miR-451a with respect to the controls ( $p \leq 0.05$ ). In the same interval of stimulation and time, we observed in the amniotic epithelium an increase in the expression of miR-146 and miR-451 with respect to the controls ( $p \leq 0.05$ ). When we estimated in the AM, the miR-146 increased in both regions (AM and CHD) with respect to the controls ( $p \leq 0.05$ ); however, miR-451 there are no significant differences in both regions compared to the control ( $p \leq 0.05$ ).

**DISCUSSION:** There is a differential expression of miR-146a and -451a between the CHD tissue and the AM epithelium, which depends on the site of stimulation. In the amniotic epithelium, we did not observe variations in the expression of miR-451a, which is why its functional role as a modulator of the inflammatory response is investigated. These results as a whole include an export mechanism between the miR-146a and the -451a tissue of the CHD and the AM epithelium.

Key words: Choriondecidua, *Escherichia coli*, microRNAs, innate immune response.

## RESÚMEN

**INTRODUCCIÓN:** Las infecciones durante el embarazo inducen en las membranas fetales humanas (MFH) la secreción de diferentes mediadores inmunológicos. Recientemente, se ha demostrado la participación de una clase de RNA no codificante (miRNA) implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria. El principal objetivo fue determinar la expresión de miR-146a y -451a en HFM durante la estimulación con *E. coli* en un modelo de infección.

**MÉTODOS:** Se procesaron y montaron seis MFH en el sistema de Transwell como ha sido descrito previamente [1]. La coriodecudia (CDH) o el epitelio amniótico (AM) se estimularon directamente con *E. coli* ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL) durante 3, 6 y 24 horas. Posteriormente, se recuperó el medio de cultivo tanto de la zona de estimulación como de la zona opuesta. El RNA se obtuvo mediante el reactivo de TRIzol. La retrotranscripción y la amplificación a punto final se realizaron con sus iniciadores específicos. Las bandas de expresión fueron determinadas por la densidad óptica con el programa ImageJ. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar y se consideró una diferencia significativa menor a 0.05

**RESULTADOS:** Después de estimular directamente el tejido de la CHD con las diferentes concentraciones de *E. coli* durante 3, 6 y 24 horas, observamos un aumento en el perfil de expresión de miR-146a y miR-451a con respecto a los controles ( $p \leq 0.05$ ). En el mismo intervalo de estimulación y tiempo, observamos en el epitelio amniótico un aumento en la expresión de miR-146 y miR-451 con respecto a los controles ( $p \leq 0.05$ ). Cuando estimulamos en el AM, el miR-146 aumentó en ambas regiones (AM y CHD) con respecto a los controles ( $p \leq 0.05$ ); sin embargo, el miR-451 no mostró diferencias significativas en ambas regiones en comparación con el control ( $p \leq 0.05$ ).

**DISCUSIÓN:** Existe una expresión diferencial del miR-146a y el -451a entre el tejido de la CHD y el epitelio AM el cual depende del sitio de estimulación. En el epitelio amniótico no observamos variaciones en la expresión del miR-451a por lo que se investigará su papel funcional como modulador de la respuesta inflamatoria. Estos resultados en su conjunto sugieren un mecanismos de exportación entre el miR-146a y el -451a del tejido de la CHD y el epitelio AM.

**Palabras clave:** Coriodecudia, *Escherichia coli*, microRNAs, respuesta inmune innata.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

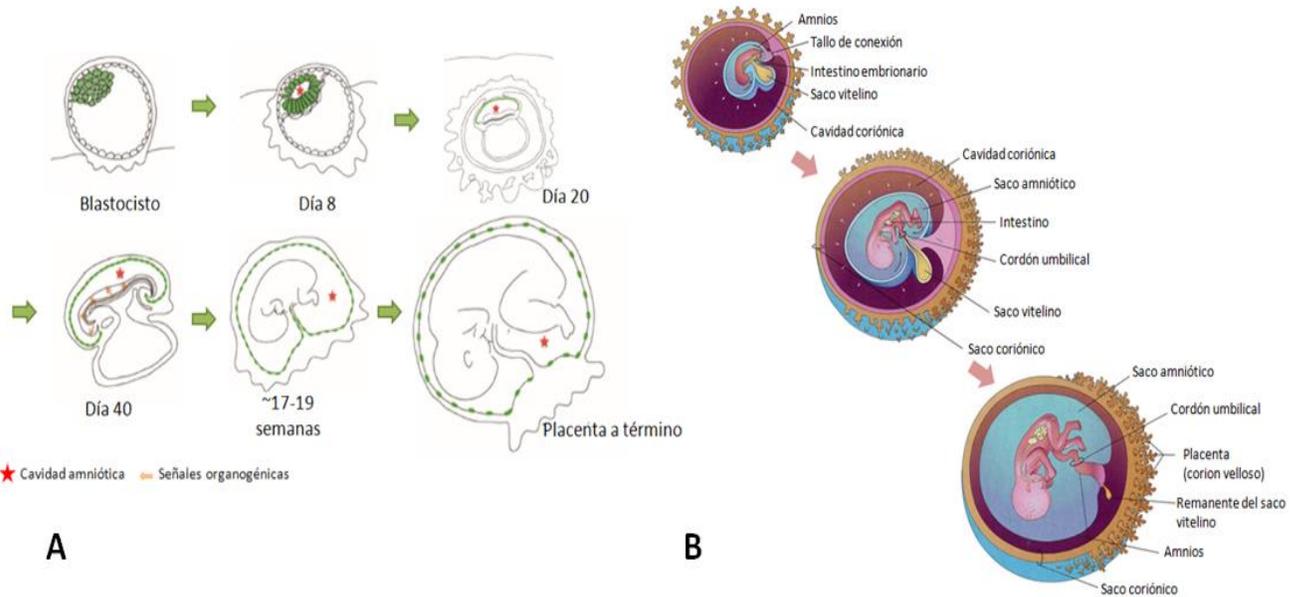
Las membranas fetales humanas (MFH) se forman a partir de las células del epiblasto del embrión en desarrollo y da origen tanto al epitelio amniótico como al tejido de la coriodecidua [1]. Las MFH, son una entidad altamente organizada y dinámica que proporcionan protección mecánica e inmunológica al desarrollo fetal [2-4]. A lo largo del embarazo las MFH se encuentran en un estado latente, caracterizado por diferentes mediadores entre los que se encuentran las interleucinas (IL- 4, IL-10), el factor de crecimiento tumoral tipo 1-beta [2], así como de la progesterona (P<sub>4</sub>) [5; 6]; sin embargo, éste perfil cambia hacia el final del embarazo caracterizado por la secreción de citocinas como la interleucina de tipo 1-beta (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ ), quimiocinas (IL-8), marcadores uterotónicos como la prostaglandina (PGE) los cuales promoverán en su conjunto la secreción de las metaloproteasas de matriz extracelular de tipo colagenolítica (MMP-2 y -9) que comprometerán la fuerza y organización de las MFH [6]. Recientemente, se ha demostrado la participación de una clase de RNA pequeños no-codificantes denominados microRNAs (miRNAs) los cuales están implicados con la regulación de la respuesta inflamatoria [7; 8]. Los miRNAs constituyen una amplia familia de moléculas de RNA con un tamaño de aproximadamente 21 nucleótidos, estas pequeñas moléculas controlan la expresión génica post transcripcional al silenciar la traducción del RNA mensajero o al promover su degradación en el citoplasma. Se sabe que varios miRNAs intervienen en la traducción de proteínas que participan en la transducción de la respuesta inmune innata, asociadas a los receptores de tipo Toll como son el complejo de MyD88, TRAF6/IRAK1 [9; 10] y en la proteína de NF- $\kappa$ B.

## 2.0 ANTECEDENTES

### *2.1 Origen y estructura de las membranas fetales humanas.*

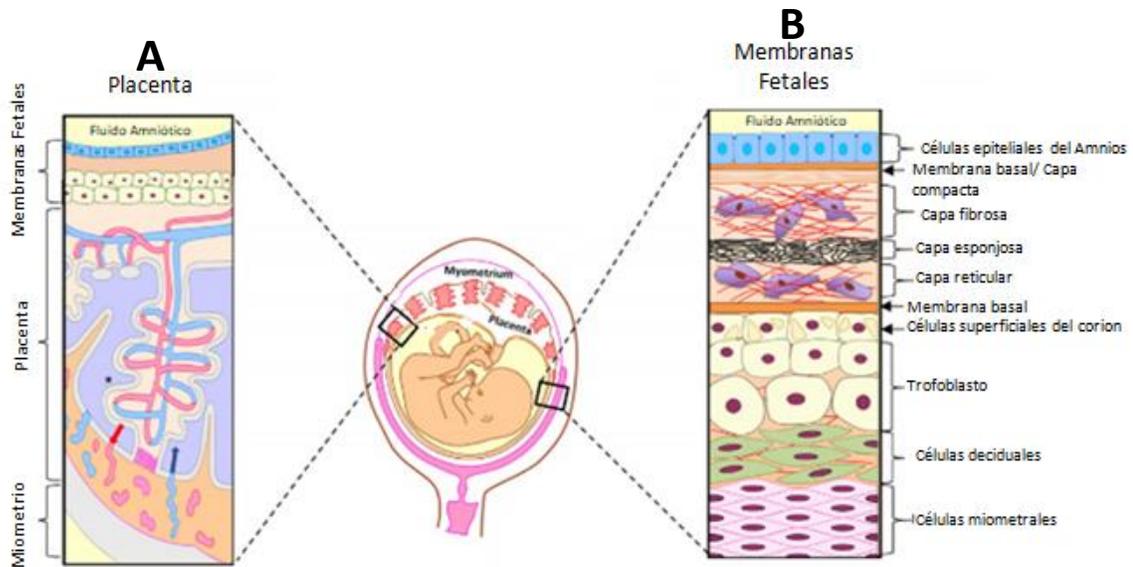
Las membranas fetales humanas (MFH) son un tejido accesorio de la placenta que comprende el epitelio amniótico (AM) y el tejido de la coriodecidua (CDH). El epitelio amniótico se forma a partir de los 8 días de la fertilización cuando ya está formado el blastocisto, esta masa celular interna del blastocisto forma un disco bilaminar formando el epiblasto y el hipoblasto [1; 11], al mismo tiempo, se genera un espacio en el epiblasto conocido como la cavidad amniótica rudimentaria. Las células del epiblasto que se encuentran en contacto con el sincitiotrofoblasto son conocidas como amnioblastos y éstas dan origen al epitelio amniótico (FIG. 1A) [1; 11; 12]. Posteriormente, las células del hipoblasto migran, diferenciándose en células mesenquimales (mesodermo extraembrionario) que darán origen a la capa de fibroblastos y de colágeno o tejido conectivo [11; 12].

El corion, se origina de una regresión parcial de vellosidades coriónicas; es decir, conforme el saco gestacional crezca, las vellosidades van a comprimir la parte baja de este saco, adyacente a la decidua basal y se reducirá el suministro vascular provocando su degeneración. Alrededor de la semana 6-8 se observa el tejido avascular liso del corion. Después, la fusión entre el tejido de la corion y el amnios se generará a partir de la expansión de la cavidad amniótica, formándose la membrana corioamniótica a las 17-20 semanas de gestación [4; 12] (FIG. 1B).



**FIGURA 1. Organogénesis de las membranas fetales. A. Epitelio amniótico.** A los 8 días después de la fertilización, la masa celular interna genera el disco bilaminar diferenciado en epiblasto e hipoblasto. La cavidad amniótica aparece en el centro del disco bilaminar. Conforme la cavidad se va expandiendo las células del epiblasto e hipoblasto migran. Modificado de Miki (2011). **B. Corion y fusión de amnio-corion.** Las vellosidades coriónicas cubren la superficie del saco gestacional a las cuatro semanas de gestación, después, algunas de las vellosidades comienzan a degenerarse formando el corion. La cavidad amniótica se agranda, se expande hacia afuera y se fusiona con el corion a las 17-20 semanas de gestación formando la membrana fetal. Modificado de Ilancheran y colaboradores (2009).

Como ya se ha mencionado, las MFH comprenden dos capas, el amnios y el corion, ambas capas poseen subcapas que sirven como conexión entre ambas y se le conoce como la matriz extracelular rica en colágeno (ECM por sus siglas en inglés) [4]. El amnios posee un grosor de ~0.02/0.05 mm, su estructura comprende 5 capas: el epitelio amniótico, la membrana basal, la capa compacta, la capa de fibroblastos y la capa esponjosa (FIG.2) [13].



**FIGURA 2. Estructura de las membranas fetales. A. Ubicación anatómica de las membranas fetales.** Después del miometrio, se encuentra la placenta, donde se alojan las membranas fetales humanas. En la parte superficial (a partir de la placenta hasta el fluido amniótico) se encuentra la corioidécida y en la región más interna el amnios (color azul). **B. Estructura de las membranas fetales.** La descripción comienza desde la capa más interna (amnios) y termina en el útero. Las células epiteliales de amnios están conectadas a la primera capa de la ECM llamada la membrana basal/capa compacta. La capa fibrosa, esponjosa y capas reticulares le proceden las cuales contienen células del estroma (células moradas). El corion se conecta al ECM a través de una membrana pseudo-basal. El corion se compone de dos tipos de celdas: (1) Células superficiales del corion que contienen vacuolas (círculos amarillos oscuros) y (2) las células de trofoblastos de corion. El corion interactúa con la decidua, comunicando al feto con los compartimentos maternos del útero. Tomada de Martín (2018).

*El epitelio amniótico:* Es la capa más interna del amnios y está en contacto con el líquido amniótico. Esta capa comprende una única línea celular con forma cuboidal y las células son mononucleares e internamente poseen muchas vacuolas de distintos tamaños. La cara opuesta de la membrana basal, es decir, la que está dando cara del líquido amniótico es convexa y presenta en toda su extensión microvellosidades [11; 13]. Estas células secretan glicoproteínas y fibras de colágeno, para la estructura de la membrana basal. Las células epiteliales también secretan una amplia variedad de factores de crecimiento y citocinas como lo son los factores de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ), interleucina 8 (IL-8), factores de crecimiento parecidos a la insulina, proteínas de unión, entre otras moléculas [11].

*Membrana basal:* Esta capa delgada que sigue del epitelio y posee una red de fibras reticulares, contiene colágeno intersticial y sirve como andamiaje para otras proteínas estructurales (laminina, entacina y proteoglicanos) [14].

*Capa compacta:* Esta capa prácticamente no posee células; sin embargo, es una red compleja de fibras reticulares, es la capa más fuerte del amnios, es una maya que superpone las fibras y permite su elasticidad. En esta se observan cúmulos de colágeno lo cual le permite su elasticidad y mantiene la integridad del amnios [13; 15].

*Capa de fibroblastos:* Es la capa más gruesa del amnios, comprende una red laxa de fibroblastos embebidos en una masa de reticulina, bañados en mucina. Esta capa permite la unión con el corion, el cual está adosado a la decidua.

*Capa esponjosa:* El tejido del celoma extraembrionario se comprime entre el amnios y el corion para formar la capa esponjosa. Sus haces de reticulina son fibras ramificadas que tienen nódulos de forma triangular en las uniones. Algunos fibroblastos aislados están presentes en esta capa. Esta capa con frecuencia se vuelve edematosa y, como tal, explica el aumento de espesor que a menudo ocurre en el amnios. Permite que el amnios se deslice sobre el corion subyacente que está firmemente adherido a la decidua materna.

*El corion:* Se encuentra cercano a la decidua materna y permite la tolerancia materno-fetal [4], posee cuatro capas que van del amnios a la decidua: celular, reticular, la membrana pseudo-basal y el trofoblasto (FIG. 2).

*La capa celular:* Es una capa delgada que consiste de una red entrelazada de fibroblastos.

*La capa reticular:* Esta capa posee la mayor parte del grosor del corion y consiste

en una red reticular, estas fibras tienden a ser paralelas y presentan nodos de donde divergen las ramas del corion.

*Membrana pseudo-basal.* En esta membrana el trofoblasto descansa, se puede decir que es la membrana basal del trofoblasto. Es una capa densa de tejido conectivo y de conexión a la capa reticular ya que internaliza sus fibras para la comunicación con el trofoblasto.

*Trofoblasto:* La capa más profunda del corion, puede tener de 2 a 10 capas de células del trofoblasto, posee residuos de las vellosidades del corion.

## *2.2 Función de las membranas fetales humanas.*

Durante el embarazo, las membranas fetales humanas cumplen una función fundamental de protección al feto y a la madre, además de proteger al feto permiten su correcto crecimiento y desarrollo, sufriendo modificaciones tanto mecánicas, estructurales, inmunológicas y endocrinas [4; 16].

La protección mecánica de las MFH permite el crecimiento fetal, ya que la matriz extracelular rica en colágeno (ECM) posee proteínas fibrosas embebidas en un gel de polisacáridos y diferentes tipos de colágeno lo que les da la propiedad de elasticidad, es decir, las MFH van a modificar su estructura conforme el feto vaya creciendo. La ECM responde activamente a la regeneración de los tejidos a partir de factores de crecimiento que promueven la proliferación, la migración y la diferenciación de las células epiteliales durante la gestación. Por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico y de queratinocitos estimula la proliferación y migración de las células epiteliales, jugando un papel importante en la remodelación de tejidos. De la misma manera, el factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF- $\beta$ ) regula la proliferación celular, la migración y la diferenciación, así como la

remodelación de la matriz extracelular. Por otra parte, TGF- $\beta$  inhibe la degradación de ECM aumentando la producción de colágeno, suprimiendo la expresión de metaloproteinasas y estimulando sus inhibidores de tejido. Toda esta respuesta latente de la ECM es la que permite el crecimiento de las MFH proporcionalmente con el crecimiento fetal.

Además de las propiedades tensiles de las MFH, poseen la capacidad de secretar citocinas anti-inflamatorias Th2 (IL-4, IL-10) se secretan durante un embarazo normal, cumpliendo con diferentes funciones como promover la formación placentaria, modular la invasión y diferenciación del trofoblasto, inducir la proliferación placentaria y angiogénesis e inhibir la secreción de citocinas pro-inflamatorias. La citocina tipo 4 (IL-4) se produce comúnmente por las células inmunológicas de la placenta, aunque también las MFH secretan altas cantidades de esta citocina y de su promotor la progesterona ( $P_4$ ), estas moléculas en conjunto inhiben la secreción de citocinas del tipo Th1 (pro-inflamatorias). Las células deciduales son importantes productoras de IL-10, la función que cumple es el mantenimiento del tejido placentario y el crecimiento y desarrollo del feto. En mujeres embarazadas, se ha observado el incremento de IL-10 durante los 2 primeros trimestres del embarazo y una disminución en el tercer trimestre [17; 18].

Como se ha mencionado, el tejido de la coriodeciduala permite la tolerancia materno-fetal, estudios han demostrado que en células de la decidua se expresan linfocitos B que en respuesta al estímulo de IL-4, IL-6 e IL-10 expresan IgG y alguna disrupción en este mecanismo podría producir un aborto. IgG es una molécula de histocompatibilidad de clase I que tiene una función fundamental en la tolerancia del feto a través de la inhibición de la citólisis celular fetal por medio de las células natural killer (NK) [16; 18; 19].

Las células deciduales expresan macrófagos capaces de secretar moléculas reguladoras como IL-10, prostaglandinas, esta clase de macrófagos son de tipo 2 (M2), por su fenotipo anti-inflamatorio y capaz de llevar a cabo la remodelación del tejido [19].

### *2.3 Ruptura de las membranas fetales humanas*

Al final del embarazo, a partir de las 37 semanas, disminuye toda la respuesta anti-inflamatoria (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1), consecuentemente se desencadena una respuesta pro-inflamatoria por parte de las MFH habiendo una secreción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8, y se produce la secreción de MMP-2, MMP-9 y factores uterotónicos. La secreción de MMP-2, -9 y factores uterotónicos producen la degradación de la ECM y se separa el amnios de la coriodecidual, a este fenómeno se le conoce como ruptura de las membranas fetales humanas [15; 16; 20]. La ruptura de las membranas fetales humanas ocurre en respuesta de factores uterotónicos (oxitocina, vasopresina) que llevan a cabo las contracciones uterinas. Además, la infiltración de células T, neutrófilos y macrófagos favorece la respuesta inflamatoria en las MFH. La infiltración de los leucocitos puede ocurrir por el miometrio o por la cavidad uterina, sin embargo, la cavidad uterina la cual está en estrecho contacto con la coriodecidual es el principal medio de infiltración de leucocitos para las MFH [16; 21]. Al mismo tiempo en que los leucocitos se infiltran por la coriodecidual [22], el amnio-corion empieza a secretar agentes quimiotácticos y entonces en las MFH muestran un incremento de células Th1 y de monocitos los que permiten una gran señalización para el trabajo de parto que incluye la secreción de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8. Estas moléculas son el primer paso a la respuesta inflamatoria ya que anteceden a una segunda respuesta inflamatoria [15; 16].

Por ejemplo, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  inducen la producción de prostaglandinas, MMP-2, y MMP-9. IL-8 es regulada por IL-1 $\beta$ , IL-8 mejora las contracciones uterinas miométriales inducidas por IL-1 $\beta$  a través de la prostaglandina lo cual aumenta la expresión de los receptores de TGF- $\alpha$  en el miometrio [16]. Está bien reportado que después de la primer respuesta inflamatoria, las células Th1 secretan la metaloproteinasa 2 y 9 de tipo colagenolítica (MMP-9, -2) y a partir de estas moléculas se degradan diferentes componentes de la matriz extracelular y generan la ruptura de las MFH durante el trabajo de parto [15; 16].

Además de estos factores, Menon (2016) ha reportado que la ruptura de las MFH también se debe a la senescencia inducida por p38 MAPK dependiente de telómeros. p38 MAPK se activa a partir del estrés oxidativo generado por la misma respuesta inflamatoria y el colapso proteolítico de la ECM, y una vez que se incrementa la p38 MAPK hay una disminución en las capacidades funcionales y mecánicas hasta favorecer la ruptura de las MFH.

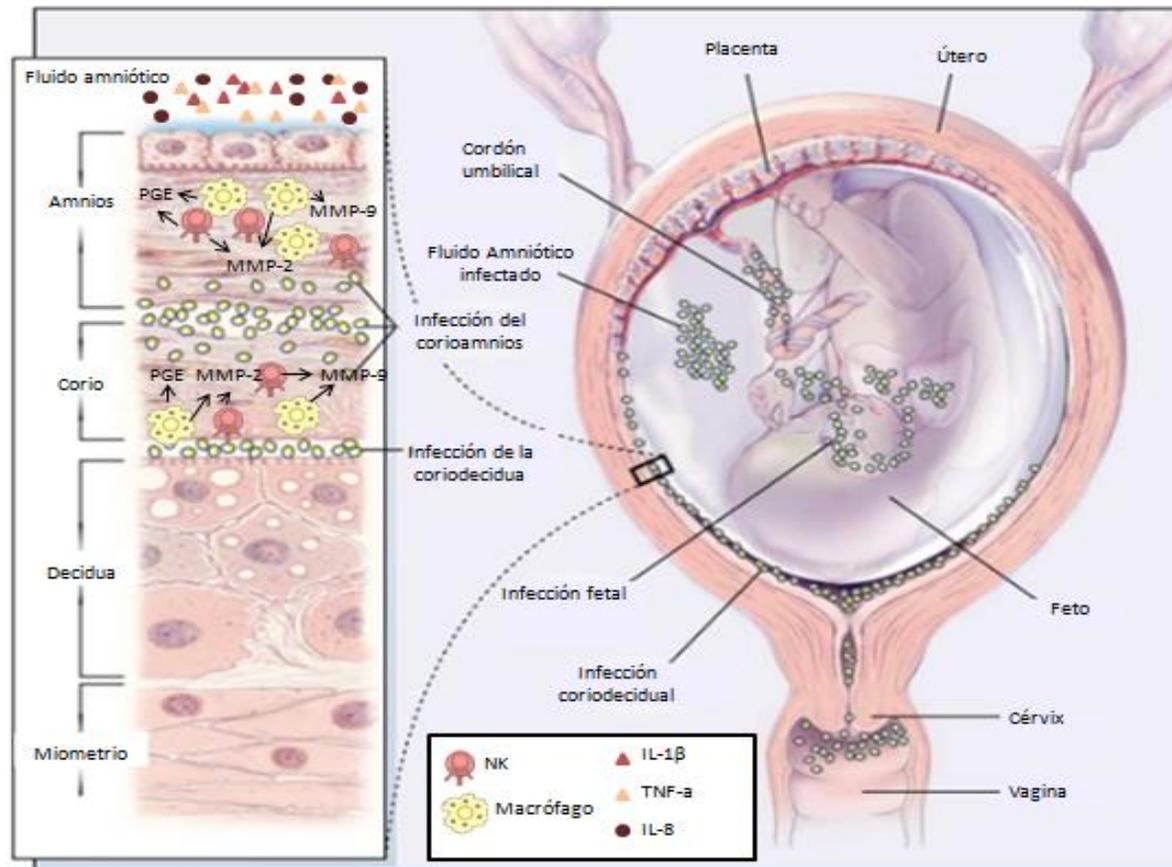
Las células de membranas fetales senescentes producen un fenotipo secretor asociado a senescencia (inflamación de SASP) y también libera daño pro-inflamatorio asociado a patrones moleculares (DAMP), concretamente HMGB1 y fragmentos de telómeros fetales libres de células. En un ciclo de retroalimentación, SASP y DAMP aumentan la senescencia y aumentan la carga inflamatoria lo que promueve el trabajo de parto [4; 23].

#### *2.4 Infecciones intrauterinas.*

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) durante los últimos 20 años se ha incrementado el número de incidencias de parto prematuro. El parto prematuro es la activación del parto antes de las 37 semanas del embarazo y aproximadamente un millón de niños prematuros mueren cada año. Los neonatos

nacidos prematuros que sobreviven sufren algún tipo de discapacidad de por vida como son capacidad de aprendizaje, auditivo y visual (Romero et al., 2014). Las causas que desencadenan un nacimiento prematuro puede ser la salud y nutrición materna (5.0%), hemorragias producidas por desprendimientos de la decidua (15.0%), distensiones uterinas (7.0%), causas desconocidas o idiopáticas (3.0%) y las infecciones intrauterinas (70.0%).

Las infecciones intrauterinas provocan la ruptura prematura de las MFH, el proceso infeccioso se inicia por una disminución en la cuenta viable de los lactobacilos que habitan comúnmente en la microbiota vaginal (*Lactobacillus vaginalis*, *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii*), esta disminución de lactobacilos puede ser ocasionada por el consumo de antibióticos de la madre o por alguna exposición viral [24]. El *lactobacillus spp.* favorece a un medio saludable en el tracto vaginal, contribuyendo al mantenimiento de un pH bajo (<4.5) por medio de la producción de ácido láctico. Cuando disminuye la población de los lactobacilos se rompe este equilibrio y se lleva a cabo la colonización de bacterias patógenas (FIG. 3). Las bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* ascienden por el tracto cervico-vaginal hasta contactar con las membranas fetales quienes responden con un proceso pro-inflamatorio, este proceso inflamatorio inicia por la secreción de citocinas inflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , quimiocinas IL-8 [25; 26], las cuales promueven la infiltración de células especializadas del sistema inmune como macrófagos y células natural-killer (NK), quienes a su vez secretan factores uterotónicos como la PGE, además de degradadores de matriz extracelular como los son la MMP-2 y -9 comprometiendo a las MFH, generando la ruptura del tejido [4; 27]. Dentro de toda esta microbiota patógena se ha observado que la cepa *Escherichia coli* obtenida de la cavidad oral presenta tolerancia a endotoxinas [28], por lo tanto, se cree que cuando la microbiota asciende en el tracto vaginal, *E. coli* favorece la colonización [24].



**FIGURA 3. Infección Intrauterina.** Cuando ocurre la disminución de *Lactobacillus* y el establecimiento y colonización de bacterias patógenas, empieza la infección con el ascenso de bacterias patógenas por el tracto cérvico-uterino que al contactar con las membranas fetales humanas y con las células profesionales del sistema inmunológico (macrófagos, células NK) se estimula la secreción de los factores uterotónicos (PGE, prostaglandina), y de las MMP-2, -9. Las bacterias al evadir la respuesta de las MFH logran invadir el líquido amniótico activando la secreción de las citocinas inflamatorias y de las MMP-2 y -9 y posteriormente al producto. Imagen modificada de Goldenberg (2000).

#### 2.4.1 *Escherichia coli* como agente patógeno en infecciones intrauterinas.

El género *Escherichia* que fue nombrado por el pediatra alemán Theodor Escherichia, consiste en una bacteria anaerobia facultativa gram-negativa que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. La especie de este género, *Escherichia coli* (*E. coli*), comúnmente se encuentra en la microbiota intestinal [29], algunas cepas de *E. coli* pueden provocar una gran variedad de enfermedades infecciosas como diarrea, infecciones del tracto urinario, septicemia y meningitis neonatal. Los análisis filogenéticos han demostrado que las cepas de *E. coli* se dividen en cuatro grupos filogenéticos principales (A, B1, B2 y D) [30] y que las cepas virulentas extraintestinales pertenecen principalmente al grupo B2 y, en menor medida, al grupo D, mientras que la mayoría de las cepas comensales pertenecen al grupo A [29].

Cepas de *E. coli* extraintestinales se han localizado en el tracto uterino y en la cavidad amniótica [24; 27]. Sin embargo, no generan ningún proceso infeccioso, incluso favorecen protegiendo inmunológicamente, secretando moléculas anti-inflamatorias durante el embarazo [24]. Existe una barrera entre el comensalismo de *E. coli* y su virulencia y como ya se ha mencionado, un cambio en el pH del cérvix genera su colonización y patogenicidad [24; 27].

*E. coli* es el principal agente etiológico durante el embarazo y representa el 90% de las infecciones asociándose con complicaciones múltiples como restricción del crecimiento fetal, parto prematuro, parálisis cerebral, septicemia o muerte materna, además, presenta una fuerte resistencia a antibióticos lo cual perfila a la bacteria como un agente patogénico importante durante el periodo perinatal [31].

Las adhesinas, el antígeno capsular K1, las hemolisinas, la aerobactina y la proteína de invasión IbeA desempeñan un papel esencial en la patogénesis de las infecciones causadas por *E. coli* [31]. Esta bacteria posee la capacidad de invadir células epiteliales, replicar en macrófagos e inducir la liberación de TNF- $\alpha$  y una fuerte respuesta inflamatoria a partir del lipopolisacárido (LPS) que posee en su membrana por medio del receptor de tipo toll (TLR) [32].

## 2.5 *MicroRNAs*

Los microRNAs (miRNAs) constituyen una amplia familia de moléculas de RNA no codificante de alrededor de 21-23 nucleótidos. Estos se descubrieron hace más de 20 años como reguladores post-transcripcionales generando cambios epigenéticos. Se descubrieron por primera vez en el nematodo *Caenorabditis elegans*, se describió como una doble cadena de RNA (dsRNA) que realiza el silenciamiento específico génico [33]. Estudios posteriores demostraron que este fenómeno ocurría en plantas, mamíferos incluyendo al hombre.

En seres humanos, se ha hecho un amplio estudio de los miRNAs como biomarcadores predictivos en patologías, a partir del descubrimiento de la expresión de miRNAs en tejido placentario, algunas moléculas se han propuesto como un fuerte diagnóstico durante la gestación debido a que diversos miRNAs son secretados del tejido placentario por medio de exosomas y pueden ser detectados en el plasma o suero sanguíneo de la madre lo cual le da una ventaja como prueba no invasiva [34].

En la respuesta inflamatoria, se ha visto la intervención de estas moléculas. Lee y colaboradores (2016) demostraron que el incremento del miR-146a modula la secreción de las citocinas inflamatorias, además miR-146 al igual que miR-494 incrementan niveles de expresión para TNF $\alpha$  [7; 32]. En el caso contrario, miR-451

inhibe la expresión de TNF- $\alpha$  y los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6 [35]. La secreción de las metaloproteasas de matriz extracelular de tipo colagenolítica (MMP-9) disminuye de acuerdo con el incremento en la expresión de miR-126.

### *2.5.1 Biogénesis de los miRNAs*

Los miRNAs son codificados por exones y en algunos casos por intrones codificantes o no codificantes e incluso pueden ser codificados por un loci que se encuentra cerca de otro, constituyendo una unidad transcripcional policistrónica [36]. La transcripción de los miRNAs se realiza por la RNA polimerasa II (RNA pol II) y es controlada por la RNA pol II-asociada a factores de transcripción y reguladores epigenéticos. Los factores de transcripción como p53, MYC, ZEB1 y ZEB2 y la proteína de determinación de mioblastos 1 (MYOD1) pueden regular de manera positiva o negativa los miRNAs. La RNA pol II genera un transcrito primario largo (pri-miRNA) que tiene una estructura de horquilla donde las secuencias del miRNA están unidas por una secuencia complementaria, a excepción de la parte apical de la horquilla donde la secuencia no se encuentra unida.

#### *Edición del núcleo.*

Después de la transcripción el pri-miRNA pasa por varias ediciones para su maduración. El pri-miRNA es muy largo (generalmente más de 1 kb) la estructura común posee al final de la horquilla de segmentos de RNA de cadena simple y ambos con su 5' y 3' en cada lado. La RNasa nuclear Drosha inicia el proceso de maduración cortando la horquilla para liberar un pequeño RNA también en forma de horquilla de ~ 65 nucleótidos de longitud (pre-miRNA). Junto con su cofactor esencial DGCR8, Drosha forma un complejo llamado Microprocesador. Drosha es

una proteína nuclear de ~ 160kDa, y Drosha, así como Dicer, pertenece a una familia de endonucleasas de tipo RNasa III que actúan específicamente sobre el RNA de doble cadena (dsRNA), DGCR8 es una proteína de ~ 90 kDa (aunque tiene una masa aparente de ~120 kDa en SDS-PAGE) que se localiza en el nucleoplasma y el nucleolo. El dominio de unión al hemo y su interacción con los iones férricos son necesarios para un procesamiento eficiente del pri-miRNA. Drosha corta de la horquilla a aproximadamente 11 pb de la unión "basal" entre el RNA monocatenario y el RNA bicatenario y aproximadamente a 22 pb de la unión "apical" unida al asa terminal. La unión basal funciona como el principal punto de referencia para determinar el sitio de escisión, pero la unión apical también es importante para un procesamiento eficiente y preciso.

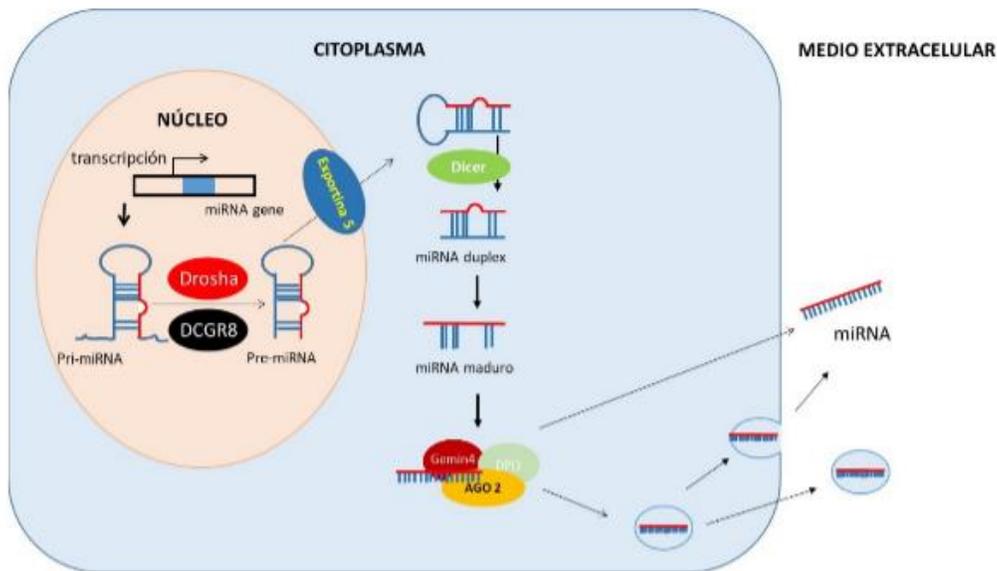
#### *Exportación del núcleo.*

Después del procesamiento de Drosha, el pre-miRNA se exporta al citoplasma, donde se puede completar la maduración. La proteína exportina 5 (EXP5), forma un complejo de transporte con la proteína nuclear de unión a GTP RNA • GTP y un pre-miRNA. Tras la translocación a través del complejo de poro nuclear, el GTP se hidroliza, lo que da como resultado el desensamblaje del complejo y la liberación del pre-miRNA en el citosol.

### Procesamiento citoplasmático.

Tras la exportación al citoplasma, pre-miRNA sufre una escisión por Dicer cerca del bucle terminal, liberando un pequeño dúplex de RNA. Dicer es una endonucleasa de tipo RNasa III de ~ 200 kDa. Los dominios en tandem C-terminal de RNasa III de Dicer forman un dímero intramolecular para crear un centro catalítico, similar a los de Drosha. El dominio helicasa N-terminal de Dicer facilita el reconocimiento de pre-miRNA al interactuar con el bucle terminal y aumenta el procesamiento de ciertos pre-miRNAs.

El dúplex de RNA pequeño generado por Dicer se carga posteriormente en una proteína argonauta (AGO) para formar un complejo efector denominado complejo silenciador RNA-inducido (RISC). El montaje de RISC implica dos pasos: la carga del dúplex de RNA y su desenrollamiento posterior (FIG. 4).



**FIGURA 4. Biogénesis de los microRNAs.** La transcripción de los miRNAs inicia en el núcleo por RNA pol II y se obtiene un pri-miRNA el cual es procesado por el complejo de Drosha (RNasa III) y la proteína DGCR8 que forman un complejo llamado microprocesador como se muestra (rojo y negro). Drosha a través de su dominio de unión al RNA bicatenario, reconoce al sustrato del pri-miRNA, y mediante sus dominios de RNasa III (RIIIds a-b) escinden las cadenas laterales del pri-miRNA para formar un pre-miRNA. Posteriormente, la exportina 5 junto con el cofactor RAN transportan los pre-miRNA del núcleo al citoplasma. En el citoplasma, la RNAasa de tipo III (Dicer) procesa al pre-miRNA generando al miRNA dúplex de ~22 pares de bases. Posteriormente el miRNA dúplex es reconocido por secuencias del complejo AGO2 los cuales concluyen con las ediciones dando lugar al miRNA maduro. Modificado de Bartel (2004).

### *2.5.1 Función de los miRNAs*

Los mecanismos de acción de los miRNAs no son completamente claros, pero se sabe que los miRNAs son cruciales para la estabilidad y el mantenimiento de la expresión de un gen, a través de la degradación de un RNA mensajero (mRNA) o la inhibición en la síntesis de las proteínas.

Los miRNAs pueden actuar directamente en los mRNA blanco uniéndose a la secuencia complementaria de su región 3' no transcripcional (3'UTR) de aproximadamente 6 a 8 nt de longitud, cuando la cadena líder del miRNA se complementa con la región 3' UTR, ocurre una regulación epigenética por medio de la degradación del mRNA blanco o la inhibición de la traducción de proteínas. Los avances recientes con las tecnologías ómicas han progresado con la comprensión del papel de codificación de RNA en la expresión génica y el metabolismo celular en varios procesos, incluida la inflamación. Por otra parte, los miRNAs proporcionan un enlace entre las vías de señalización de respuesta inmune y también en la respuesta inflamatoria temprana o tardía [32].

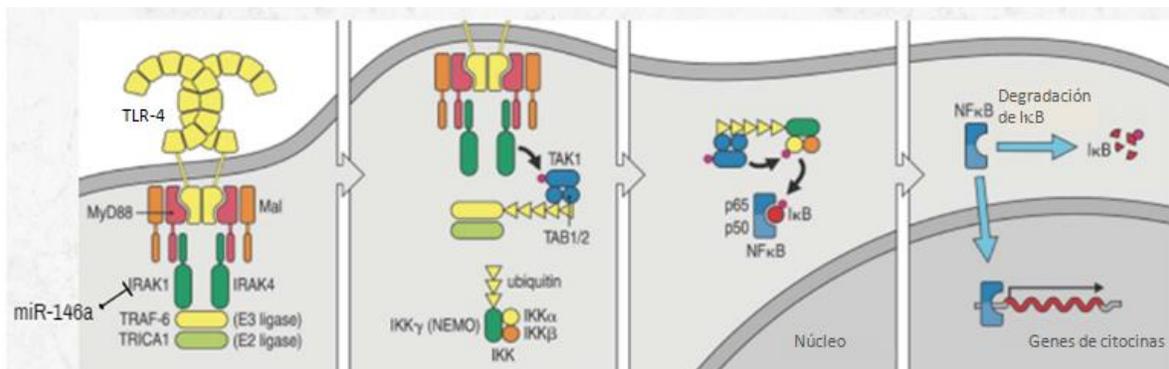
Los estudios in vitro e in vivo han demostrado la participación esencial de algunos de estos miRNAs en la producción y regulación de diversas citocinas proinflamatorias. En conjunto, estos hallazgos indican una participación de miRNAs en el inicio, progresión y mantenimiento de varias patologías.

#### *Función de mir-146a*

La familia del mir-146 se subdivide en dos; mir-146a y mir-146b ambos localizados en el cromosoma 5 y 10 respectivamente. El primer estudio de ambos miRNAs fue realizado por Taganov y colaboradores [37] en respuesta inmune en células humanas monocíticas THP-1 a partir de su activación por medio de LPS. En las células se utilizó un gen reportero con luciferasa en la región 3'UTR de TRAF e IRAK. Lo que se observó fue que hubo un incremento de miR-146a a diferencia de

miR-146b, además también había una expresión alta del factor de transcripción NFK-B lo que sugirió que miR-146a es dependiente de NFK-B. Hoy en día se sabe que miR-146a es un regulador importante en la señalización de TLR-4 por medio de la cascada de señalización de MyD88 como parte de una respuesta inmune inflamatoria (FIG. 5).

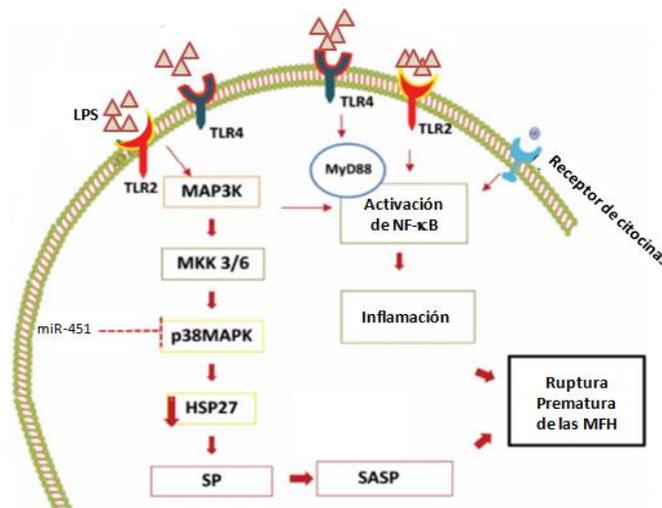
Muchos estudios de perfiles de expresión han demostrado patrones distintos de expresión de miR-146 en varios linajes hematopoyéticos, lo que sugiere su participación en el mantenimiento de la identidad del linaje en subconjuntos de linfocitos. Por ejemplo, la abundancia de miR-146 es mayor en células T helper tipo 1, pero menor en células T helper tipo 2 en comparación con la de las células T vírgenes maduras. Además, miR-146 es uno de los miRNAs más expresados en células T reguladoras y, en general, el patrón de expresión del miRNA del linaje de células T reguladoras (así como la expresión constitutiva de CD25 de las células) se asemeja al perfil de activación en lugar de células T vírgenes [38].



**FIGURA 5. Función del miR-146a** La cascada de señalización que se activa en presencia de LPS comienza por un receptor de tipo toll (comúnmente TLR-4), continúa con las proteínas citosólicas a partir de MyD88 y a partir de fosforilaciones activa al factor de transcripción NF-κB, quien activa los genes de citocinas. IRAK1 es parte de esta transducción y miR-146 inhibe a su RNA mensajero, impidiendo su síntesis y consecuentemente no se lleva a cabo toda la señalización. miR-146 actúa como inhibidor de la expresión de genes de citocinas, específicamente IL-8 e IL-1β. Imagen modificada de Janeway (2012).

## *Función de mir-451*

MiR-451 se expresa principalmente en el plasma. Puede regular el crecimiento celular, la apoptosis y el desarrollo tumoral, además, miR-451 regula citocinas de acuerdo a un estudio que demuestra que son secretadas por células dendríticas en determinadas condiciones [39], además, Wang *et. al.* (2015) en células de fibroblasto sinovial, demostró que las citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) disminuían en presencia del miR-451 y que las mismas células estimuladas con miR-451 disminuían de manera significativa la p38 MAPK [35], esta proteína se activa como una vía alterna en la respuesta inflamatoria y está reportada como la responsable de la senescencia y ruptura de las membranas fetales humanas (FIG. 6) [4].



**FIGURA 6. Función del miR-451.** La cascada de señalización que se activa en presencia de LPS comienza por un receptor de tipo toll (comúnmente TLR-2), continúa con las proteínas citosólicas a partir de MAP3K y a partir de fosforilaciones puede conducir al desarrollo del fenotipo de senescencia (SP) en células fetales humanas. Las células senescentes causan una respuesta inflamatoria única que se conoce como fenotipo secretor asociada a la senescencia (SASP). Con SASP, un conjunto único de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos y enzimas degradadoras de ECM. miR-451 puede actuar como inhibidor de la expresión de p38 MAPK y su consecuente respuesta inflamatoria. La imagen fue modificada de Bredeson y cols. (2014).

### 3.0 JUSTIFICACIÓN

*Escherichia coli* y sus componentes estructurales activan en el tejido de la coriodecidua la secreción de diferentes mediadores de la respuesta inflamatoria y degradativa. Actualmente se conoce que algunos miRNAs regulan la respuesta inflamatoria inducida por diferentes procesos infecciosos, como el miR-146a y -451 los cuales inhiben la traducción de proteínas (IRAK y p38 MAPK respectivamente) quienes intervienen en cascadas de señalización que activan el factor de transcripción NFK-B el cual promueve la traducción de citocinas inflamatorias. Estas cascadas de señalización se activan en respuesta a LPS propio de bacterias gram negativas, como *E. coli*; sin embargo, no se ha demostrado el efecto de *E. coli* en la modulación de la expresión del miR-146a y miR-451 en las MFH.

## 4.0 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

- Determinar la expresión del miR-146 y miR-451 en las membranas fetales humanas después de la estimulación con *E. coli* en un modelo in vitro.

### 4.2 Objetivos particulares

- ✓ Cuantificar la expresión del miR-146 y miR-451 en las membranas fetales humanas (amnios y coriodecidua) después de las 3, 6 y 24 horas de estimulación con *E. coli* en la coriodecidua.
- ✓ Cuantificar la expresión del miR-146 y miR-451 en las membranas fetales humanas (amnios y coriodecidua) después de las 3, 6 y 24 horas de estimulación con *E. coli* en el amnios.
- ✓ Comparar los niveles de expresión entre el tejido de la coriodecidua y el epitelio amniótico para cada una de las estimulaciones.

## 5.0 HIPÓTESIS

Al estimular las membranas corioamnióticas humanas existirá una expresión diferencial en cuanto a tiempo y concentración de *E. coli* del miR-146a y miR-451 mostrando una respuesta anti-inflamatoria.

## 6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

### *6.1 Aspectos éticos.*

Previo a la obtención de las MFH se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes en donde se les explicó la finalidad del proyecto de investigación el cual ha sido aprobado por los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad institucionales con el número de registro 2017-2-82 (Anexo I). A cada paciente se le entregó la carta de consentimiento informado para que firmaran de manera libre (Anexo II).

### *6.2 Características de las pacientes.*

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

### *6.3 Obtención de las MFH*

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

#### *6.3.1 Procesamiento de las MFH en el sistema de Transwell.*

En la campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad a las MFH se les quitó la sangre adherida al tejido. Las MFH fueron cortadas en porciones de 2 cm<sup>2</sup>

y los explantes fueron montados en el sistema de Transwell como ha sido previamente reportado por nuestro grupo de investigación [25; 26]. Este sistema permite tener dos regiones (amnios y coriodecidua) independientes, pero manteniendo la estructura y comunicación celular. Una porción de las MFH se analizó para la detección de bacterias patógenos. Las MFH se incubaron con 1 ml de medio de cultivo DMEM a cada región suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SBF) y 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/mL y 100 µg/mL respectivamente; Gibco, Bethesda, MD, USA) e incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Al término de este periodo, se les retiró el medio de cultivo, a cada región se le adicionó PBS (1x), con la finalidad de eliminar el SBF este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, a cada región se le adicionó 1 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con 0.2% de hidrolizado de lactoalbúmina (DMEM-HLA; Gibco) e incubados en las condiciones arriba descritas.

#### 6.4 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una bacteria Gram-negativa, la cual fue aislada de canal cérvico-vaginal de paciente con datos clínicos de corioamnionitis que presentó ruptura prematura de membranas fetales con más de 72-horas de progresión. La identificación de *E. coli* se realizó por pruebas bacteriológicas que mediante el lector automatizado VITEC a partir del crecimiento en medio McConkey (lactosa positiva), y su sensibilidad a antimicrobianos por el método de difusión en disco. Su filogenia fue determinada con iniciadores específicos para los genes *chuA* y *yjaA* la cual corresponde al grupo B2 [29]. Dada las características patogénicas de *E. coli* se utilizó campana de bioseguridad nivel II con el siguiente equipo de seguridad personal: cubre bocas, guantes de látex los cuales serán desechados en bolsa de polietileno color roja. Para la protección de los ojos se usarán lentes

los cuales fueron limpiados con una gasa roseada de alcohol que fue eliminada en bolsa roja.

#### *6.4.1 Estimulación de las MFH con E. coli*

Las MFH se estimularon con *E. coli* ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/ml) por 3, 6 y 24-horas y en cada intervalo de tiempo se manejó un control experimental. El medio de cultivo se recuperó a las 3, 6 y 24 horas después de la estimulación y en cada caso las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se recuperó en tubo Eppendorf y se almacenó a  $-70$  °C para determinar el perfil de expresión del miR-146a y -451 a partir del RNA total.

#### *6.5 Extracción del RNA total.*

A 500  $\mu$ l de medio de cultivo de cada procedimiento de estimulación se le adicionó el mismo volumen de TRIzol (InvitroGen; Carlsbad, CA) la mezcla se agitó vigorosamente por 15 seg y se incubaron por 15 min a  $30^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente a cada muestra se les añadió 100  $\mu$ l de cloroformo (Invitrogen), se agitaron por 15 seg. y fueron incubadas por 5 min a  $30^{\circ}\text{C}$ . Al término las muestras fueron centrifugadas a 4 000 rpm por 15 min y la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le agregó 550  $\mu$ l de isopropanol (Invitrogen) y 1  $\mu$ l de Glucógeno (Invitrogen). Posteriormente se incubaron por 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al término de este tiempo las muestras se centrifugaron a 4 000rpm por 30 min. Al pellet se le adicionó 1 ml de etanol al 100% y se agito vigorosamente por 15 seg., y fue centrifugado nuevamente a 4000 rpm por 15 min. El procedimiento se repitió una vez más con etanol al 75%. El RNA fue evaporado toda la noche a temperatura ambiente, y al día siguiente fue hidratado con 20  $\mu$ l de agua inyectable.

### 6.5.1 Reacción de RT-PCR

Para la obtención del cDNA se utilizó el kit Access RT-PCR System (RT-PCR, cat A1250; Promega Madison WI, USA). Se tomaron 7 ng de cada una de las muestras y se preparó el mix de RT con 5 µL de Buffer AMV-Tfi 5X, 1 µL dNTP [10 mM], 2 µL MgSO<sub>4</sub> [50 mM], 10 µL agua libre de RNAsas, 1 µL de AMV RT y 1 µL de iniciador específico de RT miR-451 [20 pmol; tabla 1]. La síntesis del cDNA se realizó durante 45 minutos a una temperatura de 45°C.

**TABLA 1.** Secuencia de iniciadores específicos para RT.

miRNA	Secuencia (5' a 3')	Número de pb	Tamaño esperado
146a	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GGG TAT TCG CAC TGG ATA CGA CAA CCC A	49	65
451	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTA GAT ACG ACA ACT CA	50	66

*La secuencia de los iniciadores fue diseñada a partir de la secuencia de hsa-miR-146a y -451 maduros obtenida por el sitio web [www.mirBase.org](http://www.mirBase.org).*

### 6.5.2 Reacción de PCR

A partir del cDNA obtenido se trabajó con 10 µL del mismo y con un mix de PCR el cual contenía 5 µL de Buffer AMV-Tfi 5X, 1 µL dNTP [10 mM], 2 µL MgSO<sub>4</sub> [50 mM], 10 µL agua libre de RNAsas, 1 µL de Tfi, 1 µL de iniciador específico para PCR miR-451 [20 pmol] y 1 µL iniciador universal [20 pmol; tabla 2]. Cada uno de los tubos fueron procesados en el termociclador con el siguiente programa: 94°C

para una elongación inicial durante un minuto y 40 ciclos con 94°C durante 30 segundos, 56°C en 30 segundos, 72°C durante 30 segundos. Se realizó una elongación final de 72° durante 10 minutos.

**TABLA 2.** Secuencia de iniciadores específicos para PCR.

miRNA	Secuencia (5' a 3')	Tamaño esperado
Universal (Rev)	GTG CAG GGT CCG AGG T	
146a (forw)	CGG CCG ACT CTT GAC	71
451 (forw)	CGG CCG AAA CCG TTA CC	72

*La secuencia de los iniciadores fue diseñada a partir de la secuencia de hsa-miR-146a y -451 maduros obtenida por el sitio web [www.mirBase.org](http://www.mirBase.org).*

### 6.5.3 Expresión del miR-146a y miR-451.

Los amplificadores fueron sometidos en geles de agarosa al 4% a voltaje constante por 40 minutos y las bandas fueron visualizadas en luz UV. Las imágenes fueron capturadas usando el sistema fotodocumentador (Gel Doc 2000. Bio-Rad, USA). El perfil de las bandas del miR-451 y miR-146a en las diferentes condiciones experimentales de infección fueron determinadas mediante la densidad óptica utilizando el programa ImageJ (NIH; USA).

### 6.6 Análisis estadístico

Los datos de expresión fueron reportados como la media  $\pm$  desviación estándar y la comparación entre los tratamientos se realizó mediante la prueba de ANOVA de

una sola vía seguida de la Tukey con una diferencia estadística menor a 0.05

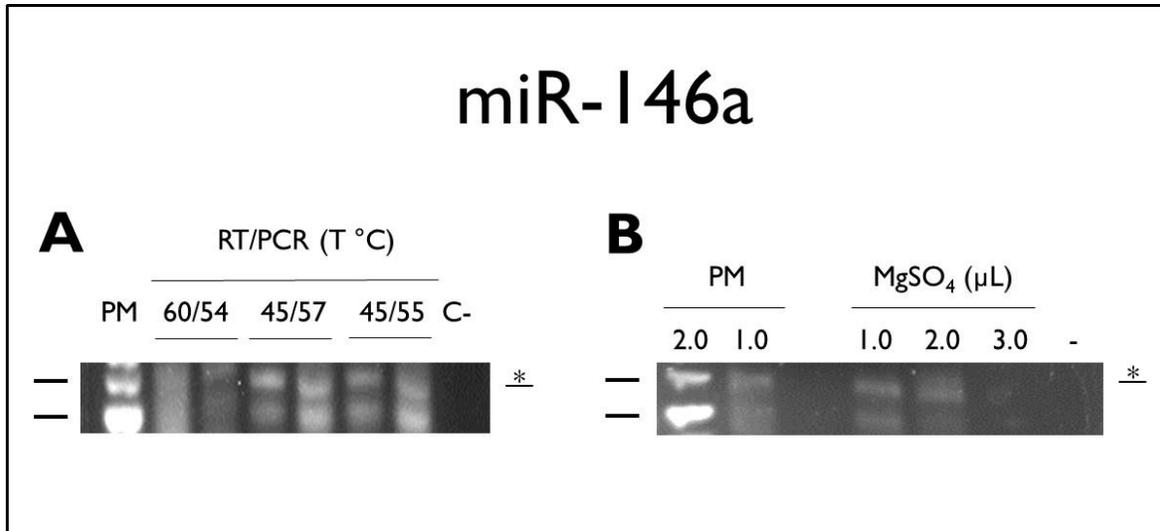
## 7.0 RESULTADOS

### 7.1 Características de las pacientes

En el periodo de febrero del 2017 a enero del 2018 se obtuvieron un total de 9 membranas fetales humanas. En todos los casos se determinó la identificación de bacterias patógenas la cual se realizó en el departamento de Infectología del INPer. Tres de las MFH fueron excluidas del estudio por presentar el desarrollo de *Staphylococcus coagulasa* negativa, *E. coli*, *Streptococos* del grupo B, y cocos Gram-positivos. Seis de las MFH fueron procesadas y montadas en el sistema de Transwell.

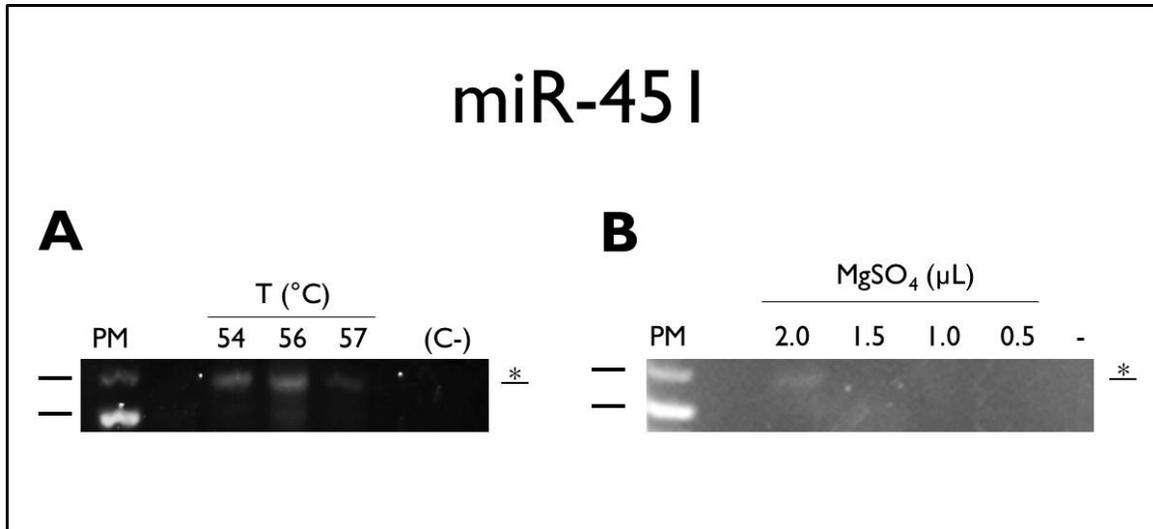
Antes de determinar el perfil de expresión del miR-146a y -451 en el tejido de la coriodecidual y del epitelio amniótico en las diferentes condiciones de estimulación se inició a determinar las condiciones de temperatura y la concentración de MgSO<sub>4</sub> para lo cual se tomó como control de expresión una porción de la placenta humana.

Se realizó la expresión del miR-146a a tres temperaturas tanto de RT como de PCR (FIG.7A) y se obtuvo una mejor banda de expresión a una temperatura de 45 y 57 °C (RT/PCR). Posteriormente se prosiguió a determinar las concentraciones de MgSO<sub>4</sub> y se obtuvo que con 2 µL [50 mM] se da la mejor banda de amplificación (FIG 7B).



**FIGURA 7. Perfil de expresión del miR-146a.** Para estandarizar las condiciones de temperatura de retrotranscripción y de amplificación (RT/PCR; A) y la concentración de MgSO<sub>4</sub> (B) se utilizó una porción placenta de paciente sana a término y sin trabajo de parto la cual fue intervenida por cesárea. Peso molecular (PM; invitrogen) de 50 y 75 pares de bases respectivamente y se indica la banda de interés (asterisco).

Se realizó la expresión del miR-146a a tres temperaturas tanto de RT como de PCR (FIG. 8A) y se obtuvo una mejor banda de expresión a una temperatura de 45 y 57 °C (RT/PCR). Posteriormente se prosiguió a determinar las concentraciones de MgSO<sub>4</sub> y se obtuvo que con 2 μL [50 mM] se da la mejor banda de amplificación (FIG. 8B).



**FIGURA 8. Perfil de expresión del miR-451.** Para estandarizar las condiciones de temperatura de retrotranscripción y de amplificación (RT/PCR; A) y la concentración de MgSO<sub>4</sub> (B) se utilizó una porción placenta de paciente sana a término y sin trabajo de parto la cual fue intervenida por cesárea. Peso molecular (PM; invitrogen) de 50 y 75 pares de bases respectivamente y se indica la banda de interés (asterisco).

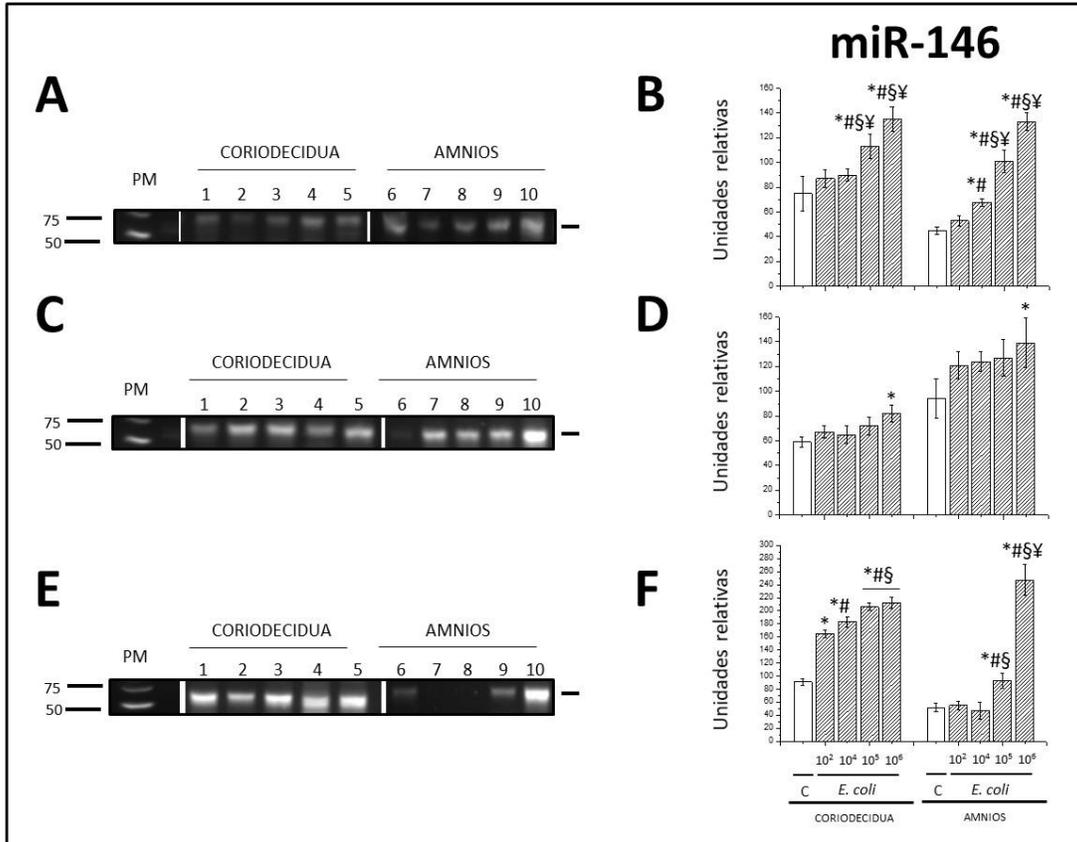
Con las condiciones de temperatura de alineamiento y concentración de MgSO<sub>4</sub> se prosiguió a evaluar el perfil de expresión del ambos miRNAs en el tejido de la coriodeciduala después de la estimulación con diferentes unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de *E. coli* a las 3, 6 y 24 horas.

## 7.2. Expresión de miRNAs estimulando el tejido de la coriodeciduala.

### 7.2.1. miR-146a.

La figura 9 muestra la banda de expresión del miR-146a en el tejido de la coriodeciduala a las 3 (FIG. 9A), 6 (FIG. 9C) y 24 horas (FIG. 9E) después de la

estimulación con las diferentes unidades formadoras de *Escherichia coli* y en el cambio en la expresión en la cara opuesta (epitelio amniótico).



**FIGURA 9. Perfil de expresión del miR-146a después de la estimulación con *Escherichia coli* sobre el tejido de la coriodecidua.** La banda de expresión de interés se indica y corresponde a 73 nucleótidos con respecto al marcador de peso molecular (PM; invitrogen). Se muestra la expresión en el grupo control y en los diferentes tratamientos de estimulación tanto en el tejido de la coriodecidua como en su cara opuesta (amnios) a las 3 (A), 6 (C), y 24 horas (E). Grupo control (carril 1 y 6), estimulación en el tejido de la CDH con *E. coli* a 10<sup>2</sup> (carril 2 y 7), 10<sup>4</sup> (carril 3 y 8), 10<sup>5</sup> (carril 4 y 9) y 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (UFC/ml; carril 5 y 10). Se determinó la banda de expresión relativa a las 3 (B), 6 (D) y 24 horas (F) fue determinada mediante el programa de ImageJ (NIH, USA). Los datos se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar y se indica la diferencia estadísticamente significativa que corresponde a \* vs control, # vs 10<sup>2</sup>, § vs 10<sup>4</sup>, ¥ vs 10<sup>5</sup>, £ vs 10<sup>6</sup> ( $p \leq 0.05$ ).

A las 3 horas determinamos que la expresión en el grupo control fue de  $75.7 \pm 14.0$  la cual incrementó significativamente 1.2, 1.2, 1.5, y 1.8-veces con 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>,

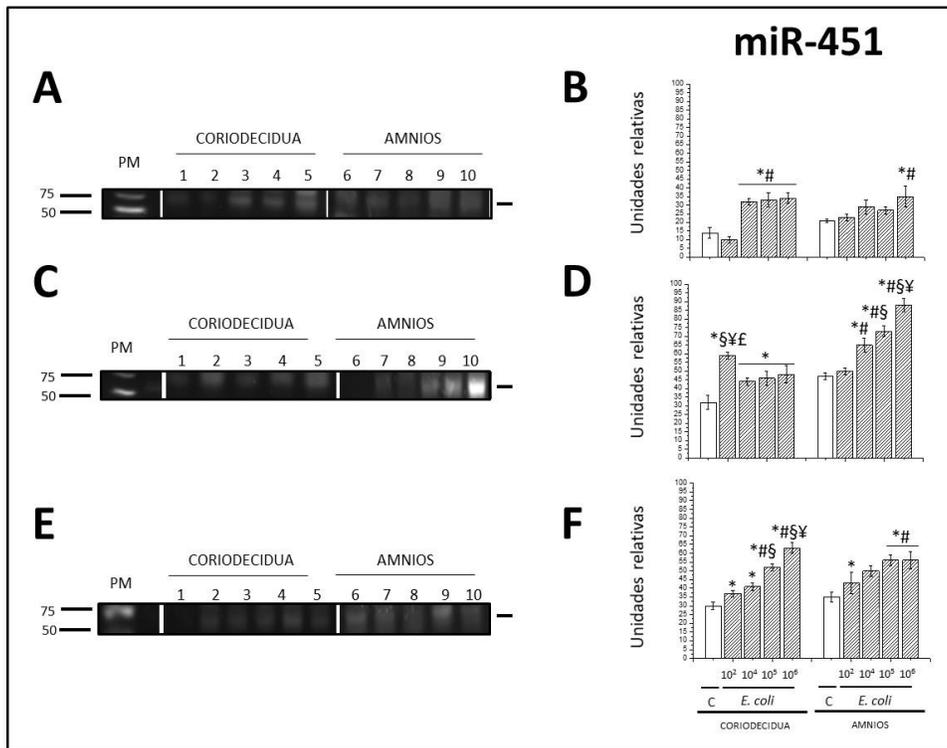
$10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 9B). En este mismo intervalo de tiempo observamos en la cara opuesta de la estimulación (epitelio amniótico) un incremento significativo en la expresión del miR-146a de 1.2, 1.5, 2.2, y 2.9-veces con  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente con respecto al grupo control  $45.7 \pm 3.5$  ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 9B).

A las 6 horas determinamos que la expresión en el grupo control fue de  $94.5 \pm 16.6$  la cual incrementó 1.2, 1.3, 1.3, y 1.5-veces con  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 9D). En este mismo intervalo de tiempo observamos en la cara opuesta de la estimulación (epitelio amniótico) un incremento significativo en la expresión del miR-146a de 1.1, 1.1, 1.2, y 1.3-veces con  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente con respecto al grupo control  $59.7 \pm 4.1$  ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 9D).

A las 24 horas la expresión en el grupo control fue de  $91.0 \pm 5.1$  la cual incrementó 1.8, 2.0, 2.2, y 2.3-veces con  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 9F). En este mismo intervalo de tiempo observamos en la cara opuesta de la estimulación (epitelio amniótico) un incremento significativo en la expresión del miR-146a de 1.0, 1.7, y 4.8-veces con  $10^2$ ,  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente con respecto al grupo control  $52.7 \pm 7.2$  ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 9F).

### 7.2.2 miR-451

La figura 10 muestra la banda de expresión del miR-451 en el tejido de la coriodecidual a las 3 (FIG. 10A), 6 (FIG. 10C) y 24 horas (FIG. 10E) después de la estimulación con las diferentes unidades formadoras de *Escherichia coli* y en el cambio en la expresión en la cara opuesta (epitelio amniótico).



**FIGURA 10. Perfil de expresión del miR-451 después de la estimulación con *Escherichia coli* sobre el tejido de la coriodescidea.** La banda de expresión de interés se indica y corresponde a 73 nucleótidos con respecto al marcador de peso molecular (PM; invitrogen). Se muestra la expresión en el grupo control y en los diferentes tratamientos de estimulación tanto en el tejido de la coriodescidea como en su cara opuesta (amnios) a las 3 (A), 6 (C), y 24 horas (E). Grupo control (carril 1 y 6), estimulación en el tejido de la CDH con *E. coli* a 10<sup>2</sup> (carril 2 y 7), 10<sup>4</sup> (carril 3 y 8), 10<sup>5</sup> (carril 4 y 9) y 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (UFC/ml; carril 5 y 10). Se determinó la banda de expresión relativa a las 3 (B), 6 (D) y 24 horas (F) fue determinada mediante el programa de ImageJ (NIH, USA). Los datos se muestran como la media ± desviación estándar y se indica la diferencia estadísticamente significativa que corresponde a \* vs control, # vs 10<sup>2</sup>, § vs 10<sup>4</sup>, ¥ vs 10<sup>5</sup>, £ vs 10<sup>6</sup> ( $p \leq 0.05$ ).

A las 3 horas determinamos que la expresión en el grupo control fue de  $14.2 \pm 3.0$  la cual incrementó significativamente 2.2, 2.3, y 2.4-veces con 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, y 10<sup>6</sup> UFC/mL de *E. coli* respectivamente ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 10B). En este mismo intervalo de tiempo observamos en la cara opuesta de la estimulación (epitelio amniótico) un incremento significativo en la expresión del miR-451 de 1.3, 1.2, y 1.6-veces con 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, y 10<sup>6</sup> UFC/mL de *E. coli* respectivamente con respecto al grupo

control  $21.5 \pm 1.3$  ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 10B).

A las 6 horas determinamos que la expresión en el grupo control fue de  $32.5 \pm 4.0$  la cual incrementó 1.8, 1.3, 1.4, y 1.5-veces con  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 10D). En este mismo intervalo de tiempo observamos en la cara opuesta de la estimulación (epitelio amniótico) un incremento significativo en la expresión del miR-451 de 1.0, 1.3, 1.5, y 1.8-veces con  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente con respecto al grupo control  $47.2 \pm 1.8$  ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 10D).

A las 24 horas la expresión en el grupo control fue de  $30.0 \pm 2.0$  la cual incrementó 1.2, 1.3, 1.7, y 2.1-veces con  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 10F). En este mismo intervalo de tiempo observamos en la cara opuesta de la estimulación (epitelio amniótico) un incremento significativo en la expresión del miR-451 de 1.2, 1.4, 1.6, y 1.6-veces con  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente con respecto al grupo control  $34.5 \pm 2.6$  ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 10F).

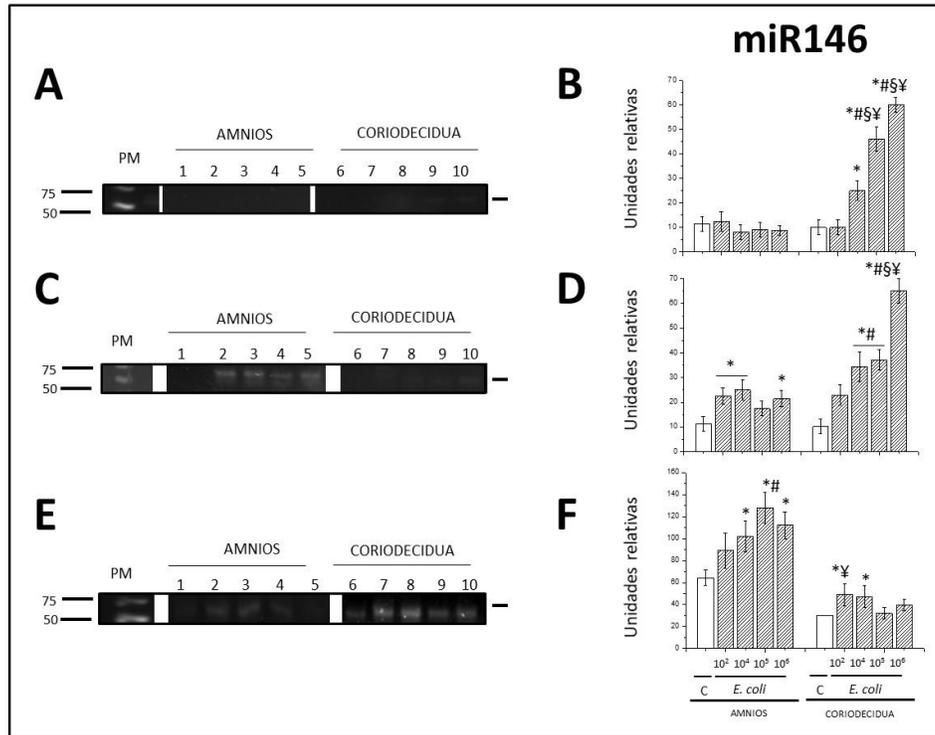
El modelo experimental de infección mediante el sistema de Transwell, permiten determinar en conjunto tanto la zona donde se hizo la estimulación directa (FIG. 7) como en la cara opuesta (FIG. 8). A continuación, se muestran los resultados de expresión que se obtuvieron cuando la estimulación con *Escherichia coli* se realizó directamente sobre el epitelio amniótico, así como en su cara opuesta.

### 7.3. Expresión de miRNAs estimulando el epitelio amniótico.

#### 7.3.1 miR-146a.

La figura 9 muestra la banda de expresión del miR-146a en el epitelio amniótico a

las 3 (FIG. 9A), 6 (FIG. 9C) y 24 horas (FIG. 9E) después de la estimulación con las diferentes unidades formadoras de *Escherichia coli*, así como el cambio de expresión en la cara opuesta (tejido de la coriodecidua).



**FIGURA 11. Perfil de expresión del miR-146a después de la estimulación con *Escherichia coli* sobre el epitelio amniótico.** La banda de expresión de interés se indica y corresponde a 73 nucleótidos con respecto al marcador de peso molecular (PM; invitrogen). Se muestra la expresión en el grupo control y en los diferentes tratamientos de estimulación tanto en el tejido de la coriodecidua como en su cara opuesta (amnios) a las 3 (A), 6 (C), y 24 horas (E). Grupo control (carril 1 y 6), estimulación en el tejido de la CDH con *E. coli* a 10<sup>2</sup> (carril 2 y 7), 10<sup>4</sup> (carril 3 y 8), 10<sup>5</sup> (carril 4 y 9) y 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (UFC/ml; carril 5 y 10). Se determinó la banda de expresión relativa a las 3 (B), 6 (D) y 24 horas (F) fue determinada mediante el programa de ImageJ (NIH, USA). Los datos se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar y se indica la diferencia estadísticamente significativa que corresponde a \* vs control, # vs 10<sup>2</sup>, § vs 10<sup>4</sup>, ¥ vs 10<sup>5</sup>, £ vs 10<sup>6</sup> ( $p \leq 0.05$ ).

A las 3 horas determinamos que la expresión en el grupo control fue de  $11.5 \pm 3.4$  y no observamos cambios significativos después de la estimulación con *E. coli* en

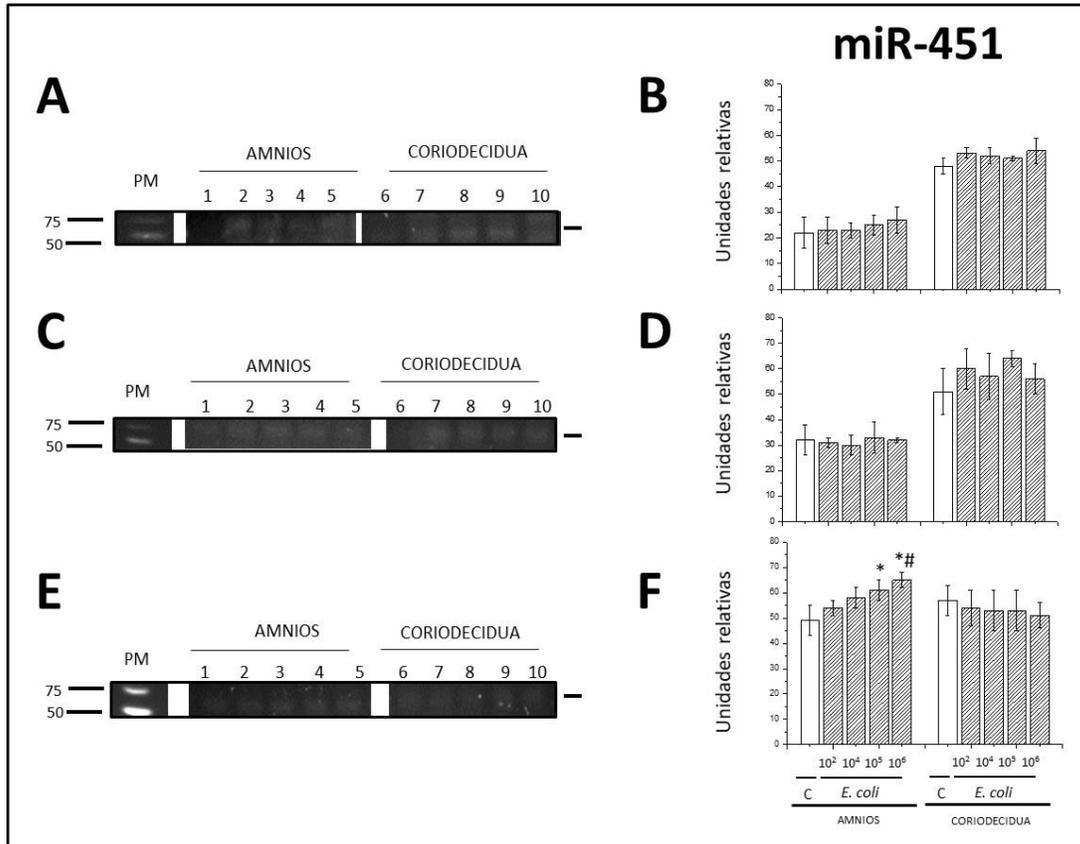
las diferentes condiciones de estimulación ( $p = 0.287$ ; FIG. 9B). En este mismo intervalo de tiempo observamos en la cara opuesta de la estimulación (tejido de la coriodecidua) un incremento significativo en la expresión del miR-146a de 2.5, 4.6, y 5.9-veces con  $10^4$ ,  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente con respecto al grupo control  $10.2 \pm 3.0$  ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 9B).

A las 6 horas determinamos que la expresión en el grupo control fue de  $11.2 \pm 3.0$  la cual incrementó 2.0, 2.2, y 1.9-veces con  $10^2$ ,  $10^4$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 9D). En este mismo intervalo de tiempo observamos en la cara opuesta de la estimulación (tejido de la coriodecidua) un incremento significativo en la expresión del miR-146a de 2.2, 3.3, 3.6, y 6.3-veces con  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente con respecto al grupo control  $10.2 \pm 2.7$  ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 9D).

A las 24 horas la expresión en el grupo control fue de  $64.2 \pm 7.1$  la cual incrementó 1.3, 1.6, 1.9, y 1.7-veces con  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 9F). En este mismo intervalo de tiempo observamos en la cara opuesta de la estimulación (tejido de la coriodecidua) un incremento significativo en la expresión del miR-146a de 1.6, 1.5, y 1.3-veces con  $10^2$ ,  $10^4$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente con respecto al grupo control  $30.2 \pm 3.5$  ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 9F).

### 7.3.2 miR-451

La figura 10 muestra la banda de expresión del miR-146a en el epitelio amniótico a las 3 (FIG. 10A), 6 (FIG. 10C) y 24 horas (FIG. 10E) después de la estimulación con las diferentes unidades formadoras de *Escherichia coli*, así como el cambio de expresión en la cara opuesta (tejido de la coriodecidua).



**Figura 12. Perfil de expresión del miR-451 después de la estimulación con *Escherichia coli* sobre el epitelio amniótico.** La banda de expresión de interés se indica y corresponde a 73 nucleótidos con respecto al marcador de peso molecular (PM; invitrogen). Se muestra la expresión en el grupo control y en los diferentes tratamientos de estimulación tanto en el tejido de la coriodesidua como en su cara opuesta (amnios) a las 3 (A), 6 (C), y 24 horas (E). Grupo control (carril 1 y 6), estimulación en el tejido de la CDH con *E. coli* a 10<sup>2</sup> (carril 2 y 7), 10<sup>4</sup> (carril 3 y 8), 10<sup>5</sup> (carril 4 y 9) y 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (UFC/ml; carril 5 y 10). Se determinó la banda de expresión relativa a las 3 (B), 6 (D) y 24 horas (F) fue determinada mediante el programa de ImageJ (NIH, USA). Los datos se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar y se indica la diferencia estadísticamente significativa que corresponde a \* vs control, # vs 10<sup>2</sup> ( $p \leq 0.05$ ).

A las 3 horas determinamos que la expresión en el grupo control fue de  $22.0 \pm 6.6$  y no observamos cambios significativos después de la estimulación con *E. coli* en las diferentes condiciones de estimulación ( $p = 0.682$ ; FIG. 10B). En este mismo intervalo de tiempo no observamos en la cara opuesta de la estimulación (tejido de la coriodesidua) variaciones significativas en la expresión del miR-451 con las

diferentes unidades formadoras de *E. coli* con respecto al grupo control  $48.8 \pm 3.0$  ( $p = 0.263$ ; FIG. 10B).

A las 6 horas la expresión del miR-541 en el grupo control fue de  $32.7 \pm 6.0$  y no observamos cambios significativos en la expresión del miR-541 con las diferentes UFC/mL de *E. coli* ( $p = 0.275$ ; FIG. 10D). En este mismo intervalo de tiempo no observamos cambios significativos en la expresión del miR-451 en la cara opuesta de la estimulación (tejido de la coriodecidual) con las diferentes UFC/mL de *E. coli* con respecto al grupo control  $51.2 \pm 9.0$  ( $p = 0.275$ ; FIG. 10D).

Finalmente, a las 24 horas la expresión en el grupo control fue de  $49.2 \pm 5.9$  la cual incrementó significativamente la expresión en 1.2, y 1.3-veces con  $10^5$ , y  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* respectivamente ( $p \leq 0.05$ ; FIG. 9F). En este mismo intervalo de tiempo no observamos cambios en la expresión del miR-451 en la cara opuesta de la estimulación (tejido de la coriodecidual) con respecto al grupo control  $56.5 \pm 6.5$  ( $p = 0.816$ ; FIG. 10F).

## 8.0 DISCUSIÓN

Como bien se sabe, la función de los miRNAs es crucial para la estabilidad y el mantenimiento de la expresión génica por diversos mecanismos que dan origen a algunos tipos celulares, tejidos y respuestas biológicas, incluso varios miRNAs han surgido como importantes reguladores transcripcionales de algunas proteínas relacionadas con la inflamación. Tanto el miR-146a como el miR-451 han sido asociados en la regulación de la respuesta inflamatoria [10; 35; 37].

Nuestros resultados muestran que al estimular directamente al tejido de la coriodecidual con diferentes unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* se induce la expresión del miR-146a siendo esta respuesta dosis dependiente teniendo su máxima expresión a las 24 horas de la estimulación (FIG. 7).

Perry y colaboradores (2008) demostraron que al estimular diferentes tipos celulares de origen pulmonar con IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) o con el lipopolisacárido (LPS)-*E. coli* se induce a las 3 y 24 horas la expresión del miR-146a [40].

El miR-146a inhibe la respuesta inflamatoria mediante su acción sobre las proteínas de señalización de MyD88, IRAK1/TRAF6 las cuales se encienden como respuesta a la estimulación con diversas bacterias patógenas o sus componentes estructurales [10]. Este mecanismo de señalización intracelular está mediado por el receptor de tipo Toll (TLR)-4 el cual reconoce al LPS [37; 41]. Oglesby (2006) propone que el miR-146a puede estarse transcribiendo por la secreción de IL-1 $\beta$  y probablemente por este mecanismo sea su máxima expresión en el presente modelo a las 24 horas [10].

Rosenberger y colaboradores (2012) han demostrado que al infectar células dendríticas con el virus de la influenza se induce la expresión del miR-451 el cual estuvo asociado con la disminución en la secreción de IL-6, -8, TNF $\alpha$ , CCL5 y CCL3. Estos mismos autores restablecieron la respuesta inflamatoria mediante el

uso tanto del antagonista para el miR-451 (antagomiR) como por el empleo de células knockout miR451null [39]. Se ha demostrado en células de fibroblastos que el miR451 reduce la expresión de la proteína 38 cinasa de activación mitógenica (p38MAPK) la cual está asociada con la secreción de la respuesta inflamatoria. No se ha demostrado la participación del miR-451 en las membranas fetales humanas durante el proceso de infección/inflamación; sin embargo, se sabe que la expresión de la proteína p38MAPK inhibe las vías de señalización que promueven la respuesta inflamatoria durante el embarazo y mantiene en un estado de senescencia tanto al tejido de la coriodecidua como al epitelio amniótico [42; 43]. El miR-451 puede inhibir p38MAPK, esta proteína es parte de la cascada de señalización que junto con SASP y un conjunto único de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos y enzimas degradadoras de ECM puede conllevar a la ruptura de las MFH [23]. Nuestros resultados sugieren que la expresión del miR-451 estaría reduciendo la expresión de la p38MAPK promoviendo con respecto al tiempo la respuesta anti-inflamatoria. Previamente, nuestro grupo de investigación y utilizando el modelo de Transwell hemos demostrado que en las primeras 6 horas de estimulación con *E. coli* la secreción de IL-1 $\beta$  está reducida [26]. Por otro lado, se ha demostrado que el miR-451 reduce la expresión del factor de migración para macrófagos [44] lo que podría reducir el arribo de las células profesionales de la respuesta inflamatoria hacia la región de la coriodecidua.

Este sistema de regulación inflamatorio mediado tanto por el miR-146a como por el miR-451 podrían estar inhibiendo en las membranas fetales humanas la secreción de la IL-1 $\beta$  como ha sido reportado previamente por nuestro grupo de investigación [26] este efecto deberá de demostrarse posteriormente.

El modelo de infección desarrollado mediante el sistema de Transwell permite determinar la respuesta integral en las membranas fetales humanas tanto del lado donde se llevó a cabo la estimulación directa como en su cara opuesta [25; 26].

Después de evaluar la expresión del miR-146a en el tejido de la coriodecidua determinamos su expresión en epitelio amniótico y detectamos que la máxima expresión se da a las 24 horas con  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL de *Escherichia coli* (FIG. 9F).

Actualmente no se tienen reportes sobre la movilidad de los miRNAs en las membranas fetales humanas; sin embargo, Kent y colaboradores (1994) utilizando Iodo ( $I^{125}$ ) marcaron radioactivamente a la IL- $1\beta$  y al TNF $\alpha$  y determinaron el movimiento de estas citocinas en las membranas fetales. En la parte final de la biogénesis de los miRNAs estos se encuentran en endosomas de secreción, es probable que el mayor porcentaje de los endosomas sea liberado hacia la cara de la coriodecidua y un porcentaje sea transferido hacia la cara del epitelio amniótico [45]. Lo anterior podría ser abordado al marcar con fluorescencia al miR-146a y -451 y determinar su migración en las membranas fetales humanas. Otro posible mecanismo que explique la detección del miR-146a y -451 en la cara opuesta a la zona de estimulación pudiera deberse a que *E. coli* invada al tejido de la coriodecidua y migre hacia el epitelio amniótico y en el exterior induzca las vías de señalización para la expresión de los miRNAs. Diversas evidencias han demostrado que las bacterias patógenas al evadir la respuesta inmunológica contactan e invaden el tejido de la coriodecidua y han sido detectadas en el líquido amniótico sin que ocurra la degradación del tejido de soporte [27; 46].

## 9.0 CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que a) el miR-146a y miR-451 son dependientes del tiempo de estimulación con *E. coli*. B) Ambos se secretan en la cara de la membrana estimulada; sin embargo, también se ve su expresión en la cara opuesta. C) la expresión de miR-451 no es significativa cuando se estimula el amnios únicamente con  $10^6$  UFC/mL.

## 10.0 REFERENCIAS

1. Miki T (2011) Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2:25
2. Hunt JS, Langat DL (2009) HLA-G: a human pregnancy-related immunomodulator. *Curr Opin Pharmacol* 9:462-469
3. Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, Botelho MF (2012) Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res* 349:447-458
4. Menon R (2016) Human fetal membranes at term: Dead tissue or signalers of parturition? *Placenta* 44:1-5
5. Goldman S, Weiss A, Almalah I, Shalev E (2005) Progesterone receptor expression in human decidua and fetal membranes before and after contractions: possible mechanism for functional progesterone withdrawal. *Mol Hum Reprod* 11:269-277
6. Mazor M, Hershkovitz R, Chaim W, Levy J, Sharony Y, Leiberman JR, Glezerman M (1994) Human preterm birth is associated with systemic and local changes in progesterone/17 beta-estradiol ratios. *Am J Obstet Gynecol* 171:231-236
7. Lee HM, Kim TS, Jo EK (2016) MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Rep* 49:311-318
8. Park H, Huang X, Lu C, Cairo MS, Zhou X (2015) MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins. *J Biol Chem* 290:2831-2841
9. Montenegro D, Romero R, Pineles BL, Tarca AL, Kim YM, Draghici S, Kusanovic JP, Kim JS, Erez O, Mazaki-Tovi S, Hassan S, Espinoza J, Kim CJ (2007) Differential expression of microRNAs with progression of gestation and inflammation in the human chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 197:289 e281-286
10. Oglesby IK, McElvaney NG, Greene CM (2010) MicroRNAs in inflammatory lung disease--master regulators or target practice? *Respir Res* 11:148
11. Favaron PO, Carvalho RC, Borghesi J, Anunciacao AR, Miglino MA (2015) The Amniotic Membrane: Development and Potential Applications - A Review. *Reprod Domest Anim* 50:881-892
12. Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U (2009) Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* 30:2-10
13. Bourne GL, Lacy D (1960) Ultra-structure of human amnion and its possible relation to the circulation of amniotic fluid. *Nature* 186:952-954
14. Menon R, Williams SM, Fortunato SJ (2007) Amniotic fluid interleukin-1beta and interleukin-8 concentrations: racial disparity in preterm birth. *Reprod Sci* 14:253-259
15. Moore RM, Mansour JM, Redline RW, Mercer BM, Moore JJ (2006) The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta* 27:1037-1051
16. Gomez-Lopez N, StLouis D, Lehr MA, Sanchez-Rodriguez EN, Arenas-Hernandez M (2014) Immune cells in term and preterm labor. *Cell Mol Immunol* 11:571-581
17. Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM (2014) Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Frontiers in immunology*

18. La Rocca C, Carbone F, Longobardi S, Matarese G (2014) The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunol Lett* 162:41-48
19. Tang MX, Hu XH, Liu ZZ, Kwak-Kim J, Liao AH (2015) What are the roles of macrophages and monocytes in human pregnancy? *Journal of reproductive immunology* 112:73-80
20. Rangaswamy N, Abdelrahim A, Moore RM, Uyen L, Mercer BM, Mansour JM, Kumar D, Sawady J, Moore JJ (2011) [Biomechanical characteristics of human fetal membranes. Preterm fetal membranes are stronger than term fetal membranes]. *Gynecol Obstet Fertil* 39:373-377
21. Keski-Nisula L, Aalto ML, Katila ML, Kirkinen P (2000) Intrauterine inflammation at term: a histopathologic study. *Hum Pathol* 31:841-846
22. Takeda J, Fang X, Olson DM (2017) Pregnant human peripheral leukocyte migration during several late pregnancy clinical conditions: a cross-sectional observational study. *BMC pregnancy and childbirth* 17:16
23. Bredeson S, Papaconstantinou J, Deford JH, Kechichian T, Syed TA, Saade GR, Menon R (2014) HMGB1 promotes a p38MAPK associated non-infectious inflammatory response pathway in human fetal membranes. *PLoS one* 9:e113799
24. Ramos Bde A, Kanninen TT, Sisti G, Witkin SS (2015) Microorganisms in the female genital tract during pregnancy: tolerance versus pathogenesis. *American journal of reproductive immunology* 73:383-389
25. Flores-Herrera H, Garcia-Lopez G, Diaz NF, Molina-Hernandez A, Osorio-Caballero M, Soriano-Becerril D, Zaga-Clavellina V (2012) An experimental mixed bacterial infection induced differential secretion of proinflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha) and proMMP-9 in human fetal membranes. *Placenta* 33:271-277
26. Osorio-Caballero M, Perdigon-Palacio C, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera O, Olvera-Sanchez S, Morales-Mendez I, Sosa-Gonzalez I, Acevedo JF, Guzman-Grenfell AM, Molina-Hernandez A, Diaz NF, Flores-Herrera H (2015) Escherichia coli-induced temporal and differential secretion of heat-shock protein 70 and interleukin-1beta by human fetal membranes in a two-compartment culture system. *Placenta* 36:262-269
27. Romero R, Dey SK, Fisher SJ (2014) Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science* 345:760-765
28. Sun Y, Li H, Sun MJ, Zheng YY, Gong DJ, Xu Y (2014) Endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*: alternations in Toll-like receptor 2 and 4 signaling pathway. *Inflammation* 37:268-276
29. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66:4555-4558
30. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 172:6175-6181
31. Kaczmarek A, Skowron K, Budzynska A, Grudlewska K, Gospodarek-Komkowska E (2017) Virulence genes and antimicrobial susceptibility of lactose-negative and lactose-positive strains of *Escherichia coli* isolated from pregnant women and neonates. *Folia microbiologica* 62:363-371

32. Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, Bressan J, Martinez JA, Marti A (2015) Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *FASEB J* 29:3595-3611
33. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811
34. Cretoiu D, Xu J, Xiao J, Suci N, Cretoiu SM (2016) Circulating MicroRNAs as Potential Molecular Biomarkers in Pathophysiological Evolution of Pregnancy. *Disease markers* 2016:3851054
35. Wang ZC, Lu H, Zhou Q, Yu SM, Mao YL, Zhang HJ, Zhang PC, Yan WJ (2015) MiR-451 inhibits synovial fibroblasts proliferation and inflammatory cytokines secretion in rheumatoid arthritis through mediating p38MAPK signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 8:14562-14567
36. Ha M, Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 15:509-524
37. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:12481-12486
38. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD (2008) MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature immunology* 9:839-845
39. Rosenberger CM, Podyminogin RL, Navarro G, Zhao GW, Askovich PS, Weiss MJ, Aderem A (2012) miR-451 regulates dendritic cell cytokine responses to influenza infection. *Journal of immunology* 189:5965-5975
40. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM, Lindsay MA (2008) Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *Journal of immunology* 180:5689-5698
41. Amirchaghmaghi E, Taghavi SA, Shapouri F, Saeidi S, Rezaei A, Aflatoonian R (2013) The role of toll like receptors in pregnancy. *International journal of fertility & sterility* 7:147-154
42. Menon R, Mesiano S, Taylor RN (2017) Programmed Fetal Membrane Senescence and Exosome-Mediated Signaling: A Mechanism Associated With Timing of Human Parturition. *Frontiers in endocrinology* 8:196
43. Menon R, Papaconstantinou J (2016) p38 Mitogen activated protein kinase (MAPK): a new therapeutic target for reducing the risk of adverse pregnancy outcomes. *Expert opinion on therapeutic targets* 20:1397-1412
44. Graham A, Falcone T, Nothnick WB (2015) The expression of microRNA-451 in human endometriotic lesions is inversely related to that of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and regulates MIF expression and modulation of epithelial cell survival. *Human reproduction* 30:642-652
45. Kent AS, Sullivan MH, Elder MG (1994) Transfer of cytokines through human fetal membranes. *Journal of reproduction and fertility* 100:81-84
46. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW (2000) Intrauterine infection and preterm delivery. *The New England journal of medicine* 342:1500-1507



## ANEXO I

*Carta de autorización emitida por los Comités de Investigación.*



INSTITUTO NACIONAL  
DE PERINATOLOGÍA  
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

DIRECCIÓN GENERAL

INPER-DG - 000906 -2017

"AÑO DEL CENTENARIO DE LA PROMULGACIÓN DE LA CONSTITUCIÓN  
POLÍTICA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS"

CIUDAD DE MÉXICO, A 29 DE SEPTIEMBRE DE 2017.

M. EN C. HÉCTOR FLORES HERRERA  
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS  
ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE INMUNOBIOQUÍMICA  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
P R E S E N T E

Me es grato informar a usted y a su grupo de colaboradores que los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad, han revisado y emitido el dictamen de **APROBADO**, correspondiente a su proyecto:

**La progesterona modula la secreción de las proteínas de choque térmico en el tejido de la coriodesciva después de la estimulación con *Escherichia coli* en un modelo de infección.**

**Registro: 2017-2-82**

Vigencia autorizada: **18/09/2017 al 08/09/2019**

Monto autorizado: **\$ 351,300.00**

En cuanto al monto económico solicitado por usted para desarrollar el proyecto mencionado, la asignación dependerá estrictamente de la disponibilidad de los recursos fiscales correspondientes y, en su caso, de la disponibilidad de los mismos entregados por agencias financiadoras externas. Si requiere una extensión de tiempo para la terminación del proyecto deberá requisitar el formato correspondiente, y solicitarla un mes antes de la fecha de vencimiento de la vigencia del mismo.

Me permito hacer de su conocimiento que, durante el desarrollo de este proyecto, deberá entregar informes trimestrales y al concluir el mismo el **informe técnico final y financiero** según el formato institucional, para la presentación de productos de investigación, acompañado de los documentos probatorios del mismo.

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

ATENTAMENTE

  
DR. JORGE ARTURO CARDONA PÉREZ  
DIRECTOR GENERAL

Montes Urales 800, Col. Lomas Virreyes, Deleg. Miguel Hidalgo, Ciudad de México, C.P. 11000  
Teléfonos: 5520 8565 y 5202 2493 Fax: 5520 1593, e-mail: dirgral@inper.mx



## ANEXO 2

### Carta de consentimiento informado.



INSTITUTO  
NACIONAL DE  
PERINATOLOGÍA  
Isidro Espinosa de los Reyes

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

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimada señora:

Queremos informarle que en el departamento de Inmunobiología de este Instituto se está llevando a cabo el estudio denominado

**La progesterona modula la secreción de las proteínas de choque térmico en el tejido de la coriodecidua después de la estimulación con *Escherichia coli* en un modelo de infección.**

Las infecciones durante el embarazo son una de las condicionantes relacionadas con los nacimientos prematuros. Se sabe que en el proceso infeccioso se da la secreción inicial de las proteínas de choque térmico las cuales están involucradas con la respuesta inmunológica. La progesterona además de mantener el embarazo modula la secreción de diferentes proteínas; sin embargo, no se ha demostrado si la progesterona disminuye la secreción de las proteínas de choque térmico, por lo que el principal objetivo en este estudio es determinar si la progesterona reduce la secreción de las proteínas de choque térmico de -60 y -70 KDa y aumenta a la Hsp-27 KDa modulando a las citocinas pro y anti-inflamatorias en el tejido de la coriodecidua humana después de la infección con *Escherichia coli*.

El estudio básicamente consiste en lo siguiente:

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

Su participación en este estudio permitirá contribuir en forma importante a la comprensión de la participación de la progesterona ante un estímulo infeccioso en el tejido de la coriodecidua en las fases tempranas de infección.

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

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

Las preguntas que considere necesarias para aclarar todas sus dudas las puede externar con

M. en C. Héctor Flores Herrera  
Investigador en Ciencias Médicas  
Instituto Nacional de Perinatología  
55 20 99 00 ext 375  
[floresh8@yahoo.com](mailto:floresh8@yahoo.com)

Dr. Alejandro Martínez Juárez  
Presidente del Comité de Ética en Investigación.  
Instituto Nacional de Perinatología  
Tel 5520 9900 Extensión 316



**TEXTO DECLARATORIO**

**YO** \_\_\_\_\_

(Nombre del participante o de su representante legal)

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar (en que participe mi representado cuyo nombre aparece abajo) en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se especifican en el Apartado A de este documento.

Se me ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me deba brindar y que toda la información que se otorgue sobre mi (su) identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener mi autorización.

México D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_.

	NOMBRE	FIRMA
PARTICIPANTE		
REPRESENTANTE		
INVESTIGADOR	Héctor Flores Herrera	
	RELACIÓN CON LA PACIENTE	DOMICILIO
TESTIGO 1		
TESTIGO 2		