



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA PROLACTINA EN LA SECRECIÓN DE
MODULADORES PRODEGRADATIVOS EN EL TROFOBLASTO HUMANO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

LIRIO CORAL PEÑA RODRÍGUEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. CLAUDIA VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES
DEPARTAMENTO DE INMUNOBIOQUIMICA

ASESORA INTERNA

DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE 2018.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza” por permitirme ser parte de su comunidad.

Este proyecto fue aprobado por el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer IER-212250-32102-21205-01-14).

A la Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina, por la oportunidad de realizar el presente trabajo en el laboratorio de inmuniobioquímica, bajo su dirección; y a todo su equipo de trabajo.

El presente proyecto, contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) CB2014-01 242162 con el título “Caracterización del mecanismo inmuno-endócrino de la Prolactina en el inicio y progresión del trabajo de parto”. El sustentante contó con apoyo CONACYT con número de registro 25502.

A la M. en C. Ma. Del Pilar Flores Espinosa, por su apoyo y guía incondicional en cada una de las etapas del desarrollo del proyecto.

A la Dra. Leticia Morales Ledesma, por sus comentarios y sugerencias en la elaboración de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. María Elena Ayala Escobar, Dra. Rosa Linares Culebro, M. en IBSH Angélica Flores Ramírez, por sus revisiones y aportaciones en la elaboración del presente trabajo.

Quiero agradecer a aquellas personas que hicieron que este trabajo fuera posible, especialmente a la Dra. Vero, por su paciencia, apoyo, y que a pesar de mis condiciones me dio la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, gracias a su presión constante he podido concluir satisfactoriamente mi trabajo de tesis.

A Pily Flores, por el apoyo que me brindaste desde el inicio de mi estancia en el laboratorio, por tus enseñanzas constantes y paciencia para explicarme cada una de las técnicas realizadas en mi proyecto, por tu amistad brindada. Gracias por alimentar mi ser, tanto académica como fisiológicamente.

A Monse, por tu compañía a lo largo de la elaboración de mi proyecto, por cada momento que pasamos mientras realizábamos las técnicas que duraban miles de horas, gracias por tu amistad, por ser un apoyo incondicional, por cada momento de tensión y aflicción, gracias por ser mi cómplice.

A Andy, por tus explicaciones claras y sencillas, por tus aportaciones en la elaboración de mi tesis. Por tu apoyo brindado y por tu amistad, gracias por los “memes” compartidos día a día.

A Pilar Luna, por tu carisma y amabilidad desde el primer día que te conocí, gracias por tus consejos y por el café.

A Jorge, por tu paciencia, apoyo y comprensión, compañía en el desarrollo de este proyecto, y cada momento compartido a mi lado.

Este trabajo está dedicado a mi padre Mario Peña, que aunque no pudo ver los frutos, siempre creyó en mí, y siempre estuvo orgulloso de su hija.

A mi madre, Minerva Rodríguez, por sus sacrificios hechos día a día para sacar a sus hijos adelante.

A mis hermanos: Natán, Lauri, César, Kere, Anna y Dan, por su amor incondicional y por estar conmigo en las buenas y en las malas, por ser mis consejeros, mis compañeros y mis cómplices, a Lauri por ser mi segunda mamá, y por cargar con el peso de ser la hermana mayor. Todos y cada uno tienen un lugar especial en mi corazón.

Indice		Página
I. Resumen	6
II. Introducción	7
III. Marco teórico	7
Tolerancia inmunológica	7
Características de la placenta	9
Formación de la placenta	10
Implantación	11
Aposición	11
Adhesión	12
Invasión trofoblástica	12
Infección intrauterina y parto pretérmino	14
Inflamación y parto	15
Metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs)	15
Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs)	18
Prolactina	18
Mecanismo de acción de la PRL	19
IV. Justificación	21
V. Hipótesis	23
VI. Objetivo general de la investigación	24
VII. Objetivos particulares	24
VIII. Metodología	25
Cultivo celular	25
Estímulos	25
ELISA de IL-6, IL-8, TIMP-1 y MMP-10	26
Migración por técnica de herida	27
Análisis estadístico	28
IX. Resultados	29
X. Discusión	38
XI. Conclusiones	42
XII. Bibliografía	43

Resumen

El embarazo es el resultado de múltiples adaptaciones del sistema materno dirigidas por factores endocrinos e inmunológicos que permiten que el feto crezca y se desarrolle en un ambiente de tolerancia inmunológica, sin perder la capacidad de responder ante un reto inmunológico. Durante el primer trimestre del embarazo, la regulación del proceso inflamatorio y la migración del trofoblasto es determinante para la implantación y el desarrollo del embrión. En el sistema inmunológico, la prolactina (PRL) ejerce efectos paracrinos y autocrinos y ha sido relacionada con algunos procesos inmunomoduladores. Existen evidencias que indican a la PRL como un promotor de la migración del trofoblasto. Por otro lado, uno de los eventos que afecta el curso normal del embarazo y que puede alterar irreversiblemente el ambiente inmunológico y la secreción de metaloproteinasas (MMPs) en la interface materno-placentaria, es el desarrollo de un proceso infeccioso a nivel intrauterino. El objetivo de este estudio fue determinar si el tratamiento de las células del trofoblasto con concentraciones de PRL similares a las presentes durante el primer trimestre del embarazo, puede modular la secreción de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8), MMP-9 y TIMP-1 inducidos por el tratamiento con lipopolisacárido (LPS). Se utilizaron células de trofoblasto humano de la línea HTR-8/SVneo las cuales fueron cultivadas y pre-tratadas con PRL (50, 100, 250 y 500 ng/mL) después de 24 h se cambió el medio y fueron co-tratadas con LPS (10ng/mL y PRL (50, 100, 250 y 500 ng/mL) durante 12h. La expresión de IL-6, IL-8, MMP-9 y TIMP-1 se cuantificó usando la técnica de ELISA. Para ensayos de migración, las células se cultivaron bajo los diferentes co-tratamientos con LPS y PRL, una vez formada la monocapa se realizó una herida, se analizó la migración y el cierre de la herida en respuesta a estos tratamientos. El LPS indujo el incremento significativo de la expresión de IL-6 e IL-8. El co-tratamiento con LPS y PRL indujo la secreción de IL-6 e IL-8 dosis-dependiente. El LPS presentó una baja migración en comparación con los co-tratamientos con PRL. La co-estimulación de LPS + PRL 500 ng/mL cerró casi por completo después de 24 h. Estos resultados sugieren que la PRL promueve la disminución de IL-6 e IL-8 que son citocinas que están implicadas en el proceso de migración en células del trofoblasto humano durante el primer trimestre.

Introducción

En la mujer, el embarazo es un proceso que requiere grandes adaptaciones del sistema inmunológico de la madre, que, junto con el producto, activan una serie de estrategias inmunológicas, por lo que el feto crece y se desarrolla en un ambiente hostil, pero al mismo tiempo permisivo inmunológicamente (Zaga y col., 2016).

Estudios recientes han sugerido que la tolerancia inmunológica durante el embarazo es mantenida por una serie de mecanismos que incluyen factores fetales, maternos y placentarios (Vázquez y col., 2011).

Marco teórico

Tolerancia inmunológica

La tolerancia del sistema inmune materno permite que dos eventos aparentemente contradictorios se lleven a cabo simultáneamente: por un lado, se establece un ambiente inmunológicamente privilegiado que evita el rechazo del producto, mientras que la capacidad para entablar una respuesta inmune efectiva ante cualquier reto inmunológico permanece intacta (Mendelson, 2009).

La interacción inmunológica entre el feto y la madre es una comunicación que está regulada por la presentación de los antígenos fetales y/o por la reacción del sistema inmune de la madre a estos antígenos. En la figura uno, se observan las interacciones moleculares que participan en la tolerancia inmunológica del embarazo. El reconocimiento inmunológico de la gestación es vital para el mantenimiento de la misma y el reconocimiento inadecuado de los antígenos fetales puede causar aborto. En este evento participan elementos inmunológicos complejos, entre los que se encuentran el antígeno leucocitario humano (HLA) (Torres y col., 2013).

Diversos mecanismos previenen el rechazo inmunológico del feto durante un embarazo exitoso. Los antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH o MHC por las siglas en inglés de Major Histocompatibility Complex) de clase II, así como muchos antígenos clase I de gran polimorfismo, como los HLA-A y HLA-B no se expresan en los trofoblastos que originan la placenta. Por contraste, los citotrofoblastos extravellosos

invasivos y las células trofoblásticas endovasculares expresan una subserie única de alelos CPH clase I, HLA-C y HLA-G. Los detritos de los trofoblastos necróticos o apoptóticos se liberan a la circulación periférica materna y activan al sistema inmune materno. Subsecuentemente, las células T reguladoras (Treg) activadas (FOXP3+CD4+CD25+) inducen tolerancia a los antígenos fetales específicos, suprimiendo la activación del sistema inmune (Burt, 2013).

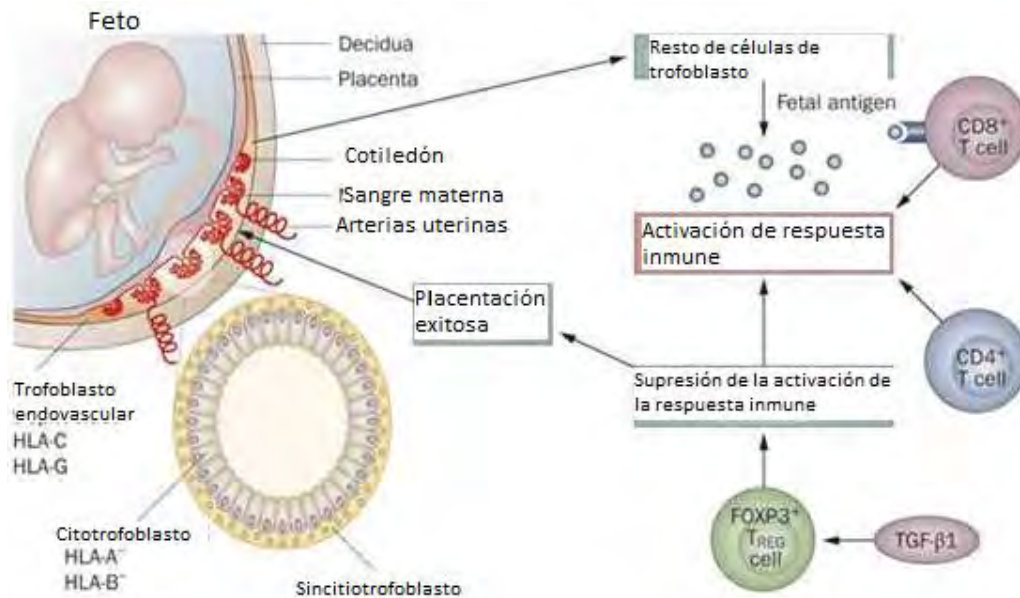


Figura 1. Mecanismos celulares que participan en la tolerancia hacia el feto alógeno. HLA (antígeno leucocitario humano), TGF- β (factor de crecimiento transformacional- β) (Modificado de Torres y col., 2013).

Durante el embarazo, el sistema inmunológico de la madre implementa una serie de cambios, y a nivel sistémico, la inmunidad adquirida disminuye, mientras que la respuesta inmunitaria innata está aumentada y activada para dar respuesta inmediata y adecuada frente a microorganismos patógenos (Rico y Vega, 2012).

Las citocinas son moduladores proinflamatorios, claves en la tolerancia inmunológica de la unidad materno fetal; se sintetizan, sobre todo, las que tienen un perfil Th2 (Interleucina-4, Interleucina-5, Interleucina-6 e Interleucina-10) con un fenotipo supresor

que regula la evolución y el desarrollo de la placenta del feto; en un ambiente inmunológico normal, el feto moriría. En las células del trofoblasto hay receptores de baja afinidad para citocinas Th1 como interleucina-2 (L-2), interferón (FN- γ), y factor de necrosis tumoral (TNF- α) las cuales inhiben el desarrollo embrionario y el crecimiento del trofoblasto (Rico y Vega, 2012). En la figura dos, se muestra las citocinas implicadas en el equilibrio inmunológico en la unidad materno-fetal.

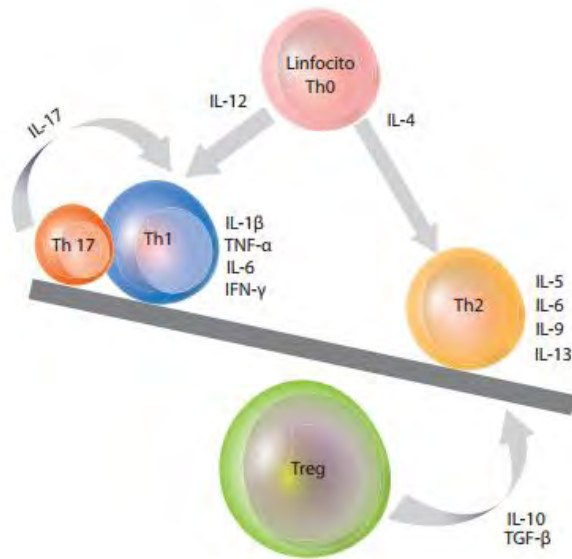


Figura 2. Equilibrio inmunológico en la unidad materno-fetal.

Una vez que la implantación ha concluido, el ambiente inmunológico que favorece el mantenimiento de la gestación está relacionado con el equilibrio de las poblaciones celulares tipo Th (linfocitos T helper “ayudadores”) en el útero. El ambiente antiinflamatorio es favorecido por las poblaciones Th2 y Treg (linfocitos T reguladores), cuyos moduladores pueden inhibir los efectos de las citocinas proinflamatorias secretadas por los Th1 (Tomado de: Zaga y col., 2016).

Características de la placenta

La placenta es un órgano indispensable en el embarazo. Tiene función endocrina e interviene en la nutrición fetal, en el control del crecimiento del feto y en la regularización de su metabolismo, haciendo las funciones de pulmón, intestino y riñón fetal (Cunningham y col., 2006).

El desarrollo de la placenta (figura tres) y el feto es un proceso continuo que comienza en el momento de la fecundación. Se establece su función total entre las 10 y 12 semanas

del embarazo, utiliza un perímetro uterino que incluye 80 a 100 arterias espirales y forma alrededor de 32 mil capilares; además, se forman proyecciones celulares, conocidas como vellosidades coriales, que tienen los capilares que se ponen en contacto con la sangre materna para recoger oxígeno y nutrientes y eliminar los desechos metabólicos (Hernández y col. 2014).

Formación de placenta

La fertilización (unión del ovocito con un espermatozoide) representa la génesis de un nuevo individuo. Acto seguido, el cigoto experimenta divisiones mitóticas y morfogénesis para formar el blastocisto, una etapa embrionaria con dos distintos linajes celulares: el trofoectodermo (el progenitor del trofoblasto) y la masa celular interna (responsable de la organogénesis fetal) (Hernández y col. 2014).

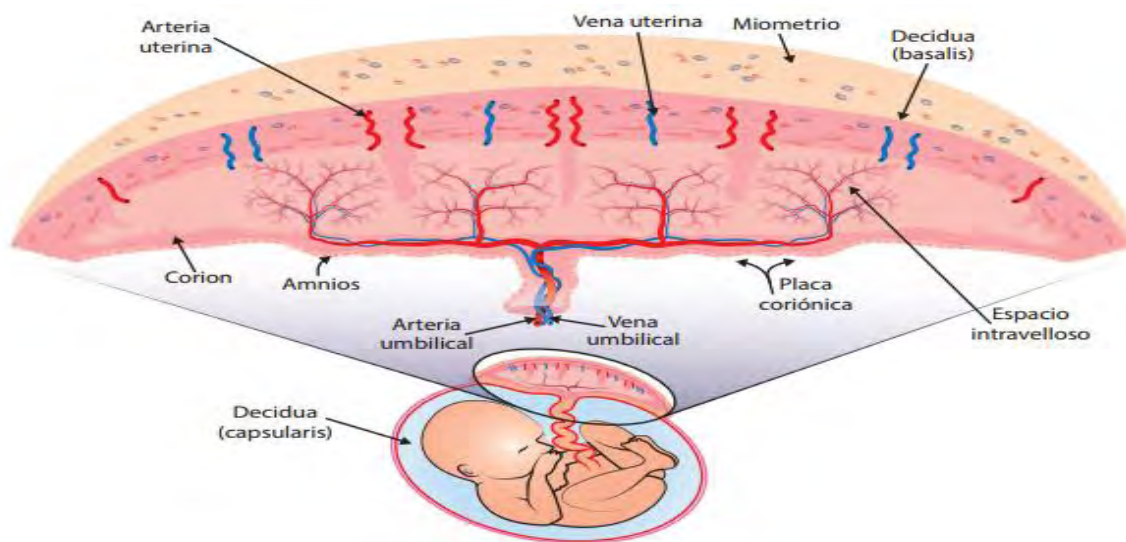


Figura 3. Anatomía general de la placenta y las membranas corioamnióticas.

El proceso de formación de la placenta se completa una vez que concluye la invasión trofoblástica y las circulaciones sanguíneas materna y fetal están ya en estrecho contacto sin mezclarse (obtenida de Zaga y col., 2016).

El trofoblasto placentario se divide en citotrofoblasto veloso relativamente indiferenciado (vCTB), citotrofoblasto intermedio, sincitiotrofoblasto veloso diferenciado (vSTB), y citotrofoblasto extraveloso (EVTC) que invade el interior de la decidua materna (Takao y col., 2011).

El citotrofoblasto (CTB) son las llamadas células madre epiteliales de la placenta, que, dependiendo de las señales que reciben, puede diferenciarse en trofoblasto extraveloso (EVT) o sincitiotrofoblasto (STB). El EVT ancla la placenta a la pared uterina y remodela las arteriolas espirales maternas para proporcionar un amplio suministro de sangre al feto en crecimiento. El STB surge a través de la fusión las células de CTB, segrega hormonas necesarias para el mantenimiento del embarazo y forma una barrera a través de la cual puede tener lugar el intercambio de nutrientes y gases. La mayor parte de la diferenciación de EVT ocurre durante el primer trimestre, antes del inicio del flujo sanguíneo arterial materno en el espacio intervilloso de la placenta, y por lo tanto bajo una baja tensión de oxígeno (Chang y col., 2018).

Implantación

El primer paso para la formación de la placenta es la implantación. La cual comienza de seis a siete días después de la fertilización (Witkin, 2004).

La implantación es un proceso progresivo en el que el embrión se aproxima y adhiere al endometrio materno, para invadirlo (Pacheco, 1999). Ésta ocurre por la interacción entre el blastocisto y el útero receptivo, que sólo puede efectuarse durante un breve periodo denominado “ventana de implantación”. Esta interacción requiere diversos mensajeros, como las hormonas esteroideas, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Dimitriadis y col., 2005).

Aposición

La aposición es la primera etapa que denota la adhesión inicial, aún inestable, del blastocisto a la pared uterina (Staun y Shalev, 2005).

Adhesión

La adhesión estable, revela un aumento del contacto físico entre el blastocisto y el epitelio uterino, mientras que el polo embrionario está orientado hacia el epitelio. La adhesión del blastocisto al endometrio depende de la interacción entre moléculas de adhesión, tales como selectinas, integrinas y trofininas (Aplin y Kimber, 2014).

En respuesta a la implantación, las células estromales circundantes experimentan una transformación (decidualización) para desencadenar la invasión trofoblástica y el crecimiento embrionario. Es entonces cuando inicia la placentación (Hernández y col., 2014).

Invasión trofoblástica

Luego de la implantación, el trofoblasto se introduce poco a poco en el endometrio. Al noveno día posfecundación, la pared del blastocisto se orienta hacia la cavidad uterina y está constituida por una sola capa de células planas; al lado opuesto, se distingue el macizo de células internas que dará origen al embrión. Para el décimo día, el blastocisto está totalmente cubierto por endometrio; el mecanismo de invasión es similar al de las metástasis por células malignas. Para el día trece, posfecundación, el sincitiotrofoblasto es atravesado por conductos de lagunas trofoblásticas o pequeñas cavidades. Conforme pasan los días, el sincitiotrofoblasto invade más tejido materno (decidua basal), incluyendo las paredes de los capilares deciduales superficiales; las lagunas se llenan de sangre materna, formándose así el espacio intervelloso (Cunningham y col., 2006).

El trofoblasto invasor origina los troncos vellositarios primarios, en la proximidad de la capa coriónica, los mismos que aumentan de grosor, transformándose en troncos o vellosidades de primer orden (tipo I), de donde salen ramas que constituirán las vellosidades de segundo orden (tipo II), que a su vez dan origen a las vellosidades de tercer orden (tipo III); estas se dirigen hacia la capa basal, a la que se unen formando las coronas de implantación, para luego dirigirse al espacio intervelloso, en el que se ramifican para formar las vellosidades libres o terminales, que conformarían la barrera placentaria (Hernández, 2003). Las vellosidades tipo I miden más de 300 micras de diámetro; se forman en los días 12 a 13 posfecundación y están contenidas en el

cotiledón placentario que, en número de 12 a 30, son consideradas como la unidad funcional de la placenta (Demir y col., 1997). Las vellosidades o troncos tipo II tienen un diámetro de 120 a 300 micras; se ramifican en 2 a 12 vellosidades tipo II y se forman después de los 16 días posfecundación. Las vellosidades tipo III representan las más pequeñas de las vellosidades, con un diámetro de 80 a 120 micras. Se forman a partir de la tercera semana posfecundación y terminan en más o menos 144 vellosidades terminales (Cross y col., 2006).

La invasión del trofoblasto y la migración es controlada a través de la interacción molecular y celular de los componentes del microambiente materno (figura 4) (Staun y Shalev, 2005).

Asimismo, la invasión del trofoblasto involucra, además de la adhesión vascular, la aproximación física de estas células a la matriz extracelular, su degradación y la subsecuente migración (Purizaca-Benites, 2008).

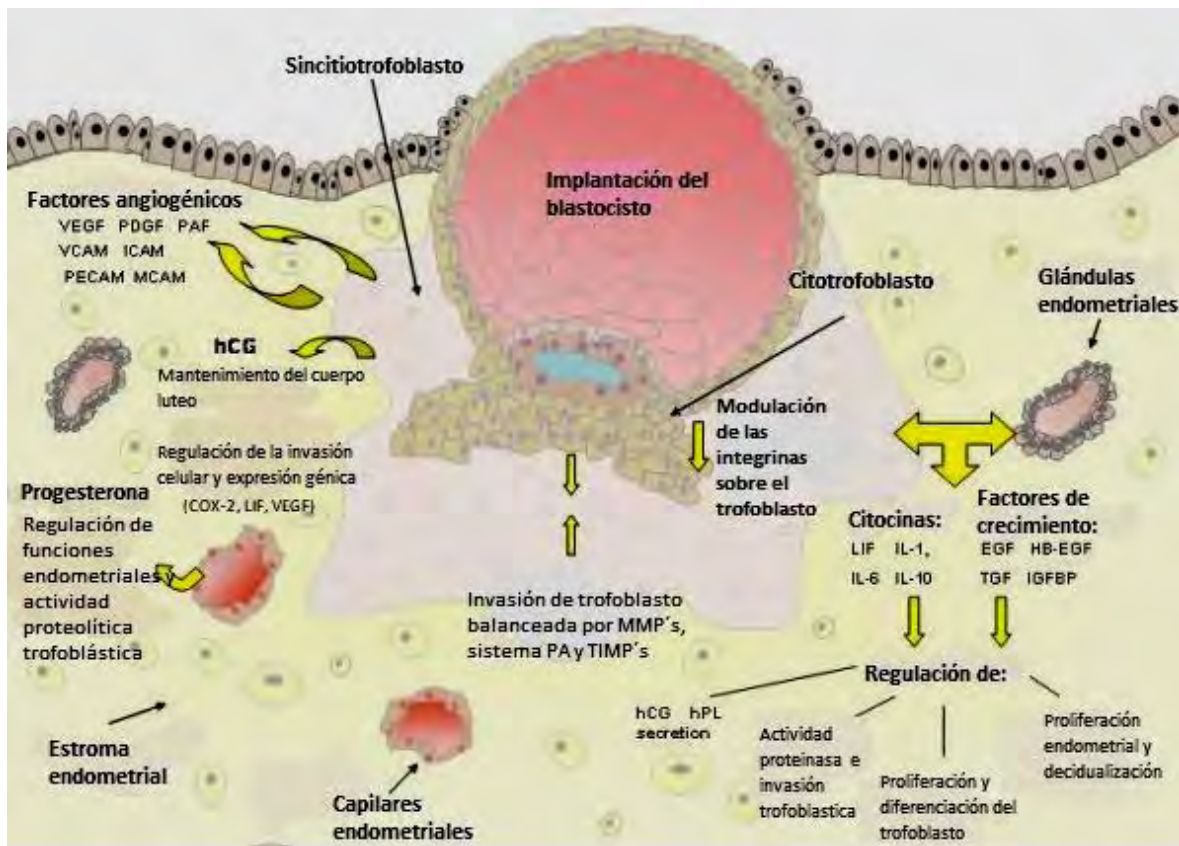


Fig.4. Representación esquemática de un blastocisto implantado, que resalta las interacciones entre las células trofoblásticas y endometriales, incluidas las integrinas, los factores de crecimiento, las citocinas, las hormonas y las proteasas (Modificada de Staun y Shalev, 2005).

Infección intrauterina y parto pretérmino

El embarazo constituye un caso particular de injerto en un sitio de privilegio inmunológico que es el resultado de múltiples mecanismos que participan en el mantenimiento de la tolerancia del binomio materno-fetal (Torres y col., 2013).

Uno de los eventos que afecta el curso normal del embarazo y que puede alterar irreversiblemente el privilegio inmunológico en la interface materno-placentaria, es el desarrollo de un proceso infeccioso a nivel intrauterino, esta condición patológica está asociada con aproximadamente el 30% de todos los partos pretérmino en el mundo (Asrat, 2001).

El ambiente intrauterino se consideró durante mucho tiempo como estéril. Este dogma clásico ha sido cuestionado durante la última década (Van Well y col., 2017). Un estudio de Aagaard y colaboradores (2014), mostró que el microbioma placentario es más parecido al microbioma oral humano.

Las infecciones intrauterinas son la principal causa de parto prematuro. Sin embargo, también está bien establecido que la presencia de bacterias en el líquido amniótico no siempre da como resultado un parto prematuro, ni siempre induce corioamnionitis. La corioamnionitis es la inflamación o infección de la placenta, corion y el amnios, ocurre con mayor frecuencia como resultado de bacterias ascendentes de la vagina y el cuello uterino. Se caracteriza histológicamente por la inflamación y necrosis en todo el amnios. La mayoría de los fetos expuestos a corioamnionitis desarrollan una respuesta inflamatoria sistémica conocida como síndrome de respuesta inflamatoria fetal. Esto a menudo causa la ruptura prematura de las membranas y, por lo tanto, está fuertemente asociada con el nacimiento prematuro (Van Well y col., 2017). En infecciones bacterianas Gram-negativas, los efectos patógenos pueden ser el resultado principalmente de la presencia del componente lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de las bacterias. El LPS en el fluido amniótico durante infecciones intrauterinas ha sido asociado a parto espontáneo prematuro, displasia broncopulmonar, síndrome de dificultad respiratoria, y aborto (Pineda y col., 2014).

Inflamación y parto

En el humano, el inicio del trabajo de parto es el resultado de la conjunción de factores físico-anatómicos, mecánicos, endocrinológicos (autócrinos/parácrinos) e inmunológicos producidos en el útero, placenta y membranas corioamnióticas, los cuales se coordinan con señales de origen fetal (Mendelson, 2009).

Hay cada vez más evidencia de que el trabajo normal espontáneo a término es un proceso inflamatorio en sí mismo (Van Well y col., 2017).

El incremento en la liberación de citocinas proinflamatorias juega un papel crítico en la placentación y el parto. Específicamente el incremento en las concentraciones de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β , IL-8 y TNF- α en el compartimiento gestacional está asociado con resultados adversos en el parto en humanos (Hassan y col., 2016).

Metaloproteinasas de la matriz extracelular

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que participan en la degradación de diversas proteínas en la matriz extracelular (MEC). Típicamente, las MMPs tienen una secuencia de propéptido, un dominio de metaloproteinasa catalítica con zinc catalítico, una región bisagra o péptido de enlace, y un dominio de hemopexina. Las MMPs se clasifican comúnmente sobre la base de sus sustratos y la organización de sus dominios estructurales (cuadro 1) en colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, MMPs de tipo membrana (MT) y otras MMPs (Ning y col., 2017).

Clasificación	Tipo de MMP	Función
Colagenasas	MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18	Son capaces de escindir el colágeno intersticial I, II y III dando lugar a colágeno desnaturalizado o gelatina. También digieren otras moléculas de la MEC (Bode y col., 1999).
Gelatinasas	MMP-2, MMP-9	Degradan el colágeno desnaturalizado o gelatina. MMP-2 también digiere colágenos I, II y III y es expresada en condiciones normales por las células del estroma de la mayoría de los tejidos. La MMP-9, en cambio, está casi ausente en tejidos normales y se encuentra limitada a monocitos y macrófagos (Birkedal-Hansen y col., 1993).
Estromalisinas	MMP-3, MMP-10, MMP-11	Digieren diversos componentes de la MEC. Diferentes estudios indican que son elaboradas por fibroblastos del estroma al ser activados por una glicoproteína de membrana llamada EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) producida por las células tumorales. Esta interacción lleva a la degradación de la membrana basal y de la MEC. Otra función de la MMP-3 es activar varias proMMPs (Konttinen y col., 1999).
Matrilisinas	MMP-7, MMP-26	Estructuralmente son las más simples debido a que carecen del dominio hemopexina. Actúan sobre moléculas de la superficie celular y son expresadas específicamente por células tumorales de origen epitelial (Cascales y Álvarez, 2010).

Cuadro 1. Clasificación de MMPs de acuerdo a su función. Principalmente se clasifican en gelatinasas, colagenasas, estromalisinas y matrilisinas.

Las MMPs, también conocidas como matrixinas, desempeñan un papel esencial en la remodelación de la matriz extracelular. Son capaces de degradar todos los componentes de la MEC (Weiss y col., 2007).

La regulación de la actividad de las MMPs en la interfase materno-fetal parece ser crítica para el éxito de la implantación y la placentación. La expresión de MMP-2 y MMP-9 ha sido localizada con mayor intensidad en el lecho placentario en el embarazo precoz principalmente en células de citotrofoblasto extraveloso de 6 a 8 semanas de gestación y estas proteínas parecen regular la invasión del trofoblasto (Zhu y col., 2012).

Las MMPs son importantes en múltiples procesos biológicos, incluida la proliferación celular, migración, diferenciación, remodelación de la MEC, invasión y vascularización. Estos procesos biológicos tienen lugar varias veces durante el desarrollo normal y la organogénesis, pero, si no está debidamente equilibrado, también podría contribuir a condiciones patológicas perjudiciales como cáncer, progresión tumoral e invasión tisular (Ning y col., 2017).

En la actualidad, se acepta que la ruptura de las membranas corioamnióticas durante el parto se relaciona con aumento en la actividad enzimática de las MMPs de matriz extracelular. Se han señalado diferentes estímulos que afectan a las células de las membranas. Éstos producen la secreción de MMPs e inician la degradación de la matriz extracelular, con ello se pierde el soporte estructural y la subsiguiente rotura de las membranas. Se han aportado pruebas que apoyan la coexistencia de estas enzimas en la membrana corioamniótica de diferentes especies, las cuales se expresan de manera importante al final de la gestación (Meraz y col., 2006).

Los estudios *in vitro* sugieren que la implantación exitosa y la placentación son el resultado del equilibrio entre la secreción de MMP del trofoblasto y su inhibición por los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz (TIMPs) (Staun y Shalev, 2005).

Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas

Los TIMPs, son los principales inhibidores tisulares de las MMPs en el tejido, controlando fisiológicamente su actividad. Las cuatro proteínas TIMP conocidas (TIMP 1-4) inhiben las MMP en una forma estequiométrica 1:1, mediante la interacción principalmente del C-terminal con el sitio catalítico de MMP. Cada uno de los TIMPs difieren en su capacidad para inhibir varias MMP, y en su regulación génica y patrones de expresión génica específicos de tejido. TIMP-1 y 2 exhiben actividad inhibitoria contra las formas activas de todas las MMP, TIMP-1 se une preferentemente a MMP-9 tanto en forma activa como latente, y TIMP-2 se une preferentemente a MMP-2 activa o latente. TIMP-2 además tiene un papel importante en la activación de MMP-2, junto con MT1-MMP (Valenzuela y col., 2000).

Los TIMP (1-3) son producidos por tejidos trofoblásticos y deciduales durante la gestación. TIMP-4 se secreta a partir de blastocisto de ratón, y la adición de anticuerpo TIMP-4 específico aumenta la expresión y la actividad de MMP-2 y MMP-9. Últimamente se detectaron TIMP-1 y -3 y en menor medida TIMP-2 en embriones humanos preimplantacionales, lo que indica que los genes MMP y TIMP se encuentran entre los primeros genes que se expresan en el embrión en desarrollo, preparándose para la implantación. Los factores de crecimiento y las citocinas que se sabe que afectan la invasividad del trofoblasto pueden actuar por regulación hacia arriba o hacia abajo de los TIMP, es decir, puede acelerar la velocidad de invasión o disminuirla. Los TIMP pueden tener funciones adicionales además de la inhibición de MMP, que incluyen el aumento de la proliferación y el desarrollo de embriones (Staun y Shalev, 2005).

Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica sintetizada principalmente por las células lactotropas de la adenohipófisis (Martín, 2010). Sus funciones inmunomoduladoras se han asociado con procesos múltiples, incluido el metabolismo, la lactancia y la proliferación celular (Goffin y col., 2002). Aunque la PRL es producida por lactotrofos en la hipófisis, múltiples tejidos extrapituitarios también pueden producir PRL;

durante embarazo, la fuente principal de esta hormona es la decidua materna (Wu y col., 1995).

Mecanismo de acción de la PRL

Para llevar a cabo sus funciones biológicas la PRL se une a su receptor transmembranal, del cual se han descrito tres isoformas codificadas a partir de un mismo gen, que difieren en el tamaño (corto, medio y largo), siendo la isoforma larga la más frecuente en los tejidos humanos. Todas las isoformas en su dominio intracelular están asociadas constitutivamente a la proteína tirosina cinasa JAK2, lo cual hace que la señalización de PRL sea muy rápida (Yu-Lee, 2002).

La vía canónica de señalización dirigida por PRL fue descrita originalmente en células de la glándula mamaria. Para iniciar la señal intracelular es necesaria la formación de un homodímero del PRL-R, la cercanía entre los receptores induce la fosforilación cruzada de las subunidades JAK2, señal que fosforila los residuos de tirosina del PRL-R, misma que precede a la migración y fosforilación de diferentes miembros de la familia STATs (del inglés signal transduction and transcription) tales como STAT1, 3 y 5; una vez fosforiladas, estas proteínas se disocian del receptor y forman un dímero que se transloca al núcleo para unirse a la secuencia GAS (secuencia gamma activada) presente en la región promotora presente en todos los genes PRL inducibles (Miyoshi y col., 2001).

Estos receptores contienen secuencias de aminoácidos altamente conservadas en sus dominios intra y extracelular. La PRL actúa sobre las células blanco a través de la unión con sus receptores membranales específicos (Méndez y col., 2005).

Las citocinas son proteínas que se distinguen por compartir diversas características como: participar en las respuestas inflamatoria e inmunitaria, son sintetizadas por múltiples tipos celulares y son pleiotrópicas, es decir, que también actúan en diferentes tipos de células, pueden ejercer acciones diferentes en la misma célula blanco, sus efectos son con frecuencia redundantes y pueden actuar en conjunto con otra citocina para producir efectos de adición, de sinergismo o antagonizar mutuamente sus acciones (Díaz y col., 2013). La PRL colabora en sus acciones con otras citocinas, siendo

estas acciones redundantes. Estas características conducen a considerar a la PRL como una citocina (Méndez y col., 2005).

En la mujer, las concentraciones de prolactina en el líquido amniótico comienzan a detectarse a partir de las 10 semanas de gestación, alcanzando su máximo entre las semanas 20 y 24; su concentración puede llegar a alcanzar entre 50 y 100 veces la de la sangre materna o fetal. Esto se debe a dos factores, el enorme tamaño de la decidua, con una producción estimada en 1 μg de PRL/g de decidua; y a la elevada vida media de la PRL en este compartimiento (Martín, 2010).

Justificación

El primer trimestre del embarazo es el periodo crítico para el desarrollo de la placenta, la formación de la unidad materno-fetal y, por lo tanto, determina la continuación del embarazo. Como parte de las adaptaciones más relevantes en el útero gestante durante este periodo, se encuentra la transformación del endometrio y la producción de PRL por las células deciduales, lo que indica que la PRL ejerce efectos autocrinos y paracrinos sobre los tejidos que conforman la unidad materno-fetal.

En este sentido, se ha mostrado que la invasión del trofoblasto puede ser modulada por citocinas y factores de crecimiento, así como por otras moléculas; Stefanoska y colaboradores (2013) mostraron que la PRL estimula la invasión del trofoblasto (línea celular HTR-8/SVneo) a través de los receptores de PRL. La apropiada invasión del trofoblasto está asociada a un proceso inflamatorio y de reorganización del tejido conectivo estrictamente controlado, que permite el establecimiento de una tolerancia hacia el producto.

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de un proceso infeccioso en la interfase materno-fetal puede ocasionar una respuesta inflamatoria exacerbada y por lo tanto llevar a la pérdida de la tolerancia, poniendo en peligro la continuidad del embarazo en cualquiera de sus etapas (primer, segundo o tercer trimestre).

Existe evidencia de que el LPS es capaz de inducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, e IL-8 en la línea celular HTR-8/SVneo (Svinarich y col., 1996), simulando la capacidad de respuesta de los trofoblastos ante un agente patógeno.

Por otro lado, el papel de la PRL como un modulador de la respuesta inmunológica de los tejidos extraembrionarios, ha sido demostrado en un estudio realizado por Zaga y colaboradores, donde esta hormona fue capaz de modular la secreción de IL-1b, TNF-a y de MMP-9 en las membranas fetales de edad gestacional a término (Zaga y col, 2014). Como continuidad de esta investigación, recientemente se ha demostrado que la PRL posee efectos inmunomoduladores sobre la respuesta proinflamatoria en membranas fetales a término en presencia de LPS (Flores y col., 2017).

Tomando en cuenta todo lo expuesto anteriormente y el hecho de que los efectos de la PRL sobre las capacidades inmunológicas del trofoblasto

Considerando la importancia que tiene la regulación estricta de un ambiente de tolerancia, el impacto de un proceso infeccioso sobre el éxito y continuación del embarazo, y finalmente, el hecho de que los efectos de la PRL aún no son completamente comprendidos; en el presente trabajo se evaluó el efecto modulador de la PRL sobre diferentes elementos de respuesta inmune en células de trofoblasto humano HTR-8/SVneo estimuladas con LPS, con el fin de comprender en parte el papel de esta hormona durante el embarazo.

Hipótesis

Si la PRL participa en la regulación de la expresión de citocinas proinflamatorias, entonces, el co-tratamiento de la línea celular de trofoblasto extraveloso HTR-8/SVneo con LPS, el cual provocará un ambiente inflamatorio en las células, y con diferentes concentraciones de PRL, equivalentes a las presentes durante el primer trimestre del embarazo, modificará la secreción y actividad de moduladores de degradación de la matriz extracelular tales como IL-6, IL-8, MMP-9, TIMP-1.

Objetivo general

Determinar si la estimulación selectiva de células de trofoblasto humano con concentraciones de PRL presentes a lo largo del embarazo (50-500 ng/mL) puede disminuir la secreción de moduladores de degradación de matriz extracelular inducidos por la infección con componente LPS.

Objetivos particulares

1. Estandarizar la técnica de cultivo y sub-cultivo de las células de trofoblasto humano HTR-8/SVneo.
2. Determinar mediante una curva dosis-respuesta la concentración de LPS necesaria para inducir una respuesta pro-inflamatoria y pro-degradativa en las células HTR-8/SVneo en cultivo.
3. Determinar mediante una curva dosis-respuesta el efecto de diferentes concentraciones de PRL (50-500 ng/mL) sobre el perfil de secreción de moduladores pro-degradativos secretados por las células HTR-8/SVneo en cultivo como IL-6, IL-8, MMP-9, TIMP1.
4. Caracterizar el perfil de secreción de la MMP-9 en los medios de cultivo de células HTR8-SVneo después de la co-estimulación con LPS y Prolactina.
5. Caracterizar el perfil de secreción de la MMP-2 en los medios de cultivo de células HTR8-SVneo después de la co-estimulación con LPS y Prolactina.

Metodología

Cultivo Celular

Las células que se usaron para el presente proyecto son de trofoblasto humano HTR-8/SVneo (ATCC[®]CRL-3271[™]).

La línea celular HTR-8/SVneo es originada de citotrofoblasto extravelloso, fue establecida por transfección de trofoblasto humano primario de explantes de primer trimestre de embarazo (Takao y col., 2011).

Se procedió a descongelar el vial de células a baño maría a una temperatura de 37°C, el cual contenía 1×10^6 células de trofoblasto humano HTR-8/SVneo, preservado en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C. El medio de cultivo en el cual se sembraron fue RPMI 1640 adicionado con suero fetal bovino al 10%. Se colocó 9 mL de medio en un tubo cónico y se adicionaron las células contenidas en el vial. El tubo se centrifugó durante 9 minutos a 130 gravedades con una temperatura de 21 °C. Se retiró el medio sobrenadante del pellet de células que se formó al fondo del tubo con una pipeta al vacío, evitando quitar totalmente el medio para que no se seque el pellet, se resuspendió y se tomó con una pipeta para pasarlo a la caja de cultivo que se preparó previamente con RPMI-1640. Una vez completado estos pasos, se llevó a la incubadora a 37 °C y 5% de CO₂.

Estímulos

En placas de 12 pozos se sembraron 600 mil células HTR-8/SVneo por pozo, cuantificadas con cámara de Neubauer, las cuales fueron estimuladas con diferentes concentraciones de LPS para determinar mediante una curva dosis-respuesta la concentración necesaria para inducir una respuesta pro-inflamatoria y pro-degradativa en las células en cultivo. Se usaron concentraciones 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10 ng/mL de LPS, las cuales se analizaron a las 6, 24 horas de tratamiento. A las células se les analizó la morfología, así como la viabilidad con muestras 1:1 de colorante azul tripan. Posteriormente se realizaron ensayos con 1, 10 y 100 ng/mL de LPS de acuerdo a literatura consultada para obtener la concentración de LPS necesaria para provocar un

efecto pro-inflamatorio y pro-degradativo sin matar a las células. Una vez encontrada la concentración de LPS en donde hay mayor expresión de citocinas, se procedió a determinar mediante una curva dosis-respuesta el efecto de diferentes concentraciones de PRL sobre el perfil de secreción de modulares pro-degradativos secretados por las células en cultivo. En placas de 12 pozos se sembraron 600 mil células por pozo HTR-8/SVneo, una vez adheridas en las placas, se procedió a realizar un pre-estímulo con PRL usando concentraciones a partir de 50, 100, 250, 500 ng/mL. 24 horas después se aplicó co-estímulo de LPS 10 ng/mL + PRL (50, 100, 250, 500 ng/mL), transcurridas 12 horas se colectó el medio para realizar cuantificación de citocinas.

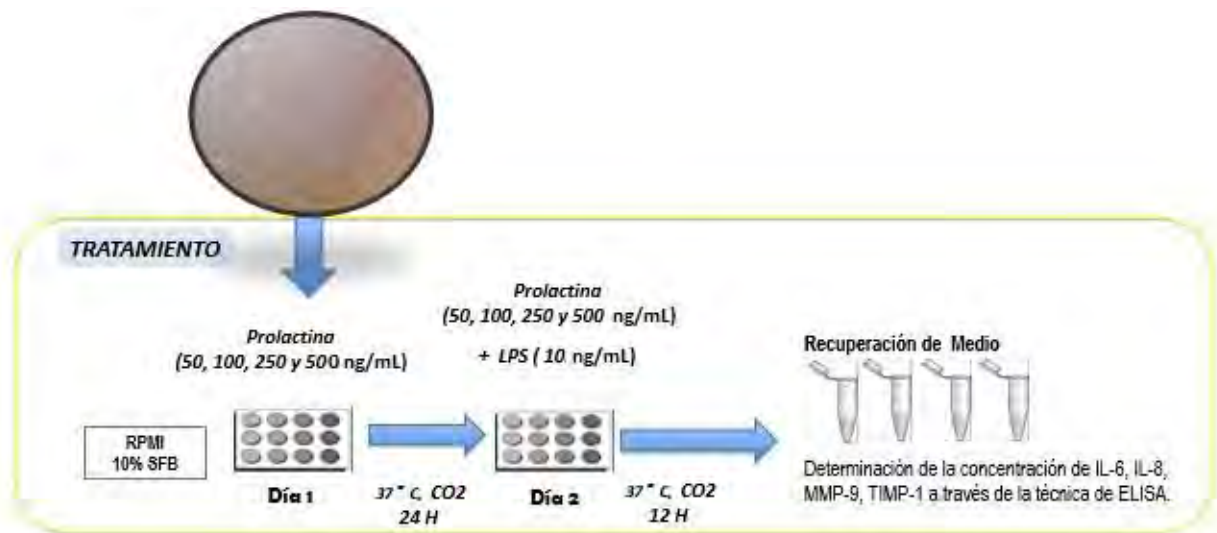


Figura 5. Diagrama donde se muestran los tratamientos que se aplicaron sobre células HTR-8/SVneo, cuando el cultivo se encontró en confluencia del 75% se realizó un pre-estímulo con PRL, 24 horas después se aplicaron co-estímulo de PRL + LPS.

ELISA de IL-6, IL-8, TIMP-1, MMP-9

La cuantificación de cada citocina se realizó mediante ELISA específico tipo sándwich. Se utilizaron microplacas de 96 pozos (Nunc Maxisorp, Dinamarca), que fueron recubiertos con el anticuerpo de captura. La placa se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, la placa se lavó 3 veces, usando solución de lavado (0.05% Tween 20 en PBS, pH 7.2 - 7.49, con el objetivo de remover el anticuerpo no unido al pozo, para posteriormente bloquear la caja adicionando 300 μ L de

solución de bloqueo (1% BSA en PBS filtrada en membranas de 0.2 μm) durante una hora a temperatura ambiente.

Después del bloqueo, la placa se lavó 3 veces más. Se realizó una curva estándar, y a cada pozo se adicionaron 100 μL de cada estándar o muestra, la caja se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Terminado este proceso, se lavó la placa, se adicionó el anticuerpo de detección biotinilado y se incubó durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo la caja se lavó 3 veces, para adicionar a cada pozo 100 μL de streptavidina-HRP (R&D Systems, Minneapolis, E.U.A.) y se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente, cubriendo la caja de la luz. Después de lavar la placa 3 veces más, se adicionaron 100 μL del sustrato. La caja se incubó a temperatura ambiente entre 15 y 20 minutos, tiempo en el que se dio la reacción colorimétrica, que fue detenida utilizando 50 μL de ácido sulfúrico 2N. Finalmente la placa se leyó utilizando un lector de ELISA (BioRad) a una longitud de onda de 450 nm(Engvall y Perlmann, 1971).

Migración por técnica de herida

Este ensayo se realizó con ligeras modificaciones al protocolo de Stefanoska (Stefanoska y col., 2013). Para esto se preparó una placa de 24 pozos con una matriz de gelatina porcina al 0.05%, sobre la cual se sembraron 150 mil células HTR-8/SVneo con medio RPMI 5% SFB, después de 24 horas de incubación, se procedió a realizar una herida sobre la monocapa de células con una punta para micropiteta de 10 μL , se lavó dos veces con PBS 1X y se preparó diferentes condiciones con LPS 10 ng/mL y PRL a diferentes concentraciones usando medio RPMI sin suero , se tomaron fotografías con ayuda del programa zeiss. Las células se incubaron durante 24 más para observar el proceso de migración. Transcurrido ese tiempo se realizó un lavado de las células con PBS 1X y se observaron al microscopio para nuevamente tomar fotografías y analizar el proceso de migración. Se midió el área de la herida al tiempo inicial T0 y 24 horas después.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el programa Sigma Plot versión 11.0 (Systat Software, California, USA). Se realizó ANOVA de 2 vías, y posteriormente se aplicó t-student. $P < 0.05$ fue considera estadísticamente diferente.

Resultados

En la figura seis se muestran cultivos de células HTR-8/SVneo, 24 horas después de descongelar el vial las células comienzan a adherirse en las paredes de la caja de cultivo, inician un proceso de proliferación y su apariencia es alargada (a). En (b) se puede observar una confluencia celular del 100%, donde las células tienen una forma poliédrica y están expuestas en una monocapa.

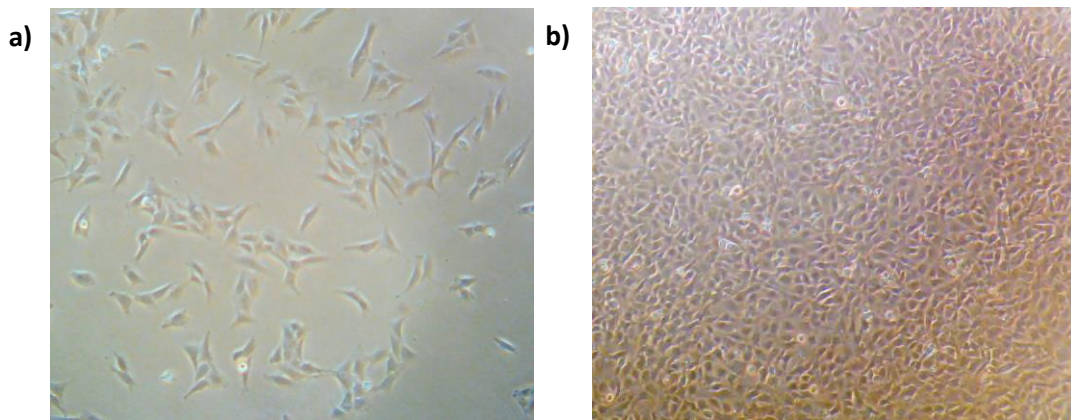


Figura 6. Células HTR-8/SVneo cultivadas en medio RPMI 1640, 10 % Suero fetal bovino, 5% CO₂, 37°C, observadas en microscopio invertido objetivo 10X. **a)** Células 24 horas después de ser descongeladas, **b)** células en confluencia del 100%.

En la figura siete se observa que después de 6 horas de incubación con estímulo con LPS a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10 ng/mL, las células HTR-8/SVneo no se ven afectadas por dicho estímulo, se mantienen adheridas a la placa de cultivo y la morfología de las células se conserva poliédrica, y la confluencia es muy similar en todas las concentraciones.

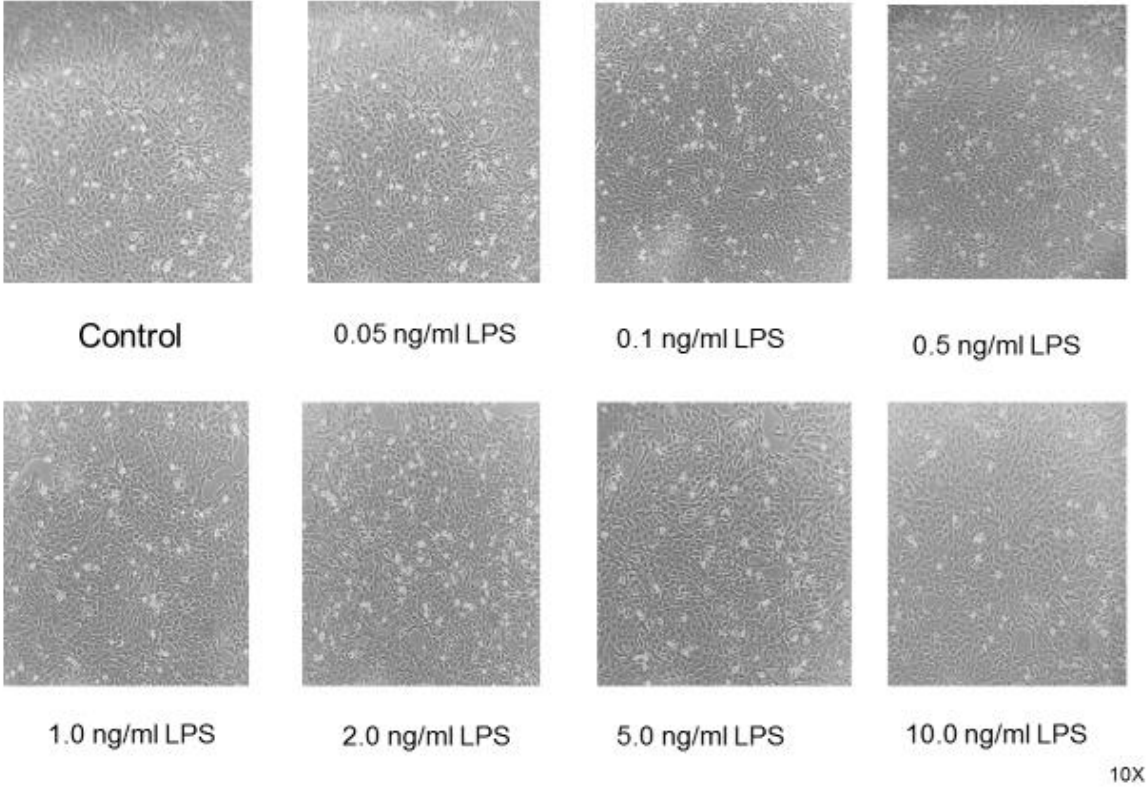


Figura 7. Células HTR-8/SVneo estimuladas con diferentes concentraciones de LPS. Tiempo de incubación 6 horas.

En la figura ocho, se observa que después de 24 horas de incubación las células HTR-8/SVneo estimuladas con LPS a diferentes concentraciones (0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10 ng/mL) no modifican su morfología poliédrica ni su confluencia y se mantienen adheridas a la placa de cultivo.

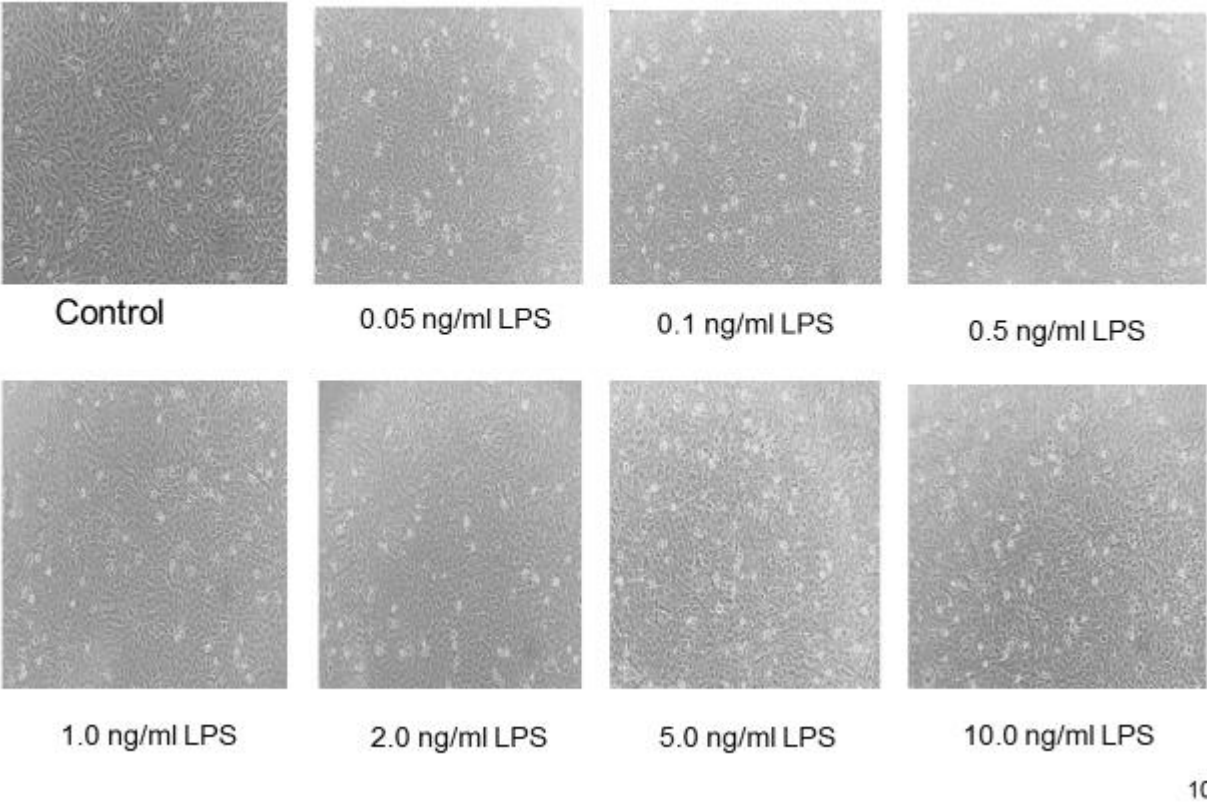


Figura 8. Células HTR-8/SVneo estimuladas con LPS a diferentes concentraciones. Tiempo de incubación 24 horas.

Al realizar el análisis de la viabilidad de las células con azul tripán, se obtuvo el siguiente gráfico (figura nueve), en donde se observa que la viabilidad de las células no se ve afectada significativamente a las 6 y 24 horas de estímulo con LPS.

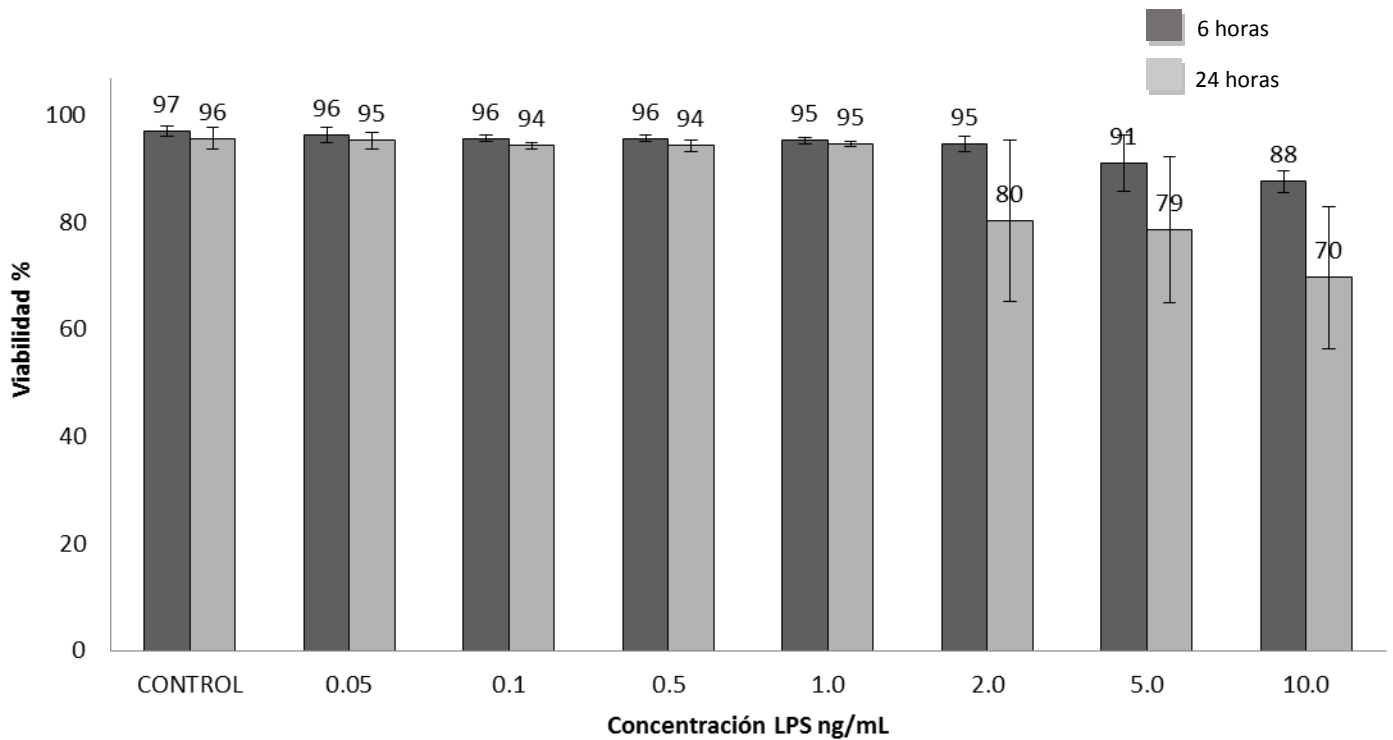


Figura 9. Porcentaje (media \pm E.E.M.) de viabilidad de las células HTR-8/SVneo, la cual no se ve afectada significativamente por el estímulo de diferentes concentraciones de LPS.

En los resultados obtenidos se observó que la morfología de las células y la viabilidad no se ve afectada por los estímulos de LPS.

Se realizó ELISA para determinar la expresión de citocinas (IL-6, IL-8TNF α , IL-1 β).

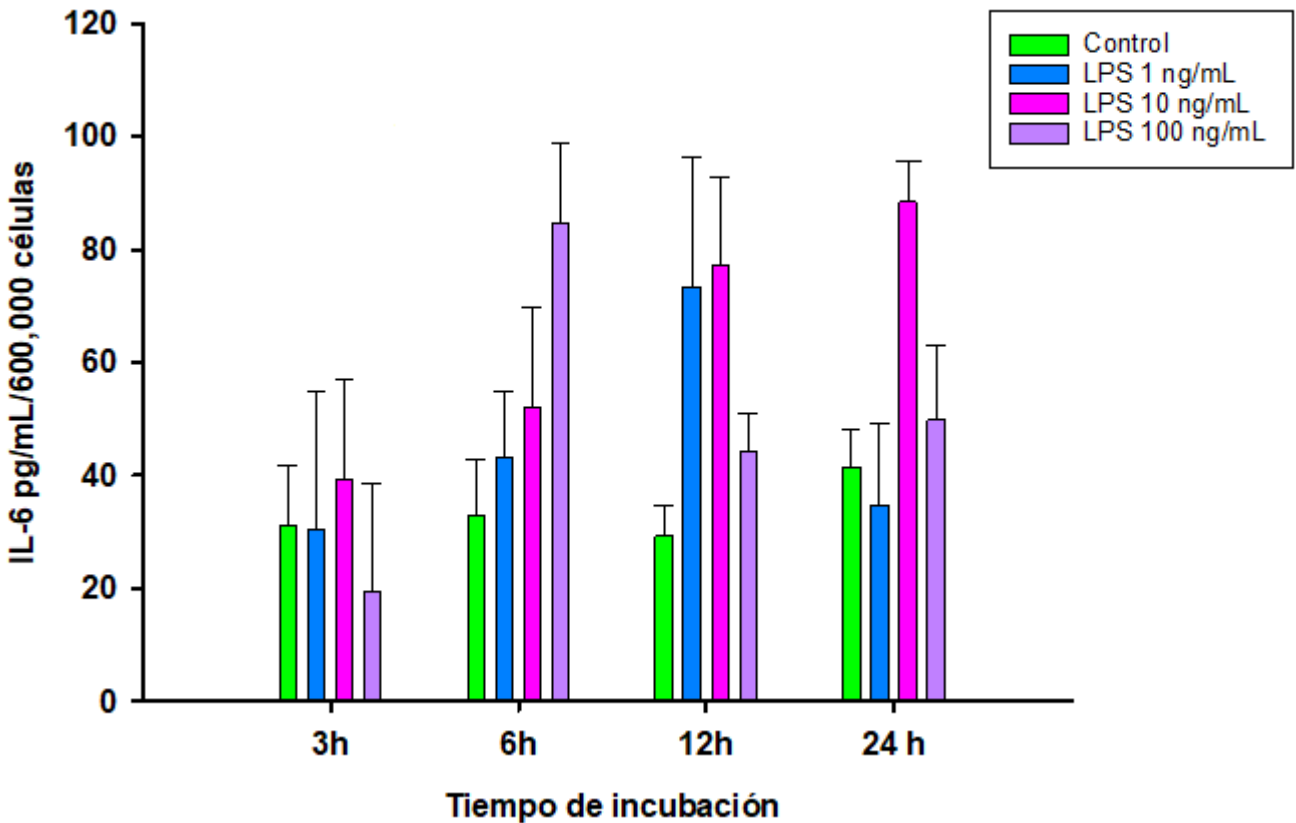


Figura 10. Expresión de IL-6 en células HTR-8/SVneo estimuladas con LPS (1, 10, 100 ng/mL) durante 3, 6, 12 y 24 horas. E.E.M. n=3

Los valores obtenidos con kit de ELISA para TNF α , IL-1 β son inferiores a los obtenidos en la curva.

Los valores de IL-6 obtenidos con ELISA mostraron mayor actividad a las 12 horas de incubación, con esos resultados se procedió a elegir una concentración de LPS y un tiempo de incubación, los cuales fueron 10 ng/mL de LPS durante 12 horas de incubación, en los cuales se observó mayor actividad de IL-6.

Una vez obtenida una concentración y tiempo de incubación, se usaron diferentes concentraciones de PRL, similares a las presentes en el primer trimestre del embarazo (50, 100, 250 y 500 ng/mL). Se aplicó un pre- estímulo de PRL y posteriormente un co-

estímulo de LPS (10 ng/mL). Los medios colectados de estos experimentos de analizaron por técnica de ELISA.

Los gráficos de los resultados obtenidos (figura 11) muestran que el estímulo con LPS sobre las células HTR-8/SVneo produce un incremento en la expresión de IL-6, pero en las condiciones en las que se aplica co-estímulo de LPS+PRL se observa la disminución en la expresión de IL-6. Del mismo modo, la expresión de IL-8 se ve aumentada ante un estímulo de LPS, mientras que ante la presencia de PRL, las concentraciones de IL-8 disminuyen. Estos resultados sugieren que la PRL regula la expresión de IL-6 e IL-8 ante un proceso inflamatorio.

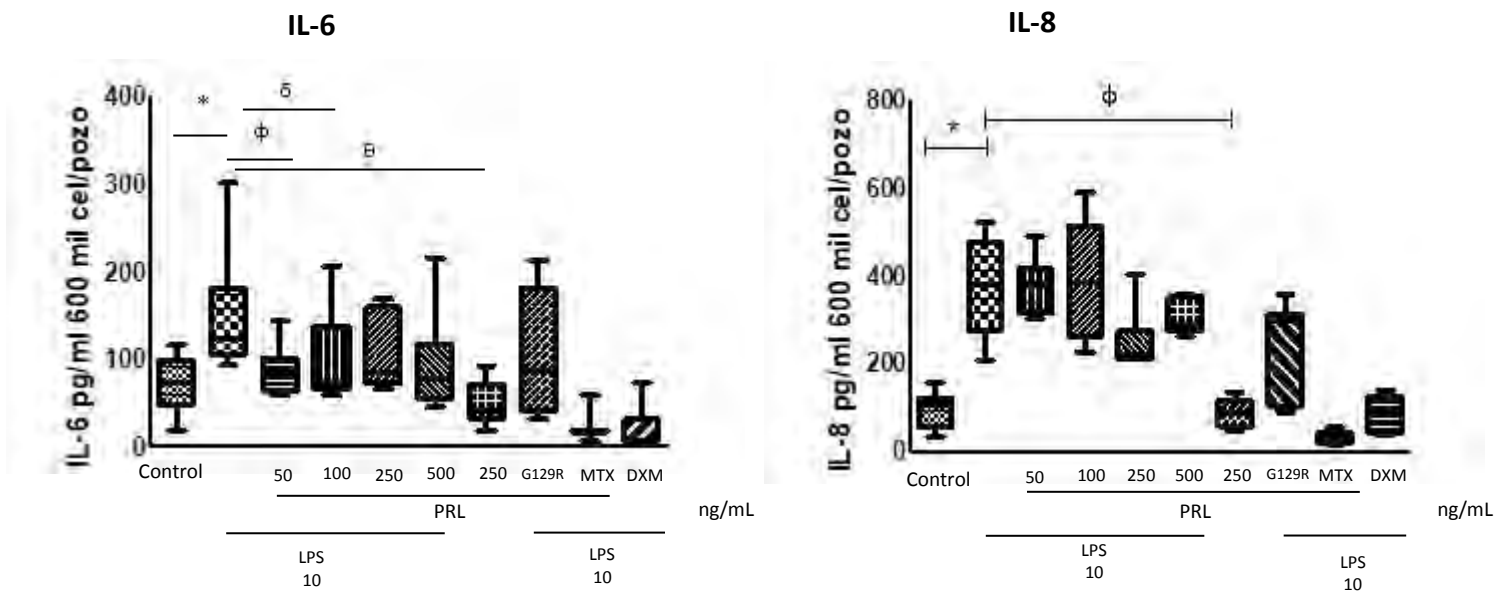


Figura 11. Media \pm E.E.M del Perfil de secreción *in vitro* de IL-6 e IL-8 en células HTR-8/SVneo. Fueron medidas por la técnica de ELISA en el medio de cultivo en condiciones basales y con diferentes tratamientos. Los datos representan 5 experimentos independientes, realizado en triplicado * $P \leq 0.05$ vs control; $\phi P \leq 0.05$ vs LPS; $\delta P \leq 0.05$ vs PRL 100 ng/mL; θ versus tratamiento PRL 250 ng/mL. ANOVA de dos vías.

En el caso de los ensayos realizados con ELISA para determinar la expresión de MMP-9 y su inhibidor TIMP-1, se obtuvieron los siguientes resultados (figura 12), en los cuales no se observa un cambio en la expresión de estas citocinas.

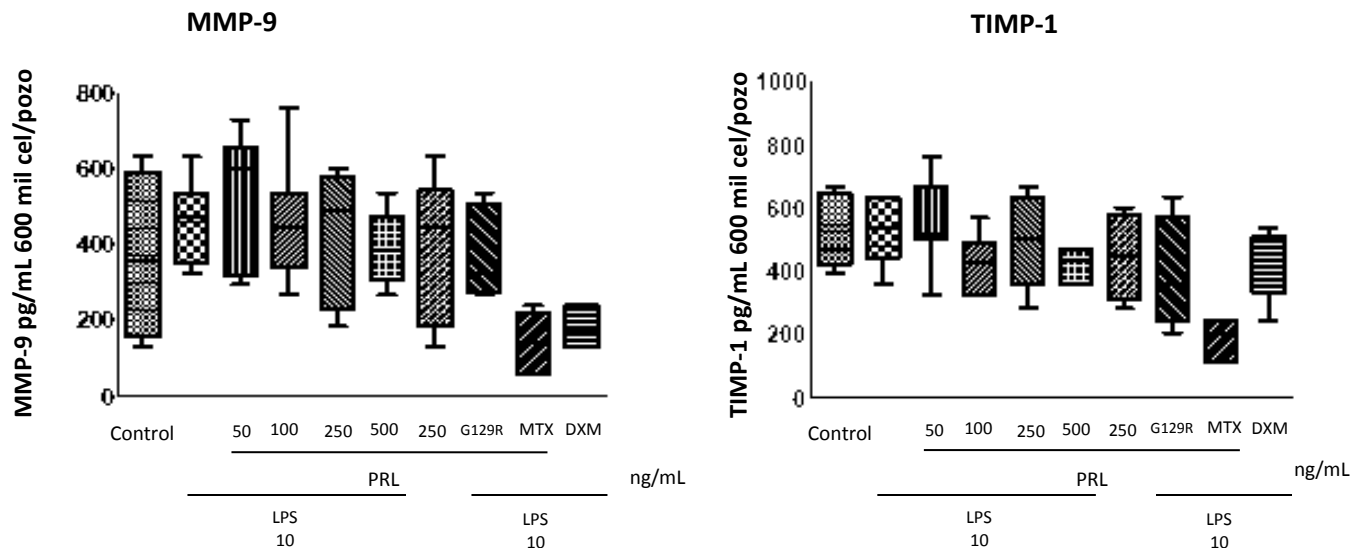


Figura 12. Media \pm E.E.M del perfil de secreción in vitro de MMP-9 y TIMP-1 en células HTR-8/SVneo. Se midieron a través de la técnica de ELISA en el medio de cultivo en condiciones basales y con diferentes tratamientos. Los datos representan 5 experimentos independientes realizado en triplicado $P \leq 0.05$.

En los ensayos de migración, se realizó una herida sobre la monocapa de células HTR-8/SVneo, se tomaron fotografías de la herida realizada, se aplicaron estímulos con las diferentes condiciones de LPS y PRL y se dejaron en incubación 24 horas, posterior al tiempo de incubación, se volvieron a tomar fotografías de las diferentes condiciones (figura 13), para analizar el proceso de migración bajo los diferentes estímulos, se encontró que el proceso de migración es acelerado en las condiciones con PRL y se cierra casi por completo la herida con el estímulo de LPS+ PRL 500 ng/mL, lo que indica a la PRL como un promotor de la migración.

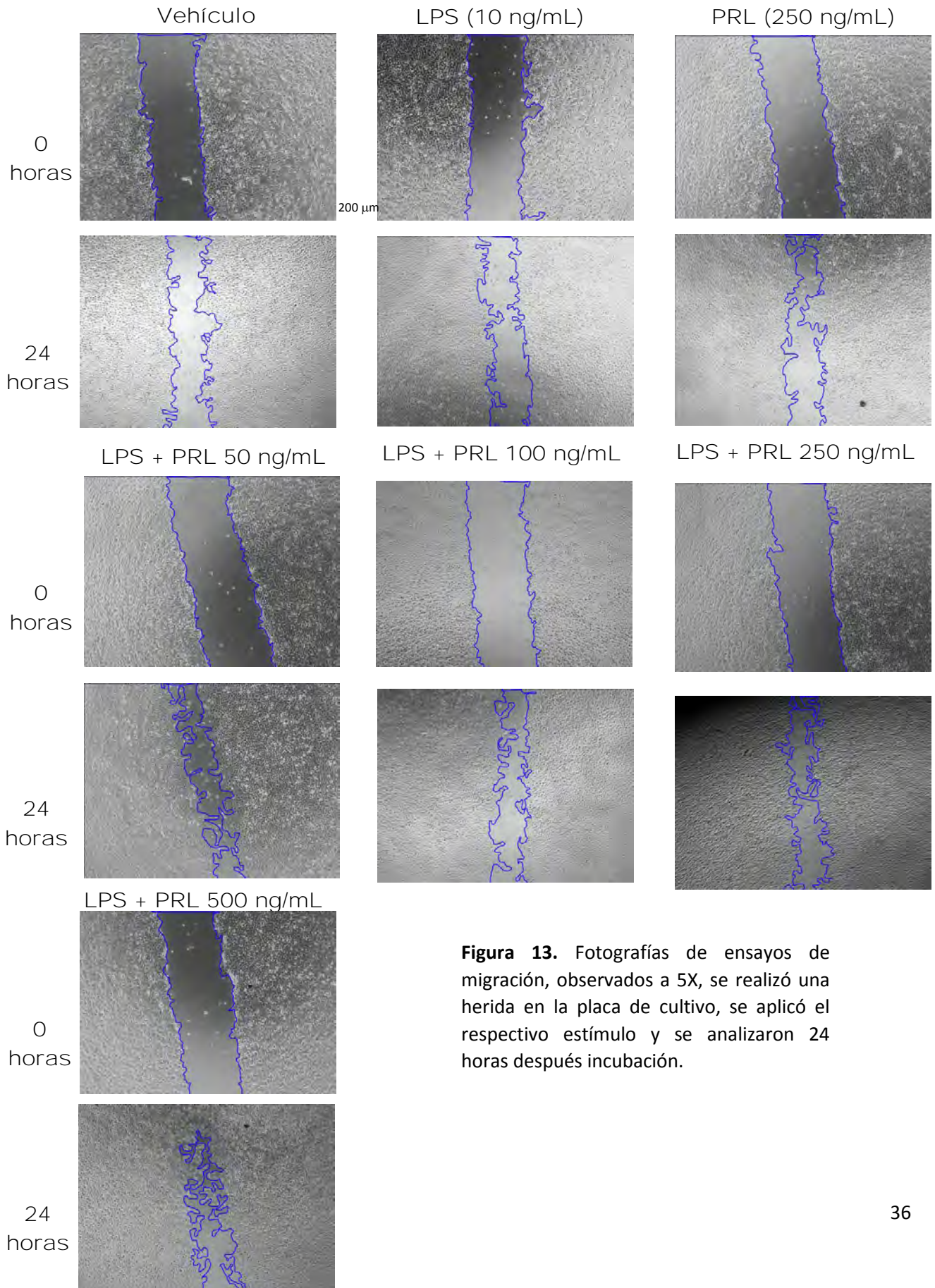


Figura 13. Fotografías de ensayos de migración, observados a 5X, se realizó una herida en la placa de cultivo, se aplicó el respectivo estímulo y se analizaron 24 horas después incubación.

Se analizó el área de la herida al tiempo 0 y 24 horas después, para sí obtener un delta de crecimiento, lo cual nos indicó el grado de migración de las células del trofoblasto para cerrar la herida. En la gráfica obtenida (figura 14), se observa que la migración de las células HTR-8/SVneo bajo condiciones de estímulo con PRL, se incrementa, y todas presentan diferencia respecto al LPS, lo cual sugiere que la PRL promueve la migración en estas células.

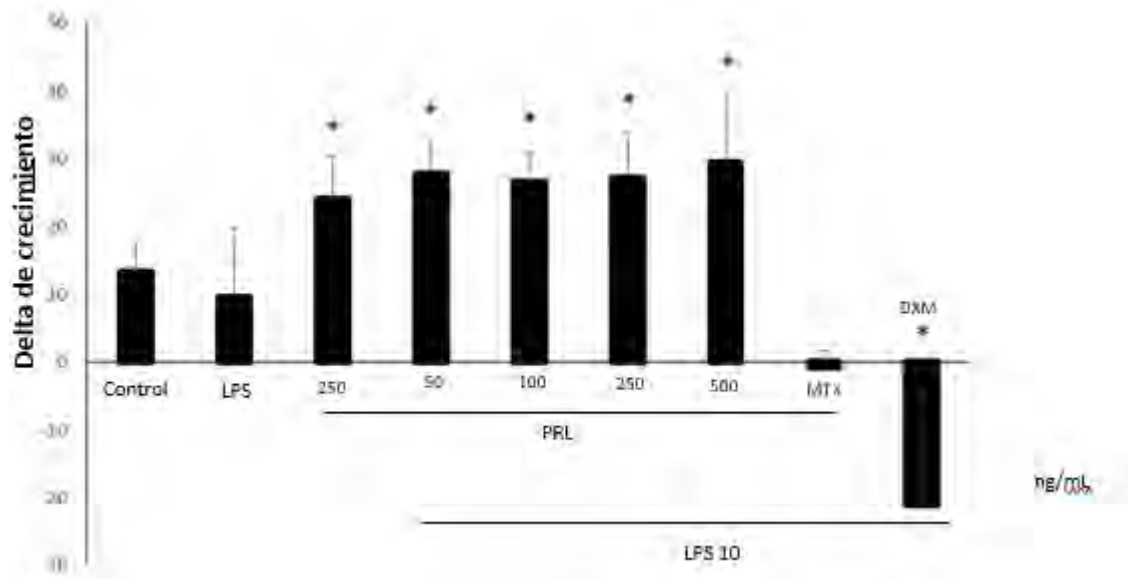


Figura 14. Media \pm E.E.M. del Ensayo de migración del trofoblasto (HTR-8/SVneo) realizado mediante la técnica de Herida * $P < 0.05$ vs. LPS n = 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía y Holm-Sidak post-hoc test.

Discusión

En el presente trabajo mostramos que la prolactina en concentraciones similares a las presentes durante el primer trimestre de gestación, es capaz de disminuir las concentraciones de IL-6 e IL-8 secretadas por trofoblastos extravelosos del primer trimestre (HTR-8/SVneo) estimuladas con LPS de *E. coli*. Adicionalmente, mostramos que esta hormona favorece de manera significativa la migración celular por una vía independiente de la acción de MMP-9.

En el humano, el éxito de la gestación es el resultado de múltiples estrategias inmunológicas y endócrinas que permiten que tejidos maternos y fetales coexistan en un ambiente que simultáneamente proporciona condiciones tolerogénicas e inmunocompetencias suficientes para responder ante cualquier reto infeccioso. Una de las estrategias más complejas y eficientes que favorecen la tolerancia fetal corre a cargo del trofoblasto, que representa la unidad funcional de la placenta, la cual, se encarga de proveer de oxígeno y nutrientes al feto (Carter y Enders, 2012).

La evidencia clínica y experimental indican que la PRL, que durante el embarazo es mayoritariamente sintetizada por la decidua materna induce profundos efectos inmuno-modulatorios que favorecen el mantenimiento de la unidad fetoplacentaria como un sitio inmunológicamente privilegiado (Ignacak y col., 2012). De hecho, se ha reportado que la prolactina regula la función celular del trofoblasto y el grado de invasión de éste en el endometrio.

IL-6 es una citocina pro-inflamatoria secretada por membranas fetales humanas, miometrio, útero y placenta (Pineda y col., 2014, Flores y col., 2014, Anbe y col., 2007). Evidencias clínicas y experimentales sugieren que concentraciones elevadas de IL-6 en el líquido amniótico están asociadas con parto pre-termino y pueden ser usados como predictores de infección intrauterina; de hecho, los niveles de IL-6 en líquido amniótico de mujeres con parto pre-termino asociados a infección son entre 20 y 30 veces más altos que en mujeres sanas (Saito y col., 1993). El incremento de IL-6 como parte de una respuesta proinflamatoria ante *E. coli* ha sido previamente demostrada tanto en células mononucleares aisladas del

espacio intervelloso de la placenta humana (Preciado y cols., 2017) como en un sistema de cultivos de explantes de placenta humana a término (García y col., 2015).

Tomando en consideración que nuestro modelo utiliza trofoblasto extravelloso del primer trimestre, la intención fue evaluar el efecto de la PRL sobre el perfil de secreción de IL-6; el presente trabajo demuestra que la PRL favorece un ambiente antiinflamatorio inhibiendo IL-6, efecto que ha sido previamente mostrado, utilizando membranas corioamnióticas humanas a término (Flores-Espinosa y col., 2017).

Ahora bien, comprender el papel que IL-6 tiene sobre el trofoblasto *per se* resulta controversial, ya que se ha reportado que la IL-6 endógena en la misma línea celular utilizada en el presente proyecto estimula la migración y la invasión del trofoblasto (Jovanovic y Vicovac, 2009); sin embargo, evidencia contraria señala que esta citocina no afecta el potencial invasivo de estas células (Champion y col., 2012). A pesar de esta controversia, es un hecho que altas concentraciones de IL-6 en la unidad fetoplacentaria tiene efectos deletorios en la continuidad de la gestación; por lo tanto, el que la PRL disminuya a esta citocina parece contribuir a inhibir, al menos parcialmente, la inflamación.

IL-8 es una quimiocina clave para la activación de la infiltración de neutrófilos que permite que la respuesta inmune innata y adaptativa converjan reforzando la respuesta inmune en la placenta (Yuan y col., 2009). La evidencia clínica y experimental confirma que altas concentraciones de IL-8 están asociadas con la respuesta inmune de pacientes que desarrollan corioamnioititis (Shimoya y col., 1992) y/o parto pre término (Romero y col., 1991).

Adicionalmente se ha demostrado que IL-8 es responsable del reclutamiento de neutrófilos en membrana fetales y placenta durante el desarrollo de infección intra uterina (Cheroung y col., 1993) además IL-8 ha sido asociada con el inicio del trabajo de parto normal y sus altas concentraciones coinciden con la dilatación cervical (Hebisch y col., 2001). Las concentraciones de IL-8 en líquido amniótico

son considerablemente altos en mujeres con parto a término y pre-término en comparación con las que aún no han entrado en trabajo de parto (Arntzen y col., 1998, Marvin y col., 2002 y Romero y col., 1991).

Mientras que el co-tratamiento de PRL con LPS disminuye de manera significativa la IL-8 secretada al medio de cultivo por las células del trofoblasto.

Los resultados indican que el tratamiento con LPS induce el incremento significativo de IL-8, lo cual concuerda con los resultados que demuestran que placentas con corioamnioititis (Shimoya y col., 2000) y células mononucleares de sangre placentaria estimuladas con LPS de *E. coli* (Preciado y col., 2017) secretan altos niveles de esta quimiocina como parte de la respuesta ante los diferentes retos inmunológicos. En un contexto *in vivo*, el disminuir los niveles de IL-8 puede significar la disminución en el número de células profesionales del sistema inmune materno que migran hacia el sitio infectado, y si bien este efecto puede detener parcialmente la potenciación del proceso inflamatorio, podría también ser deletorio para la unidad materno-fetal, ya que se autolimita la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, si bien la MMP-9 es reconocida como una metaloproteasa clave en el mantenimiento del equilibrio del recambio de los diferentes elementos de matriz extracelular en la unidad fetoplacentaria, y que juega un papel esencial en el encendido y progresión del trabajo de parto normal y patológico (Bryant y Yamamoto, 1995; Cox y col., 1988; Deb y col., 2004; Dunkan y col., 2002), en las etapas tempranas de la gestación, la MMP-9 es indispensable para una correcta invasión del trofoblasto en el endometrio materno (Zhu-Jia y col., 2012); en este trabajo nosotros no logramos demostrar que la PRL modificara el perfil de secreción de esta enzima y su inhibidor tisular (TIMP-1), sin embargo, el co-tratamiento con PRL sí acelera de manera significativa la velocidad de migración del trofoblasto, lo cual puede indicar que este proceso debe de estar siendo modulado por un mecanismo diferente al ejercido por la MMP-9; podríamos pensar en MMP-2 como un candidato clave a evaluar en estudios posteriores.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo, sustentan que la PRL, en

concentraciones equivalentes a las del primer trimestre de la gestación, tiene la capacidad de modificar la respuesta inmune y el perfil prodegradativo del trofoblasto extravelloso humano estimulado con endotoxina bacteriana.

Conclusiones

La estimulación de las células HTR-8/SVneo con LPS induce el incremento en las síntesis de IL-6 e IL-8.

La PRL disminuye las concentraciones de IL-6 e IL-8 sintetizadas por HTR-/SVneo en respuesta a la estimulación con endotoxina.

El tratamiento de las células HTR-8/SVneo con LPS, no modifica el perfil de MMP-9 y de su inhibidor TIMP-1 ni la velocidad de migración.

La PRL acelera la velocidad de migración de las células HTR-8/SVneo.

Bibliografía

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J. & Versalovic, J. 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 6(237): 1-22.
- Anbe, H., Okawa, T., Sugawara, N., Takahashi, H., Sato, A., Vedernikov, Y., Saade, G. & Garfield, R. 2007. Influence of progesterone on myometrial contractility in pregnant mice treated with lipopolysaccharide. *J Obstet Gynaecol Res.* 33(6): 765-771.
- Aplin, D. & Kimber, J. 2014. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2(1): 48-59.
- Asrat, T. 2001. Intra-amniotic infection in patients with preterm prelabor rupture of membranes. Pathophysiology, detection, and management. *Clin Perinatol.* 28(4):735-751.
- Betancourt, A., Flores, F., Rosas, V. & Martínez, M. 2006. Papel de las citocinas en la implantación embrionaria en mamíferos domésticos. *Vet Méx.* 37 (3): 335-350.
- Birkedal, H., Moor, M., Bodden, L., Windsor, B. Birkedal, A. DeCarlo, A. & Engler, J. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 4 (2): 197-250.
- Bode, W., Fernandez, H., Tschesche, F., Grams, H., Nagase, H. & Maskos, K. 1999. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci.* 55 (4): 639-652.
- Bryant, G., & Yamamoto, S. 1995. Control of peripartal collagenolysis in the human chorion-decidua. *Am J Obstet Gynecol.* 172 (1): 63-70.
- Burt, T. 2013. Fetal regulatory T cells and peripheral immune tolerance in utero: implications for development and disease. *Am J Reprod Immunol.* 69(4): 346-358.
- Carter, A. & Enders A. 2012. The evolving placenta: convergent evolution of variations in the endotheliochorial relationship. *Placenta.*33(5): 319-326
- Cascales, M. & Álvarez, J. 2010. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cancer. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 76 (1): 59-84.
- Chang, C., Wakeland, A., & Parast, M. 2018. Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension. *J Endocrinol.* 236(1): 43-56.

- Cox, S., MacDonald, P., & Casey, M. 1988. Assay of bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) in human amniotic fluid: potential usefulness in diagnosis and management of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 159(1): 99-106.
- Cross, J., Nakano, H., Natale, D., Simmons, D. & Watson E. 2006. Branching morphogenesis during development of placental villi. *Differentiation.* 74(1): 393-401.
- Cunningham, F., Leveno, K., Bloom, S., Hauth, J., Gilstrap, L., & Wenstrom, K. 2006. Obstetricia. Implantación, Embriogénesis y desarrollo placentario. 22a Ed. México: Mc Graw Hill. 39-83.
- Deb, K., Chaturvedi, M., & Jaiswal, Y. 2004. Comprehending the role of LPS in Gram-negative bacterial vaginosis: ogling into the causes of unfulfilled child-wish, *Arch Gynecol Obstet.* 270(3): 133-146.
- Demir, R., Kosanke, G., Kohnen, G., Kertschanska, S., & Kaufman, P. 1997. Classification of human placental stem villi. Review of structural and functional aspects. *Microsc Research Technique.* 38(1): 29-41.
- Díaz, L., Díaz, M., González, L., Lira, S., Larrea, F., & Méndez I. 2013. Prolactin in the Immune System, Prolactin György M. Nagy, IntechOpen, 1(1): 53-80.
- Dimitriadis, E., White, C. & Jones R. 2005. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update.* 11(1): 613-630.
- Dunkan, J., Cock, M., & Scheerlinck, J. 2002. White matter injury after repeated endotoxin exposure in the preterm ovine fetus, *Pediatr Res.* 52 (6): 941-949.
- Engvall, E. & Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 8(9): 871-874.
- Fernandes, P., Koodoo, S., Wodzicki, A., Allardice, J. & McCoshen, J. 1997. Maternal prolactin secretion is phasic during induced term and post-term labor. *J Soc Gynecol Investig.* 4(2): 81-85.
- Ferriani, R., & Silva, M. 1988. Prolactin levels in blood from the intervillous space of the human placenta. *Gynecol Obstet Invest.* 26(1):73-76.
- Flint, D., Boutinaud, M., Whitelaw, C., Allan, G., & Kolb, A. 2006. Prolactin inhibits cell loss and decreases matrix metalloproteinase expression in the involuting mouse

mammary gland but fails to prevent cell loss in the mammary glands of mice expressing IGFBP-5 as a mammary transgene. *J Mol Endocrinol.* 36(3):435-48.

- Flores, P., Preciado, E., Mejía, A., Sedano, G., Bermejo, L., Parra, A., Estrada, G., Vega R., Méndez, I., Quesada, B., Olmos, A., & Zaga, V. 2017. Selective immunomodulatory effect of prolactin upon pro-inflammatory response in human fetal membranes. *Jour of Rep Im.* 123(1): 58–64.
- Goffin, V., Binart, N., Touraine, P. & Kelly, P. 2002. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol.* 64(1): 47–67.
- Golander, A., Hurley, T., Barrett, J., Hizi, A. & Handwerger, S. 1978. Prolactin synthesis by human chorion-decidual tissue: a possible source of prolactin in the amniotic fluid. *Science.* 202(4365): 311-313.
- Hassan, I., Kumar, A., Park, h., Lash, H. & Caruso, R. 2016. Reactive Oxygen Stimulation of Interleukin-6 Release in the Human Trophoblast Cell Line HTR-8/SVneo by the Trichlorethylene Metabolite S-(1,2-Dichloro)-l-Cysteine. *Biol Reprod.* 95(3): 1-11.
- Hernández, J. 2003. Morfogénesis y morfología de la placenta a lo largo de la gestación. Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción. Madrid: Editorial Médica Panamericana.:204-2016.
- Hernández, M., Valencia, J., Ríos, B., Cruz, P. & Vélez, D. 2014. Elementos de la implantación y placentación, aspectos clínicos y moleculares. *Reproducción.* 7(2): 102-116.
- Ignacak, A., Kasztelnik, M., Sliwa, T., Korbut, R., Rajda, K. & Guzik, T. 2012. Prolactin--not only lactotrophin. A "new" view of the "old" hormone. *J Physiol Pharmacol.* 63(5): 435-443.
- Jarrar, D., Wang, P., Cioffi, W., Bland, K. & Chaudry, I. 2000. The female reproductive cycle is an important variable in the response to trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279(3):1015-1021.
- Jovanovic, M. & Vicovac. 2009. Inteleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. *Placenta.* 30 (1): 320-328.

- Kanda, Y., Jikihara, H., Markoff, E. & Handwerger, S. 1999. Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(2):677-681.
- Karabulut, A., & Pratten, M. 1998. Species-specificity of growth-promoting effects of prolactin during rat embryogenesis. *J Anat.* 192(1): 1-12.
- Kelly, R. 2002. Inflammatory mediators and cervical ripening. *J Reprod Immunol.* 57(1):217-24.
- Kletzky, O., Rossman, F., Bertolli, S., Platt, L. & Mishell, D. 1985. Dynamics of human chorionic gonadotropin, prolactin, and growth hormone in serum and amniotic fluid throughout normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 151(7): 878-884.
- Knöferl, M., Angele, M., Ayala, A., Cioffi, W., Bland, K. & Chaudry, I. 2000. Insight into the mechanism by which metoclopramide improves immune functions after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279(1): 72-80.
- Konttinen, Y., Ainola, M., Valleala, H., Ma, J., Ida, H., Mandelin, J., Kinne, R., Santavirta, S., Sorsa, T., López, C. & Takagi, M. 1999. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis.* 58(1): 691–697.
- Lundin, S. & Mitchell, M. 1991. Prostaglandin production by human chorion laeve cells in response to inflammatory mediators. *Placenta.* 12(4): 353-363.
- Maaskant, R., Bogic, L., Gilger, S., Kelly, P. & Bryant, G. 1996. The human prolactin receptor in the fetal membranes, decidua, and placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 81(1): 396-405.
- Martín P.J. 2010. Fisiología Humana. Fisiología de la prolactina. 4ta. Edición. México. Mc Graw-Hill: 3-12.
- McCoshen, J., Patalas, E., Markoff, E., Lee, D. & Ming, Y. 1990. Comparisons of glycosylated and nonglycosylated amniotic fluid prolactins in normal second- and third-trimester pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 163(1): 81-85.
- Mendelson, C. 2009. Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. *Mol Endocrinol.* 23(7): 947-954.

- Méndez, I., Cariño C. & Díaz L. 2005. La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos. *Rev. Invest. Clin.* 57 (3): 447-456.
- Meraz, N., Ortega, A., Estrada, G., Flores, A., Espejel, A., Hernández, C. & Vadillo, F. 2006. Identification of a calcium-dependent matrix metalloproteinase complex in rat chorioallantoid membranes during labour. *Basic science of reproductive medicine.* 12(10): 633-641
- Miyoshi, K., Shillingford, J., Smith, G., Grimm, S., Wagner, K., Oka, T., Rosen, J., Robinson, G. & Hennighausen, L. 2001. Signal transducer and activator of transcription (stat) 5 control the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium, *J Cell Biol.* 155(1): 531-542.
- Ning, C., Min, H. & Raouf, A. 2017. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 147(1): 1-73.
- Okamura, H., Zachwieja, J., Raguet, S. & Kelly, P. 1989. Characterization and applications of monoclonal antibodies to the prolactin receptor. *Endocrinology.* 124(5): 2499-2508.
- Pacheco, J. 1999. Inmunología de la implantación. *Ginecol y Obstet.* 45(1): 14-22.
- Pineda, M., Flores, P., Espejel, A., Estrada, G., Flores, A., Maida, R. & Zaga, V. 2014. Evidence of an immunosuppressive effect of progesterone upon in vitro secretion of proinflammatory and prodegradative factors in a model of choriodecidual infection. *B J O G.* 122(13): 1798-1807.
- Preciado, E., García, G., Flores, P., Bermejo, L., Espejel, A., Estrada, G., Razo, G., Granados, M., Helguera, A., Irlés, C. & Zaga, V. 2018. Progesterone suppresses the lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in primary mononuclear cells isolated from human placental blood. *Immunol Invest.* 47(2): 181-195.
- Prigent, A., Pageaux, J., Fayard, J., Lagarde, M., Laugier, C. & Cohen, H. 1996. Prolactin up-regulates prostaglandin E2 production through increased expression of pancreatic-type phospholipase A2 (type I) and prostaglandin G/H synthase 2 in uterine cells. *Mol Cell Endocrinol.* 122(1): 101-108.
- Purizaca, M. 2008. La placenta y la barrera Placentaria. *Rev Per Ginecol Obstet.* 54(1): 270-278.

- Rico, M. & Vega, G. 2012. Mecanismos inmunológicos involucrados en el embarazo. *Ginecol Obstet Mex.* 80(5): 332-340.
- Riddle, O., Bates, W., & Dykshorn, W. 1933. The preparation, identification and assay of prolacyin- a hormone of the anterior pituitary. *Am J Phys.* 105(1): 91-216.
- Romero, R., Espinoza, J., Goncalves, L., Kusanovic, J., Friel, L. & Hassan, S. 2007. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med.;* 25(1): 21-39.
- Romero, R., Ghidini, A., Mazor, M. & Behnke, E. 1991. Microbial invasion of the amniotic cavity in premature rupture of membranes. *Clin Obstet Gynecol.* 34(4): 769-778.
- Saito, T., Taga, T., Miki, D., Futatsugi, K., Yawata, H., Kishimoto, T. & Yasukawa K. 1993. Preparation of monoclonal antibodies against the IL-6 signal transducer, gp130, that can inhibit IL-6-mediated functions. *J Immunol Methods.* 163(2): 217-223.
- Staun, R. & Shalev, E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol.* 3(56): 1-12.
- Stefanoska, I., Jovanović, M., Vasilijć, S., Čujić, D. & Vićovac, L. 2013. Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro. *Placenta.* 34(9): 775-783.
- Stefos, T., Sotiriadis, A., Tsirkas, P., Messinis, I. & Lolis D. 2001. Maternal prolactin secretion during labor. The role of dopamine. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 80(1): 34-38.
- Sun, W., Liu, D., Li, W., Zhang, L., Long, G. Wang, J., Mei, Q. & Hu, G. 2013. Interleukin-6 promotes the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cell lines and upregulates the expression of MMP-2 and MMP-9. *Int J of oncol.* 44(5): 1551-1560.
- Svinarich, D., Bitonti, O., Romero, R. & Gonic, B. 1996. Induction and posttranslational expression of cytokines in a first trimester trophoblast cell line by lipopolysaccharide. *Am J Obstet Gynecol.* 175(4): 970-973.
- Takao, T., Asanoma K., Kato, K., Fukushima K., Tsunematsu, R., Hirakawa, T., Matsumura, S., Seki, H., Takeda, S., Wake, N. 2011. Isolation and Characterization of

Human Trophoblast Side-Population (SP) Cells in Primary Villous Cytotrophoblasts and HTR-8/SVneo. *PloS one*. 6 (7): 1-14.

- Torres, A., Hernández, M. & Rodríguez, A. 2013. Immune System and pregnancy: topics in both healthy women and rheumatic patients. *Rev Reumatolog*. 15(2): 76-82.
- Valenzuela, M., Collados, L., Kettlun, A., González, F. & Cartier, L. 2000. Increased activity of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-1 associated tropical spastic paraparesis. *Rev méd Chile*. 128(6): 585-592.
- Van Well, G., Daalderop, A., Wolfs, T. & Kramer, B. 2017. Human perinatal immunity in physiological conditions and during infection. *Molecular and Cellular Pediatrics*. 4(4): 1-11.
- Vázquez, S., Bouchan, P., González, M., Paredes, L., Calixto, R. & Cébulo, A. 2011. Mecanismos de tolerancia inmunológica en el embarazo. *Perinatol Reprod Hum*. 25(1): 39-45.
- Weiss, A., Goldman, S. & Shalev, E. 2007. The matrix metalloproteinases (MMPS) in the decidua and fetal membranes. *Front Biosci*. 1(12): 649-659.
- Witkin, W. 2004. Formation and role of placenta. *Dept. Anatomy & Cell Biology* 3(1): 2-12.
- Wu, W., Brooks, J., Glasier, A. & McNeilly, A. 1995. The relationship between decidualization and prolactin mRNA and production at different stages of human pregnancy. *J Mol Endocrinol*. 14(2): 255-61.
- Yu-Lee, Y. 1997. Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med*. 215(1): 35-52.
- Zaga, V., Estrada, G., Flores, M. 2016. Respuesta inmunológica en el embarazo. *Inmunología molecular, celular y traslacional*. 1st. Ed. México. LWW :588-599.
- Zaga, V., Garcia, G., Flores, A., Merchant, H. & Vadillo, F. 2011. In vitro secretion and activity profiles of matrix metalloproteinases, MMP-9 and MMP-2, in human term extra-placental membranes after exposure to *Escherichia coli*. *Reproductive Biology and Endocrinology*. (9)13: 1-11.

- Zhu, Y., Pang, Z. & Yu, Y. 2012. Regulation of Trophoblast invasión: the role of matrix metalloproteinases. *Rev Obstet Gynecol.* 5 (3): 137-143.