



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LOS TEJIDOS
EXTRAEMBRIONARIOS HUMANOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. MARÍA DEL PILAR FLORES ESPINOSA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CLAUDIA VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA I.E.R.

COMITÉ TUTOR: DRA. ISABEL CRISTINA MÉNDEZ HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DRA. GUADALUPE DEL CARMEN ESTRADA GUTIÉRREZ
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA I.E.R.

CD. MX., MARZO, 2019



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.



OFICIO CPCB/158/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 29 de octubre de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **FLORES ESPINOSA MARÍA DEL PILAR** con número de cuenta 300870312, con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LOS TEJIDOS EXTRAEMBRIONARIOS HUMANOS**", realizada bajo la dirección de la **DRA. CLAUDIA VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA**:

Presidente: DRA. LORENZA DÍAZ NIETO
Vocal: DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN
Secretario: DRA. GUADALUPE DEL CARMEN ESTRADA GUTIÉRREZ
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DRA. ISABEL CRISTINA MÉNDEZ HERNÁNDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 08 de febrero de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por ser la casa de estudios que me ha formado y me ha brindado la oportunidad de crecer en el camino de la investigación.

También agradezco a mi tutora principal la Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina quien me proporcionó un espacio en su laboratorio y dirigió este trabajo de manera asertiva; su conocimiento en el tema de la inmunología del embarazo, así como su experiencia en el modelo *in vitro* que trabajamos fue indispensable y enriquecedor para el desarrollo de este trabajo.

Finalmente agradezco a los miembros del comité tutorial, la Dra. Isabel Méndez Hernández con amplio conocimiento sobre las funciones fisiológicas de la prolactina, su tiempo, su interés y su disposición en todo momento. A la Dra. Guadalupe del Carmen Estrada Gutierrez, su experiencia en el tema del parto prematuro y las infecciones intrauterinas, así como sus comentarios y apoyo académico fueron un gran aporte para este trabajo.

Agradecimientos a título personal

Quiero agradecer a las personas que me apoyaron durante el desarrollo de este trabajo. Agradezco a la Dra. Martha Lucía Granados Cepeda Médico Adscrito del Departamento de Neonatología del INPer, quien nos apoyó en la toma de las muestras biológicas en la Unidad de Tococirugía con mucho compromiso; al Dr. Braulio Quesada Jefe del área de Tococirugía quien nos facilitó la toma de muestras biológicas en el Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 del IMSS.

Mi agradecimiento al Dr. Rodrigo Vega-Sánchez por su disposición para orientarnos en varios momentos durante el análisis de los resultados, la escritura de la tesis y los artículos originales, científicos que se derivaron de este estudio.

A la Dra. Claudine Irlles por su apoyo académico, sus observaciones, su guía, su paciencia y su calidad humana.

Al Dr. Ismael Mancilla por su disposición, paciencia y entusiasmo en cada duda que pedí su apoyo.

Mi agradecimiento a la M. en C. Luisa Bermejo como compañera de laboratorio siempre fue una gran ayuda para ordenar el caos, para facilitar la toma de muestras, para apoyar en cada proceso y como amiga, para ser escuchada y amenizar los días con su buena vibra.

A mis compañeros de laboratorio: el B.Q.D. Eduardo Preciado, la Q.F. B. Gabriela Sedano, la Q.F.B. Aracely Mejía, el B.Q.D. Guido García, la M. en C. Monserrat Serrano, la Biol. Lirio Peña por su compañía, su alegría, las bromas, las inmuno-conversaciones y su apoyo incondicional, porque siempre hicieron más ameno el día a día y además me motivaron siempre a dar lo mejor de mí. Ser testigo de su andar y crecimiento profesional ha sido una de mis más grandes alegrías. A muchos otros alumnos que estuvieron aquí, que vinieron a aprender y además a enseñarme a ser mejor: Cyndell, Edgar, Dany, Amairani y Alma.

Dedicatoria

Sí, la ciencia es un derecho. La ciencia es parte de la sociedad, y debe responder las preguntas que cualquier ciudadano le haga. Puede ser que la respuesta sea un simple “no lo sé”, o todavía mejor, “no lo sé aún”, pero la ciencia está obligada a contar sus historias, a compartirlas, y mediante ese mecanismo hacerlas parte de la sociedad, ahora, más informada, mejor preparada para escuchar y construir nuevas historias.

Con amor a Carmen y Pedro, mis pilares

Damián y Dante, mis estrellas

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	3
I. Introducción.....	5
1. Fisiología del trabajo de parto.....	5
1.1 Factores inmunológicos y mecánicos del trabajo de parto.....	6
1.2 Factores quimiotácticos asociados al trabajo de parto.....	7
1.3 Factores endocrinos asociados al trabajo de parto.....	9
2. Características generales de la PRL.....	11
2.1 Mecanismo de acción de la PRL.....	12
2.2 PRL decidual.....	14
2.3. Perfil de secreción de PRL en el embarazo y el trabajo de parto.....	16
2.4 Expresión del receptor de PRL en tejidos de la interfase materno-fetal.....	18
3. Las membranas corioamnióticas humanas.....	18
II. Antecedentes.....	22
1.La PRL como regulador durante el embarazo.....	22
2. La infección coriodesidual como modelo de inflamación y causa del parto pretérmino.....	24
III. Hipótesis.....	25
IV. Objetivo.....	26
Objetivos específicos.....	26
V. Metodología.....	27
1. Muestras biológicas.....	27
2. Cultivo de explantes de membranas corioamnióticas.....	28
3. Validación del modelo.....	28
4. Estandarización de las condiciones experimentales.....	31
5. Evaluación del efecto inmuno- modulador de la prolactina.....	32
6. Determinación de marcadores por medio de ELISA.....	33
7. Ensayo de Actividad de MMP-9.....	35
8. Análisis estadístico.....	36
VI. Resultados.....	37
1. Validación del modelo y estandarización de las condiciones experimentales.....	37

1.1 Viabilidad metabólica.	37
1.2 Resistencia Electrónica Transmembranal (RET).....	38
1.3 Determinación de la funcionalidad de las membranas corioamnióticas.	39
1.4 Expresión del ARNm de PRL y PRL-R en membranas corioamnióticas.	40
1.5 Determinación de la ED50 de LPS.	42
1.6 Cinética de marcadores pro-inflamatorios.	44
1.7 Ensayo de Bioactividad de la PRL.....	45
2. Efecto inmuno-modulador de la PRL sobre las membranas corioamnióticas.....	46
2.1 Efecto de PRL sobre Citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias	46
2.2 Efecto de PRL sobre Quimiocinas	50
2.3 Efecto de PRL sobre factores colagenolíticos.	54
VII. Discusión	61
VIII. Conclusión.....	76
IX. Literatura citada	77
Apéndice. Artículo requisito de egreso para obtener el grado de Doctora en Ciencias.	84

Resumen

El trabajo de parto normal que pone fin a la gestación, es considerado un evento multifactorial que requiere de la coordinación de factores endócrinos, inmunológicos, anatómicos y mecánicos que modifican profundamente tejidos maternos y fetales creando condiciones que favorecen la activación miométrial, la dilatación cervical y en las etapas más avanzadas, la ruptura de las membranas fetales. La función principal de las membranas corioamnióticas durante el embarazo es mantener “aislado” al producto dentro de la cavidad amniótica y colaborar en el establecimiento de un ambiente de tolerancia dentro de ésta, a través de sus capacidades inmuno-endocrinas.

El trabajo de parto está asociado con el establecimiento de un proceso inflamatorio encabezado por moduladores tales como IL-1 β , TNF- α , MCP1, MIP-1 α , IL-8 y RANTES que modulan la síntesis de diferentes factores incluidos: los de actividad uterotónica como las prostaglandinas (PG)-F2 α y PGE2 y los moduladores del recambio de matriz extracelular como las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP)-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13. Estos factores generan un ambiente que modifica irreversiblemente el privilegio inmunológico de la unidad materno-fetal creando condiciones incompatibles con la continuidad del embarazo. En este sentido, si bien existe consenso respecto a algunos de los eventos asociados al trabajo de parto, no existe suficiente información básica sobre las posibles señales inmuno-endocrinas que desencadenan el inicio y progresión normal de este evento.

La prolactina (PRL) es una hormona proteica que durante el embarazo es secretada por la decidua materna, en y desde donde ejerce profundos efectos en la interfase materno-fetal. Los niveles de esta hormona aumentan en el líquido amniótico y suero materno a partir de las primeras semanas de la gestación y alcanza sus concentraciones más altas durante el segundo trimestre, momento a partir del cual comienzan a disminuir de manera consistente hasta alcanzar sus niveles más bajos días y/u horas antes del inicio del trabajo de parto. Las acciones de la prolactina sobre el sistema inmune han sido ampliamente documentadas por lo que nos preguntamos si la PRL podría regular la respuesta inmune de las membranas corioamnióticas durante un proceso inflamatorio.

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de la PRL para actuar sobre las membranas corioamnióticas modulando la secreción de diferentes marcadores funcionales de trabajo de parto, incluidos los factores pro-inflamatorios, quimiotácticos y de degradación de matriz extracelular.

Se utilizaron membranas corioamnióticas humanas (n=9), de embarazos a término resueltos por cesárea. Los tejidos fueron cultivados en el sistema de transwell que permite mantener dos compartimentos independientes, el coriodecidual y el amniótico. Para simular las condiciones del embarazo, los tejidos fueron pre-tratados con concentraciones fisiológicas de PRL (250, 500, 1000 y 4000 ng/ml)

durante 24 horas, posteriormente, para reproducir la respuesta inflamatoria de los tejidos durante el trabajo de parto, se aplicó un co-tratamiento de LPS (500ng/ml) a los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de PRL. La secreción de las citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10), las quimiocinas (RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-8), los moduladores de degradación tisular (MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13, TIMP-1 y TIMP-2) fueron medidos por ELISA en los medios de cultivo condicionados a las 24 horas después del co-tratamiento.

Nuestros resultados mostraron que, en comparación con las condiciones control, el tratamiento con LPS incrementó significativamente la secreción de TNF- α , IL-1 β e IL-10 en las membranas corioamnióticas. La co-incubación con las concentraciones más altas de PRL inhibió la secreción de TNF- α e IL-1 β en ambas regiones de las membranas corioamnióticas, pero no modificó la secreción de IL-6 ni IL-10.

Por otro lado, el tratamiento con LPS fue capaz de inducir la secreción diferencial de las quimiocinas en las membranas corioamnióticas, RANTES fue secretado principalmente por la coriodecidea, MCP-1 fue secretado por el amnios, y MIP-1 α e IL-8 fueron secretados por ambas regiones de las membranas corioamnióticas. El co-tratamiento con las concentraciones más altas de PRL disminuyó la secreción de RANTES, MCP-1 y MIP-1 α , pero no de IL-8.

Finalmente, el tratamiento con LPS indujo la secreción de MMP-1 en el amnios y de MMP-9 en ambas regiones de las membranas; el co-tratamiento con 4000 ng/ml de PRL disminuyó la secreción de MMP-1, MMP-2 y MMP-9. La secreción de MMP-13 y los inhibidores TIMP-1 y TIMP-2 no se modificaron por ninguno de los tratamientos.

En conclusión, nuestros resultados sustentan que la PRL ejerce un efecto anti-inflamatorio y selectivo sobre las membranas corioamnióticas humanas, representando un mecanismo compensatorio que controla o delimita parcialmente los efectos deletéreos de un ambiente pro-inflamatorio y pro-degradativo adecuado para fin del embarazo y dar paso al inicio del trabajo de parto. Por lo que la PRL mantiene un ambiente propicio para el mantenimiento del embarazo.

Abstract

Normal labor that ends pregnancy is considered a multifactorial event that requires the coordination of endocrine, immunological, anatomical and mechanical factors that profoundly modify maternal and fetal tissues creating conditions that favor myometrial activation, cervical dilation and in the most advanced stages, the rupture of the fetal membranes. The main function of chorioamniotic membranes during pregnancy is to keep the product "isolated" within the amniotic cavity and to collaborate in the establishment of an environment of tolerance within it, through its immuno-endocrine capabilities.

Normal labor is associated with the establishment of a pro-inflammatory process headed by modulators such as IL-1 β , TNF- α , MCP1, MIP-1 α , IL-8 y RANTES that modulate the synthesis of different factors including: modulators of the uterine activity such as prostaglandins (PG)-F2 α y PGE2; and the modulators of tissue remodeling such as metalloproteases of extracellular matrix (MMP)-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13). These factors generate an environment that irreversibly modifies the immunological privilege of the maternal-fetal unit, creating conditions incompatible with the continuity of pregnancy. In this sense, although there is a consensus regarding some of the associated events with normal labor, there is not enough basic information about the possible immuno-endocrine signals that trigger the normal onset and progression of this event.

Prolactin (PRL) is a protein hormone that during pregnancy is secreted by the maternal decidua, in and from where it exerts profound effects on the maternal-fetal interface. The levels of this hormone increase in the amniotic fluid and maternal serum from the first weeks of gestation and reach its highest concentrations during the second quarter, when they begin to decrease consistently until reaching their lower levels in the days or hours before the start of labor. Therefore, we wonder if PRL could regulate the immune response of chorioamniotic membranes during an inflammatory process.

The aim of this study was to evaluate the ability of PRL to act on the choriomaniotic membranes to modulate the secretion of different functional markers of labor, specifically the pro-inflammatory, chemotactic and extracellular matrix degradation factors.

Human chorioamniotic membranes at term of cesarean delivery (n=9) were used. The tissues were cultured in a transwell system that allows keeping two independent compartments, choriodecidual and amniotic. To simulate gestation conditions, the tissues were pre-treated with physiological concentrations of PRL (250, 500, 1000 y 4000 ng/ml) for 24 hours, then LPS co-treatment was applied (500ng / ml) plus the different concentrations of PRL. The secretion of cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10), chemokines (RANTES, MCP-1, MIP-1 α and IL-8), tissue degradation modulators (MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13, TIMP-1 and TIMP-2) were

measured by ELISA in the conditioned tissues culture media at 24 hours after co-treatment.

Our results showed that compared to control conditions; treatment with LPS significantly increased the secretion of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in chorioamniotic membranes. In contrast, co-incubation with the highest concentrations of PRL were able to inhibit the secretion of TNF- α and IL-1 β in both regions of the chorioamnion membranes, but they did not modify the secretion of IL-6 or IL-10.

On the other hand, the treatment with LPS was able to induce a differential secretion of the chemokines in the chorioamniotic membranes, RANTES was secreted mainly by the choriondecidua, while MCP-1 was secreted by the amnion, MIP-1 α and IL-8 were secreted by both regions of the chorioamniotic membranes. The highest concentrations of PRL were able to decrease the secretion of RANTES, MCP-1 and MIP-1 α , but not of IL-8.

Finally, the treatment with LPS induced the secretion of MMP-1 in the amnion and of MMP-9 in both regions of the membranes; co-treatment with 4000 ng / ml of PRL decreased the secretion of MMP-1, MMP-2 and MMP-9. The secretion of MMP-13 and the inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 were not modified by any of the treatments.

In conclusion, our results support that PRL exerts a selectively anti-inflammatory effect on human chorioamniotic membranes, representing a compensatory mechanism that controls or partially delimits the deleterious effects of a pro-inflammatory and pro-degradative environment suitable for the end of pregnancy and give way to the start of labor. So, PRL maintains an environment conducive to the maintenance of pregnancy.

I. Introducción

El embarazo en todas sus etapas está regulado por estrategias inmunológicas y endocrinas establecidas por la madre y el feto, cuyo objetivo es generar un ambiente inmunológico permisivo que evite el rechazo del producto y permita que el feto crezca y se desarrolle en la cavidad uterina durante al menos 37 semanas.

Este ambiente está caracterizado por el fino equilibrio entre una respuesta tolerogénica inducida por factores fetales en el sistema inmune materno y el mantenimiento de las competencias inmunológicas que permiten a la madre y al feto responder a la presencia de agentes patógenos o cualquier molécula endógena que actúe como señal de peligro o daño (Pioli y cols., 2004).

Hacia las últimas semanas del embarazo, ocurren cambios endocrinos e inmunológicos que conllevan a la pérdida del ambiente inmunológico permisivo. La supresión de las condiciones de tolerancia representa el fin del embarazo y el inicio del trabajo de parto, debido a que inducen la pérdida de la quiescencia uterina, y alteran la integridad tanto estructural como funcional de la placenta y las membranas corioamnióticas.

1. Fisiología del trabajo de parto.

En condiciones normales, el trabajo de parto eutócico en el humano se inicia a partir de la semana 37 de la gestación. La etiología de este proceso ha sido parcialmente dilucidada a través de múltiples estudios realizados en modelos animales, evidencias clínicas en el humano y múltiples estudios experimentales *in vitro*; con lo cual se ha demostrado que el trabajo de parto es un evento particular en cada especie y es resultado de la coordinación de los cambios inmuno-endocrinos con tres eventos mecánicos/anatómicos clave: 1) la activación del miometrio y el establecimiento de las contracciones uterinas, 2) la maduración cervical que implica

el borramiento y la dilatación del cérvix y 3) en las etapas más avanzadas, la ruptura de las membranas corioamnióticas (Norman y cols., 2007).

1.1 Factores inmunológicos y mecánicos del trabajo de parto.

Hacia la semana 37 de la gestación, el estiramiento muscular del útero aumenta la activación del factor de transcripción nuclear kappa B ($\text{NF}\kappa\text{B}$), que activa la transcripción de genes de la respuesta inflamatoria, induciendo la producción de interleucina (IL)-6, IL-1 β y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α (Lindström y Bennett 2005). El aumento de estas citocinas promueve la síntesis de prostaglandina (PG) E_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ por las células del miometrio, en las cuales se incrementan los receptores de oxitocina y las uniones Gap intercelulares; la actividad de las PGs y el receptor de oxitocina incrementan los niveles de Ca^{2+} en las células del miometrio generando las contracciones uterinas intensas y sincrónicas (Challis y cols., 2000, Mesiano y cols., 2002).

En el cérvix, las PG's alteran la permeabilidad de los vasos sanguíneos incrementando su flujo, lo cual junto con la acción quimioatrayente de IL-8, genera un ambiente rico en leucocitos y neutrófilos. La activación y degranulación de neutrófilos reclutados en el estroma cervical, producen alteraciones en el colágeno que es uno de los constituyentes principales del tejido conectivo, lo que dirige los cambios estructurales que caracterizan el borramiento y la dilatación del cérvix (Timmons y cols., 2010, Norman y cols., 2007).

Finalmente, en las membranas corioamnióticas, la degradación del tejido conectivo se debe a la influencia del ambiente pro-inflamatorio en el cérvix que induce la secreción de IL-1 β y TNF- α en las membranas, estimulando un incremento en la secreción de IL-6. Si bien, la secreción basal de IL-6 está presente a lo largo del embarazo, su incremento está asociado a su función sinérgica con las otras citocinas para inducir la producción de las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP)-9 y MMP-2. Estas MMPs son enzimas con actividad gelatinasa que

degradan selectivamente los diferentes componentes de la matriz extracelular (MEC) de las membranas corioamnióticas, jugando un papel clave en el daño estructural y la pérdida de la fuerza de tensión de estos tejidos, provocando su ruptura (Figura 1) (Keelan y cols., 1997, Allport y cols, 2001, Norman y cols., 2007).

1.2 Factores quimiotácticos asociados al trabajo de parto.

El reclutamiento e infiltración de un perfil particular de leucocitos hacia los tejidos reproductivos y extraembrionarios (miometrio, la placenta, el cuello uterino y las membranas fetales), requiere la secreción selectiva de quimiocinas, así como las moléculas correspondientes de adhesión celular (Osman y cols., 2003).

Entre las quimiocinas que se encuentran relacionadas con el proceso del parto las está RANTES (del inglés: Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted) que favorece la quimioatracción de monocitos, células T, células natural killer (*NK*), pero además promueve la activación de las células T de memoria, monocitos y eosinófilos; así como la adhesión y trans migración de las células T a través del endotelio y adhesión de los monocitos a las proteínas de la matriz; MCP-1 (del inglés: Monocyte Chemoattractant Protein 1) cuya principal función es atraer monocitos al sitio de inflamación y promover la activación del estallido respiratorio en macrófagos; de MIP-1 α (del inglés: Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha) que tiene acción quimioatrayente sobre los macrófagos principalmente, pero también sobre monocitos; IP-10 (del inglés: Interferon-gamma inducible Protein 10) a diferencia de otras quimioquinas CXC, IP-10 no tiene actividad quimiotáctica para los neutrófilos, atrayendo a las células T activadas y a los monocitos e IL-8 que tiene una quimioatracción de neutrófilos (Hamilton y cols., 2013).

Hacia el final del embarazo, en el líquido amniótico también se ha descrito el aumento en la concentración de MIP1- α , IP-10 y MCP-1 durante el trabajo de parto normal y durante un proceso de corioamnionitis asociado o no a infección intra-amniótica, lo que indica que estas quimiocinas generan un tropismo de leucocitos

hacia estos tejidos, donde son capaces de generar la inflamación de las membranas corioamnióticas como parte del mecanismo de defensa de los tejidos ante señales de daño tanto fisiológicas como patológicas (Romero y cols., 1994; Esplin y cols., 2005). Por otra parte, la concentración de RANTES en el líquido amniótico fue mayor en el segundo trimestre que a término; sin embargo, su secreción incrementa en el trabajo de parto y el parto prematuro (Athayde y cols. 1998). Su función en estas condiciones parece estar asociada a la quimioatracción y activación de macrófagos, eosinófilos y basófilos, en los cuales induce la liberación de histamina que contribuye a la producción de PG's y por lo tanto a la activación del miometrio (Maintz y cols., 2008).

Diversos estudios clínicos coinciden en que durante el trabajo de parto se incrementa la expresión de RANTES, MCP-1, MIP-1 α , IL-8 e IP-10 en la coriodecidua durante el trabajo de parto y durante procesos patológicos como la infección o el parto pre término (Hamilton y cols., 2013; Kim CJ y cols., 2015).

Hasta la fecha se desconoce el origen de las células inmuno-competentes que son atraídas hacia este microambiente placentario; sin embargo, se ha demostrado que las células atraídas son funcional y fenotípicamente distintas de los leucocitos de sangre periférica materna y fetal (Vega-Sanchez y cols., 2010). También se ha descrito el cambio del perfil de las células inmunes que se encuentran en el líquido amniótico a lo largo del embarazo, incrementándose el número de neutrófilos y monocitos hacia el final de este con respecto a los otros tipos celulares que incluyen a las células linfoides innatas, NK, linfocitos T y linfocitos B (Gomez-Lopez y cols., 2017). En este contexto la participación de las quimiocinas durante el trabajo de parto, es un componente clave ya que adicionalmente a su función quimiotáctica, algunas de estas quimiocinas también están implicadas en la activación de las células inmunes que son atraídas (Esplin y cols., 2005).

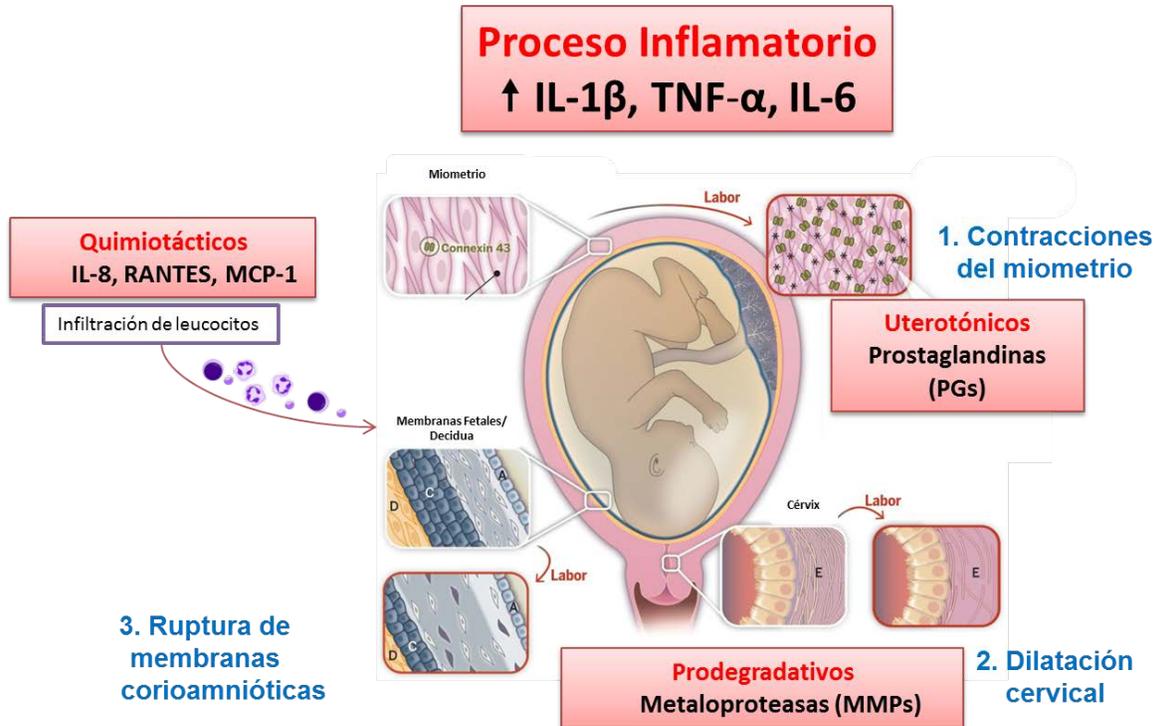


Figura 1. Señales y mecanismos que ocurren en los tejidos maternos y extraembrionarios que dirigen los tres eventos mecánicos/anatómicos necesarios para el trabajo de parto eutócico. La letra A indica el amnios; C, el corion; D, la decidua y E, la matriz extracelular del cérvix (Modificado de Romero R y cols., 2014).

1.3 Factores endocrinos asociados al trabajo de parto.

El perfil endocrino dentro de la unidad feto-placentaria muestra cambios a lo largo de la gestación, estos cambios resultan esenciales para el mantenimiento del perfil tolerogénico, pero también para la correcta culminación del embarazo.

Los conocimientos derivados de modelos de mamíferos como la oveja, el ratón y los primates han demostrado que hay mecanismos endocrinos precisos y específicos de cada especie por la anatomía y fisiología de su placenta; adicionalmente, han demostrado la participación de varias glándulas y tejidos con función endocrina que participan en este proceso incluyendo el hipotálamo, la hipófisis y las glándulas suprarrenales del feto, la placenta y el ovario materno (Challis y cols., 2000).

En el caso de los humanos, se tiene conocimiento de que la actividad endocrina de la placenta es muy importante en la producción de progesterona (P4) y estrógenos durante el embarazo. A diferencia de otros mamíferos en los que la disminución súbita de P4 al final del tercer trimestre es determinante en el inicio del trabajo de parto (Mesiano y cols., 2002; Spencer y cols., 2004), en el humano se ha reportado la existencia de un cambio en el perfil de expresión de las isoformas del receptor de P4 en el útero, lo que provoca que este deje de ser sensible a los altos niveles de P4 que se mantienen hasta el final del embarazo y pierda su estado de quiescencia o reposo (Allport y cols, 2001). Durante este periodo, el estrógeno mediante sus receptores clásicos (REs), RE- α y RE- β , intermedian las acciones vasculares del endotelio uterino incrementando el flujo sanguíneo útero-placentario; así, durante el trabajo de parto ejerce acciones opuestas a la P4, promoviendo la síntesis de conexiones tipo gap en las células del músculo liso del útero; con esto, las células quedan vinculadas siendo capaces de contraerse como una unidad coordinada (Magness y cols., 2005). Adicionalmente el estrógeno induce la expresión de receptores de oxitocina en las células del miometrio, esta oxitocina es producida por la hipófisis materna y liberada a la circulación, de modo que está disponible en el útero para potenciar la intensidad de las contracciones (Kilarski y cols., 2000), el incremento de estrógeno y la caída de P4 o su retiro funcional -en el caso del humano- también inducen la secreción de PGs y MMPs en los tejidos adyacentes, colaborando en la degradación de los mismos para lograr la expulsión del producto (Kombé y cols., 2003).

A diferencia de la P4 y el estrógeno, de naturaleza esteroide, la prolactina (PRL) es una hormona peptídica que está presente durante el embarazo; sin embargo, poco se ha estudiado su papel durante el trabajo de parto. Diversos estudios realizados en los 80's demostraron que esta hormona participaba en diferentes eventos relacionados con la reproducción y el embarazo de manera muy específica en modelos murinos (Bao y cols., 2007). De manera paralela en el humano, estudios clínicos determinaron que conforme avanza el embarazo, la concentración de PRL

incrementa tanto en suero materno como en líquido amniótico, por lo que el embarazo es considerado un evento de hiperprolactinemia fisiológica (Kletzky y cols., 1985). Un dato importante que surgió de esos estudios fue el descenso en la concentración de esta hormona hacia el tercer trimestre de la gestación que parece estar relacionado temporalmente con las primeras señales de trabajo de parto; este perfil bifásico de la PRL, en conjunto con sus múltiples acciones endocrinas e inmunológicas y la ubicuidad de sus receptores, sustentan la hipótesis de su papel clave en el control de las diferentes señales y mecanismos que activan, modifican o preparan a los tejidos de la unidad feto placentaria para el trabajo de parto; sin embargo, esta línea de investigación no ha sido abordada y por ello es motivo del desarrollo de este trabajo de tesis.

2. Características generales de la PRL.

La PRL es una hormona de naturaleza proteica, que inicialmente fue descrita como un factor involucrado en el desarrollo de las glándulas mamarias, producida por los lactotrofos de la hipófisis anterior. Sin embargo, actualmente se reconocen múltiples sitios de producción y secreción extra-hipofisiaria de PRL, lo cual explica que esta hormona esté involucrada en más de 300 funciones biológicas (Ben-Jonathan N. y cols.,1996).

En el humano, la PRL es codificada por un único gen que se encuentra en el cromosoma 6, constituido por 5 exones y 4 intrones, cuya transcripción y posterior traducción genera un polipéptido de cadena sencilla compuesto por 227 aminoácidos, de los cuales 28 corresponden al péptido señal lo que da como producto maduro un polipéptido de 199 aminoácidos con tres puentes disulfuro dentro de su estructura (Figura 2) y un peso molecular de 23 kDa (Ben-Jonathan N. y cols.,1996; Bernard y cols., 2015).

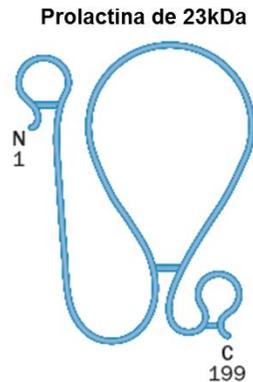


Figura 2. Estructura de la prolactina humana de 23kDa (Bernard y cols., 2015).

Debido a su naturaleza proteica, la PRL es susceptible a tener cambios post-traduccionales, de manera que se han descrito variantes de esta hormona como la PRL glicosilada de 25 kDa que ha sido documentada en sangre, leche y líquido amniótico (Meusris y cols., 1985; Lee y Markoff, 1986). La glicosilación de la PRL puede aumentar o disminuir la actividad de la PRL y también desempeña un papel en la biosíntesis, la secreción, la eliminación metabólica y la escisión proteolítica de esta hormona (Hoffmann y cols., 1993; Pellegrini y cols., 1988).

2.1 Mecanismo de acción de la PRL

Las funciones biológicas de la PRL están mediadas por la interacción con su receptor (PRLR), un miembro de la superfamilia de los receptores de citocinas. El gen del PRLR se localiza en el cromosoma 5, constituido por 10 exones, que codifican una proteína transmembranal con tres dominios: un dominio de unión al ligando extracelular (LBD), un dominio transmembrana hidrofóbico (TMD) y un dominio de señalización intracelular (ICD) (Bernard y cols., 2015).

En el humano se han descrito cinco isoformas del PRLR que resultan de eventos de empalme alternativo en el gen, estas isoformas difieren en cuanto a la longitud y composición de sus colas citoplásmicas (Figura 3), por lo que potencialmente pueden activar distintos eventos de señalización intracelular; la isoforma larga (95 -

85 kDa) e intermedia (65-60 kDa) han sido las más estudiadas (Goffin y cols., 1996; Bernard y cols., 2015).

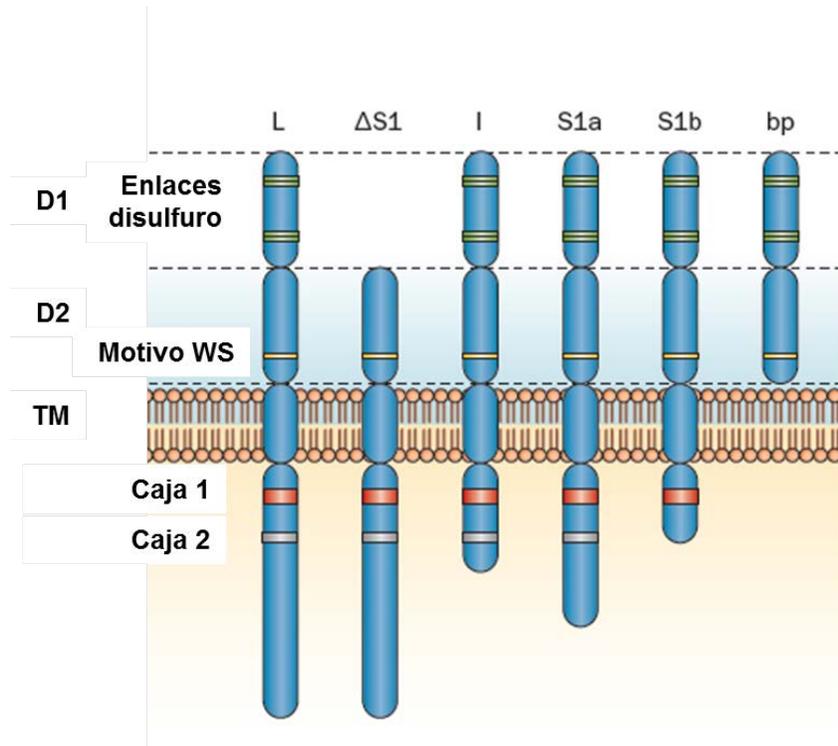


Figura 3. Esquema de las isoformas del receptor de PRL descritas en el humano que resultan del empalme alternativo del ARNm. Se observan: el dominio extracelular compuesto por el subdominio que contiene dos enlaces disulfuro (D1) y el subdominio que tiene la región conservada de triptofano-serina o motivo WS (D2); el dominio transmembranal (TM) y el dominio intracelular con las regiones conservadas conocidas como caja 1 y 2, pero cuya longitud y composición varía entre las isoformas descritas. La isoforma $\Delta S1$ carece de todo el dominio D1 del receptor; mientras que las isoformas cortas S1a y S1b no tienen una señalización eficiente, pero pueden servir para internalizar el ligando y/o para regular negativamente la señalización inducida por prolactina. El receptor soluble (bp) solo contiene el dominio extracelular (Bernard y cols., 2015).

La vía canónica de señalización de PRL requiere la dimerización de la isoforma larga del PRLR, lo que conduce a la transfosforilación de los residuos de tirosina presentes en la cinasa Janus 2 (JAK 2), que está asociada con el ICD. Este evento promueve el reclutamiento de transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) 1, 3 y 5. Las STATs dimerizan y migran al núcleo para potenciar la expresión de los genes blanco (Figura 4) (Bernard y cols., 2015). La isoforma corta del PRLR es incapaz de activar la vía JAK-STAT, pero puede activar otras vías alternativas, como la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) p44/42 y la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) /proteína cinasa B (Akt) (Devi y cols.,

2014; Bernard y cols., 2015). Adicionalmente, los datos experimentales muestran que la isoforma corta ejerce efectos reguladores negativos sobre el receptor largo de la PRL, mediando así las respuestas de los tejidos blanco (Tan y Walker, 2010).

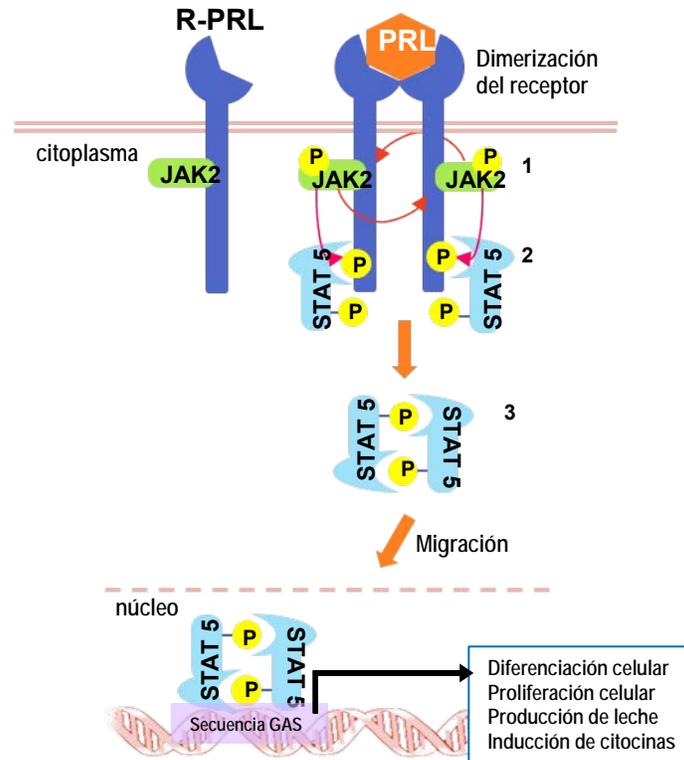


Figura 4. Esquema del mecanismo canónico de acción de la PRL mediado por la unión con su receptor transmembranal. La dimerización del receptor de PRL al unirse a la hormona, induce la transfosforilación de la proteína JAK2 asociada a su dominio intracitoplasmático, lo que promueve el reclutamiento de transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) 1, 3 y 5. Las STATs dimerizan y migran al núcleo para llevar a cabo la transcripción de los genes blanco.

2.2 PRL decidual

La decidua es un tejido de origen materno, generado por la transformación del endometrio durante la fase lútea del ciclo menstrual, cuando el ovocito es fertilizado debido a la acción directa de la P4 y el estradiol sobre las células estromales que los componen. Este tejido especializado, es indispensable para la implantación y nutrición del blastocisto y de acuerdo a su posición respecto a este último se diferencia en decidua basalis, que componen la parte materna de la placenta y la decidua capsularis, que rodea al corioamnios humano (Maslar y cols., 1980). La

decidua fue el primer tejido en el que se describió la producción extra-hipofisaria de PRL (Maslar y cols., 1980). Diversos estudios de los 90's describieron la expresión del RNAm de esta hormona en las células deciduales, con lo cual demostraron que este tejido es la fuente principal de PRL en el útero gestante y particularmente de la PRL que se encuentra en el líquido amniótico (Handwerger y cols., 1991; Wu y cols., 1991).

A diferencia de la regulación hipofisaria, la síntesis de PRL decidual no está bajo el control de la dopamina y su secreción no es pulsátil ni dirigida por ciclos circadianos, al contrario, esta PRL decidual es liberada rápidamente después de ser sintetizada y su vida media es más larga, alcanzando las 4.5 horas (Handwerger y cols., 1984).

En la decidua, la secreción de PRL es regulada a nivel transcripcional, a través de una región promotora distal compuesta por 150 pares de bases adicionales en el ARNm que conforman un exón adicional que no responde a los mismos elementos reguladores que el promotor en el ARNm de la PRL hipofisaria, siendo la región codificante idéntica en ambos RNAm (Watanabe y cols., 2001).

Entre los elementos que regulan positivamente la síntesis y la secreción de PRL en las células deciduales se encuentran factores autócrinos y parácrinos producidos por la decidua, la placenta y las membranas fetales; estos factores incluyen la P4, el E2, el calcitriol, el factor de liberación de PRLR decidual, el factor de crecimiento insulínico 1 y la relaxina (Handwerger y cols., 1991).

La liberación y síntesis de PRL decidual es inhibida por la lipocortina, el ácido araquidónico, y el factor inhibidor de PRL decidual (Pihoker y cols., 1991). Otros factores capaces de inhibir la síntesis de PRL en las células deciduales son las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-1 α , IL2, IL8 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Vicovac y cols., 1994, Kaney cols., 2010).

2.3. Perfil de secreción de PRL en el embarazo y el trabajo de parto.

En una mujer no embarazada la concentración máxima de PRL en suero es de 20 ng/ml, mientras que en mujeres durante el primer trimestre del embarazo el nivel incrementa a 45 ng/ml (Kletzky y cols., 1985). Si bien esta PRL es de origen hipofisiario, resulta interesante que los niveles máximos en suero llegan a ser 250 ng/ml a la mitad del segundo trimestre del embarazo (Kletzky y cols., 1985).

Una característica muy importante de la PRL decidual, es su capacidad de atravesar las membranas fetales (Figura 5) y concentrarse en la cavidad amniótica, generando una distribución de PRL compartimentada (McCoshen y cols., 1982, Fukamatsu y cols., 1984). Esto genera que la concentración de PRL decidual sea de 10 a 100 veces mayor en el líquido amniótico en comparación con la PRL en la circulación materna y fetal.

Si bien, el mecanismo de transporte de la PRL no ha sido determinado, la evidencia experimental ha demostrado que la integridad estructural de las membranas corioamnióticas es esencial para el transporte de esta hormona desde la región coriodecidual hacia la cavidad amniótica (McCoshen y cols., 1982, Tyson y cols., 1985).

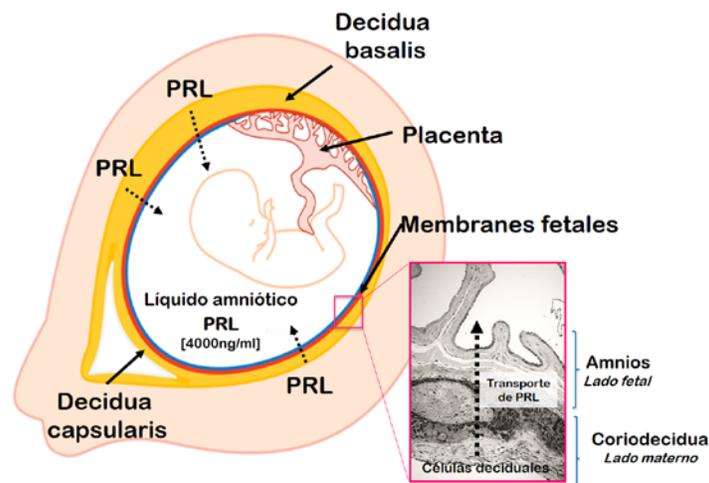


Figura 5. Esquema del transporte unidireccional de la PRL decidual a través de las membranas corioamnióticas, que provoca la acumulación de esta hormona en el líquido amniótico.

La concentración de PRL en el líquido amniótico alrededor de la semana 14 es de 33.1 ± 0.8 ng/ml, a partir de este momento la concentración de PRL incrementa rápidamente, alcanzando un valor máximo de $3,750 \pm 200$ ng/ml alrededor de la semana 26; posteriormente, la concentración de PRL disminuye gradualmente alcanzando alrededor de 500 ± 50 ng/ml alrededor de la semana 36 cuando se considera que el embarazo ha llegado a término (Kletzky y cols., 1985). Por otro lado, en el suero materno, después de su pico máximo de alrededor de 300 ± 50 ng/ml en el segundo trimestre, los niveles de PRL decaen gradualmente hasta llegar a 80 ± 20 ng/ml hacia el final del tercer trimestre donde se observan las primeras señales de trabajo de parto (Kletzky y cols., 1985). Durante el trabajo de parto activo la concentración más baja detectada en el suero materno coincide con el momento de máxima dilatación del cérvix (Rigg y cols., 1977) (Figura 6).

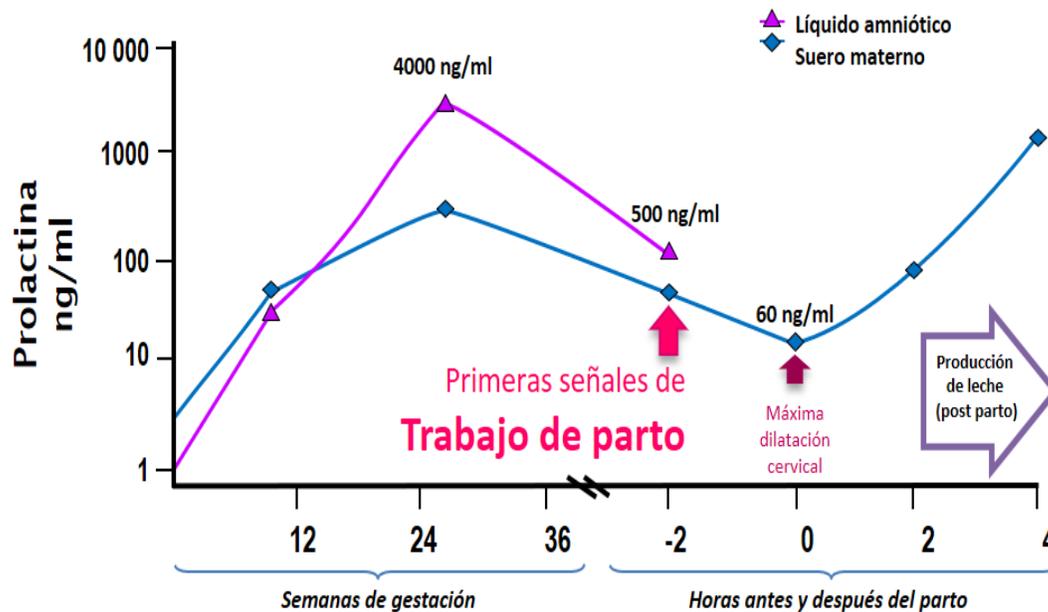


Figura 6. Perfil de la concentración de PRL a lo largo de la gestación, el parto y el periodo post-parto, medidos en suero materno y en líquido amniótico, datos tomados de Rigg y cols., 1977; Kletzky y cols., 1985.

2.4 Expresión del receptor de PRL en tejidos de la interfase materno-fetal.

Existe evidencia que demuestra la presencia de formas inmuno-reactivas para el PRLR tanto en la placenta como en las membranas fetales durante todo el embarazo. La expresión de la isoforma de 98 kDa ha sido descrita en los trofoblastos desde el primer trimestre (Stefanoska y cols., 2008) que son la principal población celular de origen fetal que compone la placenta. Otras isoformas (65-60 kDa, 55-45 kDa, 35-30 kDa, e isoformas menores de 30 kDa) han sido detectadas cerca del final del período de embarazo en la decidua, placenta, corion y amnios. Mientras que la forma de 30 kDa está ausente en el amnios, esta isoforma soluble ha sido reportada en el líquido amniótico (Maaskant y cols., 1995).

Considerando por un lado el papel de las membranas corioamnióticas como barrera selectiva que permite la separación de dos ambientes distintos (el materno y el fetal) y por otro la expresión de receptores de PRL en estos tejidos que permite inferir que estos son blancos de la PRL; resulta interesante para nosotros poder describir los efectos de esta hormona sobre estos tejidos, además de los ya descritos y que actualmente se sabe que tienen capacidades inmunológicas innatas limitadas pero determinantes para mantener el embarazo, responder y defenderse de los patógenos , así como también para coordinar el trabajo de parto y permitir la expulsión del producto (Kim y cols., 2004; Pineda-Torres y cols., 2014; Flores-Espinosa 2014; Norman y cols., 2007).

3. Las membranas corioamnióticas humanas

Las membranas corioamnióticas constituyen una entidad anatómica e histológica sumamente compleja y dinámica que mantiene el equilibrio entre los fluidos maternos y fetales, realizando un intercambio constante de gases, agua, iones, nutrientes y hormonas; además de responder a diferentes señales bioquímicas procedentes tanto del producto como de la madre (Parry y Strausss, 1998; Bryant-Greenwood, 1998).

Alrededor del día 7 posterior a la fecundación, comienza a formarse la cavidad amniótica a partir de una hendidura de la hoja ectodérmica, esta cavidad se expande por el crecimiento de celoma embrionario y finalmente es delimitada por el amnios hacia finales de la tercera semana de embarazo. El amnios se extiende sobre el cordón umbilical y forma parte de la piel del feto. De manera casi paralela, el corion se forma a partir de la hoja endodérmica, de la cual se origina el sincitiotroblasto en la zona de implantación y a partir del cual se diferencia el citotroblasto que formará el corion capsular. Debido al rápido crecimiento de la cavidad amniótica, el amnios y el corion comienzan a acercarse y eventualmente quedan en contacto alrededor de la semana 12 (Benirschke K y cols., 2006).

Finalmente, las membranas corioamnióticas se componen por la superposición de estos dos tejidos: el corion y el amnios; cada uno formado por diferentes tipos celulares embebidos en una prominente matriz extracelular, cuyo principal componente es la colágena (Figura 7) (Bryant-Greenwood, 1998).

El corion se forma a partir del endodermo y es la zona histológica más gruesa y con mayor celularidad de las membranas, está formado por dos capas: 1) la pseudo membrana basal, actúa como estructura de anclaje para los trofoblastos, constituida por colágena tipo I, III, IV, V, VI y proteoglicanos; 2) La capa de trofoblastos, presenta una polaridad hacia la decidua materna y forma la principal población celular del corion; aunque es posible encontrar células con marcadores de leucocitos, en su mayoría macrófagos y fibroblastos, todos embebidos en una matriz laxa compuesta por pocas fibras de colágena tipo IV, laminina y fibronectina (Bryant-Greenwood, 1998; Bourne, 1966).

El amnios se forma a partir del ectodermo embrionario, no tiene vasos sanguíneos por lo que obtiene sus nutrimentos directamente del líquido amniótico. Se caracteriza por presentar una gran resistencia mecánica debido a su estructura, constituida por cinco capas: 1) El epitelio amniótico, es la capa más interna y se

encuentra en contacto directo con el líquido amniótico y el feto, formado por células cúbicas coronadas por muchas microvellosidades y unidas entre sí por uniones de tipo estrechas, que descansan sobre una membrana basal; 2) La membrana basal, una estrecha capa de tejido conectivo constituido principalmente por colágena tipo IV, es responsable de mantener la unión entre las células epiteliales y, por lo tanto, de mantener la integridad estructural del epitelio, también se compone de laminina y fibronectina; 3) La capa compacta, se compone de tejido conectivo organizado en una compleja red tridimensional, compuesta por colágena tipo I, III, IV, V,VI y fibronectina; su grosor es mayor al de la membrana basal, que junto a su estructura de red le otorga gran capacidad de tensión para mantener la integridad mecánica del amnios; 4) La capa fibroblástica, está constituida por células mesenquimatosas con marcadores de fibroblastos que secretan las colágenas intersticiales de la capa compacta, es posible encontrar macrófagos dispersos en esta capa; 5) La capa esponjosa; también llamada intermedia, por su posición entre el amnios y el corion, tiene una estructura ondulante, que es poco compacta y con gran contenido de proteoglicanos y colágena I y III. La estructura de esta capa permite al amnios deslizarse sobre el corion y así absorber el estrés mecánico asociado a los movimientos fetales sin causar daño a la estructura de las membranas (Figura 7).

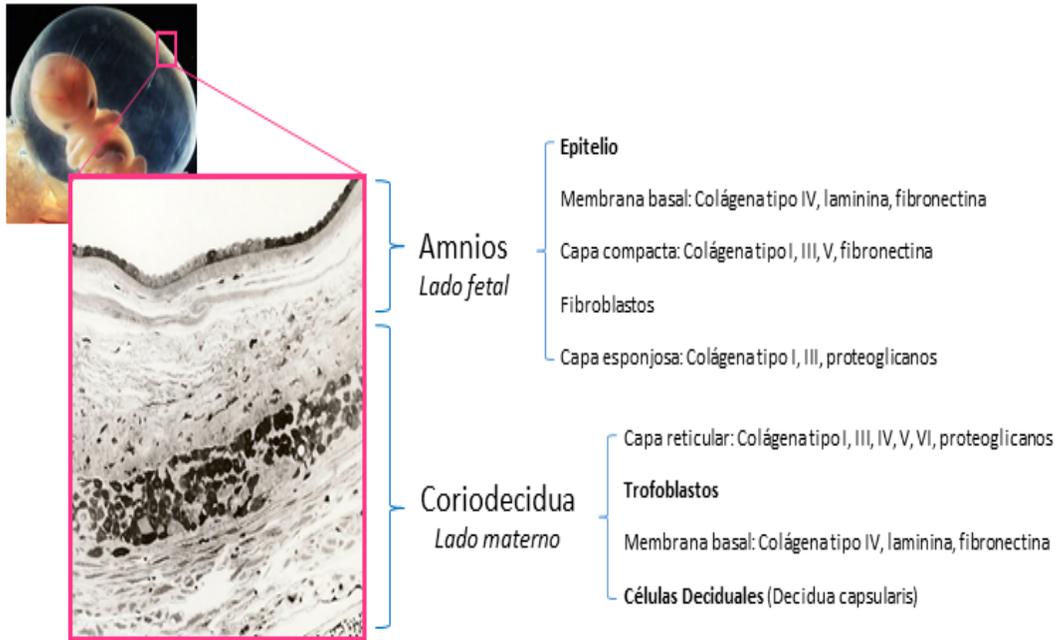


Figura 7. Imagen compuesta que ejemplifica la ubicación del feto dentro de la cavidad amniótica, delimitada por las membranas corioamnióticas. La composición celular de las membranas corioamnióticas se muestra en un corte semifino ($1\mu\text{m}$) de tejido a término y sin trabajo de parto, incluido en EPON. Se indican las capas que conforman los tejidos y los componentes principales de su matriz extracelular.

II. Antecedentes

1. La PRL como regulador durante el embarazo

Si bien el trabajo de parto es considerado un proceso multifactorial, existen evidencias experimentales y clínicas que permiten proponer a la PRL como un factor clave en el mantenimiento del embarazo y, por lo tanto, como un importante elemento asociado a los cambios inmunológicos que da inicio al trabajo de parto.

El estudio del proceso de gestación y de trabajo de parto en diferentes modelos animales estudiados ha demostrado que hay mecanismos especie-específicos, pero, de manera consistente, la PRL parece ser un elemento que determina el éxito de la reproducción en los vivíparos, al regular procesos reproductivos, de defensa del hospedero y respuesta a condiciones de estrés (Soares M y cols., 2007).

Uno de los modelos animales que ha sido ampliamente utilizado para determinar el papel de la PRL sobre el proceso reproductivo fue el desarrollo de ratones knockout para la PRL y el PRL-R, estos modelos demostraron que el fenotipo PRL^{-/-} era infértil, pero al adicionar PRL exógena las funciones biológicas del cuerpo lúteo y el desarrollo mamario eran recuperadas permitiendo la implantación del producto; mientras que los animales PRL-R^{-/-} eran completamente infértiles y la adición de PRL exógena no podía revertir el efecto causado por la delección del gen del PRL-R (Bole-Feysot y cols., 1998). Con este modelo se pudo sustentar que la PRL favorece el embarazo, ya que actúa directamente sobre las funciones del cuerpo lúteo, donde promueve la expresión de la 17 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 α -HSD), enzima encargada de catalizar la conversión de estrona en estradiol. Además, la PRL inhibe a la enzima 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20 α -HSD), lo que previene el catabolismo de la progesterona durante la gestación y también inhibe IL-6 a nivel transcripcional (Bao y cols., 2007).

Por otro lado, dentro de las evidencias clínicas y experimentales que soportan el papel de la PRL en el embarazo humano podemos mencionar los reportes de Garzia y cols. (Garzia y cols., 2004 y 2013) que sugieren que niveles bajos de PRL producida localmente en el endometrio durante el periodo conocido como ventana de implantación, es una de las principales causas de infertilidad y aborto espontáneo recurrente. Esto indica que la baja expresión de PRL por los tejidos transformados durante el embarazo está asociada con fallas reproductivas.

Por otro lado, Stefanoka y cols. (Stefanoka y cols., 2013) reportaron que la PRL estimula la migración y proliferación del trofoblasto humano en el primer trimestre del embarazo, lo cual es indispensable para la formación de la placenta. En este mismo trabajo se observó que la PRL induce la secreción de IL-8 e IL-6 lo que indica que esta hormona ejerce efectos reguladores sobre el ambiente inmunológico de estas células.

Hacia la etapa final del embarazo y en ausencia de trabajo de parto, Tyson y cols. (Tyson y cols., 1985) demostraron que el tratamiento de membranas corioamnióticas humanas con PRL es capaz de inhibir la secreción basal de PGE₂, sugiriendo su papel como un modulador importante de los factores asociados al proceso del trabajo de parto.

En relación a esto, en nuestro grupo de trabajo demostramos que el tratamiento de membranas corioamnióticas humanas con concentraciones de PRL equivalentes a las encontradas en el líquido amniótico justo al final del tercer trimestre del embarazo pueden inhibir significativamente la secreción basal de IL-1 β , TNF- α y MMP-9 así como la expresión a nivel de RNAm de estos marcadores, todos factores claves en los procesos de activación miometrial, borrado cervical y ruptura de membranas corioamnióticas indispensables para la progresión del trabajo de parto (Zaga y cols. 2014).

2. La infección coriodesidual como modelo de inflamación y causa del parto pretérmino.

Un amplio número de estudios clínicos han demostrado que el trabajo de parto eutócico y el parto pretérmino si bien no tienen el mismo origen, sí convergen en el desarrollo del proceso inflamatorio que lleva a un nuevo estado a los tejidos de la interfase materno-fetal para dar lugar al parto (Romero y cols., 2014).

Una de las causas asociadas al parto pretérmino es el desarrollo de un proceso infeccioso a nivel intrauterino que explica el 30% de estos casos (Romero y cols., 2001). Diversos modelos animales (monos, ratones, ratas y conejos) demuestran la relación entre la presencia de una infección intrauterina con diferentes bacterias o endotoxinas secretadas por estas bacterias (asociadas a esta patología en el humano), y el desarrollo de un proceso inflamatorio agudo capaz de incrementar la secreción de TNF- α , IL-1 β y óxido nítrico (Gravett y cols., 1994; Gravett y cols., 1996; Elovitz y cols., 2004), la prostaglandina F2 α placentaria y las contracciones uterinas (Waldorf y cols., 2008) induciendo la ruptura de las membranas fetales y el trabajo de parto de manera prematura, generando la interrupción del embarazo.

Con el objetivo de medir todos los marcadores inflamatorios asociados al trabajo de parto, utilizamos un modelo de cultivo de las membranas corioamnióticas que nos permitió inducir un proceso inflamatorio en la región coriodesidual mediante el uso del LPS y así poder recrear un ambiente inflamatorio similar al del trabajo de parto y estudiar si la PRL a concentraciones equivalentes a las del segundo y tercer trimestre del embarazo que se encuentran en el líquido amniótico podía regular este ambiente inflamatorio, y por lo tanto entender parcialmente el papel regulador de la PRL sobre la interfase materno-fetal en el trabajo de parto.

III. Hipótesis

El pre-tratamiento de las membranas corioamnióticas con concentraciones de PRL equivalentes a las presentes en el segundo y tercer trimestre de la gestación, inhibirá la síntesis y secreción de moduladores inmunológicos funcionales asociados al trabajo de parto inducidos por la estimulación con LPS *in vitro*.

IV. Objetivo

Caracterizar el efecto de la PRL sobre el perfil de secreción de los marcadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, los factores quimiotácticos y de degradación tisular asociados al trabajo de parto inducidos por la estimulación con LPS de explantes de membranas corioamnióticas humanas a término sin trabajo de parto.

Objetivos específicos

1. Validación del modelo de cultivo de las membranas corioamnióticas humanas, determinando su viabilidad, integridad y funcionalidad.
2. Determinar las condiciones experimentales (dosis y tiempo) para reproducir una respuesta inflamatoria inducida por la estimulación coriodecidual con LPS en las membranas corioamnióticas humanas.
3. Cuantificar los niveles de las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 secretadas al medio de cultivo por las membranas corioamnióticas después del co-tratamiento con LPS y las diferentes concentraciones de PRL (250, 500, 1000 y 4000 ng/ml).
4. Cuantificar los niveles de las quimiocinas RANTES, MIP-1 α , MCP-1 e IL-8 secretadas al medio de cultivo por las membranas corioamnióticas después del co-tratamiento con de LPS y las diferentes concentraciones de PRL (250, 500, 1000 y 4000 ng/ml).
5. Cuantificar los niveles de las MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13 secretadas al medio de cultivo por las membranas corioamnióticas después del co-tratamiento con de LPS y las diferentes concentraciones de PRL (250, 500, 1000 y 4000 ng/ml).

V. Metodología.

1. Muestras biológicas

Todas las muestras de membranas corioamnióticas fueron obtenidas de mujeres sanas atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer IER) o en el Hospital de Ginecología-Obstetrica No.4 Luis Castelazo Ayala (HGOLCA) que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado. Este proyecto fue aprobado por el comité de ética, bioseguridad e investigación del INPer IER (212250-3210- 21205-01- 15) y del HGOLCA (IMSS R-2017-785-013). Los datos de las pacientes se describen en la tabla 1.

Los criterios de exclusión fueron mujeres con infección vaginal durante el último trimestre del embarazo, alérgicas a la penicilina, o con sobrepeso. Las muestras que resultaron positivas en el análisis microbiológico que se les realizó antes de ser procesadas y aquellas que presentaron signos visibles de trabajo de parto (degradación de los tejidos) fueron eliminadas.

Variables	Promedio \pm DE	Rango
Edad maternal (años)	27.75 \pm 6.52	20 - 37
Edad gestacional (semanas)	38.62 \pm 0.75	37.5 - 39.5
Número de gestas	2.17 \pm 1.11	1 - 4
Peso Pre-gestacional (kg)	63.56 \pm 12.24	41 - 77
Peso gestacional (kg)	73.70 \pm 11.15	51 - 87
Sexo del recién nacido (%)		
Mujeres	42%	
Hombres	58%	

Tabla 1. Variables nominales demográficas de la población de estudio. DE= desviación estándar.

2. Cultivo de explantes de membranas corioamnióticas.

Los tejidos extraembrionarios, obtenidos en la unidad de tococirugía del INPer, o del HGOLCA fueron procesados en condiciones de esterilidad y montados en un sistema de Transwell (Costar, Acton, E.U.A.) creando así dos compartimentos independientes, que permiten estimular selectivamente y analizar de manera independiente la respuesta en ambos lados de la membrana: la coriodecidual y el amnios (Figura 8). Los explantes de membranas corioamnióticas fueron cultivados con 1ml de medio DMEM (Gibco, LifeTechnologies, E.U.A. MD) suplementado con 10% suero fetal bovino y 1% de antibiótico antimicótico, a 37°C y 5% de CO₂ en cada compartimento.

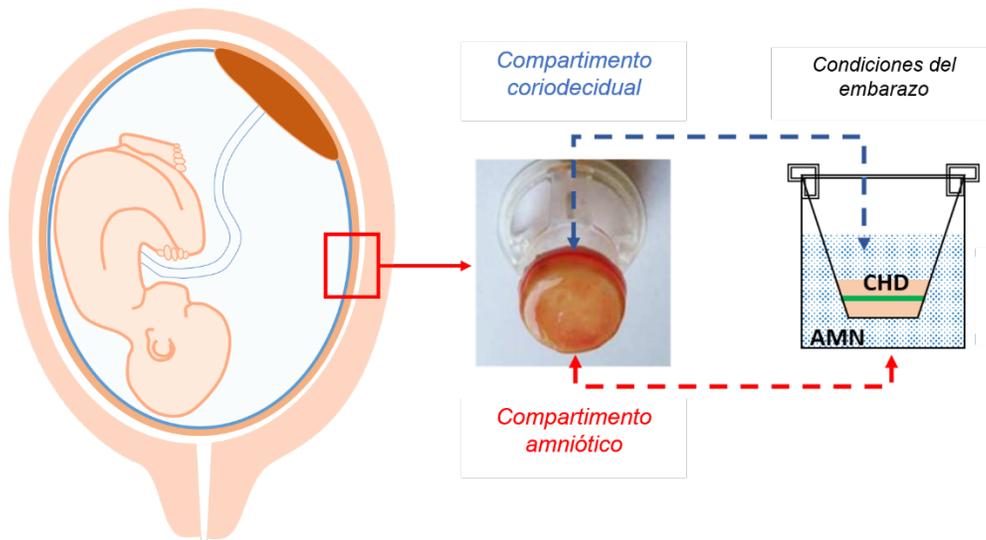


Figura 8. Modelo experimental de cultivo de las membranas corioamnióticas montadas en el sistema de Transwell. Este modelo mantiene dos compartimentos independientes uno limitado por la coriodecidual (CHD) y el otro por el amnios (AMN).

3. Validación del modelo.

Viabilidad metabólica. Los explantes de membranas corioamnióticas montados en el sistema de transwell fueron cultivados durante 96 horas, evaluando en intervalos de 24 horas la viabilidad metabólica con el ensayo comercial de proliferación celular

XTT (Cell Signaling). Para este ensayo se colocó 1 ml de medio DMEM suplementado en cada compartimiento; cada 24h se agregó la mezcla de XTT en proporción 1:50 (acoplador de electrones: sal de XTT) por cada 100ul de medio, a los 30 min se recuperaron 200ul de medio de cada compartimiento y se leyó la reacción colorimétrica a 450nm en un espectofotómetro xMark (Bio-Rad, E.U.A., CA).

Integridad estructural. Los explantes fueron cultivados en el sistema de transwell en el medio DMEM suplementado, cada 24 horas fueron retirados y colocados en una cámara de Ussing, (UNAM, Dra. Rosario López Vancell) que permite medir la resistencia electrónica transmembranal (RET). El explante se montó entre las dos cámaras de lucita, colocando un filtro de nitrocelulosa de 13mm de diámetro. Posteriormente se aplicó un pulso eléctrico de 20uAmp en la región coriodesidual, la deflexión del voltaje por el paso a través del amnios se registra con voltaje final. Los cálculos para determinar la RET (**R**) se hicieron con base a la sustracción del valor de voltaje final respecto al voltaje inicial, este valor resultante se tomó como medida del cambio de voltaje (ΔV) y se multiplicó por el valor constante de la relación entre el área sometida a la corriente y el amperaje que fue 14.135.

$$R = \Delta V(14.135) \Omega \text{cm}^2$$

Los resultados de esta medición se interpretan considerando que la resistencia de la membrana al paso de la corriente eléctrica disminuye si la integridad se ve comprometida o alterada, por el contrario, un tejido que mantiene su estructura presentará una mayor resistencia al paso de corriente.

Parte de los tejidos fue fijada en paraformaldehído al 4% en PBS1X, los tejidos fueron embebidos en parafina para realizar cortes de 5uM y posteriormente fueron teñidos con hematoxilina & eosina para determinar que no hubiera cambios estructurales relacionados con el tiempo y las condiciones de cultivo.

Funcionalidad de los tejidos. Los explantes de las membranas corioamnióticas fueron estimuladas con 1ng/ml de IL-1 β a las 24 horas de cultivo en ambos compartimentos del sistema de transwell. Cada 24 horas los medios fueron recuperados para determinar la concentración de MMP-9 secretada mediante la técnica de ELISA.

Expresión de ARNm de PRL y PRL-R. La expresión de ambos mensajeros en las membranas corioamnióticas fue evaluada por PCR en tiempo real, separando ambas regiones. Desde las 0 hasta las 96 horas se recuperaron los tejidos y sin lavarlos se colocaron en 500 μ l de Trizol para recuperar el RNA total (Invitrogen, Carsbad USA). A partir de 1 μ g de RNA total se realizó la síntesis del cDNA mediante el kit Thermo Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher).

La expresión relativa del ARNm de PRL y el PRL-R se realizó mediante PCR tiempo real a partir de 1 μ l de cDNA en un volumen de reacción final de 10 μ l en el Light Cycler 2.0 (Roche, Mannheim, Germany), utilizando primers específicos (200 nM) y sondas de hibridación (100 nM) para las secuencias de mRNA diseñadas por TIBMOBBIOL (Table 2). GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) fue usado como gen de referencia para normalizar los valores de expresión de PRL y PRLR. Las condiciones de la PCR tiempo real fueron: un ciclo de 95°C for 5 min; 45 ciclos que comprende: desnaturalización (95°C, 10 sec), alineación (57-60°C, 10 sec) y extensión (72°C, 15 sec).

Gene	Primers	Sondas de hibridación
PRL	F 5'-gggAAACgAATgCCTgAT-3'	FL probe 5'-CCTgCTCCTgTgCCAgAgCgTg-FL-3'
	R 5'-CAAACAaggTCTCgAAgggT-3'	LC probe 5'-LC-CCCCCTTgCCCATCTgTCCCg—PH-3'
PRL-R	F 5'-gAgTCCAgCgACCTTCATT-3'	FL probe 5'- CCATgAATgATACAACCgTgTgg-FL-3'
	R 5'-CACTgCCCgACAATAATCAA-3'	LC probe 5'- LC-TCTCTgTggCTgTCCTTTCTgCTgT-PH-3'
GAPDH	F 5'-gAAggTgAAggTCggAgTC-3'	FL probe 5'-AggggTCATTgATggCAACAATATCCA-
	R 5'-gAAgATggTgATgggATTTC-3'	LC probe 5'- LC-TTTACCAgAgTTAAAgCAgCCCTggTg-p -3'

Tabla 2. Primers y sondas de hibridación utilizados para la PCR tiempo real. PRL, secuencia base: NM_000948; PRL-R, secuencia base: NM_001204315; GAPDH, secuencia base: NM_002046; FL, Fluoresceína; LC, Rojo640.

4. Estandarización de las condiciones experimentales

Determinación de la dosis efectiva al 50 % (ED50) de LPS. Las membranas corioamnióticas fueron cultivadas por 24 horas de cultivo en condiciones basales, posteriormente fueron tratadas con concentraciones de 0.0.1, 1, 50, 250, 500, 1000 y 5000 ng/ml de LPS por 24h, terminado el tiempo, se recuperaron los medios de cultivo y se determinó la secreción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 por medio de ELISA. Una n=3 con triplicados de cada concentración de LPS se realizaron, los valores de cada citocina se agruparon y analizaron con el programa Graph Prisma v.6. (Graph Pad, San Diego, USA) para generar la curva de dosis efectiva al 50%.

Cinética de marcadores pro-inflamatorios. Las membranas corioamnióticas fueron cultivadas en condiciones basales y se recuperaron los medios de cultivo a las 0, 2, 4, 8 y 24h, en este tiempo se adicionó el estímulo con 500ng/ml de LPS y se recuperaron los medios a las 26, 28, 32, 48, 72 y 96 h. En los medios se midió la secreción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 por medio de ELISA, para obtener el perfil de secreción temporal de cada uno de los marcadores en comparación con el control. Para este apartado se utilizaron 3 membranas con triplicados de cada tiempo.

Ensayo de bioactividad de PRL. Para probar que la PRL recombinante humana (Peprotech) utilizada en el cultivo de las membranas coriamnióticas mantuvo su actividad biológica, se llevó a cabo un ensayo de proliferación celular utilizando la línea Nb2 (linfocitos inmaduros de rata) donada por la Dra. Isabel Méndez, cuyo crecimiento es dependiente de PRL.

Para este ensayo las células Nb2 se crecieron en medio Fischer (In Vitro S.A. México) en ausencia de suero fetal bovino por 24 horas para detener su ciclo celular en la fase G0, posteriormente por cada pozo se colocaron 50,000 células en 50 μ l de medio en una placa de 96 pozos con fondo cónico y se agregaron 100 μ l de medio Fischer sin suero fetal bovino con concentraciones crecientes de PRL (0, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 pg/ml).

Las células se incubaron por 72 horas a 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂, terminado este periodo de incubación, se agregaron 40µl del reactivo de XTT mezclado con el acoplador de electrones (1:50) a cada pozo, las células se mantuvieron en cultivo por 18 horas, tras las cuales se midió la reacción colorimétrica a 492nm y corrección a 595nm en el espectrofotómetro xMark (Bio-Rad).

5. Evaluación del efecto inmuno- modulator de la prolactina

El modelo experimental fue el siguiente: ambos compartimentos de las membranas corioamnióticas montadas en el sistema de transwell, fueron cultivadas con 1ml de medio DMEM suplementado con 2% de hidrolizado de lactoalbúmina y 1% de antibiótico-antimicótico en cada compartimento con su respectivo pre-tratamiento.

El día 1, los tejidos fueron pre-tratados por 24 horas con concentraciones de 250, 500, 1000 y 4000ng/ml de PRL recombinante humana. El día 2, el medio fue retirado y los tejidos se lavaron con 1ml de solución salina en cada compartimento por triplicado. Posteriormente, la región coriodesidual se estimuló con 500ng/ml de LPS, al mismo tiempo que se adicionaron las diferentes concentraciones de PRL correspondientes al pre-tratamiento. El diseño experimental incluyó los siguientes grupos experimentales: 1) un control sin tratamiento, 2) el tratamiento con LPS, 3) el co-tratamiento con LPS y las diferentes concentraciones de PRL, 4) el tratamiento con las cuatro concentraciones de PRL en ausencia del estímulo con LPS, 5) el control de anti-inflamación tratado con LPS y 200nM de dexametasona (Figura 9). Cada tratamiento se realizó por duplicado y se mantuvo por 24 horas.

Después de las últimas 24 horas de estímulo, se recuperaron los medios y se guardaron a -20°C hasta su uso para medir la expresión de los diversos analitos mediante ensayos comerciales de ELISA. La normalización de los datos obtenidos de las ELISAs se realizó utilizando el peso húmedo de los tejidos.

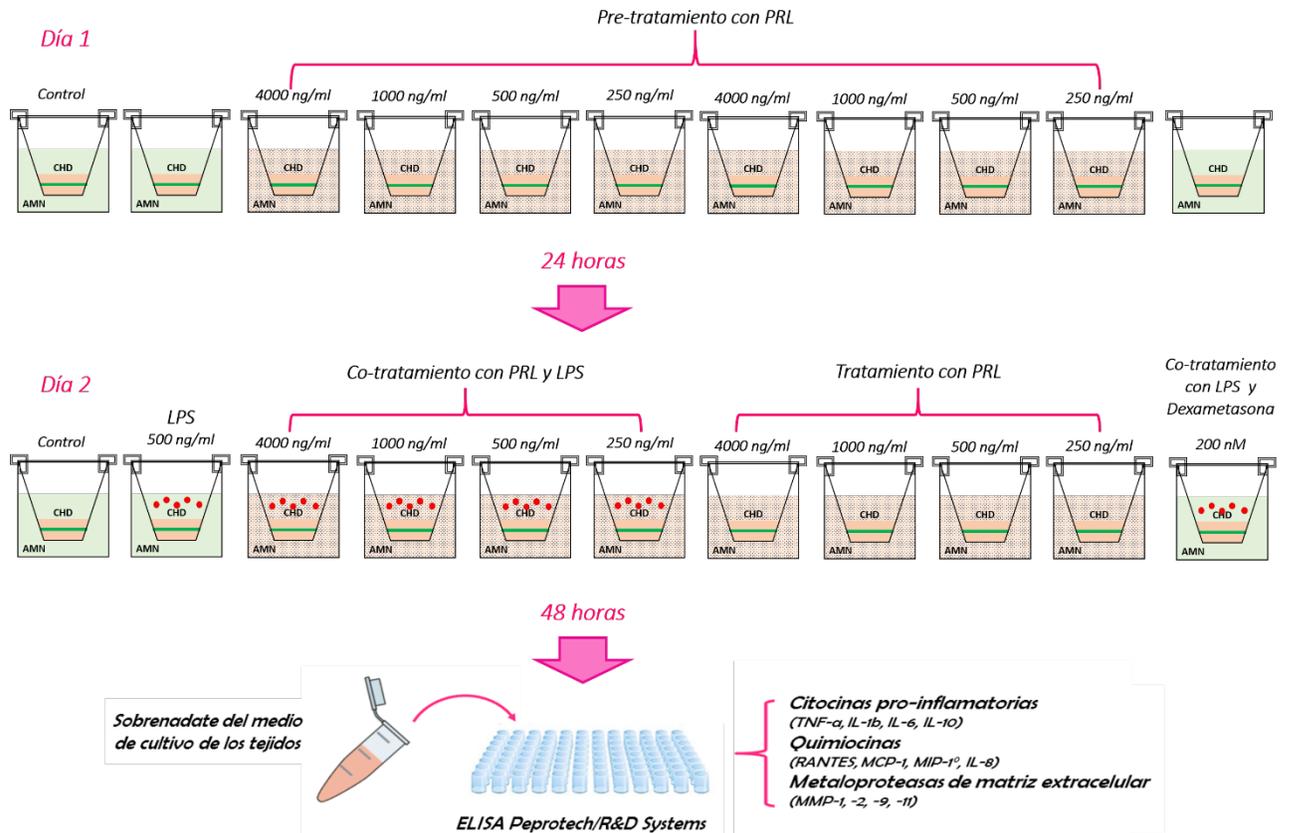


Figura 9. Esquema que muestra los grupos experimentales que se incluyeron en el estudio, la forma y duración en que se realizaron los tratamientos de las membranas corioamnióticas y la evaluación de los diferentes marcadores asociados al trabajo de parto. CHD (coriodecidua), AMN (amnios).

6. Determinación de marcadores por medio de ELISA.

Una vez concluidos los tratamientos, los niveles de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, RANTES, MIP-1 α , MCP-1, MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13 fueron cuantificados por medio de ELISA.

Se utilizaron placas NUNC (Nalgene Nunc, Dinamarca) en la que se colocaron 100 μ l del anticuerpo de captura en las concentraciones correspondientes según las indicaciones del fabricante (Tabla 3).

Las placas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo se retiró con 300 μ l de buffer de lavado preparado con PBS-Tween 20 al 0.05% (v/v); este lavado se realizó 3 veces. La unión inespecífica de anticuerpos se bloqueó colocando 300 μ l de una solución de albúmina al 1% en PBS 1X en cada pozo, durante 2 horas a temperatura ambiente, al finalizar la incubación las placas se lavaron 3 veces con buffer de lavado.

Se colocaron 100 μ l de cada punto de la curva correspondiente o de muestra y las placas se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, se lavaron las placas 3 veces con buffer de lavado. Para detectar la presencia del analito en la muestra, se agregaron 100 μ l del anticuerpo de detección a cada pozo. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se retiró el anticuerpo no adherido con 3 lavados utilizando el buffer de lavado.

Después de los lavados, se agregaron 100 μ l del conjugado estreptavidina-HRP/avidina-HRP a cada pozo, incubando por 20 min (kits R&D Systems) y 30 min (kits Peprtech) a temperatura ambiente.

Para el desarrollo de color, las placas se lavaron nuevamente con PBS-Tween 20 y se agregaron 100 μ l del sustrato correspondiente ABTS (Peprtech) y TMB (R&D Systems) monitoreando la reacción durante 20 min.

La reacción de las placas de los kits de R&D Systems se detuvo agregando 50 μ l de una solución 2N de H₂SO₄. Finalmente, las placas se leyeron a una densidad óptica de 405nm con una corrección de 650nm utilizando un ajuste de curva logística de 4 parámetros (4PL) en el espectrofotómetro xMark (Bio-Rad).

	Anticuerpo de captura	Anticuerpo de detección	Curva estándar	Dilución de la muestra	Marca
IL-1 β	4.0 $\mu\text{g/ml}$	200ng/ml	0–250 pg/mL	-	R&D Systems
TNF- α	1.0 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$	0-2000 pg/ml	-	Peprotech
IL-6	1.0 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$	0-1500 pg/ml	1:2	Peprotech
RANTES	0.50 $\mu\text{g/ml}$	0.25 $\mu\text{g/ml}$	0-2000 pg/ml	1:4	Peprotech
MIP-1α	0.50 $\mu\text{g/ml}$	0.50 $\mu\text{g/ml}$	0-4000 pg/ml	1:4	Peprotech
MCP-1	0.25 $\mu\text{g/ml}$	0.50 $\mu\text{g/ml}$	0-1000 pg/ml	1:8	Peprotech
IL-8	0.50 $\mu\text{g/ml}$	0.50 $\mu\text{g/ml}$	0-1000 pg/ml	1:8	Peprotech
MMP-1	2.0 $\mu\text{g/ml}$	50.0 $\mu\text{g/ml}$	0-10,000 pg/ml	-	R&D Systems
MMP-2	2.0 $\mu\text{g/ml}$	10.0 $\mu\text{g/ml}$	0-2000 pg/ml	-	R&D Systems
MMP-9	1.0 $\mu\text{g/ml}$	100 ng/ml	0-2000 pg/ml	1:2	R&D Systems
MMP-13	4.0 $\mu\text{g/ml}$	100 ng/ml	0-4000 pg/ml	-	R&D Systems

Tabla 3. Características específicas para el inmunoensayo de cada analito.

7. Ensayo de Actividad de MMP-9.

La MMP-9, al igual que otros miembros de esta familia de genes, se secreta como la forma precursora o zimógeno (92 kDa, pro MMP-9). Adicionalmente a la lectura de la MMP-9 secretada por los tejidos, la actividad de esta enzima en los tejidos se midió con un kit de ensayo de actividad (Biotrak; Amersham Biosciences), ya que la forma inactiva, puede convertirse *in vitro* en una forma activa mediante el acetato de p-aminofenilmercúrico (APMA).

Siguiendo las indicaciones del fabricante, sobre la placa de 96 pozos que está recubierta con un anticuerpo de captura monoclonal de ratón anti-MMP-9, se colocaron 100 μl de cada estándar pro-MMP (0.125–4 ng/mL), extracto de tejido y buffer de ensayo (blanco), esta placa se incubó a 4 ° C durante la noche. Las placas se lavaron cuatro veces con buffer de fosfato de sodio 0,01 M (pH 7,0) que contenía Tween-20 al 0,05%.

Para inducir la actividad de la MMP-9 se colocaron 50 μ l de solución APMA a los pocillos donde la actividad total de MMP-9 se midió y 50 μ l de buffer de ensayo donde se midió la actividad endógena de MMP-9 en las muestras. La placa se agitó por 20 segundos y posteriormente se incubó la placa a 37°C por 1.5 h. Posteriormente, se añadió reactivo de detección (50 μ l) a cada pocillo y las muestras se incubaron a 37°C durante 1h. La actividad de la MMP-9 es directamente proporcional a la generación de color a través de la escisión del S-2444, puede representarse por la tasa de cambio de la absorbancia a 405 nm. La actividad de MMP-9 en una muestra se determinó por interpolación a partir de una curva estándar.

8. Análisis estadístico.

La distribución de los datos fue analizada con la prueba de Kolmogorov-Smirnoff, Una ANOVA no paramétrica y una prueba de Kruskall Wallis fue utilizada para la comparación de los tratamientos utilizando el programa estadístico de SigmaPlot v.11 (Systat Software, San José, CA), se consideró significativa una $p \leq 0.05$.

Para el análisis del co-tratamiento con PRL y LPS, los datos que presentaron una distribución normal, se compararon con una prueba de t; los datos cuya distribución no fue normal, se compararon mediante la prueba de U de Man-Whitney. En todos los casos el valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo utilizando el programa SPSS (IBM Corp. Armonk, USA).

VI. Resultados

1. Validación del modelo y estandarización de las condiciones experimentales.

1.1 Viabilidad metabólica.

Con la finalidad de demostrar que las membranas corioamnióticas se mantienen metabólicamente viables por 96 horas en el sistema de cultivo en transwell, se analizó la capacidad metabólica de una deshidrogenasa mitocondrial de los tejidos. Los resultados de esta prueba demostraron que la actividad metabólica de la coriodecidua fue mayor que la del amnios, debido a que es la región con mayor densidad celular de ambos tejidos. Sin embargo, en ninguno de los dos compartimientos que componen a las membranas corioamnióticas se observó disminución significativa en la actividad metabólica a lo largo del tiempo de cultivo (Figura 10). Estos resultados indican de manera indirecta, que las membranas corioamnióticas se mantienen viables a lo largo de las 96 horas, asegurando que el periodo de tratamiento puede ser aplicado en este intervalo de tiempo.

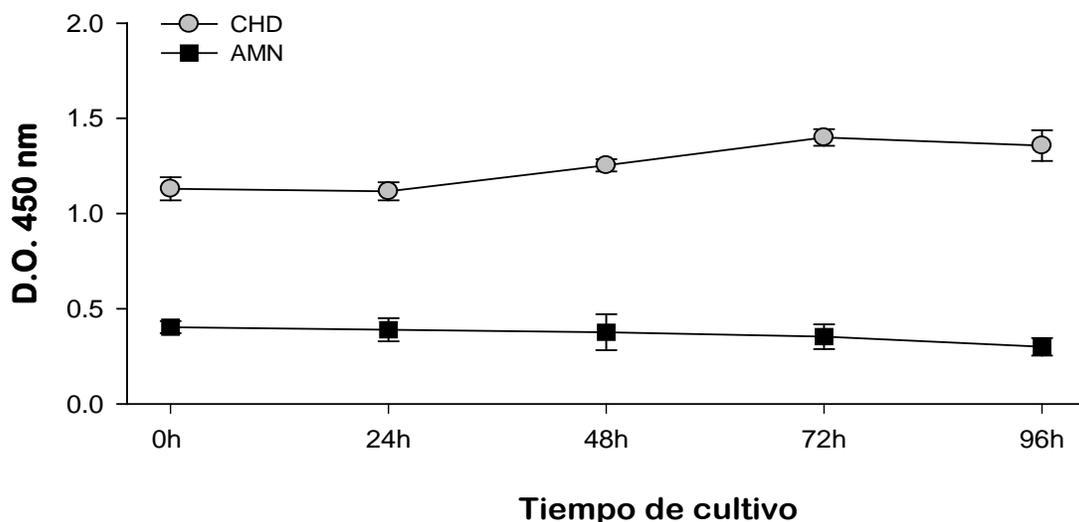


Figura 10. Viabilidad en términos de la actividad metabólica de las membranas corioamnióticas durante el tiempo de cultivo (0-96h). $n=3$, ensayos por triplicado. Promedio \pm error estándar.

1.2 Resistencia Electrónica Transmembranal (RET).

El objetivo de esta prueba fue validar y garantizar la integridad estructural de las membranas corioamnióticas mantenidas en cultivo hasta las 96 horas, en función a la resistencia que oponen los tejidos al paso de una corriente eléctrica. La RET se midió en una cámara de Ussing cada 24 horas a lo largo de un periodo de 0-96 horas, sin observarse cambios significativos asociados a las condiciones de cultivo (Figura 11).

Este resultado demuestra que las características morfológicas y estructurales no cambian durante el cultivo, por lo que mantienen *in vitro* su función de barrera, separando eficientemente los dos compartimentos.

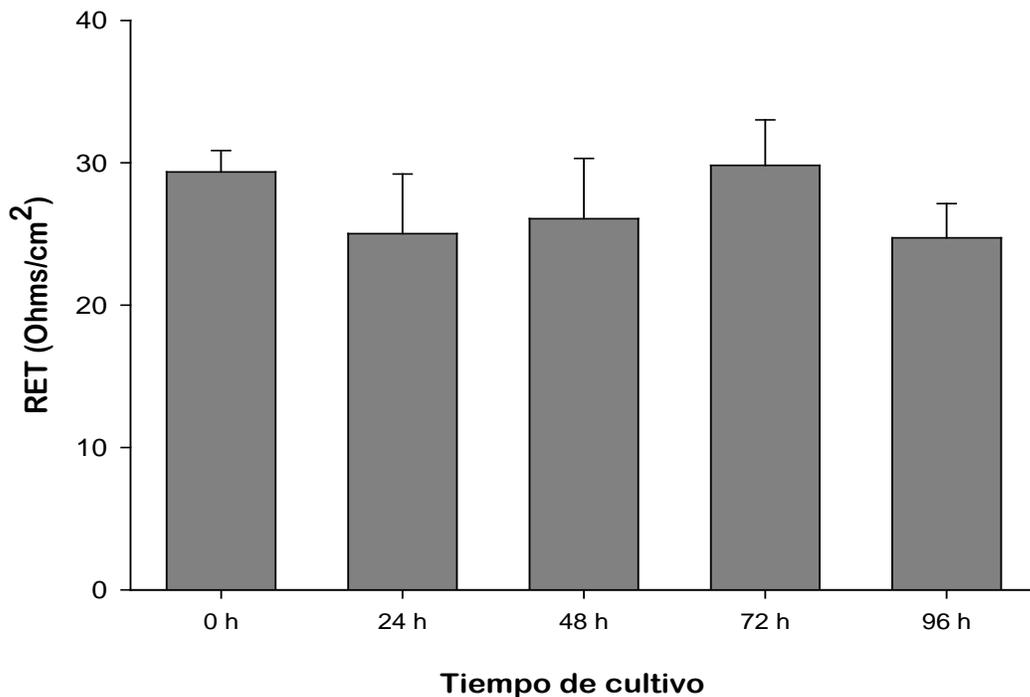


Figura 11. RET de las membranas corioamnióticas a lo largo del tiempo de cultivo. $n=3$ ensayos por triplicado. Promedio \pm error estándar.

El mantenimiento de la estructura de los tejidos se comprobó también mediante cortes histológicos, en los cuales se observa como ambos tejidos se mantienen unidos, la coriodecidua no muestra degradación de la MEC, el epitelio amniótico se observa continuo y sin ruptura, tampoco hay evidencia de alteraciones morfológicas en las diferentes capas de MEC (Figura 12), la estructura corresponde a la morfología esperada en membranas corioamnióticas íntegras.

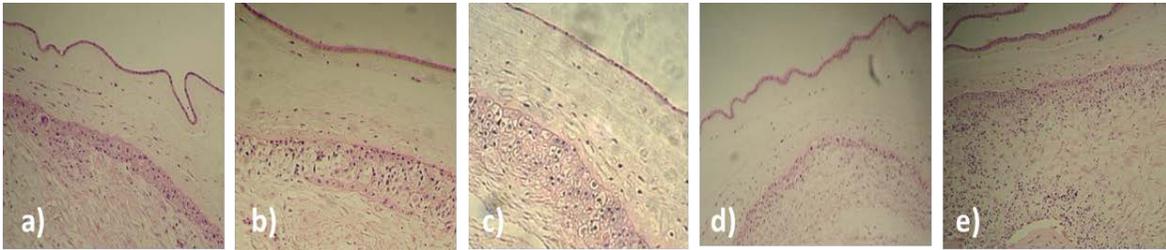


Figura 12. Cortes histológicos de las membranas corioamnióticas humanas teñidos con hematoxilina-eosina, correspondientes a diferentes tiempos de cultivo a) 0, b) 24, c) 48, d) 72 y e) 96 horas.

1.3 Determinación de la funcionalidad de las membranas corioamnióticas.

Con la intención de asegurarnos que las membranas corioamnióticas se mantienen funcionales en el cultivo, los explantes montados en el sistema de transwell fueron tratados con IL-1 β (1ng/ml), que ya se ha demostrado es capaz de inducir la secreción de MMP-9 en las membranas corioamnióticas (Vadillo-Ortega y cols., 2002).

Comparado con el control, la IL-1 β incrementó 3 veces la secreción de MMP-9 en la coriodecidua y 2 veces en el amnios después de 24 horas post-estimulación; sin embargo, fue hasta las 48 horas post estimulación que IL-1 β incrementó de manera significativa la secreción de MMP-9 tanto en la coriodecidua (4 veces), como en el amnios (3.5 veces) (Figura 13).

Este ensayo nos permite deducir que las membranas corioamnióticas montadas en este sistema además de estar vivas e íntegras, mantienen su capacidad de respuesta a estímulos inmunológicos.

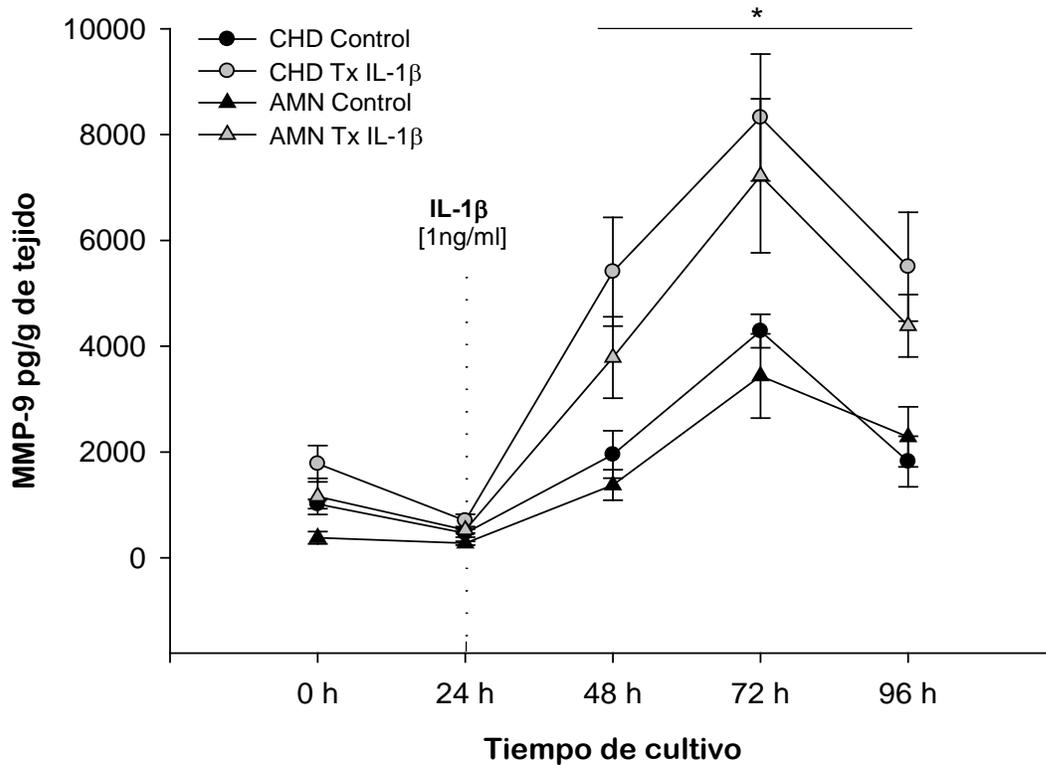


Figura 13. Funcionalidad de los tejidos determinada por la secreción al medio de MMP-9 inducida por IL-1β (1ng/ml) en las membranas corioamnióticas: coriodecidual (CHD) y amnios (AMN). n=3, ensayos por triplicado. Promedio ± error estándar. En línea discontinua se muestra el momento en que se aplicó el tratamiento (Tx) con IL-1 β. *p<0.05 vs control.

1.4 Expresión del ARNm de PRL y PRL-R en membranas corioamnióticas.

La expresión del gen de la PRL y su receptor se cuantificó mediante PCR tiempo real en la coriodecidual y el amnios por separado cada 24 horas durante el periodo de 0-96 horas de cultivo. Únicamente en la coriodecidual amplificó el ARNm de PRL y no en el amnios, lo cual es congruente con trabajos previos que reportan que la decidua es la única fuente de PRL presente en el líquido amniótico (Wu y cols.,

1995). La expresión de PRL en la coriodecidua se mantuvo sin cambios a lo largo del cultivo (Figura 14).

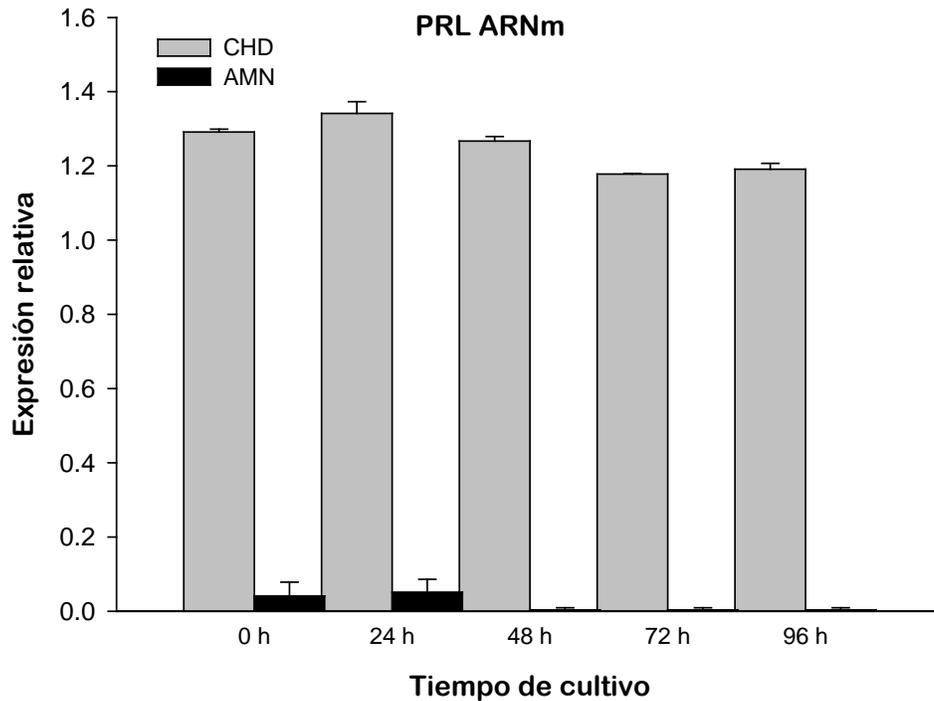


Figura 14. Expresión del ARNm de la PRL en las membranas corioamnióticas: coriodecidua (CHD) y amnios (AMN) durante el tiempo de cultivo (0-96h). n=3, ensayos por triplicado. Promedio \pm error estándar.

Por otro lado, el ARNm del PRL-R fue amplificado en ambas regiones de las membranas corioamnióticas sin cambios significativos a lo largo del cultivo, estos resultados son congruentes con estudios anteriores que describen la expresión del receptor de PRL a nivel de proteína y ARNm en estos tejidos (Maaskant y cols., 1995). La presencia del PRL-R en estos tejidos sugiere que la PRL es capaz de ejercer acciones biológicas autocrinas y paracrinas sobre los tejidos durante el cultivo (Figura 15).

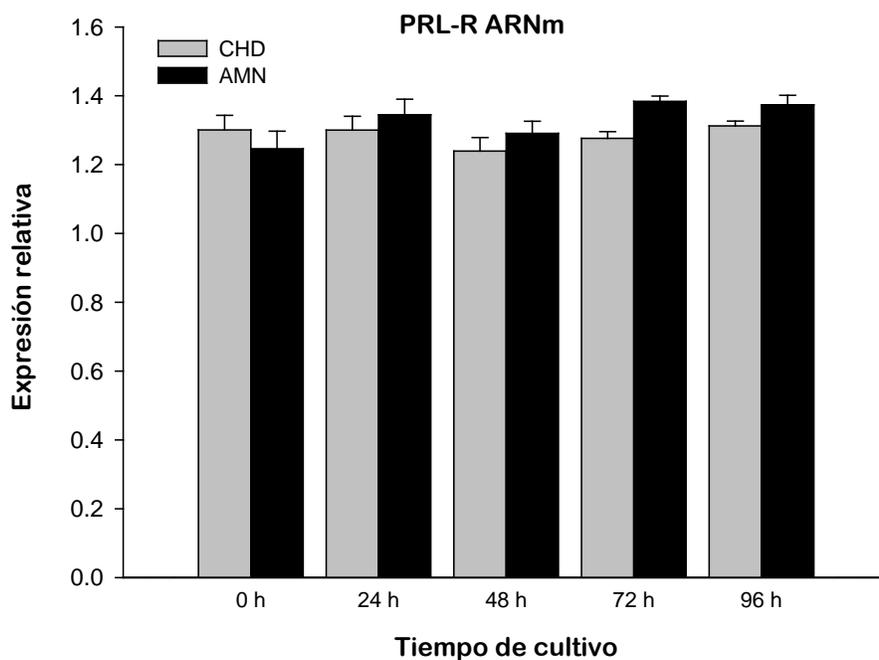


Figura 15. Expresión del ARNm de la PRL-R en las membranas corioamnióticas: coriodecidea (CHD) y amnios (AMN) durante el tiempo de cultivo (0-96h). n=3, ensayos por triplicado. Promedio \pm error estándar.

1.5 Determinación de la ED50 de LPS.

Con el objetivo de elegir la concentración de LPS a utilizar para inducir un proceso inflamatorio en las membranas corioamnióticas, se determinó la dosis efectiva al 50% (ED50) para IL-6, IL-1 β y TNF- α estimulando los tejidos con concentraciones de 0, 0.1, 1, 50, 250, 500, 1000 y 5000 ng/ml de LPS por un periodo de 24 horas.

Los resultados de la curva de dosis respuesta demostraron que la dosis efectiva para inducir la secreción de cada marcador es diferente. La citocina inducida con bajas concentraciones de LPS fue IL-6, cuya ED50 (28.72ng/ml) fue 4 veces menor que la necesaria para inducir IL-1 β (ED50 =133.4ng/ml de LPS) y 19 veces menor que la necesaria para inducir TNF- α (ED50= 571.3ng/ml de LPS) (Figura 16).

Considerando que en modelos animales, se ha demostrado que la administración intrauterina/intraperitoneal de TNF- α o IL-1 β puede inducir el trabajo de parto prematuramente (Vadillo-Ortega y cols., 2002; Gravett y cols., 1994), decidimos utilizar 500ng/ml de LPS en los experimentos posteriores, que fue el valor de ED50 de LPS para estimular la secreción de TNF- α ; debido que el valor de esta dosis fue el más alto nos aseguramos de medir la secreción de los tres principales moduladores de factores uterotónicos y pro-degradativos que caracterizan el evento fisiológico del trabajo de parto.

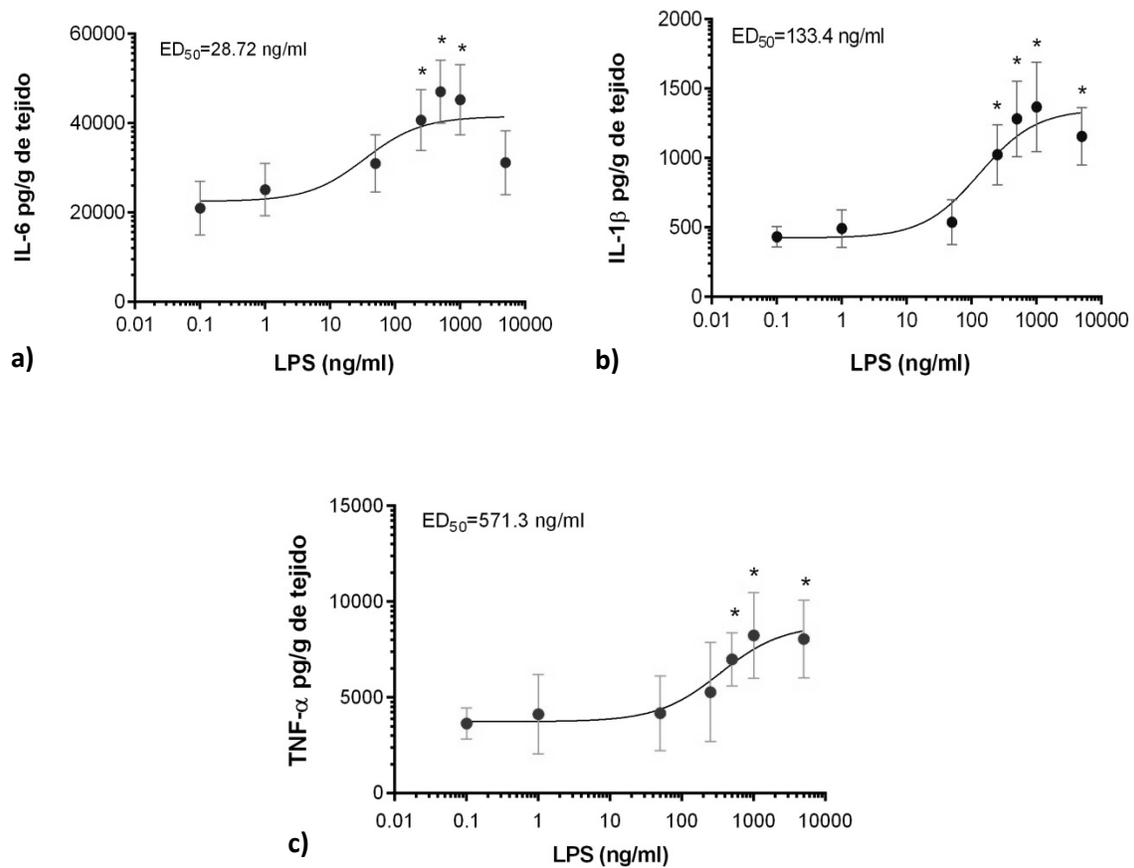


Figura 16. Curvas dosis respuesta (ED₅₀) de membranas corioamnióticas tratadas con LPS para inducir los marcadores de inflamación: **a)** IL-6, **b)** IL-1 β y **c)** TNF- α , n=5, ensayos por triplicado. Promedio \pm desviación estándar *p<0.05 vs control.

1.6 Cinética de marcadores pro-inflamatorios.

Una vez determinada la dosis efectiva de 500ng/ml de LPS, se analizó la secreción de los principales marcadores pro-inflamatorios en respuesta a este estímulo a lo largo del periodo de cultivo de las 0 hasta las 96 horas.

La secreción de TNF- α incrementó 4 horas después de aplicar el estímulo con LPS, alcanzando su máxima concentración a las 24 horas post-estimulación, siendo 6 veces mayor en comparación con su respectivo tiempo en las condiciones control (Figura 17 a).

Por otro lado, IL-1 β mostró un patrón de secreción más tardía, incrementando a las 8 horas post-estimulación, alcanzando su valor máximo a las 72 horas post-estimulación siendo 10 veces mayor en comparación con el control y estadísticamente significativo (Figura 17 b).

A diferencia de IL-1 β y TNF- α , la secreción de IL-6 incrementó a lo largo del cultivo en las condiciones control, mostrando un valor máximo a las 48 horas; en comparación, el estímulo con LPS incrementó moderadamente 1.2 veces la secreción de IL-6 en este mismo tiempo (Figura 17 c).

Con base en estos resultados determinamos que los mejores indicadores de la respuesta inflamatoria en estos tejidos son TNF- α e IL-1 β y el periodo de tiempo en el cual podemos observar una respuesta significativa de estos moduladores es alrededor de las 24h después de la estimulación.

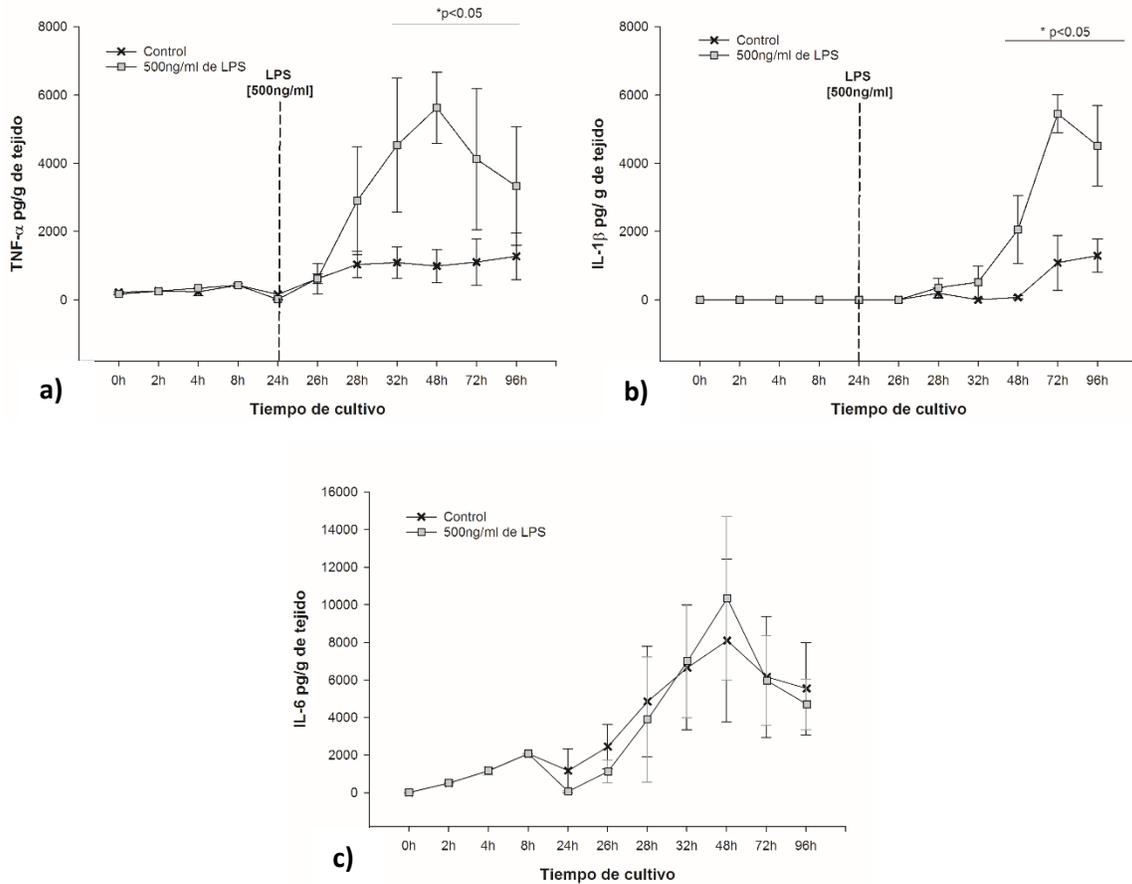


Figura 17. Cinética de tiempo de secreción de los marcadores de inflamación en las membranas corioamnióticas en respuesta a 500 ng/ml de LPS. En línea discontinua se muestra el momento en que se aplicó el tratamiento (Tx) de LPS. **A)** TNF- α , **B)** IL-1 β y **C)** IL-6. $n=4$, ensayos por triplicado \pm error estándar. * $p<0.05$ vs control.

1.7 Ensayo de Bioactividad de la PRL.

Con el objetivo de asegurarnos que la PRL recombinante (Perpotech) utilizada para el tratamiento de las membranas podía ejercer funciones biológicas, se empleó la línea celular Nb2 (linfocitos T inmaduros de rata) cuya proliferación es dependiente de PRL. La proliferación se midió con la prueba colorimétrica Cell Proliferation XTT. Los resultados mostraron un incremento en la actividad metabólica celular de manera dependiente de la dosis de PRL (Figura 18).

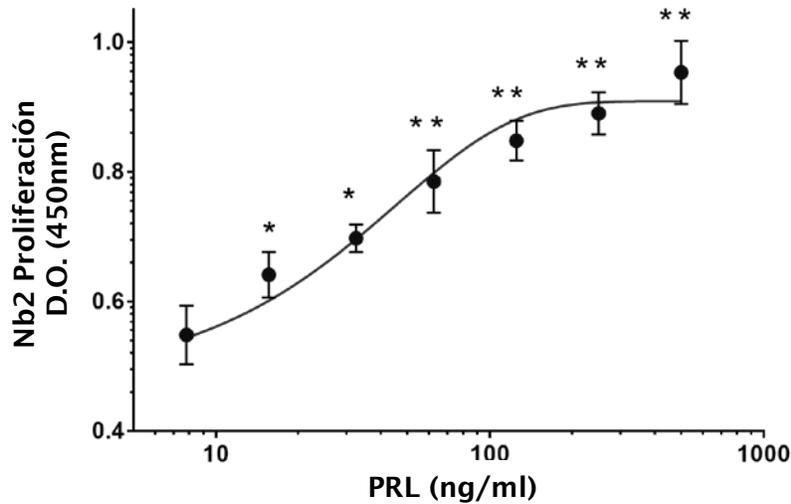


Figura 18. Proliferación de la línea celular Nb2 en respuesta a PRL. $n=3$, ensayos por triplicado. Promedio \pm desviación estándar. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

2. Efecto inmuno-modulador de la PRL sobre las membranas corioamnióticas.

Utilizando la modalidad de cultivo de las membranas montadas en el sistema de transwell, analizamos el efecto del co-tratamiento con PRL y LPS descrito en la metodología. Los resultados del presente estudio mostraron que cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas responde de manera diferente a los tratamientos aplicados como se describirán a continuación.

2.1 Efecto de PRL sobre Citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias

Secreción de TNF- α . El estímulo con LPS en la región coriodecidual fue capaz de inducir el incremento de esta citocina pro-inflamatoria de manera significativa en ambas regiones de las membranas, incrementando la concentración de TNF- α en la coriodecidual 18 veces más comparado con la secreción basal de esta citocina y de 15 veces más en el amnios comparado con su control. Por otro lado, el co-tratamiento con LPS y la concentración más alta de PRL (4000ng/ml) disminuyó de manera significativa la secreción de TNF- α en la región coriodecidual hasta un 67%

en la coriodesidua y un 54% en el amnios. El tratamiento con PRL en ausencia del estímulo con LPS no mostró cambios en el nivel de TNF- α en comparación con el control. El co-tratamiento con dexametosona disminuyó la secreción de TNF- α en ambos compartimentos de manera significativa (Figura 19 A). Adicionalmente, el co-tratamiento con metotrexato – un inhibidor de la vía JAK/STAT- revirtió de manera significativa el efecto supresor de la prolactina sobre esta citocina (Figura 19 B).

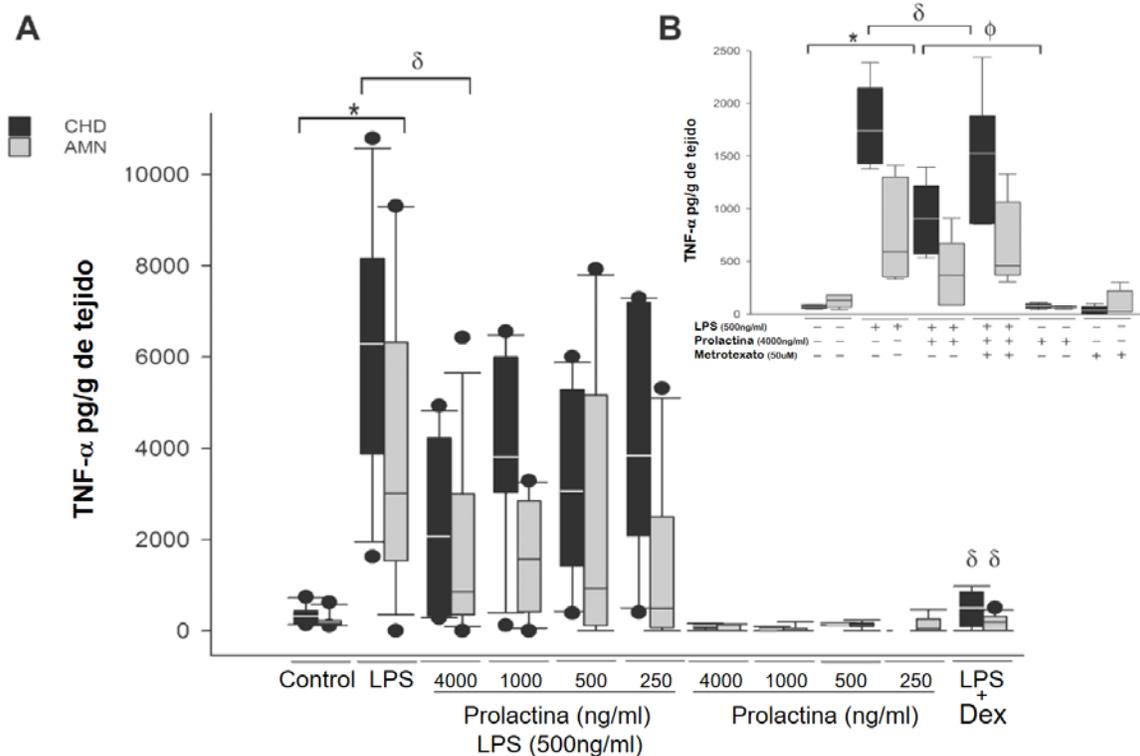


Figura 19. A) Secreción de TNF- α en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: coriodesidua (CHD) y amnios (AMN) en respuesta al co-tratamiento con LPS y diferentes concentraciones de PRL. Dexametosona (Dex). n=9 ensayos por triplicado. Mediana con rango intercuantil.*p<0.05 vs. control, δ p<0.05 vs. LPS. **B)** Secreción de TNF- α de tres experimentos independientes utilizando el metotrexato como inhibidor del efecto de la PRL.*p<0.05 vs. control, δ p<0.05 vs. LPS, ϕ .*p<0.05 vs. LPS + PRL.

Secreción de IL-1 β . En comparación con el nivel basal, el estímulo con la endotoxina indujo significativamente 6 veces más la secreción en la región coriodesidua y 5.6 veces más el amnios. En respuesta al co-tratamiento con PRL y LPS, todas las concentraciones de PRL fueron capaces de disminuir de manera significativa la secreción de esta citocina en la coriodesidua (55%) y en el amnios (46%). El tratamiento con PRL en ausencia del estímulo con LPS no mostró

diferencia respecto al control en ninguno de los dos compartimentos (Figura 20 A). El co-tratamiento con metotrexato no fue capaz de revertir el efecto de la PRL sobre IL-1 β de manera significativa (Figura 20 B).

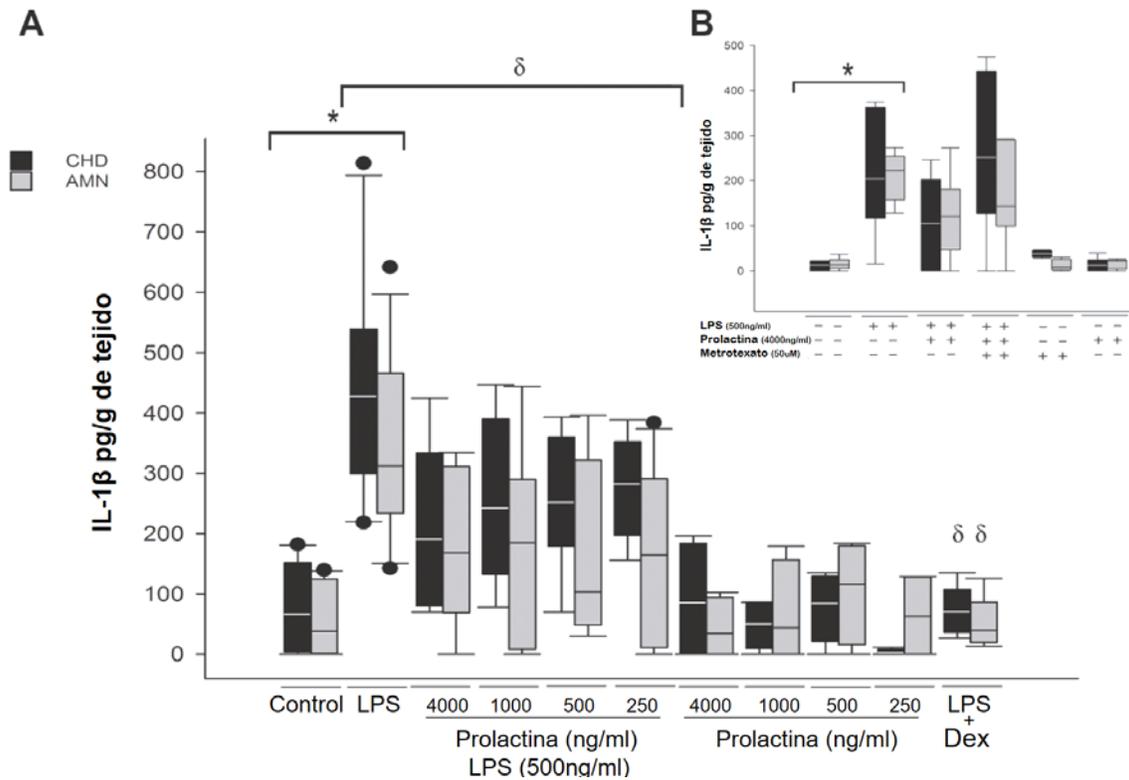


Figura 20. A) Secreción de IL-1 β en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: coriodecidual (CHD) y amnios (AMN) en respuesta al tratamiento con LPS (500ng/ml) y/o el tratamiento con diferentes concentraciones de PRL. Dexametasona (Dex). n=9 ensayos por triplicado. Mediana con rango intercuantil *p<0.05 vs. control, δ p<0.05 vs. LPS. **B)** Secreción de IL-1 β de tres experimentos independientes utilizando el metotrexato como inhibidor de la PRL. *p<0.05 vs. Control.

Secreción de IL-6. En comparación con el control, ningún tratamiento mostró cambios en la secreción de IL-6 de manera significativa, con excepción del co-tratamiento de LPS y dexametasona, esta última inhibió la secreción de IL-6 en la coriodecidual de manera significativa (Figura 21 A). El co-tratamiento con metotrexato no modificó la secreción de IL-6 en comparación de los demás tratamientos, incluido el control (Figura 21 B).

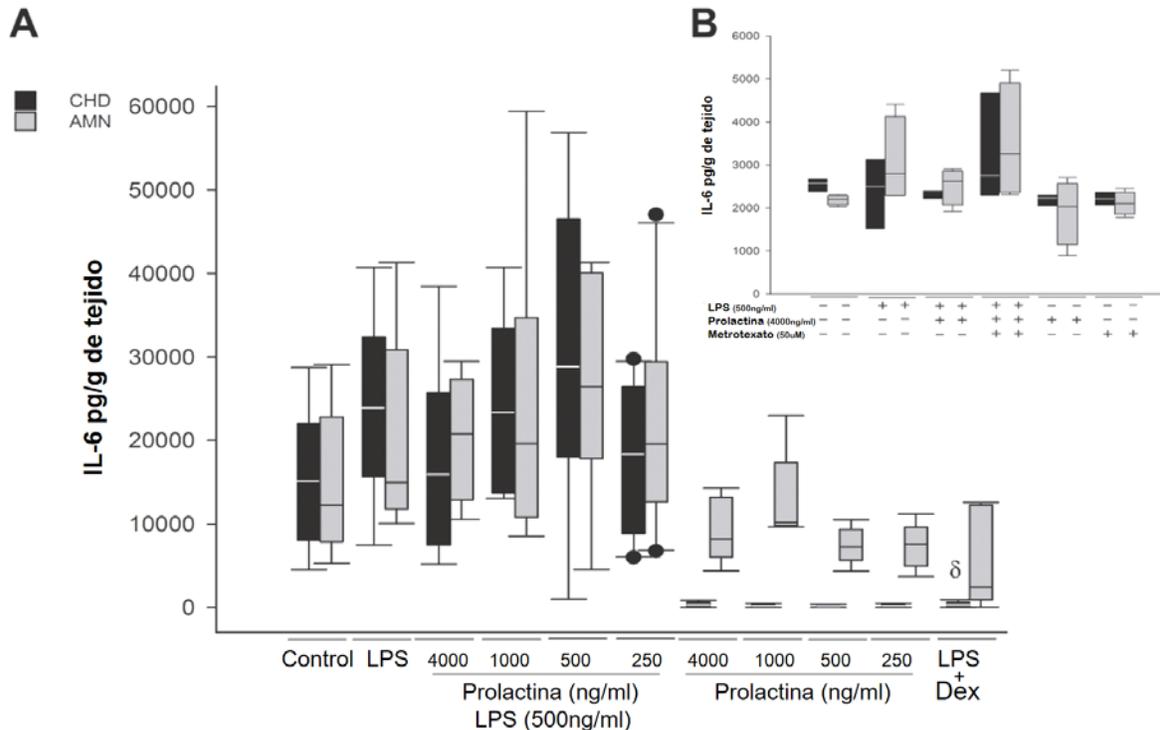


Figura 21. A) Secreción de IL-6 en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: coriodecidual (CHD) y amnios (AMN) en respuesta al tratamiento con LPS (500ng/ml) y/o el tratamiento con diferentes concentraciones de PRL. Dexametasona (Dex). n=9 ensayos por triplicado. Mediana con rango intercuantil **B)** Secreción de IL-6 de tres experimentos independientes utilizando el metotrexato como inhibidor de la PRL. δ $p < 0.05$ vs. LPS.

Secreción de IL-10. Comparado con el nivel basal de esta citocina en cada compartimiento, el tratamiento con LPS aumentó significativamente 2 veces más la secreción de IL-10 en la región coriodecidual y 1.5 veces más en el amnios. Por otro lado, el co-tratamiento con LPS y PRL mostró una tendencia a incrementar de manera dependiente a la concentración de PRL la secreción de IL-10 en ambas regiones de las membranas corioamnióticas, siendo todos los co-tratamientos significativamente mayores en comparación con el control. El tratamiento con PRL en ausencia del LPS, mantuvo el nivel basal de IL-10 tanto en compartimiento coriodecidual como en el amnios. El co-tratamiento con dexametasona inhibió la secreción de IL-10 inducida por el LPS (Figura 22 A). El co-tratamiento con metotrexato no revirtió el efecto de la PRL para esta citocina, de manera que no se observaron cambios significativos (Figura 22 B).

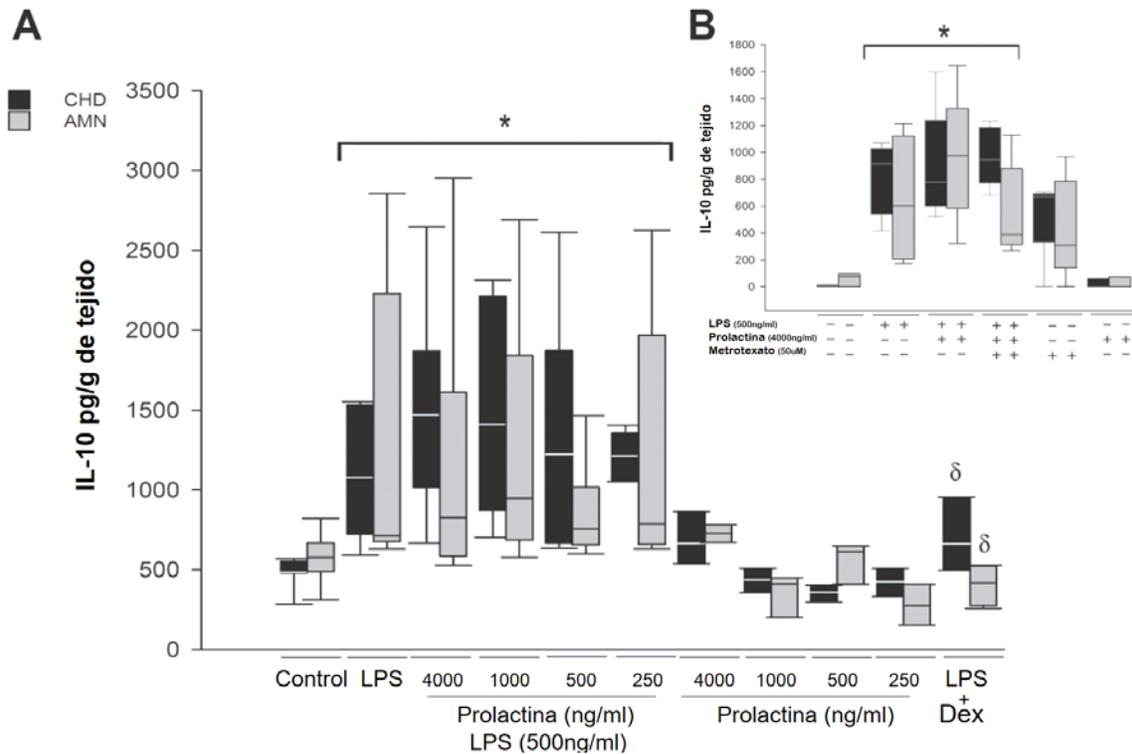


Figura 22. A) Secreción de IL-10 en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: coriodecidua (CHD) y amnios (AMN) en respuesta al tratamiento con LPS (500ng/ml) y/o el tratamiento con diferentes concentraciones de PRL. Dexametasona (Dex). n=9 ensayos por triplicado. Mediana con rango intercuantil *p<0.05 vs. control, δ p<0.05 vs. LPS. **B)** Secreción de IL-10 de tres experimentos independientes utilizando el metotrexato como inhibidor de la PRL. *p<0.05 vs. control.

2.2 Efecto de PRL sobre Quimiocinas

Secreción de RANTES. En comparación con la región amniótica, los valores basales de RANTES fueron 2 veces mayores en la coriodecidua. Después de la estimulación con la endotoxina en la región coriodecidua, la secreción de RANTES fue significativamente mayor (4 veces) respecto al control. El co-tratamiento de LPS con 4000, 1000, 500 y 250 ng/ml de PRL disminuyó significativamente la secreción de RANTES en el compartimiento de la coriodecidua. En la región amniótica, el estímulo con LPS incrementó significativamente 2 veces la secreción de RANTES, con respecto al control. En la región amniótica el co-tratamiento de LPS y PRL no modificó la secreción de RANTES. Por otro lado, el tratamiento con las diferentes

concentraciones de PRL en ausencia de LPS no mostraron diferencias en ninguna de las dos regiones comparadas con su control respectivo (Figura 23).

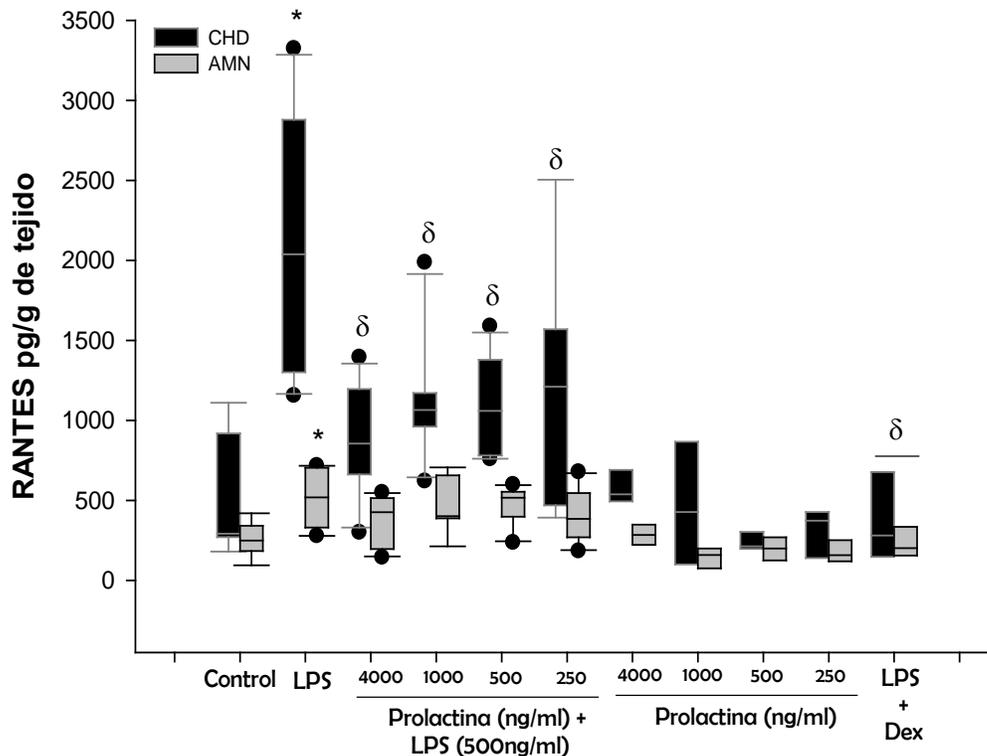


Figura 23. Secreción *in vitro* de RANTES en la coriodecidua (CHD) y el amnios (AMN) después del co-tratamiento con LPS (*E. coli*) y PRL recombinante humana. Dexametasona (Dex). Las gráficas muestran la media con el rango intercuantil. $n=9$ ensayos por triplicado. Las diferencias significativas están marcadas con $*p<0.05$ vs. control, $\delta p<0.05$ vs. LPS.

Secreción de MCP-1. De las dos regiones de las membranas corioamnióticas, en el compartimiento del amnios se observó un nivel basal de MCP-1 de 3.5 veces mayor respecto al de la coriodecidua. En respuesta al tratamiento con LPS la secreción de MCP-1 incrementó 1.3 veces en el amnios respecto al control. El co-tratamiento con LPS y las concentraciones de 4000 y 1000ng/ml de PRL disminuyó 70% la secreción de MCP-1 en el compartimiento del amnios. El tratamiento con las concentraciones de PRL más altas en ausencia de LPS mantuvo el nivel de esta quimiocina por debajo del nivel basal (Figura 24).

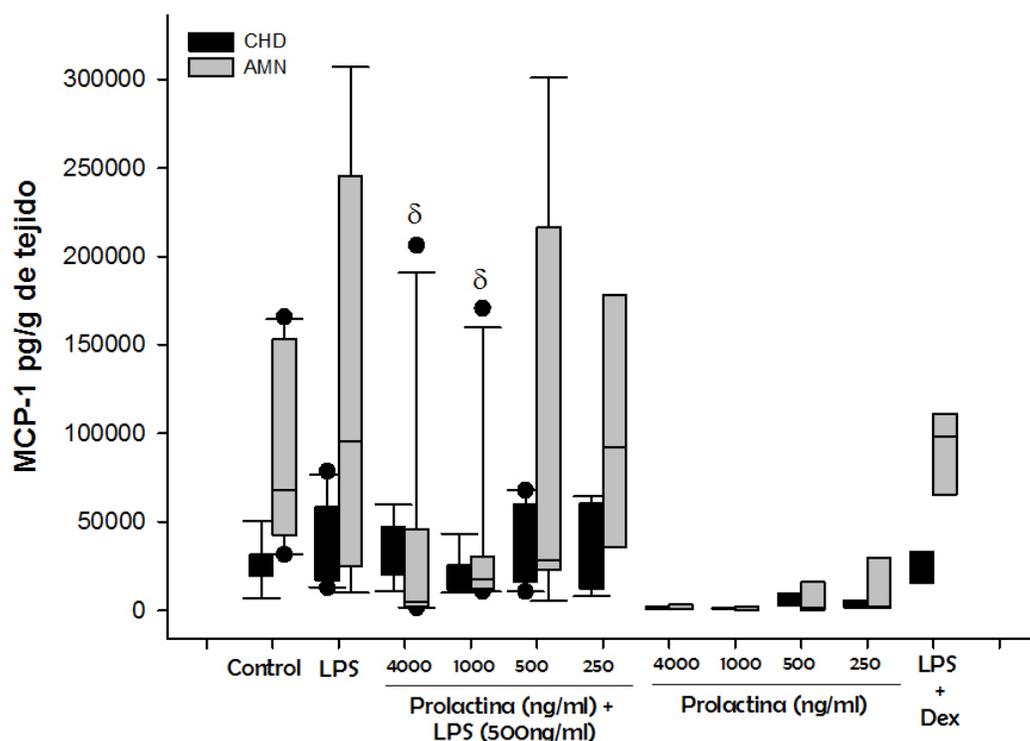


Figura 24. Efecto de la PRL sobre la secreción de MCP-1 en el compartimento coriodecidual (CHD) y el compartimento amniótico (AMN), en respuesta al tratamiento con LPS (*E. coli*). Dexametasona (Dex). Mediana con rango intercuantil. $n=9$ ensayos por triplicado. Las diferencias significativas se marcan con * $p<0.05$ vs. control, $\delta p<0.05$ vs. LPS.

Secreción de MIP-1 α . La secreción de esta quimiocina fue similar en ambos compartimentos de las membranas corioamnióticas. En la coriodecidual la secreción de MIP-1 α fue 4 veces mayor en respuesta al tratamiento con LPS comparado con el nivel control. En el compartimento amniótico el tratamiento con LPS incremento 7 veces el nivel de MIP-1 α comparado con el control. Los co-tratamientos de LPS con PRL a 1000 y 4000ng disminuyeron el 20% y 45% de la secreción de MIP-1 α inducida por el LPS en el corion y en el amnios respectivamente. El tratamiento con PRL en ausencia de LPS no mostró ningún cambio significativo respecto a los niveles basales de cada región de las membranas corioamnióticas (Figura 25).

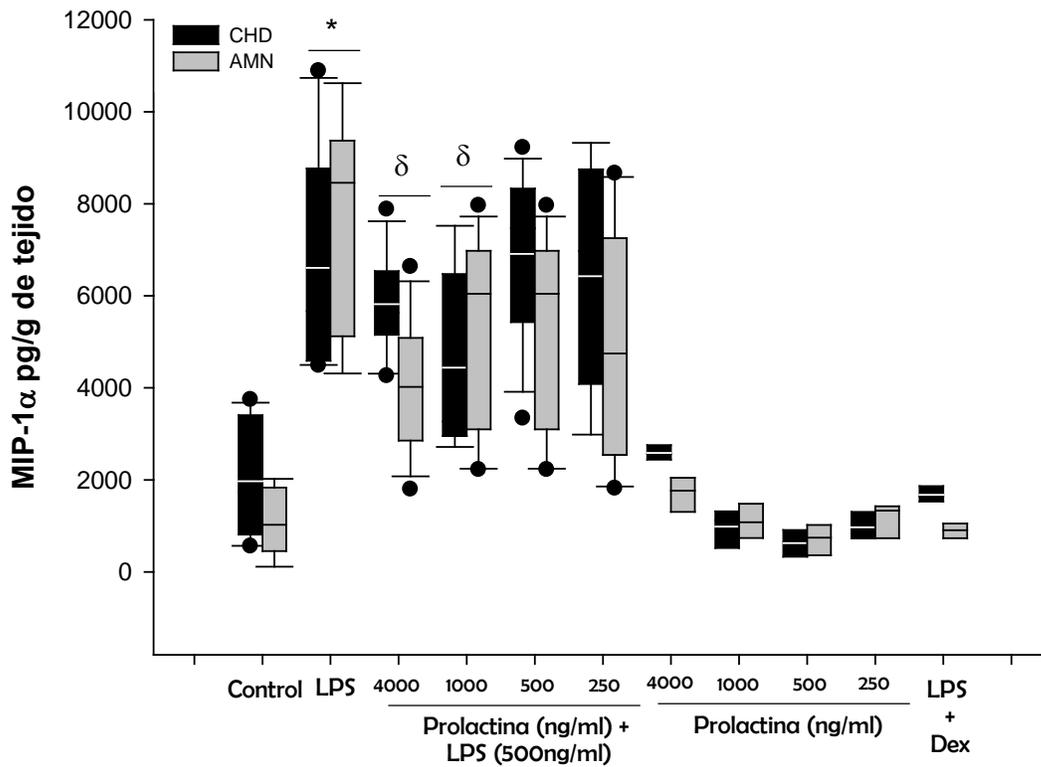


Figura 25. PRL inhibe la secreción de MIP-1 α en la coriodecidua (CHD) y el amnios (AMN), después del tratamiento con LPS (*E. coli*). Dexametasona (Dex). $n=9$ ensayos por triplicado. Las gráficas muestran la media con el rango intercuantil. $n=9$ ensayos por triplicado. Las diferencias estadísticas se marcan con * $p<0.05$ vs. control, $\delta p<0.05$ vs. LPS

Secreción de IL-8. La secreción de IL-8 no mostró cambios significativos en respuesta al LPS. De forma similar, el co-tratamiento con PRL no ejerció efectos sobre la secreción de esta citocina en la coriodecidua o el amnios. (Figura 26).

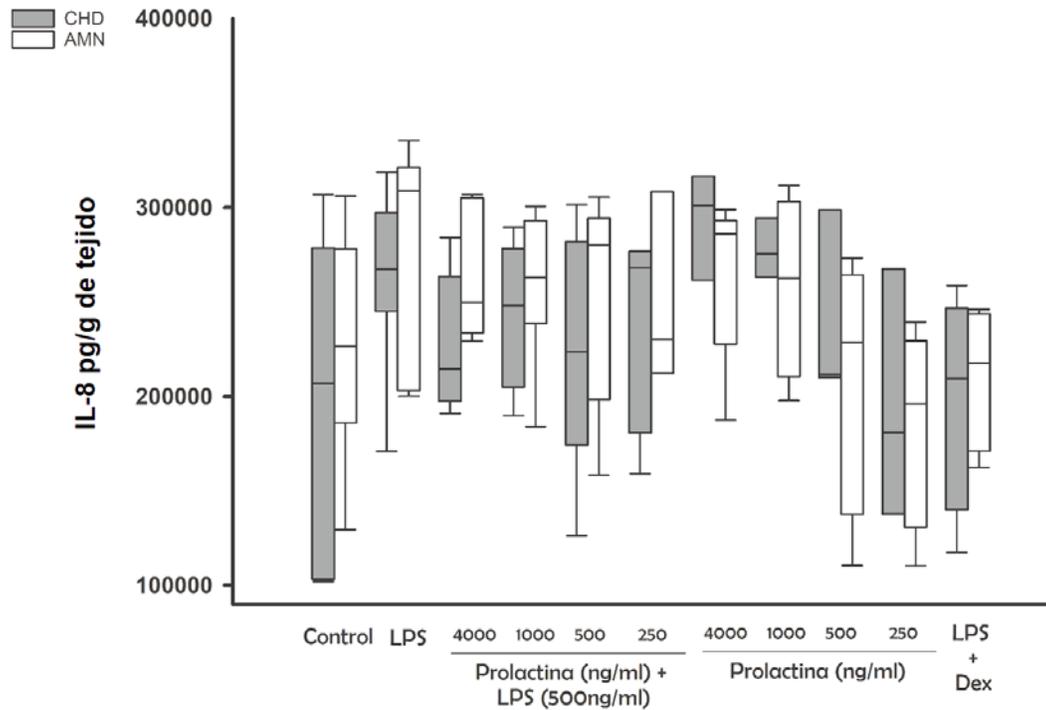


Figura 26. IL-8 secretada por la coriodecidua (CHD) y el amnios (AMN) en respuesta al co-tratamiento con LPS (*E. coli*) and human recombinant PRL. Dexametasona (Dex). Mediana con rango intercuantil. $n=9$ ensayos por triplicado.

2.3 Efecto de PRL sobre factores colagenolíticos.

Secreción de MMP-2. En ambas regiones de las membranas, la secreción basal de MMP-2 en el medio de cultivo fue similar. El estímulo con LPS no incrementó de manera significativa la secreción de esta endopeptidasa. El co-tratamiento de LPS con 4000 ng/ml de PRL disminuyó la secreción de MMP-2 en un 37% y un 62% en la coriodecidua y el amnios respectivamente. El tratamiento con las diferentes concentraciones de PRL en ausencia de LPS no modificó la secreción de MMP-2. El co-tratamiento con dexametasona mostró la tendencia a disminuir la secreción de MMP-2 inducida por el LPS en ambas regiones (Figura 27).

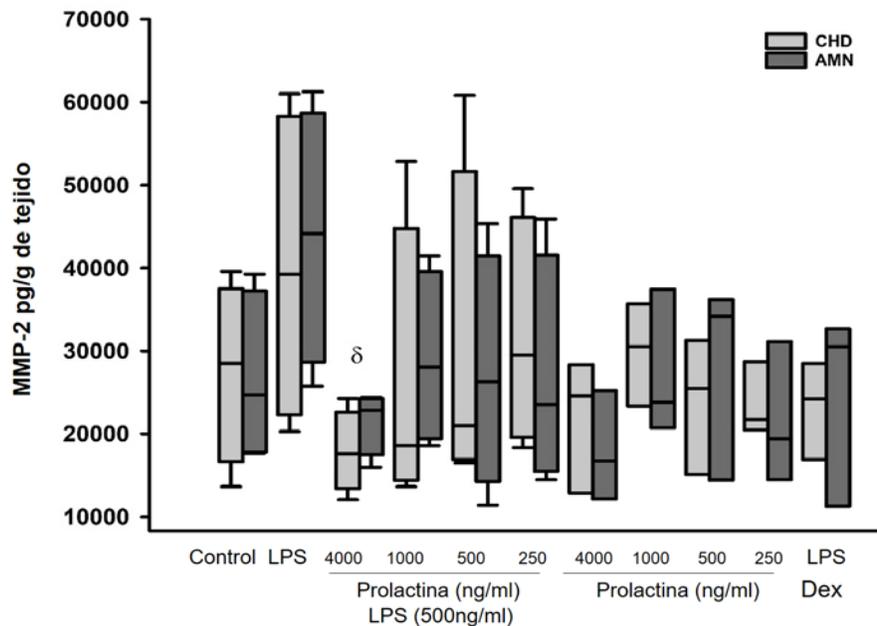


Figura 27. Secreción de MMP-2 en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: coriodecidua (CHD) y amnios (AMN) después del co-tratamiento con LPS (500ng/ml) y/o el tratamiento con diferentes concentraciones de PRL. Dexametasona (Dex). n=9 ensayos por triplicado. Mediana con rango intercuantil. $\delta p < 0.05$ vs. LPS.

Secreción de MMP-9. El estímulo coriodecidual con LPS incrementó significativamente 3 veces la secreción de MMP-9 en el corion y 2.5 veces en el amnios en comparación con la secreción basal en cada compartimento. La presencia de PRL de 4000 ng/ml y 250 ng/ml en el medio durante el co-tratamiento con LPS, disminuyó significativamente la secreción de MMP-9 en un 69% y un 75% en la coriodecidua respectivamente; en el epitelio amniótico 54% y 74% en el amnios. El tratamiento con dexametasona disminuyó de manera significativa la secreción de MMP-9 en un 70% en ambas regiones comparadas con el tratamiento con LPS (Figura 28).

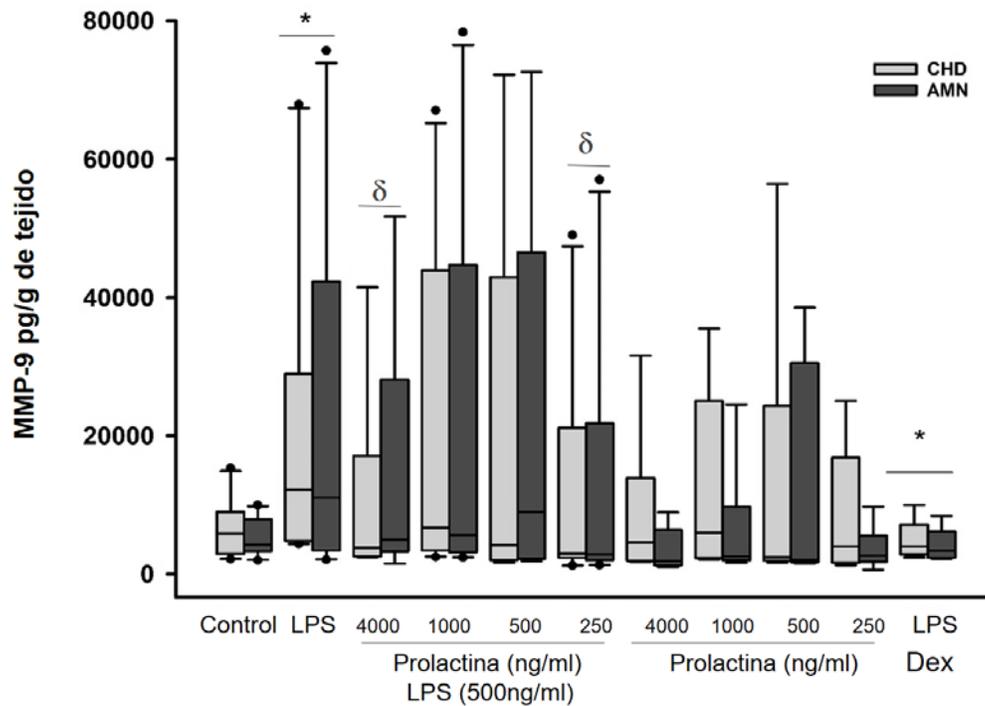


Figura 28. Efecto de la PRL sobre la secreción de MMP-9 en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: coriodecidua (CHD) y amnios (AMN) en respuesta al tratamiento con LPS (*E. coli*). Dexametasona (Dex). $n=6$ ensayos por triplicado. Mediana con rango intercuantil. * $p<0.05$ vs. control, $\delta p<0.05$ vs. LPS.

Determinación de MMP-9 activa en tejidos. Considerando que el sustrato de la MMP-9 se encuentra en la MEC de las membranas corioamnióticas, medimos los niveles de MMP-9 activa en los extractos de tejido utilizando un ensayo comercial de actividad tipo ELISA, los resultados mostraron que la concentración de MMP-9 fue mayor en la coriodecidua que en el amnios tanto a nivel basal como en respuesta a los tratamientos. El tratamiento con LPS incrementó significativamente 1.5 veces el valor de MMP-9 activa en la coriodecidua y el amnios respecto a sus basales. El co-tratamiento con 250 ng/ml de PRL disminuyó de forma significativa la concentración de la forma activa en la coriodecidua. El co-tratamiento con dexametasona también fue capaz de inhibir significativamente la forma activa de MMP-9 en comparación con el tratamiento de LPS (Figura 29).

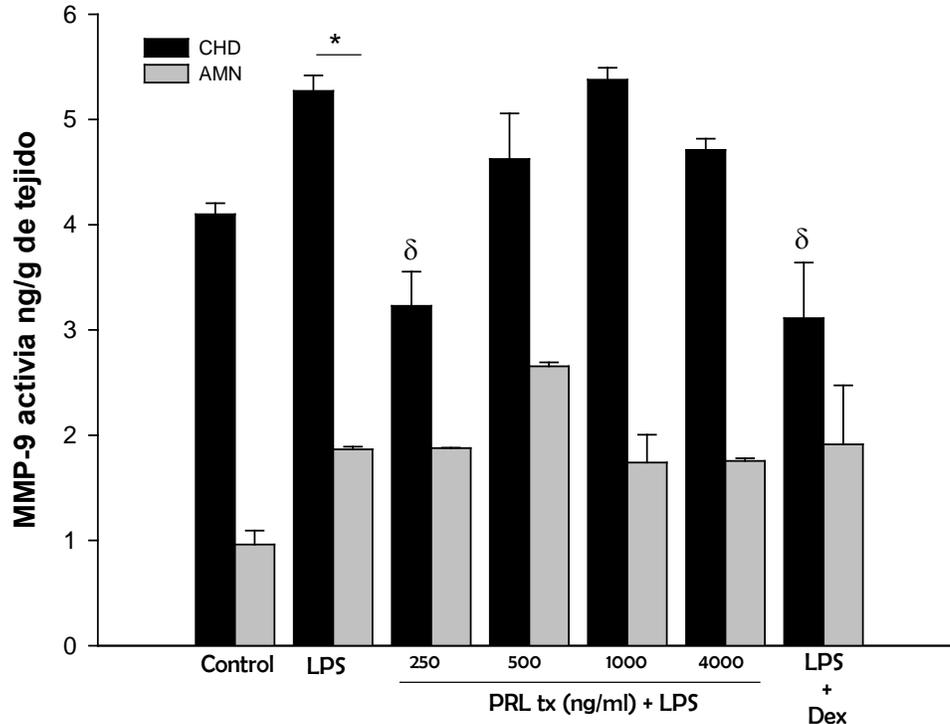


Figura 29. MMP-9 activa en extractos de tejido de cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: coriodecidua (CHD) y amnios (AMN) en respuesta al tratamiento con LPS (500ng/ml) y/o el tratamiento con diferentes concentraciones de PRL. Dexametasona (Dex). n=4 ensayos por duplicado. Promedio \pm error estándar. δ $p < 0.05$ vs. LPS

Secreción de MMP-1. La concentración de esta enzima secretada fue similar en ambas regiones de las membranas corioamnióticas. El estímulo con LPS resultó en un incremento de 2.3 veces mayor secreción de MMP-1 en el amnios en comparación con la secreción basal. El co-tratamiento de LPS con tres de las concentraciones de PRL (4000, 1000 y 250 ng/ml) fueron capaces disminuir la secreción de MMP-1 en el amnios en 51%, 55% y 48% respectivamente y en comparación con la secreción inducida por el LPS (Figura 30).

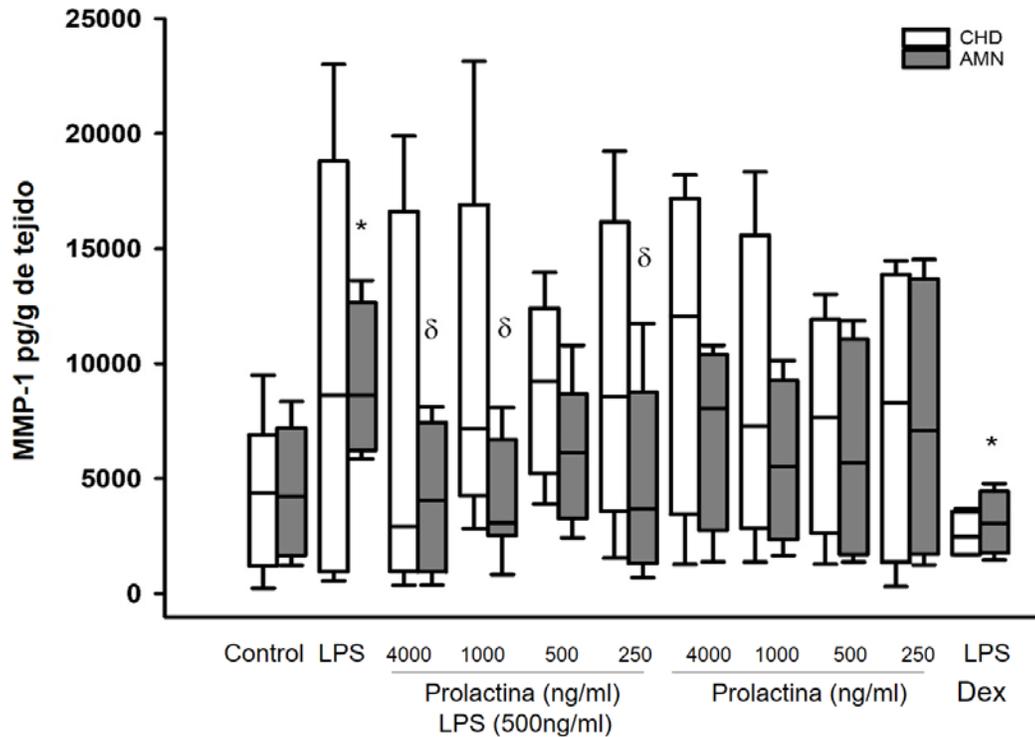


Figura 30. PRL inhibe la secreción de MMP-1 en el amnios (AMN) pero no en la coriodecidua (CHD) en respuesta al tratamiento con LPS (500ng/ml) y/o el tratamiento con diferentes concentraciones de PRL. Dexametasona (Dex). $n=9$ ensayos por triplicado. Mediana con rango intercuantil. * $p<0.05$ vs. control, $\delta p<0.05$ vs. LPS.

Secreción de MMP-13. La secreción de MMP-13 fue muy similar en ambos compartimientos, coriodecidua y amnios. El tratamiento con LPS mostró tendencia a incrementar la secreción de esta proteasa principalmente en el amnios. El co-tratamiento con LPS y las diferentes concentraciones de PRL no mostró tener un efecto sobre la secreción de MMP-13 en las membranas corioamnióticas. (Figura 31).

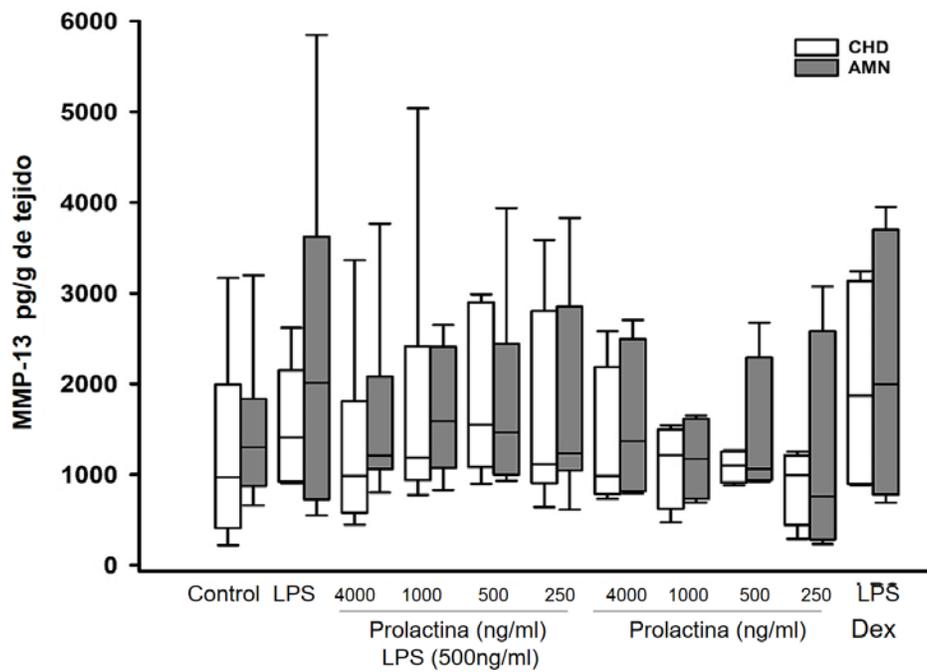


Figura 31. Determinación de la MMP-13 secretada al medio por cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: coriodecidua (CHD) y amnios (AMN) en respuesta al tratamiento con LPS (500ng/ml) y/o el tratamiento con diferentes concentraciones de PRL. Dex= Dexametasona. n=9 ensayos por triplicado. Mediana con rango intercuantil.

Secreción de TIMP-1 y TIMP-2. La secreción de TIMP-1 fue muy similar en ambas regiones de las membranas corioamnióticas y no mostró cambios en respuesta a los diferentes tratamientos. Por otro lado, TIMP-2 mostró valores moderadamente mayores en el amnios en comparación a la coriodecidual, sin embargo, tampoco se observó efecto de los tratamientos sobre la secreción de TIMP-2 (Tabla 4).

Secreción de TIMP-1 (pg/g de tejido)	Coriodecidual		Amnios	
	<i>M</i>	<i>DE</i>	<i>M</i>	<i>DE</i>
Control	7050	3070	7613	3155
LPS 500ng/ml	8038	2973	8120	3379
LPS + PRL 4000ng/ml	6079	2085	6141	1999
LPS + PRL 1000ng/ml	6109	2017	5876	1984
LPS + PRL 500ng/ml	6523	2556	6903	2647
LPS + PRL 250ng/ml	7335	2130	7084	2047
PRL 4000ng/ml	5553	2454	5854	2340
PRL 1000ng/ml	5664	1717	5600	1559
PRL 500ng/ml	5465	1151	5887	1505
PRL 250ng/ml	6195	463.8	6197	746.2
LPS + Dex 200nM	8074	2108	8802	1842
Secreción de TIMP-2 (pg/g de tejido)	Coriodecidual		Amnios	
	<i>M</i>	<i>DE</i>	<i>M</i>	<i>DE</i>
Control	113.5	149	200.5	94.62
LPS 500ng/ml	126.2	221.6	319	59.14
LPS + PRL 4000ng/ml	96.36	113.3	163.6	117.6
LPS + PRL 1000ng/ml	165.9	71.92	253	68.31
LPS + PRL 500ng/ml	90.98	236.9	310.1	50.62
LPS + PRL 250ng/ml	146.9	159.4	279.2	127.3
PRL 4000ng/ml	73.9	43.08	109	20.7
PRL 1000ng/ml	79.19	52.31	227.7	121.2
PRL 500ng/ml	87.55	30.1	221.3	127
PRL 250ng/ml	80.8	21.58	143.8	126.1
LPS + Dex 200nM	265.1	51.87	348.7	40.17

Tabla 4. Secreción *in vitro* de TIMP-1 y TIMP-2, cuantificada por ELISA en el medio de cultivo del compartimento coriodecidual y del compartimento amniótico. Media (M) y desviación estándar (DE) en los diferentes grupos experimentales.

VII. Discusión

El principal hallazgo de este estudio, fue el efecto modulador y selectivo de la PRL sobre los marcadores de inflamación, quimiotaxis y degradación de la matriz extracelular que fueron inducidos por el LPS, y que son secretados por las membranas corioamnióticas humanas durante el trabajo de parto (Tabla 5).

Tratamientos de las membranas corioamnióticas

	Control	LPS	LPS + PRL	PRL
Citocinas pro y anti-inflamatorias				
<i>TNF-α</i>	-	+++	++	-
<i>IL-1β</i>	+	+++	++	+
<i>IL-6</i>	+	+	+	+
<i>IL-10</i>	+	+++	+++	+
Quimiocinas				
<i>RANTES</i>	+	+++	+	+
<i>MCP-1</i>	++	+++	++	-
<i>MIP-1α</i>	+	+++	++	+
<i>IL-8</i>				
Metaloproteasas de matriz extracelular y sus inhibidores				
<i>MMP-2</i>	+	+	+	+
<i>MMP-9</i>	+	+++	++	+
<i>MMP-1</i>	+	++	+	+
<i>MMP-13</i>	+	+	+	+
<i>TIMP-1</i>	+	+	+	+
<i>TIMP-2</i>	+	+	+	+

Tabla 5. Efecto de los tratamientos sobre la secreción de marcadores de inflamación por las membranas corioamnióticas. (+) secreción leve, (++) secreción moderada, (+++) secreción intensa.

La regulación inmuno-endocrina en la interfase materno-fetal es clave para el establecimiento exitoso del embarazo, el mantenimiento del mismo hasta el momento en que el producto alcanza su óptimo desarrollo y para la acción en sincronía de los diferentes factores que determinan el trabajo de parto.

Si bien el trabajo de parto es un proceso que depende de múltiples factores, actualmente se reconoce que la característica principal de este evento es el encendido de un proceso inflamatorio mediado por la secreción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas que son potencialmente inductoras de las MMPs y PGs, factores que provocan cambios estructurales en las membranas corioamnióticas, el cérvix y el miometrio (Norman y cols., 2007).

La alta producción de PRL por la decidua materna durante el embarazo que contribuye a altos niveles de PRL presentes en el líquido amniótico, sugieren que esta hormona es participa en mantener o participa en la regulación del ambiente de privilegio inmunológico en la cavidad amniótica. De acuerdo con este supuesto, evidencias clínicas han demostrado que la disminución de PRL en el líquido amniótico se asocia con el inicio y la progresión del trabajo de parto (Kletzky y cols., 1985; Rigg y cols., 1977).

A pesar de que es ampliamente reconocido que el embarazo es una condición de hiperprolactinemia fisiológica, tanto a nivel sistémico como a nivel local en la interfase materno-fetal, los efectos inmuno-moduladores de esta hormona sobre los tejidos extraembrionarios particularmente no habían sido descritos hasta ahora.

Con el objetivo de determinar el efecto de la PRL en la respuesta pro-inflamatoria de las membranas corioamnióticas humanas, en el presente trabajo empleamos un modelo experimental de estimulación de la coriodecidua con LPS de *Escherichia Coli*, utilizando el sistema de cultivo de dos compartimentos independientes. Este modelo tiene como principal ventaja reproducir *in vitro* la función de estos tejidos durante el embarazo, separando el compartimiento materno del fetal, lo que nos permite estimular selectivamente y caracterizar de forma independiente la respuesta del compartimiento fetal o materno (Zaga y cols., 2004).

Los resultados de la validación del modelo, demostraron que el cultivo de las membranas corioamnióticas en este sistema se mantiene con actividad metabólica,

con integridad estructural y con capacidad funcional de responder a un estímulo como IL-1 β - induciendo la secreción de MMP-9, como se ha reportado en modelos animales (Vadillo-Ortega y cols., 2002), en conjunto estos resultados indican que este modelo mantiene la complejidad biológica y funcional de los tejidos *in vitro*.

Adicionalmente, también demostramos que las membranas corioamnióticas responden de manera diferencial al estímulo con LPS, ya que la secreción de las citocinas pro-inflamatorias es mayor en la región coriodecidual donde se aplica el estímulo, lo cual era esperado y es congruente con reportes previos donde se utilizó el mismo sistema infectando a las membranas corioamnióticas con patógenos asociados a la infección intrauterina como *S. agalactiae* (Zaga y cols., 2004), *E. coli* (Zaga y cols., 2007) y *G. vaginalis* (Zaga-Clavellina y cols., 2011).

Otro aspecto importante fue la determinación de la ED50 de LPS para tres de los marcadores biológicos más importantes durante el trabajo de parto normal o patológico, que son TNF- α , IL-1 β e IL-6. Diversos trabajos han demostrado la efectividad del LPS para inducir respuestas pro-inflamatorias, tanto en modelos animales de parto pre-término como en tejidos y células humanas; sin embargo, existe un amplio rango de la dosis utilizada sin considerar ningún criterio biológico que va desde 1 μ g hasta 1500 μ g/kg del peso del animal (Okawa T y cols., 2001; Xu D y cols., 2006; Harnett y cols., 2007) o desde 1pg/ml hasta 1000ng/ml o 1 μ g/ml (Fortunato y cols., 2001; Flores-Espinosa y cols., 2014).

Los reportes sobre la concentración de LPS en el líquido amniótico son pocos, en estos estudios los valores también presentan un amplio rango que va desde los 8.5 pg/ml hasta 47.51 ng/ml (Suda H y cols., 1996; Romero y cols., 1988), esta amplia variabilidad dificulta la elección de una concentración de endotoxina a utilizar de manera *in vitro* o experimental, que reproduzca la respuesta inflamatoria basándose en las condiciones *in vivo* ya que en estas condiciones se presenta un proceso infeccioso que no es objetivo de este trabajo simular. Considerando esto, los resultados de la ED50 de LPS en nuestro modelo demostraron que cada una de las

citocinas presenta una sensibilidad diferente al LPS y sustentan el uso de 500 ng/ml para inducir los tres marcadores pro-inflamatorios principales en las membranas corioamnióticas.

En los diferentes modelos animales se ha demostrado que un proceso de infección intrauterino induce un estado inflamatorio dirigido por la regulación temporal de la secreción de citocinas y PG's desde la placenta y las membranas corioamnióticas hacia el líquido amniótico (Gravett y cols., 1994; Dickinson y cols., 2009; Grigsby y cols., 2010). Los niveles de IL-6 son considerados como el mejor indicador de un proceso infeccioso subclínico que genera una inflamación asintomática (Cobo y cols., 2009), mientras que en estos modelos se ha demostrado que TNF- α es la primer citocina secretada hacia el líquido amniótico, seguida por IL-1 β , siendo ambas indicadores de un proceso infeccioso que correlaciona no solo con la presencia de microorganismos dentro de la cavidad amniótica, sino también con la generación de los mecanismos del trabajo de parto (Gravett y cols., 1994, Dickinson y cols., 2009; Grigsby y cols., 2010); de manera similar nuestro estudio demostró que el estímulo con LPS de las membranas corioamnióticas induce una respuesta inflamatoria encabezada por la secreción de TNF- α y reforzada por la secreción de IL-1 β , lo que indica que es un modelo eficiente para reproducir un proceso biológico de manera *in vitro*.

Adicionalmente, los niveles de IL-1 β encontrados en el compartimiento del amnios son resultado de la difusión de citocinas a través de las membranas como fue descrito experimentalmente por Kent y cols., (1994). Evidencia experimental de nuestro laboratorio ha demostrado que el amnios es incapaz de secretar IL-1 β (Flores-Espinosa y cols., 2014) y esto se explica porque la coriodecidua es la única región de las membranas corioamnióticas donde se expresa el RNAm de esta citocina (Menon y cols., 1995). En este sentido nuestros resultados apoyan la idea de que existe un mecanismo de señalización y transporte en las membranas que les permite responder de manera coordinada y cooperativa.

Ahora bien, en este modelo experimental, concentraciones de PRL similares a las presentes en el líquido amniótico durante el segundo trimestre del embarazo, ejercieron un efecto anti-inflamatorio sobre las membranas corioamnióticas. Esta inmunosupresión de la PRL sobre la secreción de TNF- α e IL-1 β inducida por LPS no se ha descrito en otros tejidos; sin embargo, nuestros resultados son congruentes con observaciones previas de nuestro laboratorio en donde la PRL es capaz de mantener inhibida la expresión de TNF- α e IL-1 β a nivel de ARNm en membranas corioamnióticas a término (Zaga y cols., 2014). Se ha visto, que en macrófagos y linfocitos, la PRL incrementa la secreción de TNF- α (Brand y cols., 2004), lo cual indica que la PRL tiene efectos que son tejido específicos y además selectivos, ya que TNF- α fue más resistente al efecto regulador de la PRL, mientras que IL-1 β fue más sensible y regulada por todas las concentraciones de PRL utilizadas en el estudio.

TNF- α es una citocina que ejerce acciones citotóxicas a nivel celular, tisular y sistémico. TNF- α es un inductor de apoptosis en las membranas corioamnióticas, este proceso de muerte celular se ha asociado a la pérdida estructural y la fuerza de tensión de las membranas corioamnióticas durante el trabajo de parto normal y patológico (Fortunato y cols., 2003; Menon y cols., 2002). Los efectos pro-apoptóticos de TNF- α no solo se observan en las membranas corioamnióticas, sino que se extienden a la placenta y la decidua (Leroy et al. 2017).

IL-1 β es un modulador inflamatorio clave de la cascada pro-inflamatoria del trabajo de parto a término (Chao y cols., 1994). Sin embargo, también se ha reportado incremento en el nivel de esta citocina en procesos patológicos como el parto pre-término, la inflamación estéril y la ruptura prematura de membranas (Gómez-López y cols., 2017).

Por otro lado, nuestros resultados no indicaron un efecto regulador de la PRL sobre la secreción de IL-6 en el modelo que utilizamos. Este resultado puede explicarse porque esta citocina es secretada en altas concentraciones por las membranas

corioamnióticas en condiciones basales de edad gestacional a término, lo cual es congruente con su uso como marcador de inflamación estéril, además se sabe que esta citocina puede ser inducida por TNF- α e IL-1 β , como parte de un complejo sistema de regulación. En contraste, la inhibición de IL-6 por PRL se ha demostrado en células deciduales de rata (Martínez-Neriy cols., 2015) y modelos animales de trauma hemorrágico (Knörfel y cols., 2000).

IL-10 fue caracterizada en un inicio como una citocina con funciones anti-inflamatorias, si bien la evidencia experimental y clínica indica que en el embarazo esta citocina actúa como una molécula reguladora dependiendo de las condiciones del ambiente inmunológico (Denison y cols., 1998; Robertson y cols., 2006). El incremento de IL-10 en estos tejidos en respuesta al co-tratamiento con P4 y LPS, sugiere que es un mecanismo que favorece la protección del producto durante un proceso pro-inflamatorio (Zaga-Clavellina y cols., 2014). De manera similar, la PRL mostró una tendencia a incrementar la síntesis de IL-10 en las membranas corioamnióticas, este hecho sugiere que la PRL favorece los mecanismos compensatorios para acotar los efectos inflamatorios derivados de las altas concentraciones de TNF- α e IL-1 β en las membranas corioamnióticas. Resultados similares se han reportado en macrófagos, en los cuales la PRL indujo la secreción de IL-10 (Brand y cols., 2004; Matalka y cols., 2003). De manera contraria en un modelo murino de inflamación crónica se observó que el tratamiento con altas concentraciones de PRL incrementó la secreción de IL-10 para mediar el proceso pro-inflamatorio (Sodhi A y Tripathi A, 2008).

El hecho de que la PRL sea capaz de regular TNF- α , IL-1 β e IL-10 en las membranas corioamnióticas durante una respuesta inflamatoria resulta relevante, ya que sugiere la importancia de esta hormona en la regulación del ambiente en la interfase materno-fetal cuando este es alterado y representa un riesgo para la tolerancia hacia el feto, así la PRL estaría siendo un elemento capaz de mantener un equilibrio entre un ambiente pro-inflamatorio y anti-inflamatorio, ya que en

ausencia de un reto inmunológico en el modelo utilizado, el co-tratamiento con PRL no indujo ningún cambio.

Además de las citocinas, durante un proceso inflamatorio las quimiocinas juegan un papel importante en la pérdida del privilegio inmunológico, ya que estas atraen a células profesionales del sistema inmune, principalmente neutrófilos, monocitos y leucocitos desde la circulación periférica materna hacia los tejidos gestacionales. Durante el embarazo estas células profesionales del sistema inmune se encuentran ausentes o en baja proporción en la interfase materno-fetal; sin embargo, se ha demostrado que la placenta, la decidua y las membranas corioamnióticas secretan estos factores quimioatrayentes durante un el trabajo de parto a término, pre término y durante un proceso de invasión microbiana de la cavidad amniótica, lo que incrementa el número de células profesionales del sistema inmune en este compartimento que, si bien actúan como una segunda ola de defensa, también causan la intensificación del ambiente pro-inflamatorio (Hamilton y cols., 2013).

En este trabajo se midieron cuatro quimiocinas principales: RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-8, ya que estudios clínicos han reportado que se encuentran elevadas en el líquido amniótico durante el trabajo de parto y el parto pretérmino (Dudley, 1996; Hamilton y cols., 2013; Esplin y cols., 2005). La importancia de estas moléculas radica en el hecho de que no solo actúan como mediadores del tráfico celular selectivo, sino también funcionan como efectores locales, induciendo la activación de las diferentes estirpes celulares, favoreciendo la degranulación, la adhesión celular endotelial y la citotoxicidad de éstas (Fraccaroli y cols., 2009; Rollis y cols., 1991).

Nuestro estudio reveló que existe un perfil diferente en cuanto a la secreción de estas quimiocinas en cada uno de los compartimentos de las membranas corioamnióticas, si bien, no podemos descartar que una vez secretadas estas quimiocinas tengan acciones paracrinas, resulta interesante, que en el compartimento del amnios la concentración de MCP-1 fue mayor con respecto a la

coriodecidua. MCP-1 es el principal quimioatrayente de monocitos, el nivel de esta quimiocina en el líquido amniótico se ha correlacionado con invasión microbiana dentro de la cavidad amniótica (Jacobson y cols., 2003), una función relevante en este sentido es la capacidad que tiene MCP-1 para estimular el estallido respiratorio necesario para la activación de los macrófagos, desencadenando la liberación de formas reactivas del oxígeno (Rollis y cols., 1991) y de este modo favorecer el proceso de fagocitosis de los patógenos que se encuentran en el líquido amniótico.

En este modelo de inflamación coriodecidual, el LPS indujo la secreción de MCP-1 en el amnios, lo cual también ha sido reportado en placenta (García-Ruíz y cols., 2015). Por otro lado, la PRL inhibió la secreción de esta quimiocina inducida por LPS al medio de cultivo, lo que no se había descrito previamente en las membranas corioamnióticas o en la placenta. En otros modelos se han reportado efectos reguladores de la PRL sobre las quimiocinas, por ejemplo la PRL en una concentración de 100ng/ml incrementó el reclutamiento de células inmunes a través de la glándula mamaria y la estimulación de la producción de MCP-1 y CXCL-1 por las células epiteliales, para favorecer el desarrollo de dicha glándula y la protección del feto durante la lactancia (Dil R y Walker AM, 2017). En un modelo murino de inflamación crónica, se observó que la PRL a bajas concentraciones induce la secreción de MCP-1, mientras que concentraciones altas (1000ng/ml) disminuyen la secreción de MCP-1 (Sodhi A y Tripathi A, 2008).

En lo que respecta a MIP-1 α cuya función es reclutar a macrófagos a los sitios de inflamación, nuestros resultados mostraron que tanto el amnios como la coriodecidua secretaron esta quimiocina en respuesta al LPS. Esto también fue reportado en explantes de placenta (García-Ruíz y cols., 2015) y en células mononucleares aisladas de sangre placentaria (Preciado-Martínez y cols, 20017). Si bien en el líquido amniótico los picos de esta quimiocina se encuentran correlacionados con la dilatación cervical (Dudley y cols., 1996a), la mayor detección a nivel de ARNm en las membranas corioamnióticas y el líquido amniótico se encuentra asociado a procesos de corioamnionitis crónica, un proceso

inflamatorio de las membranas corioamnióticas que a nivel histológico se caracteriza por el aumento de la infiltración de neutrófilos, el desarrollo de necrosis y engrosamiento del tejido conectivo de las membranas, inducido como parte de la respuesta a una infección y que como consecuencia puede ocasionar la ruptura de las membranas (Kim y cols., 2010). Adicionalmente el nivel de MIP-1 α y, el número de neutrófilos y leucocitos en el líquido amniótico mostraron una alta correlación, lo cual sugiere que entre sus funciones también se encuentra el tropismo de neutrófilos tanto de origen materno, como fetal a las membranas corioamnióticas y al cordón umbilical, lo que sugiere su participación en los procesos de inflamación sistémica en el feto, que al recibir señales de daño y estrés, promueven la secreción de cortisol, lo cual también estimula la cascada inflamatoria. (Kim y cols., 2015).

En este modelo, la PRL disminuyó la secreción de MIP-1 α tanto en la coriodecidua como en el amnios, no hay reportes similares en la literatura en modelos de reproducción; sin embargo, en macrófagos peritoneales se observó que la PRL en una concentración de 100ng/ml indujo la secreción de MIP-1 α (Sodhi A y Tripathi A, 2008).

En relación a RANTES, nuestro trabajo demostró que esta quimiocina fue principalmente secretada por la coriodecidua, incrementando su secreción con el estímulo de LPS. Los receptores de esta quimiocina se encuentran principalmente en los linfocitos T, en basófilos y eosinófilos, pero también se han encontrado en células uNK, siendo estas células una de las principales fuentes de RANTES durante la regulación de la respuesta inflamatoria, así como en el reclutamiento de linfocitos T y macrófagos en el sitio de implantación al inicio del embarazo (Hanna J 2006). Se ha encontrado que esta quimiocina, con alta capacidad de atraer linfocitos T, se incrementa en sangre materna durante un proceso infeccioso, así como también en líquido amniótico (Kin y cols., 2010), estas células al llegar a un ambiente pro-inflamatorio son inducidas a activarse y producir citocinas pro-inflamatorias, de hecho, se ha propuesto como un indicador predictivo de parto pretérmino, en conjunto con el nivel de IL-10 presente (Tsiarasy cols., 2012).

Por otro lado, no existen reportes del efecto de la PRL sobre la secreción de RANTES en las membranas corioamnióticas, la placenta o la decidua. Así pues, resultan muy relevantes los resultados que observamos en el modelo, ya que el hecho de que la PRL pueda disminuir la secreción de quimiocinas en la interfase materno-fetal, sugiere su participación en impedir la infiltración de leucocitos atraídos por esta quimiocina y por lo tanto el mantenimiento de un ambiente compatible con la continuidad del embarazo (Yamamoto y cols., 2000; Alam y cols., 1992; Bischoff y cols., 1992).

Finalmente, determinamos la secreción de IL-8, el principal atrayente de neutrófilos hacia la interfase materno fetal durante el trabajo de parto hacia los tejidos extraembrionarios: placenta y membranas corioamnióticas. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la secreción de IL-8 en respuesta a LPS o PRL, la explicación de este resultado puede estar relacionada con la alta secreción de IL-8 en condiciones control, que podría estar asociada con la edad gestacional de los tejidos. Se ha observado que a lo largo del embarazo la cantidad de neutrófilos incrementa conforme se acerca el trabajo de parto en la cavidad amniótica (Gómez-López N y cols., 2017). En relación con el efecto de la PRL sobre la secreción de IL-8, se demostró que en la línea celular de monocitos humanos THP-1, el pretratamiento con PRL incrementó la liberación de IL-8 en respuesta a la estimulación con LPS o porinas (D'Isanto M y cols., 2004); lo que sugiere un efecto de la PRL sobre la respuesta inflamatoria que es tejido específico.

La importancia del incremento desmedido de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas recae en el hecho de que estos elementos son el eje rector de un conjunto de factores efectores sintetizados tanto por las células del sistema inmune que son atraídos hacia la cavidad intrauterina como por los mismos tejidos de la interfase materno-fetal como las MMPs que alteran la estructura y función de las membranas corioamnióticas (Zaga y cols., 2007).

Entre las MMPs que están asociadas al trabajo de parto, se encuentran la MMP-2 y MMP-9 con actividad gelatinasa. Específicamente estas enzimas degradan las fibras de colágena tipo IV que dan soporte a la estructura de las membranas corioamnióticas. En nuestros resultados, la forma total de MMP-2 y MMP-9 secretada al medio fue similar en ambas regiones de las membranas corioamnióticas.

El papel de la MMP-2 durante el embarazo en condiciones normales o patológicas es discutible, esta es la gelatinasa más abundante en el líquido amniótico (Riley y cols., 1999) y de hecho se considera que MMP-2 es secretada de manera constitutiva por las membranas corioamnióticas, aunque en procesos infecciosos o inflamatorios pueden inducir un incremento en su producción. Al respecto, evidencias experimentales han demostrado que la secreción y actividad de esta enzima es inducible por LPS (Fortunato y cols, 2000; Zaga y cols.,2004), lo cual es similar a lo que observamos en este trabajo.

Por otro lado, MMP-9, es inducida por factores pro-inflamatorios en las membranas corioamnióticas (Meisser, A. et al., 1999; Weiss, A. et al., 2007). De manera similar, nosotros observamos que el estímulo con LPS induce mayor secreción de MMP-9 por ambas regiones de las membranas corioamnióticas, la mayoría de los estudios clínicos han informado cambios en el nivel de MMP-9 en suero, líquido amniótico y membranas fetales durante el embarazo pre-término, sugiriendo a esta enzima como un marcador de trabajo de parto pre-término en lavados vaginales (McLaren J y cols., 2000); Li, W. et al., 2010). Además, se ha descrito que una fuente adicional de MMP-9 en estos tejidos son los leucocitos placentarios que incrementan en número durante el trabajo de parto (Flores-Pliego, A. et al., 2013).

MMP-1 y MMP-13, dos miembros más de la familia de MMPs con actividad colagenasa sobre las fibras de colágena tipo I, II, III, VII y sobre los proteoglicanos y fibronectina, se han relacionado con la remodelación de los tejidos durante el parto pretérmino. El incremento de MMP-1 conocida también como colagenasa I en el

líquido amniótico correlacionó con pacientes que desarrollaron ruptura prematura de membranas asociada o no a procesos de infección (Maymon y cols., 2000), en muestras de lavados vaginales resultó un marcador con alta sensibilidad para predecir ruptura prematura de membranas y corioamnionitis, en conjunto con MMP-13 (Soydinc y cols., 2013).

En nuestros resultados, el estímulo con LPS indujo la secreción de MMP-1 en el amnios, pero no de MMP-13, el hecho de que sea el amnios quien muestre una mayor secreción de MMP-1 es acorde con el origen de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular y su distribución de las membranas corioamnióticas, en este sentido las colágenas tipo I y III se encuentran principalmente en las capas que componen al amnios y están prácticamente ausentes en la capa de trofoblastos de la coriodecidua; mientras que colágena tipo IV, se encuentra como el componente determinante de la membrana basal del epitelio amniótico, pero también en la red que encapsula a los trofoblastos del corion (Malak y cols., 1993). Adicionalmente, las células mesenquimales presentes en las capas intermedias del amnios y la coriodecidua son las principales productoras de estos componentes estructurales (Casey y cols., 1996). Es interesante que solo la concentración más baja de PRL disminuya la secreción de MMP-9 en la coriodecidua, mientras que todas las concentraciones de PRL disminuyen la secreción de MMP-1 en el amnios.

Los inhibidores tisulares de las MMPs están involucrados en la coordinación y balance de la remodelación de la matriz extracelular de los tejidos, inhiben la actividad de las MMPs al unirse en los sitios activos de estas. Se han descrito cuatro miembros de la familia de TIMPs en el humano; de los cuales, TIMP-1, y TIMP-2 son los más estudiados. En nuestro trabajo, determinamos la secreción de TIMP-1 y TIMP-2 en las membranas corioamnióticas. Como primer resultado observamos que tanto el corion como el amnios secretan valores similares de TIMP-1, mientras que el estímulo con LPS no mostró cambios en el nivel de TIMP-1, lo cual coincide con otros reportes previos en los que TIMP-1 no se modifica en placenta y

membranas corioamnióticas después de la estimulación con LPS (Vicent ZL y cols., 2015; Garcia-Lopez G y cols., 2007; Fortunato SJ, 2001, Zaga-Clavellina y cols., 2011). En relación con los valores de TIMP-2 determinados en nuestro estudio, se observa que estos son ligeramente mayores en el compartimento del amnios que en la coriodecidua, de manera similar a lo descrito por nuestro grupo (Zaga-Clavellina y cols., 2011), el tratamiento de las membranas corioamnióticas con LPS o *E. coli* incrementa la secreción de MMP-9 y MMP-2, sin modificar TIMP-1 ni TIMP-2 (Zaga-Clavellina y cols., 2011).

Por otro lado, la PRL no modificó la secreción de estos inhibidores tisulares producidos por las membranas corioamnióticas. Contrario a esto, evidencias experimentales han demostrado que la PRL es un regulador positivo de la expresión del ARNm y la actividad de TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 en células de la granulosa de manera dependiente de la concentración durante el ciclo ovárico (Murray y cols., 1996).

TIMP-1 regula la actividad colagenolítica de MMP-9, que como se mencionó anteriormente es el encargado de degradar la colágena tipo VI, que es el componente más importante en mantener la estructura, y por ende la función de las membranas corioamnióticas, mientras que TIMP-2 tiene una alta afinidad por MMP-2 que es un componente que se encuentra en varias de las capas que componen los tejidos. Nuestros resultados sugieren que las altas concentraciones de PRL en el líquido amniótico pudieran estar asociadas con el mantenimiento de la estructura mediante el equilibrio entre la secreción de MMP-9/TIMP-1 y MMP-2/TIMP-2 con la finalidad de mantener la organización de la matriz extracelular que da a las membranas corioamnióticas sus capacidades de resistencia mecánica.

Durante el embarazo las altas concentraciones de PRL que se alcanzan alrededor del segundo trimestre del embarazo, coinciden con el momento en que todos los tejidos, tanto materno como fetales, se encuentran en un ambiente que favorece la respuesta anti-inflamatoria. Estos resultados son congruentes con el efecto

reportado en células del sistema inmune, donde concentraciones altas de PRL inhiben la actividad de células NK y células T (Hinterberger-Fischer y cols., 2000; Matera y cols., 2000).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la PRL en concentraciones presentes durante el segundo trimestre del embarazo (aprox. 4000ng/ml) ejerce efectos inmunoreguladores que favorecen un perfil anti-inflamatorio, regulando además los factores quimiotácticos y favoreciendo la homeostasis del proceso de degradación tisular en las membranas corioamnióticas, ayudando a mantener la continuidad del embarazo. Sin embargo, también indican que la PRL parece tener capacidad limitada y selectiva para regular la respuesta inmunológica en los tejidos extraembrionarios, de modo que resulta interesante evaluar un posible papel efector de la PRL en presencia de otras condiciones que alteran el ambiente inmunológico como una infección (Figura 32). Evidentemente, se necesita profundizar en cada una de las vías a través de las cuales la PRL está ejerciendo estos múltiples efectos reguladores de la respuesta inmunológica de las membranas, así como no podemos descartar que, si bien el modelo que usamos tiene la ventaja de darnos una respuesta integral del tejido, también representa una complejidad mayor en cuanto a la interpretación de la respuesta observada.

La comprensión de los mecanismos fisiológicos que determinan el establecimiento del privilegio inmunológico durante el embarazo y los mecanismos que encienden y dirigen el trabajo de parto continúa siendo una prioridad para entender los mecanismos que subyacen al trabajo de parto fisiológico y para prevenir y mejorar la atención de patologías obstétricas.

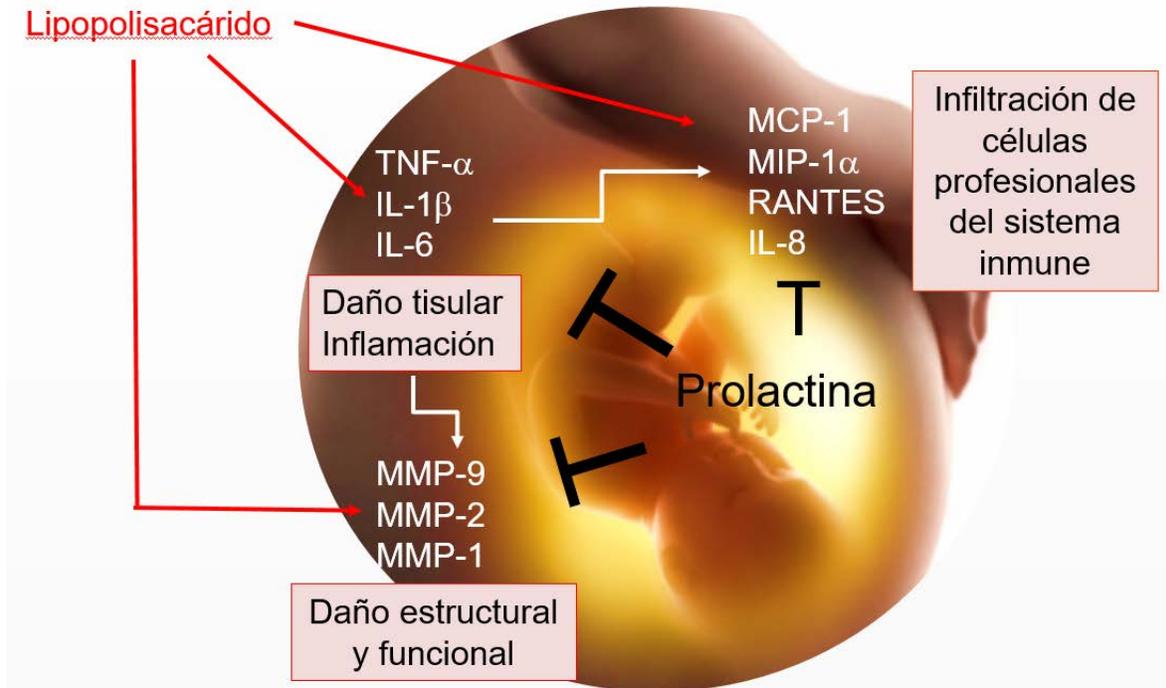


Figura 32. Esquema representativo del efecto protector de la PRL. Las altas concentraciones de PRL en la interfase materno fetal, regula la respuesta inmune de las membranas corioamnióticas frente a un reto inmunológico como lo es el LPS, disminuyendo la secreción de factores de inflamación y por lo tanto evita el daño estructural y funcional de estos tejidos.

VIII. Conclusión

En relación al efecto de la PRL sobre la respuesta inmunológica de las membranas corioamnióticas, podemos decir de forma general que los resultados de este trabajo sustentan que esta hormona a concentraciones similares a las presentes en el líquido amniótico durante el segundo trimestre de la gestación, es capaz de inhibir la secreción de moduladores pro-inflamatorios, quimiotácticos y pro-degradativos asociados al inicio y progresión del trabajo de parto, siendo parte de las estrategias que favorecen el mantenimiento del ambiente de tolerancia y privilegio inmunológico de la cavidad amniótica durante el embarazo.

IX. Literatura citada

1. Adams Waldorf KM, Persing D, Novy MJ, Sadowsky DW, Gravett MG. (2008). Pretreatment with toll-like receptor 4 antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced preterm uterine contractility, cytokines, and prostaglandins in rhesus monkeys. *Reproductive Science*. 15(2):121-7.
2. Allport, V. C., Pieber, D., Slater, D. M., Newton, R., White, J. O., Bennett, P. R. (2001). Human labour is associated with nuclear factor- κ B activity which mediates cyclo-oxygenase-2 expression and is involved with the 'functional progesterone withdrawal'. *Molecular Human Reproduction*. 7 (6), 581-586.
3. Athayde N, Romero R, Maymon E, Gomez R, Pacora P, Araneda H, Yoon BH. (1999). A role for the novel cytokine RANTES in pregnancy and parturition. *American journal of obstetrics and gynecology* Oct; 181(4):989-94.
4. Bao, L., Tessier, C., Prigent-Tessier, A., Li, F., Buzzio, O. L., Callegari, E. A., Gibori, G. (2007). Decidual prolactin silences the expression of genes detrimental to pregnancy. *Endocrinology*, 148(5), 2326-2334.
5. Benirschke, K., Kaufmann, P., & Baergen, R. N. (2006) Pathology of the Human Placenta. Springer. New York.
6. Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L., & Steinmetz, R. W. (1996). Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine reviews*, 17(6), 639-669.
7. Bernard V, Young J, Chanson P, Binart N. (2015) New insights in prolactin: pathological implications.
8. *Nat Rev Endocrinol*.11(5):265-75.
9. Bryant-Greenwood, G. D. (1998). The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta*, 19 (1), 1-11.
10. Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. (2002). Cytokines of the placenta and extraplacental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta*. 23:257-273.
11. Casey ML, MacDonald PC. (1996). Síntesis intersticial de colágeno y el procesamiento en amnios humano: una propiedad de las células mesenquimales. *Biology of Reproduction*. 55 (6): 1253-60.
12. Challis, J. R., Matthews, S. G., Gibb, W., & Lye, S. J. (2000). Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocrine reviews*, 21(5), 514-550.
13. Cobo T, Palacio M, Navarro-Sastre A, Ribes A, Bosch J, Filella X, Gratacós E. (2009). Predictive value of combined amniotic fluid proteomic biomarkers and interleukin-6 in preterm labor with intact membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 200(5):499.e1-6.

14. Denison FC1, Kelly RW, Calder AA, Riley SC. (1998). Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. *Human Reproduction*. 13(12):3560-5.
15. Devi YS, Halperin J. (2014). Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 25;382(1):400-410.
16. Elovitz, M. A., & Mrinalini, C. (2004). Animal models of preterm birth. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15(10), 479-487.
17. Esplin MS, Peltier MR, Hamblin S, Smith S, Fausett MB, Dildy GA, Branch DW, Silver RM, Adashi EY. (2005). Monocyte chemotactic protein-1 expression is increased in human gestational tissues during term and preterm labor. *Placenta*. 26(8-9):661-71.
18. Fortunato SJ, Menon R. (2003). IL-1 beta is a better inducer of apoptosis in human fetal membranes than IL-6. *Placenta*. 24(10):922-8.
19. Fukamatsu Y, Tomita K, Fukuta T.(1984). Further evidence of prolactin production from human decidua and its transport across fetal membrane. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 17(6):309-316.
20. Gomez-Lopez, N., Romero, R., Xu, Y., Leng, Y., Garcia-Flores, V., Miller, D. & Alhousseini, A. (2017). Are amniotic fluid neutrophils in women with intraamniotic infection and/or inflammation of fetal or maternal origin? *American journal of obstetrics and gynecology*, 217(6), 693-e1.
21. Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, Edwards JL, Cook MJ, Novy MJ. (1994). An experimental model for intraamniotic infection and preterm labor in rhesus monkeys. *American journal of obstetrics and gynecology*. 171(6):1660-7.
22. Gravett MG, Haluska GJ, Cook MJ, Novy MJ. (1996). Fetal and maternal endocrine responses to experimental intrauterine infection in rhesus monkeys. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1996 Jun;174(6):1725-31; discussion 1731-3.
23. Grigsby PL1, Novy MJ, Adams Waldorf KM, Sadowsky DW, Gravett MG. (2010). Choriondecidual inflammation: a harbinger of the preterm labor syndrome. *Reproductive Sciences*. 17(1):85-94. Epub 2009 Oct 20.
24. Goffin V, Kelly PA. (1996). Prolactin and growth hormone receptors. *Clinical Endocrinology*. 45:247–255.
25. Han YM, Romero R, Kim JS. (2008). Region-specific gene expression profiling: novel evidence for biological heterogeneity of the human amnion. *Biology of Reproduction*. 79:954–961.
26. Handwerger S, Markoff E, Richards R. (1991). Regulation of the synthesis and release of decidual prolactin by placental and autocrine/paracrine factors. *Placenta*. 12(2):121-130.

27. Hamilton SA, Tower CL, Jones RL. (2013). Identification of chemokines associated with the recruitment of decidual leukocytes in human labour: potential novel targets for preterm labour. *PLoS One*. 8(2):e56946.
28. Harirah H, Donia SE, Hsu CD. (2002). Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 and interleukin-6 in predicting intra-amniotic infection. *Obstetrics & Gynecology*. 99(1):80-4.
29. Hinterberger-Fischer M, Ogris E, Kier P, Bauer K, Kittl E, Habertheuer KH, Ruckser R, Schmid A, Selleny S, Fangl M, Sebesta C, Hinterberger W. (2000). Elevation of plasma prolactin in patients undergoing autologous blood stem-cell transplantation for breast cancer: is its modulation a step toward posttransplant immunotherapy? *American Journal of Clinical Oncology*. 23(4):325-9.
30. Hoffmann, T, Penel C, Ronin C. (1993). Glycosylation of human prolactin regulates hormone bioactivity and metabolic clearance. *Journal of endocrinological investigation*, 16(10), 807-816.
31. Hunt S.J. Stranger in a strange land. (2006). *Immunological Reviews*. 213:36-47.
32. Jacobsson B, Holst RM, Wennerholm UB. (2003). Monocytechemotactic protein-1 in cervical and amniotic fluid: relation-ship to microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery. *American journal of obstetrics and gynecology*. 189:1161–11677.
33. Kanda N, Watanabe S. (2007). Prolactin enhances interferon-gamma-induced production of CXC ligand 9 (CXCL9), CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes. *Endocrinology*. 148(5):2317-25.
34. Kane NM, Jones M, Brosens JJ, Kelly RW, Saunders PT, Critchley HO. (2010). TGFβ1 attenuates expression of prolactin and IGFBP-1 in decidualized endometrial stromal cells by both SMAD-dependent and SMADindependent pathways. *PLoS One*. 24;5(9):e12970.
35. Keelan, J. A., Coleman, M., & Mitchell, M. D. (1997). The molecular mechanisms of term and preterm labor: recent progress and clinical implications. *Clinical obstetrics and gynecology*. 40(3), 460-478.
36. Kim, Y. M., Romero, R., Chaiworapongsa, T., Kim, G. J., Kim, M. R., Kuivaniemi, H. & Mor, G. (2004). Toll-like receptor-2 and-4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *American journal of obstetrics and gynecology*, 191(4), 1346-1355.
37. Kim, C. J., Romero, R., Chaemsaitong, P., Chaiyasit, N., Yoon, B. H., & Kim, Y. M. (2015). Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance. *American journal of obstetrics and gynecology*, 213(4), S29-S52.
38. Kilarski WM, Hongpaisan J, Semik D, Roomans GM. (2000). Effect of progesterone and oestradiol on expression of connexin43 in cultured human myometrium cells. *Folia HistochemCytobiol*. 38(1):3-9.

39. Kombé A, Sirois J, Goff AK. (2003). Prolonged progesterone treatment of endometrial epithelial cells modifies the effect of estradiol on their sensitivity to oxytocin. *Steroids*. 68(7-8):651-8.
40. Lee D. W., & Markoff, E. (1986). Synthesis and Release of Glycosylated Prolactin by Human Decidua in Vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 62(5), 990-994.
41. Lindström TM, Bennett PR. (2005). The role of nuclear factor kappa B in human labour. *Reproduction*. 130(5):569-81.
42. Maaskant RA1, Bogic LV, Gilger S, Kelly PA, Bryant-Greenwood GD. (1996). The human prolactin receptor in the fetal membranes, decidua, and placenta. *J ClinEndocrinolMetab*. 81(1):396-405.
43. Maintz L, Schwarzer V, Bieber T, van der Ven K, Novak N; Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy: a critical review, *Human Reproduction Update*, Volume 14, Issue 5, 1 September 2008, Pages 485–495.
44. Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalglish R, Bright N, Macvicar J.(1993). Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta*. 14(4):385–406
45. Matera L1, Mori M, Geuna M, Buttiglieri S, Palestro G. (2000). Prolactin in autoimmunity and antitumor defence. *J Neuroimmunol*. 1;109(1):47-55.
46. Magness RR, Phernetton TM, Gibson TC, Chen DB. (2005). Uterine blood flow responses to ICI 182 780 in ovariectomized oestradiol-17beta-treated, intact follicular and pregnant sheep. *J Physiol*. 565(Pt 1):71–83.
47. Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ. (2002). TNF-alpha promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet*. 19(4):201-4.
48. Maslar, i. a., Kaplan, b. m., Luciano, a. a., & Riddick, d. h. (1980). Prolactin production by the endometrium of early human pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 51(1), 78-83.
49. Mazor, M., Hershkovitz, R., Chaim, W., Levy, J., Sharony, Y., Leiberman, J. R., & Glezerman, M. (1994). Human preterm birth is associated with systemic and local changes in progesterone/17β-estradiol ratios. *American journal of obstetrics and gynecology*, 171(1), 231-236.
50. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi M-T, Bianco K, Ghezzi F, Yoon BH. (2000). Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) in preterm premature rupture of membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 183:914–920.

51. McCoshen JA, Tagger OY, Wodzicki A, Tyson JE. (1982). Choriodecidual adhesion promotes decidual prolactin transport by human fetal membrane. *Am J Physiol.* Nov;243(5):R552-7.
52. Mesiano, S., Chan, E. C., Fitter, J. T., Kwek, K., Yeo, G., & Smith, R. (2002). Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(6), 2924-2930.
53. Meuris S, Svoboda M, Christophe J, Robyn C. (1985). Evidence for a glycosylated prolactin variant in human pituitary and amniotic fluid. In: MacLeod RM, Thorner MO, eds. *Prolactin, basic and clinical correlates*. Padora: Livana Press. 487-493.
54. Miller MF, Loch-Caruso R. (2010). Comparison of LPS-stimulated release of cytokines in punch versus transwell tissue culture systems of human gestational membranes. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*. 8:121.
55. Murtha AP, Auten R, Herbert WN. Apoptosis in the chorionlaeve of term patients with histologic chorioamnionitis. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2002;10(2):93-6.
56. Murray, S. C. Keeble, K. N. Muse, and T. E. Curry, Jr. (1996). Regulation of granulosa cell-derived ovarian metalloproteinase inhibitor(s) by prolactin *J ReprodFertil* 107 (1) 103-108.
57. Norman, J. E., Bollapragada, S., Yuan, M., & Nelson, S. M. (2007). Inflammatory pathways in the mechanism of parturition. *BMC pregnancy and childbirth*, 7(1), S7.
58. Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA, Norman JE. (2003). Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod*. 9(1):41-5
59. Parry, S., & Strauss, J. F. (1998). Premature rupture of the fetal membranes. *New England Journal of Medicine*, 338(10), 663-670.
60. Pellegrini I, Gunz G, Ronin C, Fenouillet E, Peyrat JP, Delori P, Jaquet P. (1988). Polymorphism of Prolactin Secreted by Human Prolactinoma Cells: Immunological, Receptor Binding, and Biological Properties of the Glycosylated and Nonglycosylated Forms. *Endocrinology*, 122(6), 2667-2674.
61. Pihoker C, Feeney RJ, Su JL, Handwerger S. (1991). Lipocortin-I inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells: evidence for autocrine/paracrine regulation by lipocortin-I. *Endocrinology*. 128(2):1123-1128.
62. Pioli, P. A., Amiel, E., Schaefer, T. M., Connolly, J. E., Wira, C. R., & Guyre, P. M. (2004). Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract. *Infection and immunity*, 72(10), 5799-5806.
63. Ravanos K, Dagklis T, Petousis S, Margioula-Siarkou C, Prapas Y, Prapas N. (2015). Factors implicated in the initiation of human parturition in term and preterm labor: a review. *Gynecol Endocrinol*, 31(9):679-83.

64. Rigg LA, Yen SS. (1977). Multiphasic prolactin secretion during parturition in human subjects. *American journal of obstetrics and gynecology*. 128(2):215-8.
65. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, Cerami A. (1989). Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *American journal of obstetrics and gynecology*. 161(2):336-41.
66. Romero R, Mazor M, Munoz H. (1994). The preterm labor syndrome. *Ann NY Acad Sci*. 734:414–29.
67. Romero, R., Dey, S. K., & Fisher, S. J. (2014). Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*, 345(6198), 760-765.
68. Stefanoska, I., Vićovac, L. (2008). Expression of prolactin receptors in the human extra villous cytotrophoblast cell line HTR-8/SVNEO. *Archives of Biological Sciences*, 60(4), 519-524.
69. Stefanoska, I., Krivokuća, M. J., Vasilijić, S., Čujić, D., Vićovac, L. (2013). Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro. *Placenta*, 34(9), 775-783.
70. Soares, Michael J. (2007). The prolactin family: effectors of pregnancy-dependent adaptations. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, Volume 18 , Issue 3 , 114 – 121.
71. Soydinc, H. E., Sak, M. E., Evliyaoglu, O., Evsen, M. S., Turgut, A., Özler, A., Gul, T.(2013). Prolidase, matrix metalloproteinases 1 and 13 activity, oxidative-antioxidative status as a marker of preterm premature rupture of membranes and chorioamnionitis in maternal vaginal washing fluids. *International journal of medical sciences*. 10(10), 1344.
72. Spencer, T. E., & Bazer, F. W. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 49.
73. Tan D, Walker AM. (2010). Short form 1b human prolactin receptor down-regulates expression of the long form. *Journal of molecular endocrinology*, 44(3), 187-194.
74. Thomas S, Fisher KH, Snowden JA, Danson SJ, Brown S, Zeidler MP. (2015). Methotrexate Is a JAK/STAT Pathway Inhibitor. *PLoS One*. 1;10(7):e0130078.
75. Timmons, B., Akins, M., & Mahendroo, M. (2010). Cervical remodeling during pregnancy and parturition. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(6), 353-361.
76. Tsiartas P, Holst RM, Wennerholm UB. (2012). Prediction of spontaneous preterm delivery in women with threatened preterm labour: a prospective cohort study of multiple proteins in maternal serum. *BJOG* 119(7), 866–873.
77. Tyson JE, McCoshen JA, Dubin NH. (1985). Inhibition of fetal membrane prostaglandin production by prolactin: relative importance in the initiation of labor. *Am J Obstet Gynecol*. 15;151(8):1032-1038

78. Vadillo-Ortega F, Sadowsky DW, Haluska GJ, Hernandez-Guerrero C, Guevara-Silva R, Gravett MG, Novy MJ. (2002). Identification of matrix metalloproteinase-9 in amniotic fluid and amniochorion in spontaneous labor and after experimental intrauterine infection or interleukin-1 beta infusion in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol.* 186(1):128-38.
79. Vega-Sanchez, R., Gomez-Lopez, N., Flores-Pliego, A., Clemente-Galvan, S., Estrada-Gutierrez, G., Zentella-Dehesa, A. & Vadillo-Ortega, F. (2010). Placental blood leukocytes are functional and phenotypically different than peripheral leukocytes during human labor. *Journal of reproductive immunology*, 84(1), 100-110.
80. Vicovac LM, Starkey PM, Aplin JD. (1994). Comment: effect of cytokines on prolactin production by human decidual stromal cells in culture: studies using cells freed of bone marrow-derived contaminants. *J Clin Endocrinol Metab.* 79(6):1877-1882.
81. Watanabe, K., Kessler, C. A., Bachurski, C. J., Kanda, Y., Richardson, B. D., Stanek, J., Brar, A. K. (2001). Identification of a decidua-specific enhancer on the human prolactin gene with two critical activator protein 1 (AP-1) binding sites. *Molecular Endocrinology*, 15(4), 638-653.
82. Weiss A, Goldman S, Shalev E. (2007). The matrix metalloproteinases (MMPS) in the decidua and fetal membranes. *Front Biosci.* 1;12:649-59.
83. Wu Wx, Brooks J, Glasier AF, McNeilly AS. (1995). The relationship between decidualization and prolactin mRNA and production at different stages of human pregnancy. *J MolEndocrinol.* 14(2):255-61.
84. Yellon SM, Ebner CA, Elovitz MA. (2009). Medroxyprogesterone acetate modulates remodeling, immune cell census, and nerve fibers in the cervix of a mouse model for inflammation-induced preterm birth. *Reprod Sci.* 2009 Mar;16(3):257-64.
85. Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, Espejel-Nuñez A, Flores-Pliego A, Soriano-Becerril D, Maida-Claros R, Merchant-Larios H, Vadillo-Ortega F. (2007). In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with *Escherichia coli* in human fetal membranes. *ReprodBiolEndocrinol.* 13;5:46.
86. Zaga-Clavellina V, Parra-Covarrubias A, Ramirez-Peredo J, Vega-Sanchez R, Vadillo-Ortega F. (2014). The potential role of prolactin as a modulator of the secretion of proinflammatory mediators in chorioamniotic membranes in term human gestation. *American journal of obstetrics and gynecology.* 211(1):48.e1-6.

Apéndice

Artículo requisito de egreso para obtener el grado de Doctora en Ciencias.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2017.09.004>



Selective immuno-modulatory effect of prolactin upon pro-inflammatory response in human fetal membranes



Pilar Flores-Espinosa^a, Eduardo Preciado-Martínez^a, Araceli Mejía-Salvador^a, Gabriela Sedano-González^a, Luisa Bermejo-Martínez^a, Adalberto Parra-Covarruvias^b, Guadalupe Estrada-Gutiérrez^a, Rodrigo Vega-Sánchez^c, Isabel Méndez^d, Braulio Quesada-Reyna^e, Andrea Olmos-Ortiz^a, Veronica Zaga-Clavellina^a

^a Immunobiochemistry Branch, Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes, Mexico City, 11000, Mexico

^b Endocrinology Branch, Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes, Mexico City, 11000, Mexico

^c Nutrition and Bioprogramation Branch, Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes, Mexico City, 11000, Mexico

^d Cellular and Molecular Neurobiology Branch, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, 76230, Mexico

^e Gynecology-Obstetric Division, Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4, Luis Castelazo Ayala (HGOLCA), Mexico City, 06720, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Prolactin
Maternal-fetal interface
Chorioamniotic membranes
Choriodecidual inflammation
Immunomodulation

ABSTRACT

During pregnancy, prolactin (PRL) is a neuro-immuno-cytokine that contributes actively to the crosstalk between the immune and endocrine systems and, thus, to the creation of an immune-privileged milieu. This work aims to analyze the capacity of PRL to modulate the synthesis and secretion of pro-inflammatory markers associated with labor. Studies were conducted using human fetal membranes at term mounted in a model of two in-dependent chambers. The choriodecidual region was stimulated with 500-ng/mL lipopolysaccharide (LPS), and the amnion and choriodecidual region were co-simulated with different concentrations of PRL that can arise during pregnancy: 250, 500, 1000, and 4000 ng/mL. Following these co-treatments, the tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-10 levels were measured in both compartments. As expected, treatment with LPS induced all cytokines to increase. Co-stimulation with the highest tested concentration of PRL induced significant decreases in TNF- α in the choriodecidual region and IL-1 β in both regions of the fetal membranes. PRL did not modify the IL-6 and IL-10 secretion profile. These findings, coupled with clinical evidence, suggest that the high level of PRL in the amniotic cavity is involved the mechanism by which the fetal-placental unit regulates the equilibrium between pro- and anti-inflammatory modulators.

1. Introduction

Successful pregnancy is the result of multiple immuno-endocrine strategies that permit the mother and fetus to co-exist (Hunt, 2006). At the end of gestation, the initiation and progression of parturition constitute one of the most complex and fundamental reproductive events; however, despite experimental, clinical, and epidemiological evidence, this process remains relatively poorly understood.

The onset of labor requires a switch from an anti-inflammatory state to an active pro-inflammatory environment (Norman et al., 2007). The levels of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β , tumor

necrosis factor (TNF)- α , and IL-6 increase significantly (El-Azzamy et al., 2017). These cytokines upregulate the secretion of effector factors, such as prostaglandins (PGs) that end uterine quiescence and extracellular matrix-degrading enzymes that deeply modify the structure and function of the cervix and fetal membranes (Phillips et al., 2014).

Prolactin (PRL) is a pleiotropic neuroendocrine hormone whose immunomodulatory functions have been associated with multiple processes, including metabolism, lactation, and cell proliferation (Goffin et al., 2002). Although PRL is produced by lactotrophs in the anterior pituitary, multiple extra-pituitary tissues can also produce PRL; during pregnancy, the main source of this hormone is the maternal decidua

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; cDNA, complementary DNA; Dex, dexamethasone; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DNase, deoxyribonuclease; ED50, 50% effective dose; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; GADPH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL, interleukin; JAK2, Janus kinase 2; LPS, lipopolysaccharide; MMP, matrix metalloprotease; Mtx, methotrexate; NAD(P)H, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PCR, polymerase chain reaction; PG, prostaglandin; PRL, prolactin; STAT5, signal transducers and activators of transcription 5; TER, transepithelial electrical resistance; TNF, tumor necrosis factor; XTT, 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

Corresponding author at: Instituto Nacional de Perinatología, Montes Urales 800, Lomas Virreyes, México City 11000, Mexico. E-mail addresses: v.zagaclavellina@gmail.com, veronica.zaga@inper.gob.mx (V. Zaga-Clavellina).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2017.09.004>

Received 23 June 2017; Received in revised form 6 September 2017; Accepted 13 September 2017
0165-0378/© 2017 Published by Elsevier Ireland Ltd.

(Wu et al., 1995).

During pregnancy the fetal membranes constitute a selective barrier that isolates and protects the fetus. Evidence suggests that decidual PRL is actively transported through fetal membranes into the amniotic fluid and plays a crucial role in the regulation of electrolytes and amniotic fluid osmolarity and volume; these factors have been directly related to tissue integrity, elasticity, and structural continuity (Josimovich and Archer, 1977; Golander et al., 1978; Lavery and Miller, 1977; McCoshen et al., 1982; Wu et al., 1991).

In normal gestation, the amniotic levels of PRL increase from 33 ng/mL at 14 weeks of gestation to 3000–4000 ng/mL at 18–26 weeks of gestation (Kletzky et al., 1985) and then decline to 300–500 ng/mL at the beginning of labor (Rigg and Yen, 1977).

The pattern of decidual PRL secretion, its compartmentalized synthesis and accumulation in the amniotic cavity (Golander et al., 1978), and the coincidence of the lowest level with the first signs of labor support the possibility that this hormone plays an important physiological role in the maintenance of pregnancy and acts as a mediator of the initiation of labor.

Examples of the evidence supporting the role of PRL in gestation include the following: 1) Low endometrial levels of PRL have been associated with spontaneous miscarriage and implantation failure (Garzia et al., 2004; Garzia et al., 2013). 2) Low levels of PRL in the amniotic fluid are associated with preterm labor (Luciano and Varner, 1984). 3) PRL and PRL receptor knockout mice develop infertility associated with implantation failure (Grosdemouge et al., 2003). 4) PRL inhibits PGE₂ and PGF₂α in uterine cells (Prigent-Tessier et al., 1996) and human fetal membranes (Tyson et al., 1995). 5) PRL stimulates human trophoblast migration and invasion (Stefanoska et al., 2013). 6) PRL inhibits the *in vitro* basal secretion of IL-1β, TNF-α, and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by human fetal membranes (Zaga-Clavellina et al., 2014a,b). 7) In a murine model, PRL was found to exert a protective effect in controlling the development of infection-associated preterm birth (Abhichandani et al., 2011).

These antecedents permit us to hypothesize that the accumulation of high concentrations of decidual PRL in the amniotic cavity is involved in the immunomodulatory mechanisms used by the fetal-placental unit to control inflammatory reactions that could negatively affect the continuity of gestation. The present work was designed to determine whether PRL can contribute to maintaining the immune equilibrium of pro- and anti-inflammatory modulators. To this end, we developed an *ex vivo* experimental model of human chorioamniotic membranes. In this model, we induced a choriodecidual inflammation (a real scenario during labor) and analyzed the effects of co-stimulation with different concentrations of PRL upon the secretion of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-10.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

PRL was purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA), lipopolysaccharide (LPS; from *Escherichia coli* 055:B5) was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Alin is a commercial formulation of dex-amethasone (Dex) that was purchased from Chino Laboratories (Mexico City, Mexico). Trixilem is a commercial formulation of methotrexate (Mtx) from Teva Laboratories (Toluca, Estado Mexico, Mexico).

2.2. Patient recruitment and biological sample collection

This project was approved by the Human Ethics, Biosecurity and Research Committees of the Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes (INPer IER-212250-3210-21205-01-15) in Mexico City. All patients provided informed, written consent one day before undergoing elective cesarean section at term (37–39 weeks of

pregnancy) with no evidence of active labor, cervical dilatation, or loss of mucus plug.

Indications for elective cesarean section included short intergenetic period, previous elective cesarean section, and breech presentation. Patients with antecedents of cervicovaginal infection, chronic hypertension, diabetes mellitus, preeclampsia, cardiac or renal insufficiency, or other systemic illnesses were not included in this study (Table S1).

Chorioamniotic membranes were collected from nine healthy patients attending the Department of Obstetrics and Gynecology of INPer. The patients were Mexican, between 20 and 38 years old, with normal, uncomplicated, singleton pregnancies.

Once the chorioamniotic membranes were dissected from the placenta, they were transported to the laboratory in sterile Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco BRL, Bethesda, MD, USA) supplemented with 1 × antibiotic-antimycotic solution (100-U/mL penicillin and 100-μg/mL streptomycin) (Gibco BRL). To preclude the presence of chorioamniotic infection, microbial analyses were conducted, and only infection-free placentas were used for this study.

2.3. Two-independent-compartment culture system

The two-compartment tissue culture system was previously validated and reported by our group (Zaga et al., 2004). Under sterile conditions, explants from different regions of the membranes were manually cut out, mounted in a transwell frame (Costar, New York, NY, USA), affixed by elastic latex bands, and placed in a 12-well tissue culture plate. In this model, the upper chamber is delimited by the choriodecidual region, and the lower chamber is delimited by the amnion.

2.3.1. Metabolic viability of explants

To guarantee the viability of the tissues, once the chorioamniotic membranes were mounted in the transwell model, the metabolic viability was measured using the colorimetric 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) assay (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

The yellow tetrazolium salt XTT is cleaved to orange formazan by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NAD(P)H) bioreduction, which occurs only in viable cells. The assay was performed in both amniotic and choriodecidual compartments after every 24 h of culture for 4 days (n = 3).

2.3.2. Structural viability

The tissue integrity of the chorioamniotic membranes was evaluated by measuring the transepithelial electrical resistance (TER). The membranes were cultured in two-independent-compartment system for 4 days, and then, the tissues were unmounted from the transwell and placed between the two Lucite chambers of a Ussing chamber. A current pulse of 20 μA was applied to the maternal side, and the voltage deflection of the amniotic side was monitored every 24 h during the culture (n = 3).

2.3.3. Functional viability

To demonstrate that the chorioamniotic membranes are immunologically responsive, the tissues were stimulated with 1 ng/mL recombinant human IL-1β (Peprotech). The level of MMP-9 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the culture medium recovered from both compartments separately after 2, 24, 48, and 72 h of continuous stimulus (Vadillo-Ortega et al., 2002) (n = 3).

2.4. PRL and PRL receptor messenger expression patterns

The expression of PRL and PRL receptor mRNA was evaluated by real-time polymerase chain reaction (PCR) in both the amnion and choriodecidual region. After culturing for different times, the total RNA

was isolated with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) from choriodecidua and amnion separately. Following treatment with 1 U of DNase (AMPD1, Sigma-Aldrich), cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA using the Thermo Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany). For relative quantification, real-time PCR was performed from 1 μ L of cDNA in a final reaction volume of 10 μ L in a Light Cycler 2.0 instrument using specific primers (200 nM) and hybridization probes (100 nM) for mRNA sequences designed by TIBMOLBIOL (Table S2). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a reference gene for normalization. The real-time PCR conditions were as follows: one cycle at 95 °C for 5 min; 45 cycles of denaturation (95 °C, 10 s), annealing (57–60 °C, 10 s), and extension (72 °C, 15 s); one cycle of melting (95 °C, 20 s; 40 °C, 20 s; 85 °C, 0 s; slope: 0.2 °C/s); and finally, one cycle of cooling (4 °C, 2 min).

2.5. Temporal secretion profile

We characterized the secretion profiles of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 after stimulation with LPS (500 ng/mL). For the purpose, explants with diameters of 14 mm were cultured and stimulated with endotoxin after 24 h of culture. A time-curve was constructed using the data collected at 2, 4, 8, 24, 26, 28, 32, 48, 72, and 96 h.

2.6. Median effective dose (ED₅₀) of LPS

The ED₅₀ of LPS for inflammation in our model was determined by treating the membranes with different concentrations of LPS (0.1, 1.0, 50, 250, 500, and 1000 ng/mL) for 24 h. The effects of this treatment on the secretion profiles of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were evaluated by ELISA.

2.7. Chorioamniotic membrane co-stimulation with PRL

The mounted explants were placed in a 12-well tissue culture plate (Costar) and incubated in 5% CO₂ at 37 °C. Then, 1 mL of DMEM containing 10% FBS without red phenol and supplemented with heat-inactivated and hormone-free 0.2% lacto albumin hydrolyzate, 1-mM sodium pyruvate, and 1 \times antibiotic-antimycotic solution (100-U/ml penicillin and 100- μ g/mL streptomycin) (DMEM-FBS) (Gibco BRL) was added to each side of the chamber (n = 9).

To mimic in vivo conditions, both fetal and maternal compartments were incubated in the presence of different concentrations (250, 500, 1000, and 4000 ng/mL) of PRL. After 24 h, the medium was replaced, and the compartment delimited by the choriodecidua region was stimulated with 500-ng/mL LPS (Sigma) for 24 h. The controls included an incubation with DMEM only, treatments with different concentrations of PRL in the absence of LPS, and an additional co-treatment with LPS and Dex.

Following the different co-treatments, the culture media from both compartments were collected, aliquoted, and stored at -70 °C until assay. All tissues were weighed to normalize the secretion of cytokines.

We also performed a set of experiments in which the chorioamniotic membranes were exposed to LPS plus 4000-ng/mL PRL and 50- μ M Mtx, which is an inhibitor of the Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducers and activators of transcription 5 (STAT5) canonical pathway transduction signal for PRL (Thomas et al., 2015).

2.8. Cytokine quantitation by ELISA

The concentrations of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 in the cell culture supernatants from both the amniotic and choriodecidua compartments were determined by sandwich ELISA using human specific duo-set kits according to the manufacturer's instructions (Table S3). The colorimetric reaction was measured at 450 nm with a correction at 540 nm. The final levels were determined by a comparison to a standard curve.

2.9. Statistical analyses

Descriptive statistics (mean, standard deviation, standard error, median, and range) were obtained for each variable. The data distribution was tested for normality using Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. Non-parametric analysis of variance (ANOVA) and Kruskal-Wallis tests were used to analyze the differences among groups; P values < 0.05 were considered statistically significant in several time course analyses. ED₅₀ values were calculated from the dose-response curve of LPS using Prism 5 Computer Software (GraphPad, San Diego, CA, USA). To analyze the results of PRL co-treatment, Student's t-test was used to compare groups when the data were normally distributed, whereas the Mann-Whitney U test was used when the data were not normally distributed. In every case, P values < 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS 17 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

3. Results

3.1. Experimental model validation

To ensure that the chorioamniotic membranes were maintained as active functional units, we tested a variety of biological parameters. The results revealed that the tissue viability, amnion compartment, and choriodecidua compartment did not change after 5 days of culture. Additionally, the TER values of the chorioamniotic membranes did not vary during the culture period, suggesting that the tissue maintained its structural integrity (data not shown). Results indicating that the only tissue that expressed PRL mRNA during the 96-h culture was the choriodecidua region. Furthermore, the culture conditions did not modify the expression pattern of PRL receptor mRNA in either the amnion or choriodecidua region.

We also demonstrated that continuously stimulating the membranes with IL-1 β led to significant increases in the levels of MMP-9 secreted into the culture medium. Indeed, the secretion of MMP-9 increased 2-fold after 48 h of stimulation in both the choriodecidua and amnion relative to the control, which supports that this tissue is immunologically responsive.

The results of the ED₅₀ dose-response curve showed that the effective dose of LPS needed to induce the secretion of each marker is different. Low concentrations of LPS induced the secretion of IL-6, whose ED₅₀ (28.72 ng/mL) was 4-fold lower than that required to induce IL-1 β secretion (ED₅₀ = 133.4-ng/mL LPS) and 19-fold lower than that required to induce TNF- α secretion (ED₅₀ = 571.3-ng/mL LPS). Given that TNF- α and IL-1 β can trigger preterm labor (Sadowsky et al., 2006), we chose the LPS dose of 500 ng/mL for co-treatments with PRL. Additionally the secretion profiles of these pro-inflammatory markers in response to 500-ng/mL LPS revealed that the secretion of TNF- α increases 6-fold compared to the control after 4 h of stimulus, reaching a maximum peak at 24 h (Fig. S2 A). IL-1 β increased later than TNF- α —8 h after the stimulus—reached its maximum peak at 72 h (Fig. S2 B). On the other hand, the basal release of IL-6 in the control increased during the culture and peaked 48 h after the stimulus, in contrast, when LPS was present, the level of this cytokine increased 1.2-fold (Fig. S2 C).

3.2. TNF- α and IL-1 β were significantly downregulated in fetal membranes under co-treatment with LPS and PRL

Compared with their respective controls, the choriodecidua and amniotic regions were both highly responsive to 500-ng/mL LPS and exhibited 18-fold and 15-fold increases in TNF- α , respectively.

The results present herein indicate that co-treatment with a high concentration of PRL is the most effective method to significantly decrease the LPS-induced secretion of TNF- α , especially in the choriodecidua. Compared with LPS stimulus alone, co-treatment with 4000-ng/mL PRL decreased the TNF- α level by 67% and 54% in the

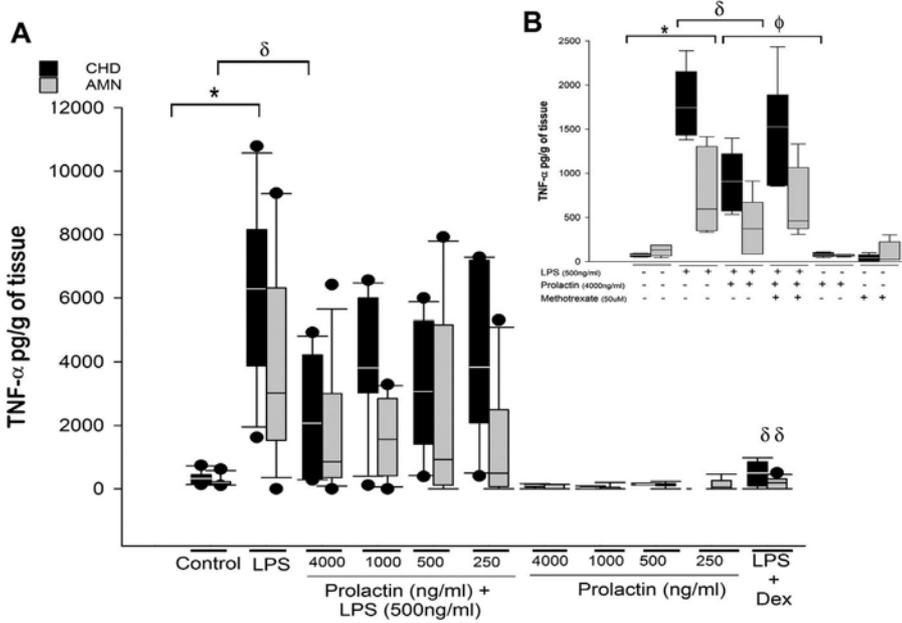


Fig. 1. TNF- α secretion by choriodecidua (CHD) and amnion (AMN) in response to different treatments in the culture model. The production of TNF- α was measured at 48 h after treatments. Bars show mean values of triplicates + SE of nine independent experiments. * $p < 0.001$ vs. control, δ $p < 0.05$ vs. LPS alone, ϕ $p < 0.05$ vs. LPS + PRL.

choriodecidua and amnion, respectively (Fig. 1A). Co-treatment with LPS plus 1000-, 500-, and 250-ng/mL PRL tended to decrease TNF- α secretion in the amnion, co-treatment with Mtx reversed the PRL downregulation of this cytokine (Fig. 1B).

Similarly, stimulation with LPS significantly enhanced IL-1 β secretion by 6-fold in the choriodecidua and 5.6-fold in the amnion relative to the control. Co-treatment with LPS and PRL (4000, 1000, 500, and 250 ng/mL) significantly downregulated this cytokine in both the choriodecidua (55%) and amnion (46%) (Fig. 2). Compared to the control, the effects of PRL alone did not differ in either region of the chorioamniotic membrane.

3.3. IL-6 was not regulated in chorioamniotic membranes under co-treatment with LPS and PRL

In contrast, LPS resulted in an increasing trend of IL-6 in both compartments compared with the control, whereas PRL co-treatment exerted no effect on IL-6 in the choriodecidua or amnion (Fig. 3).

3.4. IL-10 was upregulated in chorioamniotic membranes under co-treatment with LPS and PRL

Stimulus with LPS induced significant, 2-fold increases in this cy-tokine in both the choriodecidua and amnion compared with the control. Interestingly, co-treatment with LPS and PRL (4000, 1000, 500, and 250 ng/mL) did not modified the IL-10 secretion pattern. In contrast, treatment with PRL alone led to similar basal levels of IL-10 secretion in both regions of the chorioamniotic membrane (Fig. 4).

Dexamethasone treatment was used as a control of anti-inflammation; the intention was to make sure that the membranes were re-sponsive to an anti-inflammatory stimulus; in comparison with LPS alone, the effect of Dexamethasone was significant for all analytes.

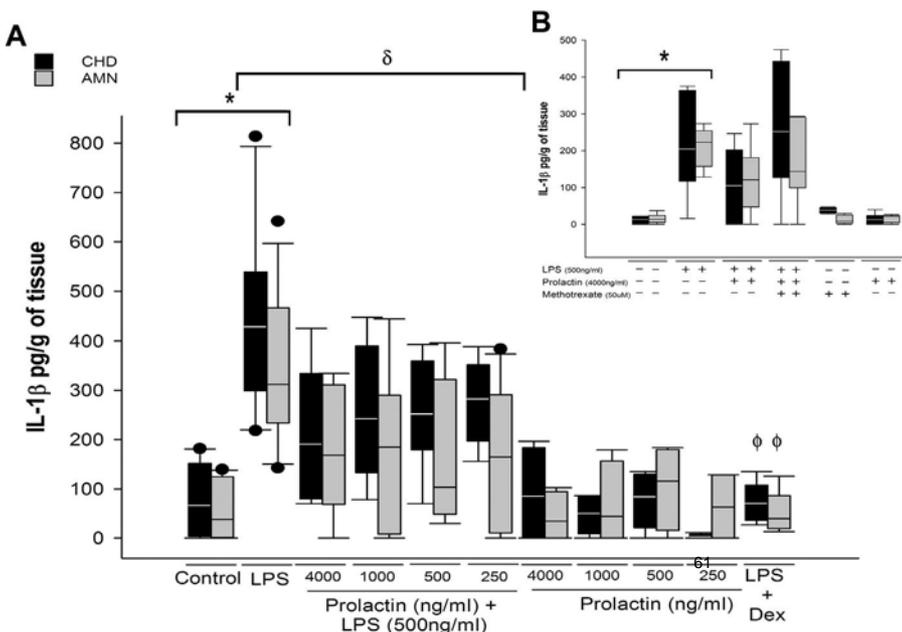


Fig. 2. IL-1 β secretion by choriodecidua (CHD) and amnion (AMN) in response to different treatments in the culture model. The production of IL-1 β was measured at 48 h after treatments. Bars show mean values of triplicates + SE of nine independent experiments. * $p < 0.001$ vs. control, δ $p < 0.05$ vs. LPS alone.

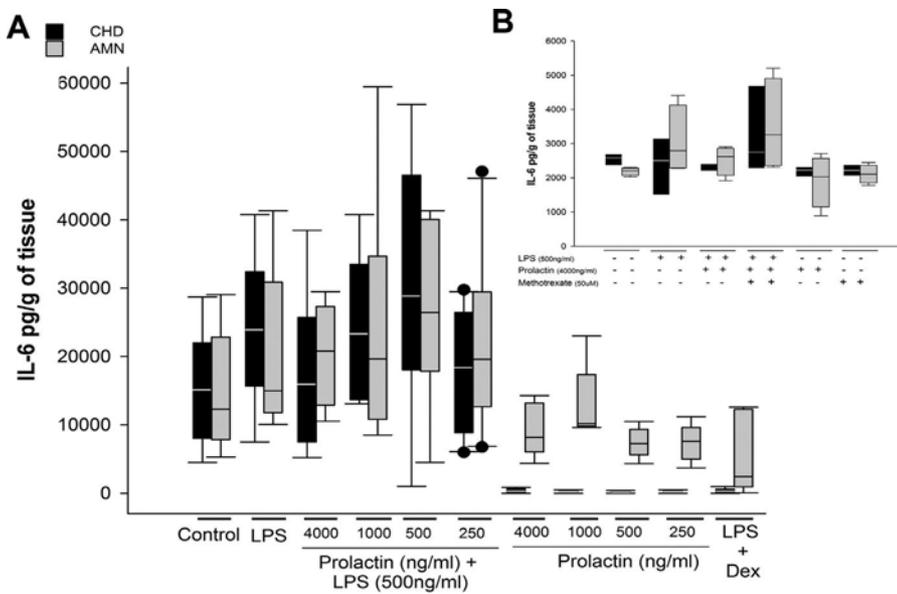


Fig. 3. IL-6 secretion by choriodecidua (CHD) and amnion (AMN) in response of different treatments in the culture model. The production of IL-6 was measured at 48 h after treatments. Bars show mean values of triplicates + SE of nine independent experiments.

4. Discussion

Successful gestation is the result of multiple immune-endocrine strategies that permit the mother and fetus to co-exist in a potentially hostile environment. Among the pro-tolerance strategies, compartmentalized secretion and the accumulation of high levels of decidual PRL in the amniotic cavity have been suggested as a mechanism to maintain an immunologically privileged milieu into this compartment (Kletzky et al., 1985). Additionally, clinical evidence indicates that the lowest levels of amniotic PRL coincide with the onset and progression of normal labor (Rigg and Yen, 1977).

Parturition is a multifactorial event associated with a massive pro-inflammatory reaction (Luciano and Varner, 1984; Garzia et al., 2004). During this process, cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6, induce the secretion of effector factors, such as MMPs and PGs, which induce deep immunological and structural changes in fetal and maternal tissues.

This study provides new evidence demonstrating that the co-stimulation of primary cultures of human fetal membranes with PRL in similar concentrations during pregnancy can inhibit the LPS-induced secretion of TNF- α and IL-1 β but not IL-6 nor IL-10.

TNF- α is a pro-inflammatory molecule that plays a key role in the mechanism that governs normal and pathological parturition (Charpigny et al., 2003; Zaga et al., 2004). TNF- α is mainly produced by the choriodecidua in response to different pathogens associated with preterm labor (Menon et al., 2009), it is noteworthy choriodecidual TNF- α has been demonstrated to decrease myometrial viability and induce apoptosis (Leroy et al., 2007).

Herein, we also confirm that after choriodecidual stimulation with LPS, TNF- α is the first cytokine produced by fetal membranes, as reported in an experimental model of intra-amniotic infection in rhesus monkey (Gravett et al., 1994).

Consistent with our hypothesis, high levels of amniotic PRL are required to maintain pro- and anti-inflammatory cytokines in equilibrium. Our results demonstrate that co-stimulation with 4000-ng/mL PRL, which is present in amniotic fluid during the second trimester (Kletzky et al., 1985) was the only strategy capable of inhibiting LPS-induced TNF- α secretion. However, this effect was reverted when the membranes were co-incubated with a JAK2/STAT5 pathway inhibitor, indicating that this inhibition is PRL dependent (Thomas et al., 2015).

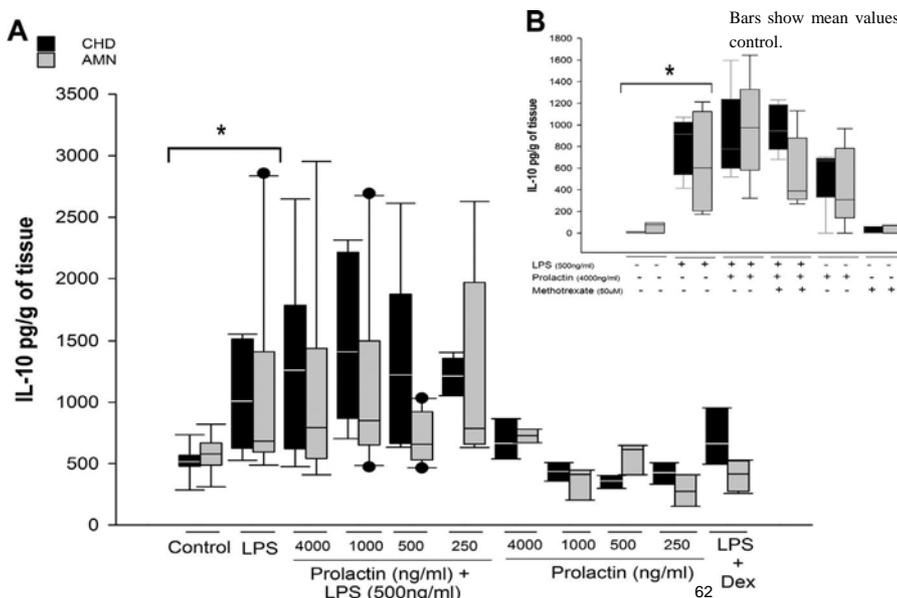


Fig. 4. IL-10 secretion of choriodecidua (CHD) and amnion (AMN) in response of different treatments in transwell system. The production of IL-10 was measured at 48 h after treatments. Bars show mean values of triplicates + SE of nine independent experiments. * $p < 0.001$ vs. control.

These results are in agreement with previous evidence indicating that PRL can inhibit the basal production of TNF- α in term human fetal membranes (Zaga-Clavellina et al., 2014a,b); however, other studies involving LPS-stimulated whole blood cultures showed that co-stimulation with high levels of PRL (300 ng/mL) upregulated TNF- α , supporting the concept of the tissue-specific action of PRL (Brand et al., 2004).

IL-1 β is also an inflammatory modulator that plays a central role during labor at term (Chao et al., 1994). Indeed, maternal and fetal tissues, such as fetal membranes, produce high levels of this cytokine during the onset and progression of labor under both physiological and pathological conditions (Chao et al., 1994; Gomez-Lopez et al., 2017), including infection (Menon et al., 2009).

As expected, in the present work, choriodecidual stimulation with LPS induced significant increases in IL-1 β in both the amniotic and choriodecidual regions. However, as indicated by previous evidence, the presence and activity of IL-1 β in the amniotic cavity is the result of the diffusion of IL-1 β secreted from the choriodecidual region through the fetal membranes (Menon et al., 1995).

Whereas only the highest concentration of PRL effectively down-regulated TNF- α , LPS-induced IL-1 β was significantly inhibited by a wide range of PRL concentrations. This effect may explain the differential immunomodulatory capacities of this hormone. The anti-IL-1 β effect of PRL is very important in a variety of contexts; indeed, evidence suggests that this cytokine per se can induce labor after its intra-amniotic infusion in pregnant rhesus macaques (Bethea et al., 1998).

The capacity of PRL to block the secretion of IL-1 β could eventually limit various cytotoxic effects, including apoptosis (Fortunato and Menon, 2003) and the synthesis and secretion of chemokines such as IL-8, PGs, and MMP-9, which can stimulate intense contraction patterns and modify the structural continuity and weakening of fetal membranes, respectively (Moore et al., 2006; Sadowsky et al., 2006; Zaga-Clavellina et al., 2014a,b).

Understanding the complex interrelations between PRL and pro-inflammatory cytokines is challenging, and evidence shows that infusing IL-1 β into the amniotic cavity decreases the amniotic PRL level and leads to the initiation of labor (Bethea et al., 1998); this effect has been also reported in human decidual cells (Jikihara and Handwerger, 1994) and T lymphocytes (Gerlo et al., 2005). Additionally, there is evidence that demonstrate that immunological challenges, such as LPS, TNF- α , or IL-1 β , can downregulate the synthesis and secretion of PRL in human decidual cells (Vičovic et al., 1994) and peripheral immune cells (Chao et al., 1994).

Altogether, these results suggest that once the immune privilege of the maternal-fetal interface has been violated, the immunomodulatory mechanisms, such as PRL, are eventually blocked/downregulated until conditions incompatible with the continuation of gestation develop.

Although IL-1 β and TNF- α are considered the main inflammatory modulators coordinating labor, in the context of infection, IL-6 is believed to be the best biomarker and has been implicated in the termination of pregnancy (Luciano and Varner, 1984).

In the present work, the co-stimulation of explants with the highest PRL concentration did not decrease in a significant way the secretion of IL-6. In contrast, the inhibition of IL-6 by PRL has been reported in rat decidual cells (Martínez-Neri et al., 2015) and trauma-hemorrhage animal models (Knöferl et al., 2000).

In contrast, IL-10 belongs to the group of immunological modulators that the maternal-fetal interface expresses to limit the immunological hostility against the fetus and favor the induction and maintenance of allograft tolerance; its expression during pregnancy is maximized in mid-pregnancy and declines at term. This anti-inflammatory cytokine is abundantly expressed/secreted by the amnion and choriodecidual region in human fetal membranes and is involved in the response to a variety of immunological/infection challenges (Robertson et al., 2006; Zaga-Clavellina et al., 2014a,b).

Although the capacity of PRL to increase IL-10 has been extensively studied in professional immune cells (Brand et al., 2004; Matalka, 2003), in the present study we did not find a significant effect of PRL on IL-10. However, this could suggest alternative tissue-specific anti-inflammatory mechanisms.

In fact the magnitude and type of effect induced by PRL was clearly cytokine dependent since, for example, the dose-response effect on IL-1 β was quite different from that on TNF- α . This could also suggest the presence of some cytokine- as well as tissue-specific regulatory mechanisms.

We would like to clarify that there is evidence supporting that MTX can inhibit the JAK2-STAT5 pathway (Thomas et al., 2015), however, its specificity is yet controversial; therefore, more experiments are required to fully demonstrate the specific pathway that PRL uses to exert the immune-modulatory effect that we show herein. Ideally we would like to design our next experimental approach using a pure prolactin receptor antagonist.

Altogether, these results support the concept that once an inflammatory condition, such as an infection, becomes established in the maternal-fetal interface, the crosstalk between the immune and endocrine systems is deeply modified.

5. Conclusion

The capacity of PRL to limit the secretion of TNF- α and IL-1 β simultaneously and, thus, maintaining IL-10 secretion level unmodified may be involved in the compensatory mechanism developed by the maternal-fetal interface to limit robust inflammatory responses, which can negatively affect gestation.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgements

These studies were supported by the Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes (INPer IER-212250-32102-21205-01-14 to VZC) and the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT) (Grant No. CB2014-242162 to VZC). We would like to thank the Graduate Program: Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México for supporting the studies of PFE.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2017.09.004>.

References

- Abhichandani, K., Sundaram, S., Munnangi, S., Reznik, S.E., 2011. Prolactin controls infection-associated preterm birth in a murine model. *Reprod. Sci.* 18 (3), 287A.
- Bethea, C.L., Gravett, M.G., Sadowsky, D.W., Haluska, G.J., Axethelm, M.K., Novy, M.J., 1998. Amniotic fluid prolactin is decreased by experimental intrauterine infection or interleukin-1 β infusion but not via prostaglandins in pregnant rhesus macaques. *Biol. Reprod.* 58 (6), 1385–1393.
- Brand, J.M., Frohn, C., Cziupka, K., Brockmann, C., Kirchner, H., Luhm, J., 2004. Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. *Eur. Cytokine Netw.* 15 (2), 99–104.
- Chao, H.S., Poisner, A.M., Poisner, R., Handwerger, S., 1994. Lipopolysaccharides inhibit prolactin and renin release from human decidual cells. *Biol. Reprod.* 50 (1), 210–214.
- Charpigny, G., Leroy, M.J., Breuiller-Fouché, M., Tanfin, Z., Mhaouty-Kodja, S., Robin, P., et al., 2003. Functional genomic study to identify differential gene expression in the preterm and term human myometrium. *Biol. Reprod.* 68 (6), 2289–2296.
- El-Azzamy, H., Balogh, A., Romero, R., Xu, Y., LaJeunesse, C., Plazyo, O., Papp, Z., et al., 2017. Characteristic changes in decidual gene expression signature in spontaneous term parturition. *J. Pathol. Transl. Med.* 51 (3), 264–283.
- Fortunato, S.J., Menon, R., 2003. IL-1 β is a better inducer of apoptosis in human fetal membranes than IL-6. *Placenta* . 24 (10), 922–928.
- Garzia, E., Borgato, S., Cozzi, V., Doi, P., Bulfamante, G., Persani, L., et al., 2004. Lack of

- expression of endometrial prolactin in early implantation failure: a pilot study. *Hum. Reprod.* 19 (8), 1911–1916.
- Garzia, E., Clauser, R., Persani, L., Borgato, S., Bulfamante, G., Avagliano, L., et al., 2013. Prolactin and proinflammatory cytokine expression at the fetomaternal interface in first trimester miscarriage. *Fertil. Steril.* 100 (1), 108–115.
- Gerlo, S., Verdood, P., Hooghe-Peters, E.L., Kooijman, R., 2005. Modulation of prolactin expression in human T lymphocytes by cytokines. *J. Neuroimmunol.* 162 (1), 190–193.
- Goffin, V., Binart, N., Touraine, P., Kelly, P.A., 2002. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu. Rev. Physiol.* 64 (1), 47–67.
- Golander, A., Hurlley, T., Barrett, J., Hizi, A., Handwerger, S., 1978. Prolactin synthesis by human chorion-decidua: a possible source of prolactin in the amniotic fluid. *Science* 202 (4365), 311–313.
- Gomez-Lopez, N., Romero, R., Xu, Y., Plazyo, O., Unkel, R., Leng, Y., et al., 2017. A role for the inflammasome in spontaneous preterm labor with acute histologic chorioamnionitis. *Reprod. Sci.* 24 (10), 1382–1401.
- Gravett, M.G., Witkin, S.S., Haluska, G.J., Edwards, J.L., Cook, M.J., Novy, M.J., 1994. An experimental model for intraamniotic infection and preterm labor in rhesus monkeys. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171 (6), 1660–1667.
- Grosdemouge, I., Bachelot, A., Lucas, A., Baran, N., Kelly, P.A., Binart, N., 2003. Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. *Reprod. Bio. Endocrinol.* 1 (1), 12.
- Hunt, J.S., 2006. Stranger in a strange land. *Immunol. Rev.* 36–47.
- Jikihara, H., Handwerger, S., 1994. Tumor necrosis factor- α inhibits the synthesis and release of human decidual prolactin. *Endocrinology* 134 (1), 353–357.
- Josimovich, J.B., Archer, D.F., 1977. The role of lactogenic hormone in the pregnant woman and fetus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 129 (7), 777–780.
- Kletzky, O.A., Rossman, F., Bertolli, S.I., Platt, L.D., Mishell, D.R., 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.W., Diodato, M.D., Angele, M.K., Ayala, A., Cioffi, W.G., Bland, K.L., Chaudry, I.H., 2000. Do female sex steroids adversely or beneficially affect the depressed immune responses in males after trauma-hemorrhage? *Arch. Surg.* 135 (4), 425–433.
- Lavery, J.P., Miller, C.E., 1977. The viscoelastic nature of chorioamniotic membranes. *Obstet. Gynecol.* 50 (4), 467–472.
- Leroy, M.J., Dallot, E., Czerkiewicz, I., Schmitz, T., Breuiller-Fouché, M., 2007. Inflammation of choriodecidua induces tumor necrosis factor α -mediated apoptosis of human myometrial cells. *Biol. Reprod.* 76 (5), 769–776.
- Luciano, A.A., Varner, M.W., 1984. Decidual, amniotic fluid, maternal and fetal prolactin in normal and abnormal pregnancies. *Obstet. Gynecol.* 63 (3), 384–388.
- Martínez-Neri, P.A., López-Rincón, G., Mancilla-Jiménez, R., del Toro-Arreola, S., Muñoz-Valle, J.F., Fafutis-Morris, M., et al., 2015. Prolactin modulates cytokine production induced by culture filtrate proteins of *M. bovis* through different signaling mechanisms in THP1 cells. *Cytokine* 71 (1), 38–44.
- Matalka, K.Z., 2003. Prolactin enhances production of interferon- γ , interleukin-12, and interleukin-10, but not of tumor necrosis factor- α , in a stimulus-specific manner. *Cytokine* 21 (4), 187–194.
- McCoshen, J.A., Tagger, O.Y., Wodzicki, A., Tyson, J.E., 1982. Choriodecidual adhesion promotes decidual prolactin transport by human fetal membrane. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 243 (5), R552–R557.
- Menon, R., Swan, K.F., Lyden, T.W., Rote, N.S., Fortunato, S.J., 1995. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 β and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172 (2), 493–500.
- Menon, R., Peltier, M.R., Eckardt, J., Fortunato, S.J., 2009. Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 201 (3) 306–e1.
- Moore, R.M., Mansour, J., Redline, R., Mercer, B., Moore, J.J., 2006. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta* 27 (11), 1037–1051.
- Norman, J.E., Bollapragada, S., Yuan, M., Nelson, S.M., 2007. Inflammatory pathways in the mechanism of parturition. *BMC Pregnancy Childbirth* 7 (Suppl 1), S7.
- Phillips, R.J., Fortier, M.A., Bernal, A.L., 2014. Prostaglandin pathway gene expression in human placenta: amnion and choriodecidua is differentially affected by preterm and term labour and by uterine inflammation. *BMC Pregnancy Childbirth* 14 (1), 241–255.
- Prigent-Tessier, A., Pageaux, J.F., Fayard, J.M., 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.
- Rigg, L.A., Yen, S.S.C., 1977. Multiphasic prolactin secretion during parturition in human subjects. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 128 (2), 215–218.
- Robertson, S.A., Skinner, R.J., Care, A.S., 2006. Essential role for IL-10 in resistance to lipopolysaccharide-induced preterm labor in mice. *J. Immunol.* 177 (7), 4888–4896.
- Sadowsky, D.W., Adams, K.M., Gravett, M.G., Witkin, S.S., Novy, M.J., 2006. Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195 (6), 1578–1589.
- Stefanoska, I., Krivokuća, M.J., Vasilijić, S., Čujić, D., Vičovac, L., 2013. Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro. *Placenta* 34 (9), 775–783.
- Thomas, S., Fisher, K.H., Snowden, J.A., Danson, S.J., Brown, S., Zeidler, M.P., 2015. Methotrexate is a JAK/STAT pathway inhibitor. *PLoS One* 10 (7), e0130078.
- Tyson, J.E., McCoshen, J.A., Dubin, N.H., 1995. Inhibition of fetal membrane prostaglandin production by prolactin: relative importance in the initiation of labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151 (8), 1032–1038.
- Vadillo-Ortega, F., Sadowsky, D.W., Haluska, G.J., Hernandez-Guerrero, C., Guevara-Silva, R., Gravett, M.G., et al., 2002. Identification of matrix metalloproteinase-9 in amniotic fluid and amniochorion in spontaneous labor and after experimental intrauterine infection or interleukin-1 (infusion) in pregnant rhesus monkeys. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 186 (1), 128–138.
- Vičovac, L.M., Starkey, P.M., Aplin, J.D., 1994. Comment: effect of cytokines on prolactin production by human decidual stromal cells in culture: studies using cells freed of bone marrow-derived contaminants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (6), 1877–1882.
- Wu, W.X., Brooks, J., Millar, M.R., Ledger, W.L., Saunders, P.T.K., Glasier, A.F., et al., 1991. Localization of the sites of synthesis and action of prolactin by immunocytochemistry and in situ hybridization within the human utero-placental unit. *J. Mol. Endocrinol.* 7 (3), 241–247.
- Wu, W.X., Brooks, J., Glasier, A.F., McNeilly, A.S., 1995. The relationship between decidualization and prolactin mRNA and production at different stages of human pregnancy. *J. Mol. Endocrinol.* 14 (2), 255–261.
- Zaga, V., Estrada-Gutierrez, G., Beltran-Montoya, J., Maida-Claros, R., Lopez-Vancell, R., Vadillo-Ortega, F., 2004. Secretions of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or choriodecidua with lipopolysaccharides or group B streptococci. *Biol. Reprod.* 71, 1296–1302.
- Zaga-Clavellina, V., Parra-Covarrubias, A., Ramirez-Peredo, J., Vega-Sanchez, R., Vadillo-Ortega, F., 2014a. The potential role of prolactin as a modulator of the secretion of proinflammatory mediators in chorioamniotic membranes in term human gestation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 211 (1) 48–e1.
- Zaga-Clavellina, V., Flores-Espinosa, P., Pineda-Torres, M., Sosa-González, I., Vega-Sánchez, R., Estrada-Gutierrez, G., et al., 2014b. Tissue-specific IL-10 secretion profile from term human fetal membranes stimulated with pathogenic microorganisms associated with preterm labor in a two-compartment tissue culture system. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 27 (13), 1320–1327.

