



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**Caracterización del efecto de la prolactina sobre la expresión
de marcadores pro-inflamatorios en la placenta humana**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

DÉCIGA GARCÍA MAYA NEDJMA

ASESOR: Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz

COASESOR: M.V.Z Ángel Germán Martínez Sosa

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

Caracterización del efecto de la prolactina sobre la expresión de marcadores pro-inflamatorios en la placenta humana.

Que presenta la pasante: **Maya Nedjma Déciga García**

Con número de cuenta: **311137334** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Abril de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q. Arcadia Hernández Beltrán	
VOCAL	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
SECRETARIO	Q.F.B. Azucena Lee Mendoza	
1er. SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

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

LMCT/cga*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida para poder realizar este trabajo de tesis, durante el periodo de febrero 2018 – enero 2019 (número de beca 27158). Este proyecto contó con el apoyo de CONACyT con número de registro 242162, perteneciente a la Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina.

A la Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de laboratorio y sobre todo sus enseñanzas que me permitieron mejorar mi formación profesional.

A mi profesor el M.V.Z Angel Germán Martínez Sosa por ser mi asesor y por el apoyo que siempre me brindó, gracias profe.

A mis compañeros de laboratorio, por todas las risas que compartimos, su confianza, amistad y por todo el apoyo.

A mi tutora, Andy no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí, todo esto no hubiera sido posible sin ti, de verdad. Gracias por permitirme compartir este tiempo contigo, y por todo el apoyo que siempre me has ofrecido. Me siento una persona muy afortunada de tenerte en mi vida y porque sé que este solo es el inicio de una gran amistad.

A mis amigas May y Edith, gracias por esas risas interminables, estar en el laboratorio no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

A Rodrigo, por siempre estar a mi lado, eres mi incondicional.

A mi familia, por siempre ser el motivo para seguir adelante.

A las mujeres más importantes: mi madre y abuela, gracias por creer en mí, alentarme a mejorar cada día y nunca dejarme sola.

NEVER *be* limited
by OTHER PEOPLE'S
LIMITED
Imaginations

"Nunca permitas que la imaginación limitada de los demás te limite".

—
*Dra. Mae Jemison,
astronauta y física
estadounidense*

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
SIGLAS.....	II
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
1.1. El embarazo y el privilegio inmunológico.....	- 1 -
1.2. Generalidades de la placenta humana.....	- 3 -
1.2.1. Desarrollo de la placenta.....	- 5 -
1.2.2. Función endocrina de la placenta.....	- 6 -
1.2.3. Aspectos inmunológicos de la placenta.....	- 8 -
1.3. Prolactina.....	- 9 -
1.3.1. Señalización ejercida por la prolactina.....	- 10 -
1.3.2. Prolactina durante el embarazo.....	- 11 -
1.4. Infecciones genitourinarias durante el embarazo.....	- 12 -
1.5. Procesos inflamatorios durante la gestación.....	- 15 -
1.5.1. Respuesta inflamatoria mediada por el TLR-4.....	- 16 -
II. ANTECEDENTES.....	- 19 -
III. JUSTIFICACIÓN.....	- 20 -
IV. HIPÓTESIS.....	- 21 -
V. OBJETIVO GENERAL.....	- 21 -
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	- 21 -
VII. METODOLOGÍA.....	- 22 -
7.1. Consideraciones éticas.....	- 22 -

7.2. Criterios de inclusión.....	- 22 -
7.3. Criterios de exclusión.....	- 22 -
7.4. Tratamientos experimentales.....	- 23 -
7.5. Cultivo primario de explantes placentarios y procedimientos experimentales	- 23 -
7.6. Análisis microbiológico de los explantes placentarios.....	- 24 -
7.7. Caracterización morfológica del cultivo de explantes placentarios por tinción de Hematoxilina y Eosina.	- 25 -
7.8. Caracterización del cultivo de explantes placentarios por secreción de gonadotropina coriónica humana (hCG).....	- 25 -
7.9. Cuantificación de citocinas pro-inflamatorias por ELISA.....	- 26 -
7.10. Inmunodetección de citocinas pro-inflamatorias y marcadores de señalización intracelular por Western Blotting	- 27 -
7.11. Activación de NFκB por ensayo de ELISA.....	- 28 -
7.12. Análisis estadístico	- 29 -
VIII. RESULTADOS	- 30 -
8.1. Validación del modelo experimental	- 30 -
8.1.1. Morfología placentaria.....	- 30 -
8.1.2. Fenotipo endocrino placentario.....	- 31 -
8.2. Validación de la actividad biológica de la prolactina mediante la activación de fosfo-Jak-2-	32 -
8.3. Validación de la actividad biológica del LPS mediante la activación de fosfo-IκB.....	- 33 -
8.4. La prolactina disminuye la secreción de IL-1β, IL-6 y TNF-α en un ambiente de inflamación inducido por el LPS.....	- 34 -
8.5. La prolactina disminuye la síntesis intracelular de IL-1β, IL-6 y TNF-α en un ambiente de inflamación inducido por el LPS.....	- 36 -
8.6. Mecanismos anti-inflamatorios ejercidos por la prolactina en explantes placentarios tratados con LPS	- 39 -

IX.	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 41 -
X.	CONCLUSIONES	- 44 -
XI.	REFERENCIAS	- 46 -
	ANEXO 1. Carta de consentimiento informado.....	- 51 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología placentaria.	- 3 -
Figura 2. Anatomía interna de la placenta humana.	- 4 -
Figura 3. Vía de señalización del receptor de prolactina (PLR-R).	- 11 -
Figura 4. Infección intrauterina.	- 14 -
Figura 5. Vía de señalización de TLR-4.	- 18 -
Figura 6. Corte transversal de explante placentario teñido con hematoxilina y eosina.	- 30 -
Figura 7. Evaluación del fenotipo endocrino del modelo de explantes placentarios en cultivo, mediante la secreción de hCG.	- 31 -
Figura 8. Ensayo de actividad biológica de la prolactina sobre explantes placentarios en cultivo, a partir de la activación de p-Jak-2.	- 32 -
Figura 9. Ensayo de actividad biológica del LPS sobre explantes placentarios en cultivo, a partir de la activación de p-IkB.	- 33 -
Figura 10. La PRL disminuye la secreción de IL- β inducida por el LPS.	- 35 -
Figura 11. La PRL disminuye la secreción de IL-6 inducida por el LPS.	- 35 -
Figura 12. La PRL disminuye la secreción de TNF- α inducida por el LPS.	- 36 -
Figura 13. La PRL disminuye la síntesis intracelular de pro IL-1 β en los explantes placentarios tratados con LPS.	- 37 -
Figura 14. La PRL disminuye la síntesis intracelular de IL-6 en los explantes placentarios tratados con LPS.	- 37 -
Figura 15. La PRL disminuye la síntesis intracelular de pro TNF- α en los explantes placentarios tratados con LPS.	- 38 -
Figura 16. La PRL disminuye la síntesis intracelular de TLR-4 mediada por el LPS.	- 39 -
Figura 17. PLR bloquea la fosforilación de NFkB inducida por el LPS.	- 40 -
Figura 18. Mecanismo propuesto del efecto anti-inflamatorio de la PRL en la placenta humana.	- 45 -

SIGLAS

AP1: proteína activadora 1

APC: células presentadoras de antígenos

COX2: ciclo oxigenasa 2

CRH: hormona liberadora de corticotropina

FcRn: receptor Fc de inmunoglobulina neonatal

FSH: hormona folículo estimulante

GH: hormona de crecimiento

GM-CSF: Factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos

hCG: gonadotropina coriónica humana

hCT: tiotropina coriónica humana

HLA: antígenos leucocitarios humanos

hLP: lactógeno placentario

IFN- γ : interferón gamma

IgG: inmunoglobulina G

IL: interleucina

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

Jak-2: cinasa de Janus 2

LBP: proteína de unión a LPS

LH: hormona luteinizante

LPS: lipopolisacárido

MHC: complejo principal de histocompatibilidad

MMP: metaloproteasas de matriz extracelular

MyD88: proteína de diferenciación mieloide 88

NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa

NK: células asesinas naturales

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PGE: prostaglandina E

PRL: prolactina

PRL-R: receptor de prolactina

PROM: ruptura prematura de membranas

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

PTB: parto pretérmino

STAT: transductor de señal y activador transcripcional

TIMP: inhibidor tisular para metaloproteasas

TLR: receptores tipo Toll

TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa

TSH: hormona estimulante de la tiroides o tirotropina

ABREVIATURAS

°C: grados Celsius

g: gramos

h: horas

kDa: kiloDaltons

L: litros

min: minutos

rpm: revoluciones por minuto

RESUMEN

La conclusión exitosa del embarazo es resultado de la interacción de diferentes órganos extraembrionarios como la placenta humana y las membranas corioamnióticas, así como el sistema inmune y múltiples hormonas y citocinas. En esta etapa se promueve un ambiente de tolerancia inmunológica que permite que se lleven a cabo interacciones entre la madre y el feto sin que exista rechazo materno. La prolactina (PRL) es una hormona de origen proteico que participa en una gran variedad de procesos biológicos, incluida la inmunomodulación. Se sintetiza principalmente por la decidua, pero los trofoblastos placentarios también son capaces de producirla. Por otra parte, los procesos inflamatorios durante el embarazo, principalmente aquellos que son producidos por infecciones de tipo bacteriano generan un ambiente adverso intrauterino que ponen en riesgo la continuidad del mismo. El principal agente etiológico es *Escherichia coli*, causante del 80-90% de las infecciones genitourinarias durante el embarazo. El propósito de este trabajo fue explorar el efecto de la PRL sobre la síntesis de los marcadores inflamatorios IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el cultivo de explantes placentarios tratados con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*, para conocer la participación de esta hormona como inmunomodulador del proceso inflamatorio durante la gestación, así como entender los mecanismos asociados a dicha inmunomodulación. Se utilizó el modelo de cultivo primario de explantes placentarios, obtenidos de placentas humanas a término y se simuló un ambiente inflamatorio utilizando lipopolisacárido de *E. coli*. Como resultado se obtuvo que la prolactina redujo significativamente la secreción y síntesis intracelular de IL-1 β , IL-6 y TNF- α dependientes del LPS. Mecánicamente hablando, la prolactina detuvo la activación inducida por el LPS de TLR-4 y la fosforilación de NF κ B. En conclusión, la prolactina atenuó la respuesta inflamatoria inducida por el LPS en la placenta humana, lo que sugiere que esta hormona juega un papel clave en la prevención de una reacción inflamatoria descontrolada en la interfase materno-fetal. Además, es la primera vez que se propone un mecanismo anti-inflamatorio de la PRL a través de la regulación negativa de la señalización TLR4/NF κ B en la placenta humana.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. El embarazo y el privilegio inmunológico

El cuerpo humano está protegido por el sistema inmunológico en contra de agentes patógenos, células o tejidos ajenos que pongan en riesgo la homeostasis. Este sistema se constituye de diversos tipos celulares y moléculas que en conjunto montan una respuesta capaz de eliminar a los patógenos y disminuir el riesgo de enfermedad.

Existen dos tipos de vías a través de las cuales se monta una respuesta inmunitaria para eliminar a estos agentes: el sistema inmune innato y el adaptativo. Ambos actúan reconociendo a estos organismos como externos a él. Las células del sistema inmune innato están especializadas para llevar a cabo una reacción inmediata en contra de patógenos invasores a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés). En cambio, las células del sistema adaptativo comprenden a los linfocitos que están programados para responder en contra de antígenos con mayor especificidad durante su maduración en el timo (Linfocitos T) y en médula ósea (Linfocitos B). Además, su activación requiere de la interacción con las células presentadoras de antígenos (APC) y se requieren días para montar una respuesta completa en contra del patógeno (Kay, Nelson, and Wang 2011).

Considerando que el feto contiene un 50% de material genético ajeno al de la madre, éste debería ser reconocido por el sistema inmune como extraño y provocar la eliminación del mismo. Sin embargo, hoy en día se sabe que durante el embarazo este sistema implementa mecanismos que permiten un ambiente de tolerancia inmunológica y al mismo tiempo de protección para ambos (Mor, Aldo, and Alvero 2017).

Esta tolerancia es mediada por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), por las células del sistema inmune y por citocinas secretadas por los mismos (Rapacz-Leonard, Dabrowska, and Janowski 2014). El MHC es una región genética altamente polimórfica que expresa proteínas que tienen como principal función la presentación de péptidos a los linfocitos T antígeno-específicos, y

como consecuencia de ello ayuda al sistema inmune a identificar a los agentes patógenos, a células dañadas y antígenos externos (Tilburgs, Scherjon, and Claas 2010). Hasta el momento se han descrito tres clases de MHC: clase I, II y III (Deakin et al. 2006). Dentro del MHC de clase I encontramos dos tipos: los clásicos y los no clásicos. Los MHC clásicos son altamente polimórficos, lo que significa que tienen la capacidad de presentar una amplia gama de antígenos, en cambio en los no clásicos su polimorfismo es limitado (Rapacz-Leonard, Dabrowska, and Janowski 2014). En los seres humanos, los productos del MHC reciben el nombre de antígenos leucocitarios humanos (HLA). Las moléculas HLA de clase I, como HLA-A y HLA-B son expresadas por la mayoría de las células somáticas maduras, y son los principales marcadores que las células T aloreactivas identifican (Burton et al. 2010).

En el embarazo, las células de origen fetal que interactúan con la madre son los trofoblastos, los cuales son los encargados de la invasión hacia el tejido uterino y de la formación de tejidos extraembrionarios como la placenta y las membranas corioamnióticas. Para llevar a cabo la formación de la placenta y establecer la interacción que existirá en la interfase materno-fetal durante el periodo de gestación, el trofoblasto debe ser reconocido y tolerado por el sistema inmunológico de la madre. Para que estas células puedan ser toleradas, expresan moléculas de histocompatibilidad no clásicas poco polimórficas o no polimórficas como HLA-C, HLA-E, HLA-F y HLA-G. Gracias a la expresión de estas moléculas, el trofoblasto puede evitar la citotoxicidad mediada por células asesinas naturales (NK) y linfocitos T. Además, la interacción de las células NK y macrófagos con HLA-C, HLA-E, HLA-F y HLA-G en los trofoblastos activa la producción de citocinas como interleucina (IL) -1, -6, -8, -10, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), entre otras, las cuales resultan benéficas para las diferentes etapas del embarazo y tienen efectos inmunomoduladores (Tilburgs, Scherjon, and Claas 2010; Hanna et al. 2006; Kay, Nelson, and Wang 2011).

1.2. Generalidades de la placenta humana

La placenta humana es un órgano altamente especializado que se desarrolla durante el embarazo, y que, en conjunto con otros órganos extraembrionarios permiten que el embarazo progrese y concluya de manera exitosa (Gude et al. 2004). La placenta y el corion constituyen a la interfase materno-fetal y son derivados del trofoblasto, el cual se separa de la masa celular interna y rodea a los precursores celulares del embrión en sí mismo (Carlson 2014).

La morfología que presenta la placenta (ver Figura 1) es discoide y al final de la gestación tiene un tamaño aproximado de 20 cm de diámetro por 3 cm de grosor y un peso de 500-600 g aprox. (Martínez and Peláez 2017). Este órgano se compone tanto de tejido fetal derivado del saco coriónico, como de tejido materno proveniente del endometrio. Por lo tanto, la placenta se trata de una interfase que tiene como fin llevar a cabo interacciones entre la madre y el producto.

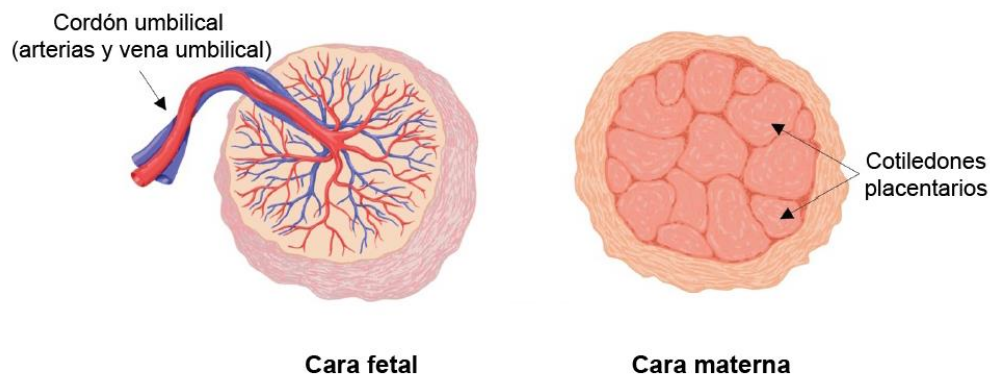


Figura 1. Morfología placentaria.

La morfología de la placenta humana es discoide y presenta dos caras: la cara materna y la cara fetal. En la cara materna encontramos a los cotiledones placentarios; la cara fetal se encuentra en contacto con el cordón umbilical, el cual se encuentra conformado por dos arterias y una vena umbilical, de las cuales se derivan las vellosidades coriónicas. Modificado de (Kay, Nelson, and Wang 2011).

Como se puede apreciar en la Figura 2, la región que se encuentra orientada hacia el feto es conocida como plato coriónico, esta región lleva vasos sanguíneos coriónicos que son ramificaciones de los vasos umbilicales. Por otro lado, la región que se encuentra orientada hacia la cara materna es llamada

placa basal. Entre estas dos regiones encontramos el espacio interveloso, que se trata de la principal unidad funcional de la placenta, la cual presenta vellosidades con una gran cantidad de ramificaciones a través de las cuales fluye la sangre fetal. Es en la región terminal de la vellosidad coriónica en donde se lleva a cabo el intercambio materno-fetal, debido a que estas vellosidades se encuentran embebidas en la sangre materna presente en las cámaras intervellosas (Gude et al. 2004).

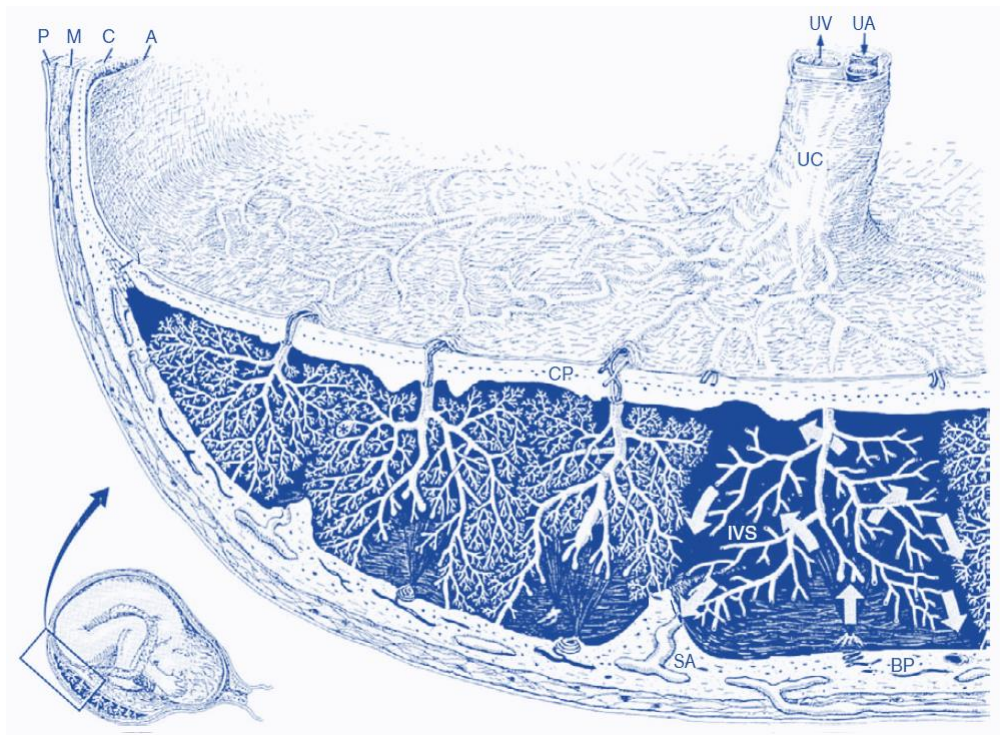


Figura 2. Anatomía interna de la placenta humana.

Próxima a los tejidos de origen materno encontramos a la capa basal (BP), la cual está en contacto con el miometrio (M) y este a su vez con el perimetrio (P). La placa coriónica (CP), se localiza hacia la cara fetal de la placenta, debajo encontramos al corion (C) y sobre ella al amnios (A). Entre la placa basal y la placa coriónica se encuentra el espacio interveloso (IVS) embebido en sangre materna, proveniente de las arterias espiraladas (SA). Además, se observa el cordón umbilical (UC), conformado por la vena umbilical (UV) y las arterias umbilicales (UA). Figura modificada de (Plant and Zeleznik 2014)

En general, las funciones que ejerce la placenta son la prevención del rechazo inmunológico, el transporte de gases, nutrientes, productos de excreción, síntesis y secreción de hormonas para el desarrollo del embrión y feto, además de la regulación del metabolismo propio del embarazo (Martínez and Peláez 2017; Kay, Nelson, and Wang 2011).

1.2.1. Desarrollo de la placenta

A partir de la fecundación del óvulo (día 1), se llevan a cabo una serie de divisiones mitóticas conocidas como proceso de segmentación (del día 1 al día 8). A lo largo de este tiempo, el cigoto se encuentra rodeado por la zona pelúcida, la cual le otorga protección, y es transportado por los cilios de la trompa de Falopio hasta llegar al útero. Al finalizar esta serie de segmentaciones, el cigoto se transforma en blastocisto, el cual al llegar a la cavidad uterina comienza el proceso de implantación en el endometrio (Carlson 2014).

La implantación es el proceso mediante el cual el embrión se introduce en la capa funcional del endometrio donde permanecerá durante toda la gestación (Martínez and Peláez 2017). Este proceso es mediado principalmente por la invasión que lleva a cabo el trofoblasto. Una vez que la zona pelúcida comienza a retirarse, el trofoblasto adquiere la capacidad de adherirse al endometrio y comienza a proliferar rápidamente. A partir de aquí el trofoblasto se diferencia en dos capas: una capa interna de células aplanadas conocidas como citotrofoblastos y una capa externa de células multinucleadas que se forma a partir de la fusión de los citotrofoblastos y en la cual no se aprecian límites intercelulares, conocida como sinciotrofoblasto. El sinciotrofoblasto es el encargado de extenderse entre el epitelio endometrial e invadir el tejido conectivo (Martínez and Peláez 2017; Gude et al. 2004). Las prolongaciones del sinciotrofoblasto se introducen entre las células epiteliales uterinas y se expanden a través del estroma endometrial. A medida que estas células continúan invadiendo, las prolongaciones cubren tramos de los vasos sanguíneos espiralados endometriales maternos y los restos celulares de esos tejidos destruidos quedan incluidos dentro de su masa citoplasmática, erosionan las paredes vasculares y comienzan a formar pequeños espacios denominados lagunas para que después la sangre de la madre comience a rellenar esas lagunas aisladas que se han ido formando. Estas lagunas se definen como la forma primitiva de lo que se convertirá en el espacio intervelloso de la placenta en donde la sangre materna circulará (Carlson 2014; Martínez and Peláez 2017; Gude et al. 2004).

Una vez que el saco trofoblástico ha penetrado en su totalidad al endometrio, el tejido endometrial comienza a regenerarse mientras que los espacios lagunares comienza a confluir con otros formando redes. En la periferia de estas redes, el trofoblasto comienza a proliferar y acumularse para formar las vellosidades coriónicas primarias, las cuales madurarán hasta convertirse en árboles vellosos. Estos

árboles vellosos se encontrarán embebidos en sangre materna en el espacio intervelloso, y será en este sitio donde ocurrirá el intercambio de nutrientes y otras sustancias.

Gracias al proceso de regeneración que ocurre en el endometrio, la invasión trofoblástica es controlada por la adhesión y formación de una gran matriz extracelular por parte de las células de tipo fibroblástico del estroma endometrial. Este proceso es conocido como decidualización y ocurre por el almacenamiento de glucógeno y gotas lipídicas provocando la edematización de estas células y por ende se impide la penetración descontrolada del sincitiotrofoblasto. Esta reacción primero rodea al embrión y más tarde ocupa la mayoría del endometrio; cuando la reacción decidual se propaga por todo el estroma endometrial entonces ese tejido es nombrado decidua (Carlson 2014; Martínez and Peláez 2017).

1.2.2. Función endocrina de la placenta

Una de las muchas funciones que lleva a cabo la placenta es fungir como un órgano neuroendocrino, gracias a la capacidad que tiene para producir hormonas análogas a las del hipotálamo, hipófisis y gónadas (Loke 2013). La importancia de estas hormonas radica en la participación que tienen en el establecimiento y mantenimiento de la gestación, el desarrollo fetal y además en la participación del trabajo de parto (Loke 2013; Costa 2016).

La mayoría de las hormonas de origen placentario son sintetizadas y secretadas por el sincitiotrofoblasto, sin embargo, existen otros tipos celulares que participan en la secreción de estas hormonas como lo son el citotrofoblasto, las células del estroma y las células de Hofbauer (Kay, Nelson, and Wang 2011). La placenta humana produce tanto hormonas de origen esteroideo como de origen proteico. Dentro de las hormonas de origen proteico que sintetiza encontramos a la gonadotropina coriónica humana (hCG), lactógeno placentario (hPL), prolactina (PRL), tirotropina coriónica humana (hCT) y hormona liberadora de corticotropina (CRH). Las principales hormonas esteroides que produce son la progesterona y diversos estrógenos.

1.2.2.1. Gonadotropina coriónica humana (hCG)

La primera hormona que es producida por la placenta es la hCG, la cual es una glicoproteína compuesta por dos subunidades α y β . La subunidad α es compartida con la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH) y la tirotropina (TSH); mientras que la subunidad β es única de la hCG (Kay, Nelson, and Wang 2011). Esta hormona se sintetiza por el trofoblasto 48 horas después de llevar a cabo la implantación y participa en diversos procesos como en la estimulación del cuerpo lúteo para que produzca progesterona, el incremento en la producción de testosterona en las células de Leydig fetales que participa en el desarrollo sexual de los hombres, promueve la diferenciación del citotrofoblasto hacia sinciotrofoblasto, participa como modulador en la angiogénesis endometrial y placentaria, entre otras funciones (Costa 2016; Kay, Nelson, and Wang 2011).

A partir del día 8, la hCG es detectable en suero y orina materna, alcanza su nivel máximo durante la décima semana de gestación y disminuye progresivamente hasta el final del embarazo. Por lo tanto, en la práctica clínica, se utiliza la detección de la fracción β en sangre y orina como un marcador biológico para la detección temprana del embarazo, ya que esta hormona es producida exclusivamente durante el embarazo (salvo algunas células tumorales que también son capaces de producir a esta hormona) (Costa 2016). Y experimentalmente, se utiliza la expresión de hCG como marcador fenotípico trofoblástico en los cultivos de trofoblasto vellosos o de explantes placentarios (Olmos-Ortiz et al. 2018).

1.2.3. Aspectos inmunológicos de la placenta

La placenta es un órgano que durante toda la gestación se encuentra expuesta a cualquier clase de patógenos que estén presentes en la circulación materna. Por ello, este tejido tiene diferentes mecanismos a través de los cuales confiere protección y evita el paso de organismos que puedan causar daño al feto o interrumpir la continuidad del embarazo (Ander, Diamond, and Coyne 2019).

Este órgano es capaz de iniciar directamente una respuesta de tipo innata para llevar a cabo la supresión de infecciones microbianas y al mismo tiempo alertar al sistema inmune del peligro que se avecina. Esto ocurre gracias a la capacidad que tienen los trofoblastos de reconocer patógenos a partir de los receptores tipo Toll (TLR); que desencadenan una cascada de señalización antimicrobiana y permiten la secreción de citocinas que alertan a las células del sistema inmune (Ander, Diamond, and Coyne 2019). También, la placenta es capaz de producir diversas quimiocinas, citocinas y péptidos antimicrobianos en respuesta a compuestos bacterianos como el LPS (Duval et al. 2019).

Otra forma de evitar el paso de agentes de tipo viral es a partir de la secreción de citocinas como interferones y vesículas de miRNAs, que ayudan a restringir las infecciones virales (Calvert and Jones 2017). Además, los trofoblastos muestran altos niveles de autofagia basal, lo cual permite combatir infecciones contra patógenos intracelulares (Ander, Diamond, and Coyne 2019).

Como se mencionó anteriormente, en la interfase materno-fetal ocurre el intercambio selectivo de moléculas que son necesarias para el desarrollo del embrión. La transferencia de proteínas a través de esta barrera es altamente selectiva, sin embargo, existe una excepción: la inmunoglobulina G (IgG), la cual puede atravesar esta barrera y es transferida como un complejo inmune. El paso de esta proteína está mediada a través del receptor Fc de inmunoglobulina neonatal (FcRn), que se encuentra presente en el sincitiotrofoblasto. La importancia del paso de esta inmunoglobulina radica en que la madre provee al feto de anticuerpos maternos que ayudan a reforzar su sistema inmune aún inmaduro. Todo esto ocurre a partir de la semana 16 de gestación y concluye al término del embarazo, cuando existe una concentración considerable de IgG en suero fetal. (Calvert and Jones 2017; Ander, Diamond, and Coyne 2019; Kay, Nelson, and Wang 2011).

1.3. Prolactina

La prolactina es una hormona de origen proteico con un peso de 23 kDa, que presenta 199 aminoácidos, los cuales forman una cadena polipéptidica con tres puentes disulfuro (Ignacak et al. 2012). El gen que la codifica se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, 6p22.3, y se compone de 5 exones y 5 intrones.

Esta hormona se secreta principalmente por los lactotrofos de la adenohipófisis; sin embargo, actualmente es bien conocido que otros órganos son capaces de llevar a cabo su síntesis extra hipofisiaria, como el sistema inmune, la decidua, glándulas mamarias, cerebro, endometrio, tejido adiposo y próstata (Méndez, Cariño, and Díaz 2005; Ignacak et al. 2012).

La prolactina participa en una gran variedad de procesos biológicos como lo es el transporte de electrolitos, metabolismo, modulación del sistema inmune, crecimiento y desarrollo, lactancia, reproducción y el embarazo (Marano and Ben-Jonathan 2014). La versatilidad biológica de esta hormona está dada por la expresión de su receptor (PRL-R) en diferentes tejidos, incluyendo a las glándulas mamarias, gónadas, hígado, riñón, glándulas adrenales, cerebro, corazón, pulmón, hipófisis, útero, músculo esquelético y células del sistema inmune (Ignacak et al. 2012).

El PRL-R pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas de clase 1, en esta familia se incluyen receptores como el de la leptina, de la hormona de crecimiento (GH), del factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CFS), de la eritropoyetina y de algunas interleucinas (Méndez, Cariño, and Díaz 2005; Chavez-Rueda et al. 2005). Este receptor presenta un dominio transmembranal, un dominio extracelular para la unión con su ligando y el dominio citoplasmático para la traducción de señales (Ignacak et al. 2012).

Se sabe que las funciones que ejerce la PRL sobre el sistema inmune contribuyen a la proliferación y diferenciación de las células NK, además de estimular la síntesis de interferón gamma (IFN- γ) en las mismas. Por otra parte, en los linfocitos estimula la inmunidad celular, la proliferación, la síntesis de IFN- γ , IL-2 y sus receptores, inhibe la apoptosis, así como regula la síntesis de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible). Para el caso de los monocitos induce la diferenciación y estimula la efectividad de presentación del antígeno (Méndez, Cariño, and Díaz 2005).

1.3.1. Señalización ejercida por la prolactina

Como se mencionó anteriormente el receptor de prolactina es sumamente versátil y se expresa en muchos tejidos blanco. Su dominio extracelular contiene dos puentes disulfuro que son esenciales para que la unión al ligando se lleve a cabo, mientras que la región citoplasmática se conforma por dos dominios (Box 1 y Box 2), indispensables para acoplarse a las cinasas de Janus (Jak) y a las moléculas transductoras de señal y activador transcripcional (STAT) (Saleem, Martin, and Coates 2018).

La unión de la prolactina a su receptor permite que ocurra la dimerización del receptor y se forme un trímero, que está constituido por dos PRL-R y un ligando, lo que genera un cambio en la conformación y da lugar a la iniciación de la transducción de señales intracelulares. Este cambio conformacional resulta en la activación (fosforilación) de Jak-2, la cual es una tirosina cinasa que se encuentra asociada a la región intracelular Box 1. La fosforilación de Jak-2 resulta en la consiguiente fosforilación de los residuos de tirosina localizados al final del dominio intracelular del PRL-R (Box2), los cuales una vez que son activados atraen a las proteínas STAT1, STAT3 o STAT5 las cuales son fosforiladas por JAK-2, siendo STAT5 la más común. Una vez que STAT es fosforilado da lugar a homodímeros (la fosforilación ocurre en las dos moléculas) o heterodímeros (solo una de las moléculas se encuentra fosforilada). Los dímeros de STAT son entonces translocados al núcleo para llevar a cabo la transcripción de genes (Saleem, Martin, and Coates 2018; Oclon et al. 2018; Ignacak et al. 2012).

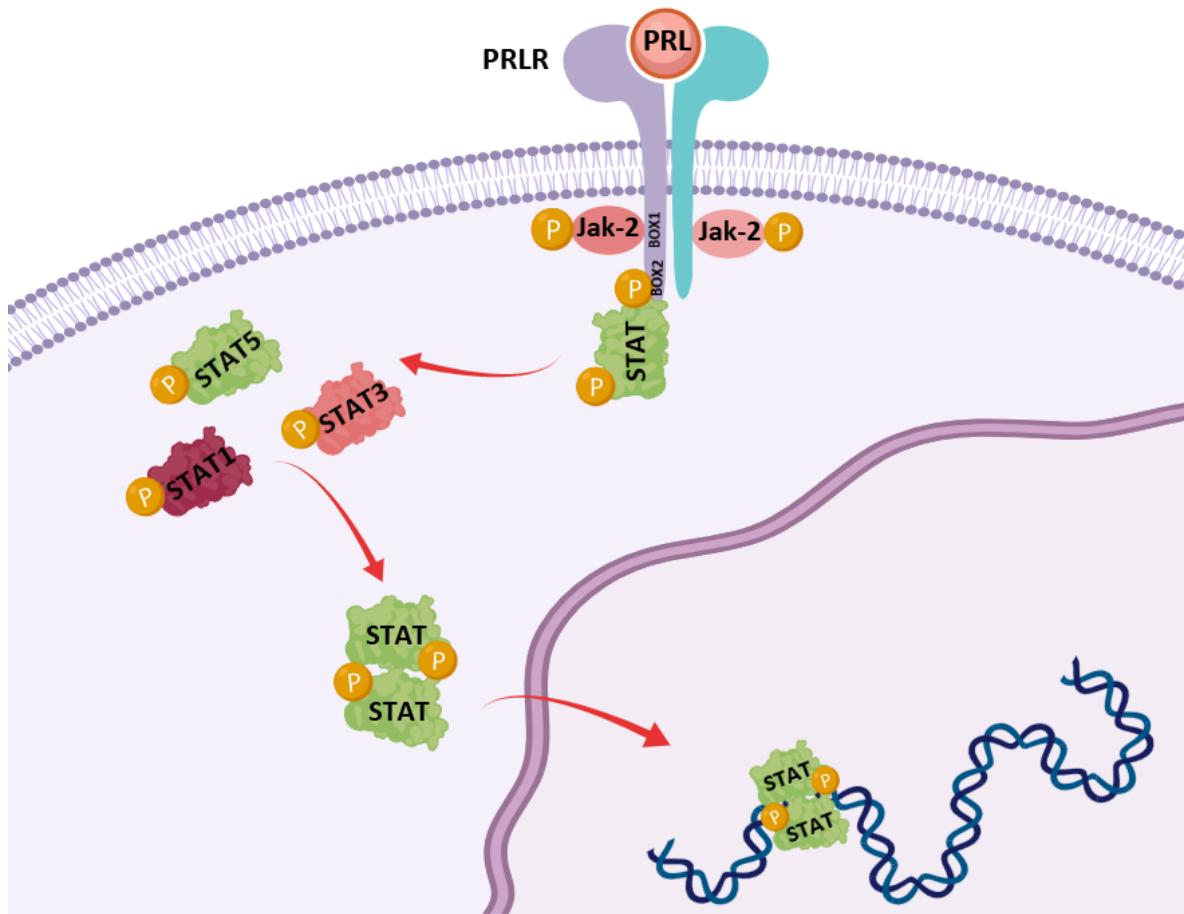


Figura 3. Vía de señalización del receptor de prolactina (PLR-R).

La activación de la vía comienza cuando el complejo PRL/PRL-R se forma y el receptor se dimeriza; posteriormente Jak-2, asociada al dominio citoplasmático Box-1 del receptor se auto fosforila, dando como resultado la activación y fosforilación de los residuos de tirosina que se localizan al final del dominio intracelular. Estos residuos de fosfo-tirosinas se unen a las proteínas STAT 1, 3 y mayormente 5, para que sean activadas y puedan translocarse hacia el núcleo y así regular la expresión de diversos genes. Figura realizada por Déciga-García, 2019.

1.3.2. Prolactina durante el embarazo

En mujeres no gestantes la concentración sérica de PRL es <23 ng/mL. Durante el segundo y tercer trimestre de embarazo la mujer desarrolla un estado de hiperprolactinemia fisiológico, su concentración incrementa a ~300 ng/mL en el espacio intervelloso (Moreno 2005; Halperin 2013). La decidua es su principal sitio de síntesis y se conoce que la PRL decidual estimula la proliferación y diferenciación de células inmunológicas que promueven un ambiente de tolerancia entre la madre y el

feto (Tomás-Alvarado 2016). Durante el embarazo, además de la decidua también los arboles vellosos, los trofoblastos columnares y los citotrofoblastos son sitios placentarios de expresión de la PRL y su receptor (Garzia et al. 2013; Stefanoska et al. 2013).

Dentro de las funciones en las que participa la PRL durante el embarazo encontramos el mantenimiento de la producción de progesterona por parte del cuerpo lúteo, regulación de la homeostasis de la glucosa a partir del incremento de la masa de células β pancreáticas, así como la inhibición de la contracción miométrial. En la placenta humana la prolactina lleva a cabo la regulación de genes que participan en la angiogénesis, permite el crecimiento del trofoblasto y estimula la migración e invasión trofoblástica (Wooding and Burton 2008; Binart 2016; Saleem, Martin, and Coates 2018; Stefanoska et al. 2013).

1.4. Infecciones genitourinarias durante el embarazo

Las infecciones del tracto urinario son un problema de salud muy común que tiene como característica la invasión de patógenos en cualquier sitio del tracto urinario, ya sean los riñones, los uréteres, la vejiga o la uretra. Este tipo de infecciones son de mayor prevalencia en mujeres debido a la configuración anatómica del aparato reproductor femenino, un ejemplo de ello es la proximidad que existe entre el ano y la vagina, además de la capacidad de transmisión de organismos patógenos por medio de las prácticas sexuales (Mittal and Wing 2005).

Gran cantidad de organismos son capaces de invadir el tracto urinario y son los responsables de la patogénesis de la infección genitourinaria (Gomi et al. 2015; Amiri et al. 2015); los principales agentes etiológicos asociados son similares en mujeres no embarazadas y embarazadas. *Escherichia coli* es uno de los organismos causante del 80 al 90% de las infecciones genitourinarias ocasionadas por organismos Gram-negativos, y se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal. (Matuszkiewicz-Rowinska, Malyszko, and Wieliczko 2015; Dautt-Leyva et al. 2018).

Estas infecciones se clasifican clínicamente en aquellas que cursan o no con bacteriuria sintomática. Se considera bacteriuria asintomática cuando la infección se limita al crecimiento bacteriano en orina pero no existe dolor, ardor o comezón asociada. Las infecciones sintomáticas a su vez se subdividen

en infecciones del tracto bajo (cistitis) o del tracto urinario alto (pielonefritis); y ocurren cuando se presenta una invasión de patógenos a tejidos del tracto urinario que desencadena la respuesta inflamatoria (Kalinderi et al. 2018; Matuszkiewicz-Rowinska, Malyszko, and Wieliczko 2015).

Durante el periodo de gestación existen cambios hormonales y anatómicos que favorecen aún más el desarrollo de infecciones genitourinarias (Kalinderi et al. 2018; Hannan, Hooton, and Hultgren 2013). Entre estos cambios se ha reportado el aumento del pH en la orina y en la osmolaridad, además de glicosuria y aminoaciduria lo que facilita el crecimiento bacteriano en este líquido y por consecuencia el desarrollo de infecciones bacterianas (Ipe, Horton, and Ulett 2016; Kalinderi et al. 2018). Es por ello que durante esta etapa, las infecciones genitourinarias representan la complicación más frecuente y común durante el embarazo (Szweda and Jozwik 2016).

La importancia de las infecciones genitourinarias durante la gestación radica en que los agentes etiológicos pueden llegar a infectar a los tejidos extraembrionarios como la placenta y las membranas corioamnióticas y en casos críticos el líquido amniótico; y se considera como el tipo de infección placentaria más común (Kaplan 2007). Esto se debe a que estos organismos pueden migrar ascendentemente desde la vagina, el cévix y llegar hasta la cavidad intrauterina, provocando complicaciones inminentes como el parto pretérmino, ruptura prematura de membranas (PROM), bajo peso al nacer o el desarrollo de infección sistémica materna (Szweda and Jozwik 2016) (Ver figura 4).

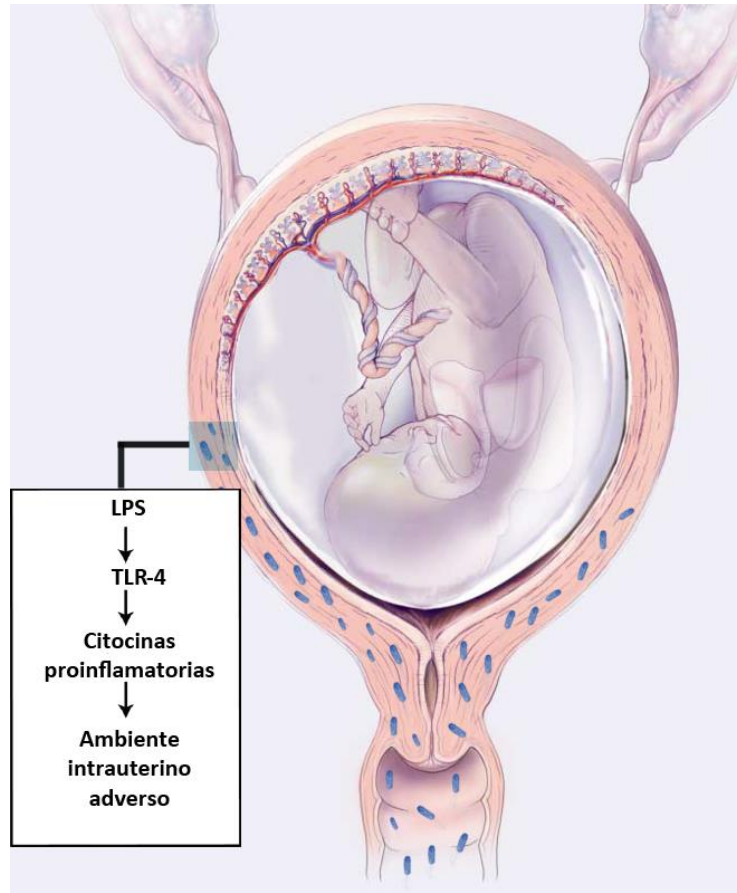


Figura 4. Infección intrauterina.

Las infecciones desarrolladas durante la gestación más comunes son aquellas que son consecuencia de la migración ascendente de agentes patógenos desde la vagina hacia el útero. Desencadenando la activación de procesos inflamatorios en respuesta a la invasión, provocando un ambiente adverso intrauterino que interfiere con la continuidad del embarazo. Modificado de: (Goldenberg, Hauth, and Andrews 2000).

Este tipo de consecuencias se desarrollan porque el sistema inmune debe actuar en contra de la infección, montando una respuesta de tipo inflamatoria, por lo tanto, se pierden los mecanismos de tolerancia que mantenían la continuidad del embarazo y las complicaciones comienzan a presentarse.

1.5. Procesos inflamatorios durante la gestación

El proceso de inflamación se define como el mecanismo de respuesta que resulta de la actividad biológica de citocinas y otros mediadores después de un estímulo, que puede tener o no como origen un proceso infeccioso (Zheng 2012).

Durante el proceso de implantación y parto, la inflamación juega un papel significativo para el desarrollo normal de estos cambios. Sin embargo, la inflamación debe ser finamente controlada debido a que ésta es capaz de provocar efectos negativos que alteran la función tisular y que por ende pueden provocar complicaciones durante el embarazo (Kalagiri et al. 2016).

La inflamación participa en los mecanismos de labor de parto. Primero, la contractilidad miometrial inicia con la actividad de la oxitocina y el posterior aumento en los niveles de citocinas asociadas al trabajo de parto, principalmente TNF- α e IL-1 β que tienen un efecto similar al de la oxitocina, y también por el incremento en la expresión de COX2 y la producción de prostaglandinas (Challis et al. 2009). Segundo, el borrado cervical es dependiente de metaloproteasas de matriz (MMPs) como MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-9, de catepsina S, ciclo oxigenasa 2 (COX2) y prostaglandina E2 (PGE2). Por último, la ruptura de membranas está relacionada con el aumento en la secreción de citocinas proinflamatorias, mayor producción de MMP-9, colagenasas y prostaglandinas y la disminución concomitante de los niveles de los inhibidores tisulares para metaloproteasas (TIMP) dando como resultado el debilitamiento membranal y su posterior ruptura.

El desarrollo de procesos de tipo inflamatorio inducidos por infecciones durante el último trimestre del embarazo, enciende todos estos mecanismos y logra desestabilizar el equilibrio inmunológico, por lo que se comienzan a montar estas respuestas sin que se haya concluido el proceso de gestación. Como resultado se desata la secreción de citocinas pro-inflamatorias por células como trofoblastos, macrófagos además de leucocitos deciduales infiltrados (Zheng 2012).

Se considera que las tres citocinas proinflamatorias secretadas por el sistema inmune innato más importantes son IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Esta última citocina tiene la función de activar a factores de transcripción como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa (NF κ B) y AP-1 que participan en respuestas inflamatorias. IL-1 β es también un mediador de la respuesta inflamatoria y se considera que esta citocina es la primera implicada en la respuesta en contra de productos

microbianos en la decidua humana, su inducción resulta en la producción de prostaglandinas por parte del amnios y la decidua (Zheng 2012). IL-6 es otra de las principales citocinas que participa en esta respuesta y por esto es utilizada como un biomarcador clínico de infección intrauterina (Abbas, Lichtman, and Pillai 2015; Zheng 2012).

1.5.1. Respuesta inflamatoria mediada por el TLR-4

El aumento en la producción de citocinas proinflamatorias en la interfase materno-fetal es una característica clave para generar un ambiente intrauterino adverso. Esto genera interés para conocer los mecanismos a través de los cuales se modifica la producción de citocinas (Zheng 2012).

La detección de agentes microbianos es mediada a través de receptores especializados llamados PRRs. Los PRRs detectan patrones moleculares conservados conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La detección de los PAMPs por sus PRRs específicos activa cascadas de señalización que resultan en la expresión de citocinas y la activación de respuestas inflamatorias y antimicrobianas (Iwasaki and Medzhitov 2004). Uno de los PRRs más estudiados es la familia de receptores de tipo Toll (TLR). Estos receptores están conformados por glicoproteínas integrales que contienen repeticiones ricas en leucina flanqueadas por estructuras ricas en cisteína en sus regiones extracelulares y que participan en la unión al ligando. Hasta ahora se han identificado 10 TLRs en el humano (Abbas, Lichtman, and Pillai 2015).

Los TLRs se clasifican en dos grupos basados en su localización celular y su especificidad del ligando. Los TLRs que se localizan en la membrana son TLR-1, -2, -4, -5 y -6 y generalmente reconocen PAMPs basados en lípidos, lipoproteínas y proteínas. Los TLRs localizados en endosomas intracelulares son el -3, -7, -8 y -9 y reconocen PAMPs basados en ácidos nucleicos microbianos o virales. La función del TLR-10 aún no se conoce completamente pero se sugiere que también podría estar relacionado con el reconocimiento de lípidos (Kawai and Akira 2010; Zheng 2012).

Uno de los PRRs mejor estudiados es el TLR-4, un receptor para lipopolisacárido (LPS) bacteriano (Rosadini and Kagan 2017), el cual se expresa por diversos tipos celulares como monocitos, macrófagos, células polimorfonucleares, células dendríticas, linfocitos B, células epiteliales,

fibroblastos y, de interés para nosotros, los trofoblastos (Ospelt and Gay 2010). La especificidad en el reconocimiento del LPS por el TLR-4 se fundamenta en la colaboración con otras 3 proteínas que no pertenecen a los TLRs: 1) La proteína de unión al LPS (LBP) que facilita el transporte del LPS; 2) La proteína extracelular MD2 que se une al componente lipídico A del LPS y forma un complejo con el TLR-4; 3) CD14 que es necesaria para la producción eficiente de señales a partir del LPS.

El lipopolisacárido es un PAMP que se encuentra en la parte más externa de la pared de las bacterias Gram negativas y tiene la capacidad de iniciar una fuerte respuesta inmune. El LPS se extrae inicialmente de la membrana bacteriana y se atrapa en vesículas por acción de la LBP, proteína que se encuentra presente en el plasma. Después la LBP transfiere el LPS hacia CD14 que rompe el agregado del LPS en moléculas monoméricas y las presenta al complejo TLR-4/MD2 (Park and Lee 2013). Cuando TLR-4 es activado a partir del reconocimiento del LPS, su activación puede ocurrir a través de MyD88 (factor de diferenciación mieloide) o independiente de MyD88. La vía dependiente de MyD88 induce la activación de NFκB, lo que finalmente resulta en la inducción de la expresión y síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Ramachandran 2014).

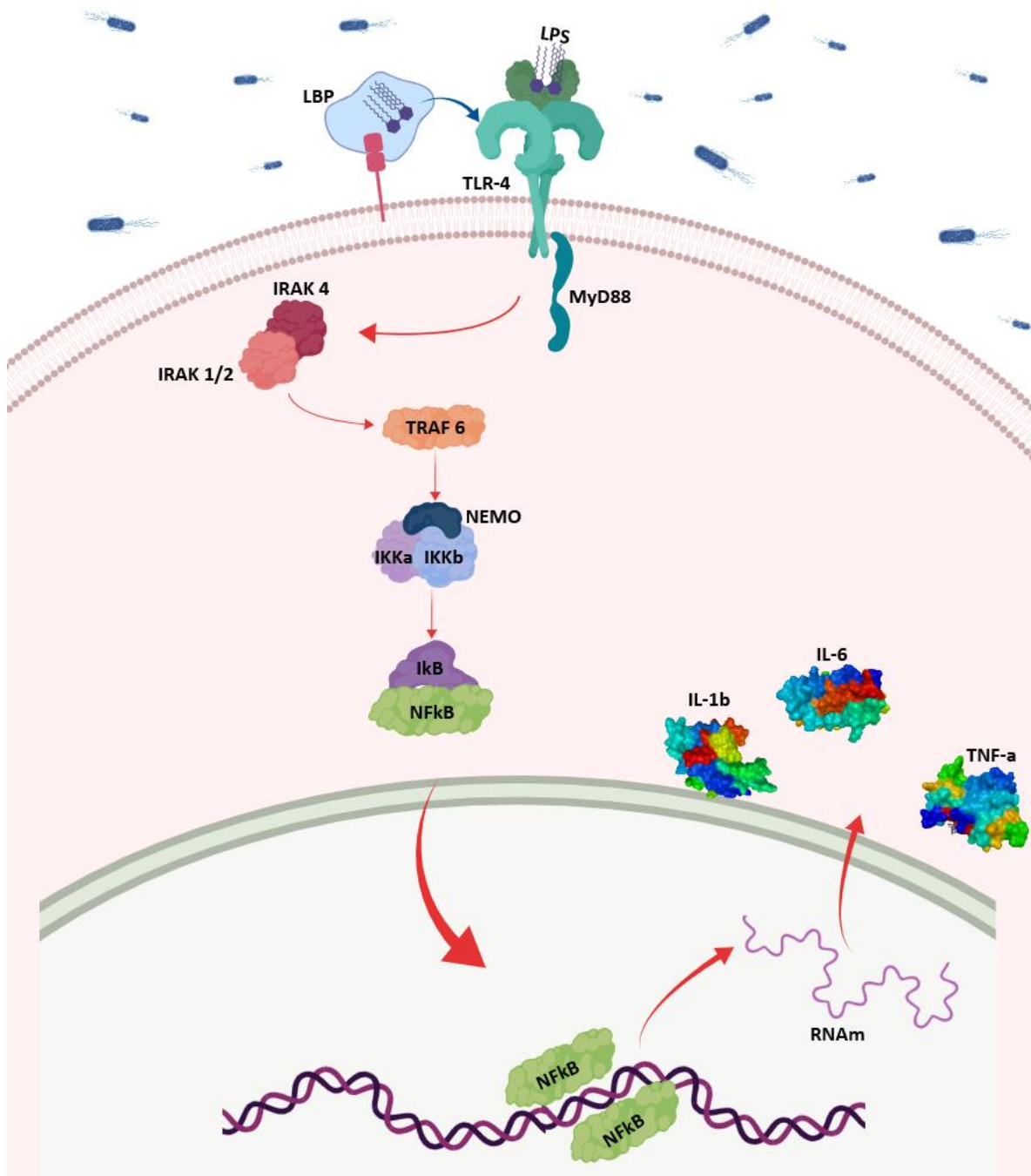


Figura 5. Vía de señalización de TLR-4.

El reconocimiento de esta endotoxina comienza cuando la LBP transfiere el LPS hacia CD14, el cual es el encargado de presentar al LPS al complejo de TLR-4/MD2. La agregación de TLR-4/MD2 después de la unión del LPS genera la activación de múltiples componentes, empezando por IRAK4 y seguido de IRAK2 e IRAK1. La activación de IRAK resulta en la interacción con TRAF6, que en conjunto con otros factores provocan la unión al componente regulador NEMO, el cual se encarga de regular al complejo IKK. IKK es el encargado de activar a IκB, el cual es una molécula reguladora de NFκB. Cuando IκB es fosforilado libera a NFκB, y puede translocarse hacia el núcleo, en donde se dimeriza y se une a elementos de respuesta a NFκB en el ADN para activar la transcripción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1β y TNF-α. Figura realizada por Déciga-García, 2019.

II. ANTECEDENTES

La PRL es una hormona con actividad inmunomoduladora conocida; sin embargo, parece ejercer actividades pro- o anti-inflamatorias dependientes del tejido y el microambiente. Por ejemplo, en un modelo murino, Sodhi y Tripathi observaron que la adición de 100 ng/mL a macrófagos en cultivo resultó en la inducción de la secreción de IL-1 β e INF- γ (Sodhi and Tripathi 2008). En otros modelos de linfocitos T y monocitos en cultivo, el uso de estrategias con anticuerpos dirigidos contra PRL indicó que esta hormona participa en el mantenimiento de la síntesis de INF- γ , IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Chavez-Rueda et al. 2005; Lopez-Rincon et al. 2013). Estas 3 evidencias en conjunto posicionan a la PRL como una hormona con actividad pro-inflamatoria en las células especializadas del sistema inmune.

Por otra parte, en la interfase materno-fetal la PRL parece ejercer actividades más bien anti-inflamatorias. Desde hace más de una década, Bao y colaboradores observaron que la presencia de PRL inhibe la síntesis de IL-6 en la región decidual en el modelo murino (Bao et al. 2007). Otras evidencias más recientes desarrolladas por nuestro grupo de laboratorio en membranas corioamnióticas humanas en cultivo, evidenciaron a la PRL como una hormona capaz de atenuar la inflamación mediante la reducción en la secreción de TNF- α e IL-1 β (Zaga-Clavellina et al. 2014; Flores-Espinosa et al. 2017).

Dado los efectos a veces opuestos de la PRL dependiendo del tejido, resulta importante evaluar el papel inmunomodulador de la prolactina en la placenta humana.

III. JUSTIFICACIÓN

El parto pretérmino y PROM son condiciones patológicas obstétricas que se asocian con la morbimortalidad tanto de la madre como del producto. Evidencias clínicas y epidemiológicas apuntan a que la principal causa asociada a PROM y a parto pretérmino son las infecciones genitourinarias desarrolladas en el último trimestre del embarazo, las cuales son responsables de alrededor del 30% de los partos pretérmino en el mundo. Las mujeres que experimentan infecciones en la etapa perinatal son también propensas a desarrollar enfermedades como anemia, trombocitopenia, insuficiencia renal transitoria, así como endometriosis post-parto (Gilstrap and Ramin 2001). En México nacen más de 120 mil prematuros al año, identificándose como causa de mortalidad neonatal en un 28.8% (López-García, Ávalos-Antonio, and Díaz-Gómez 2018). En el mundo, alrededor de 1 millón de muertes neonatales al año son consecuencia de infecciones durante el periodo perinatal (OMS 2015). De los agentes causales de tipo Gram-negativo relacionados con las infecciones genitourinarias durante el embarazo, el 80 al 90% corresponden con *Escherichia coli* uropatogénica (Delzell and Lefevre 2000). Razón por la cual, en esta tesis se eligió simular un ambiente infeccioso a través de la inflamación estéril con lipopolisacárido (LPS) derivado de *Escherichia coli*, el cual es capaz de activar selectivamente la vía del TLR-4 de manera semejante a como ocurre con una infección endógena.

Tal como se describió en la sección de antecedentes, la PRL puede ser un importante inmunomodulador en un escenario de infección y/o inflamación, en particular en los tejidos extraembrionarios. Por lo que, y dada su relevancia en el área de salud pública perinatal, en este proyecto de tesis se planteó evaluar si la prolactina puede modificar el perfil de inflamación inducido por la infección estéril con LPS en la placenta humana. Los resultados derivados contribuirán en la comprensión de los eventos asociados a la infección con *E. coli* en la placenta humana y a vislumbrar si la prolactina tiene un efecto anti-inflamatorio que pudiera contener el ambiente adverso intrauterino asociado a la inflamación, y que puede derivar en múltiples complicaciones para el recién nacido.

IV. HIPÓTESIS

El cultivo primario de explantes placentarios será un modelo útil y viable para el análisis de la función inmunomoduladora de la PRL. El tratamiento con LPS resultará en la inducción de un ambiente inflamatorio caracterizado por una exacerbada producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Por otra parte, el tratamiento con prolactina disminuirá la síntesis de estas citocinas bajo la condición inflamatoria del LPS. La regulación de la actividad anti-inflamatoria de la PRL será dependiente de su impacto sobre el receptor TLR-4 y su señalización sobre NF κ B.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la prolactina sobre la síntesis de los marcadores inflamatorios IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el cultivo de explantes placentarios tratados con lipopolisacárido de *E. coli* (LPS), para conocer la participación de esta hormona como inmunomodulador del proceso inflamatorio durante la gestación. Además, se buscará esclarecer los mecanismos asociados a la inmunomodulación observada por la prolactina en la placenta humana.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Validar el modelo del cultivo primario de explantes placentarios mediante su caracterización morfológica y la síntesis de gonadotropina coriónica humana (hCG).
- b) Comprobar la funcionalidad biológica de la prolactina que se usará en los tratamientos experimentales, a través de la activación de Jak2.
- c) Comprobar la funcionalidad biológica del LPS que se usará en los tratamientos experimentales, a través de la activación de I κ B.
- d) Evaluar el efecto de la PRL sobre la secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el cultivo de explantes placentarios estimulados con LPS.
- e) Evaluar el efecto de la PRL sobre la síntesis intracelular de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el cultivo de explantes placentarios estimulados con LPS.
- f) Evaluar el efecto de la prolactina sobre la síntesis de TLR-4 en explantes placentarios inflamados con LPS.
- g) Evaluar el efecto de la prolactina sobre la activación de NF κ B en el cultivo de explantes placentarios inflamados con LPS.

VII. METODOLOGÍA

7.1. Consideraciones éticas

La recolección de las muestras biológicas se realizó en la Unidad Médica de Alta Especialidad del IMSS Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”. El protocolo fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social con el título de “Caracterización del mecanismo inmuno-endocrino de la prolactina en el inicio y progresión del trabajo de parto”, con número de registro R-2017-785-013. La metodología del estudio siguió los estatutos de protección a las pacientes en los protocolos de investigación de acuerdo a los criterios del Informe Belmont de justicia, beneficencia y respeto a las personas y a la Norma General del DHHS para la Protección de Sujetos Humanos en la Investigación. El consentimiento informado por escrito se apega a los estatutos establecidos en la declaración de Helsinki.

7.2. Criterios de inclusión

Se obtuvieron placentas de pacientes con las siguientes características: Pacientes entre 18 y 37 años de edad programadas a operación cesárea, que cursaron con embarazo normoevolutivo a término (37 a 40 semanas de gestación), sin enfermedades endocrinas o metabólicas subyacentes, sin consumo de medicamentos diferentes a los propios del embarazo y sin desarrollo de infecciones cervico-vaginales en el último trimestre.

7.3. Criterios de exclusión

Se excluyeron de este estudio a las pacientes con alergia a la penicilina o estreptomina, con parto eutócico vaginal, con embarazo múltiple y aquellas pacientes que no proporcionaron su consentimiento informado para la toma de la muestra.

7.4. Tratamientos experimentales

El medio de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” (DMEM) así como el suero fetal bovino (SFB) se obtuvieron de Gibco/Invitrogen (CA, EUA) y se utilizaron como medio de mantenimiento para el cultivo primario de explantes placentarios. Además se utilizó lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 055:B5 de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), el cual se diluyó en PBS y se empleó como inductor de la inflamación estéril en el modelo biológico. La prolactina recombinante humana se obtuvo de PeproTech (Rocky Hill, NJ, EUA) y se reconstituyó en H₂O-0.1% albúmina sérica bovina (BSA). Alin (Laboratorios Chinoin, Ciudad de México, México) es la formulación comercial de la dexametasona (DXM) y se empleó como control anti-inflamatorio. Trixilem (Laboratorios Teva, Toluca, Estado de México, México) es una formulación comercial del metotrexato (MTX) y se utilizó como inhibidor de pan-JaK.

7.5. Cultivo primario de explantes placentarios y procedimientos experimentales

Se procesaron un total de 25 placentas de las cuales se derivó el cultivo primario de explantes placentarios. Para ello, después del alumbramiento se recolectó la placenta y se colocó en un contenedor estéril de acero inoxidable con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) a 37 °C para su transporte al laboratorio de Inmunología de la Unidad feto-placentaria en el INPer. Una vez en el laboratorio se realizaron lavados con suficiente solución salina estéril a temperatura ambiente y se repitieron hasta que la mayoría de la sangre en la que se encontraba embebida la placenta fuera eliminada. Posteriormente se resectó el cotiledón central placentario con ayuda de material quirúrgico estéril, para obtener un cotiledón con un radio aproximado de 5 cm alrededor del cordón umbilical. Se eliminaron los restos deciduales, coágulos y vasos sanguíneos, por ambas caras. Después se colocó el cotiledón sobre una gasa estéril para eliminar el exceso de solución salina y se cortaron explantes de 3 a 5 mm, los cuales se mantuvieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB, 1% de piruvato de sodio y antibiótico/antimicótico (penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL, fungizona 25 ng/mL). El cultivo de explantes placentarios se mantuvo en un incubador húmedo durante 24 horas en condiciones de esterilidad a 37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Desde el primer

día (0 – 24 horas) se mantuvo a los explantes placentarios con PRL para abatir la respuesta inflamatoria y emular el ambiente natural del embarazo (Zaga-Clavellina et al. 2014). Al día siguiente (25 – 48 horas) se agregaron los tratamientos experimentales. Las concentraciones de PRL empleadas fueron 100, 300 y 500 ng/mL, para semejar la concentración fisiológica de PRL que existe en la sangre de las cámaras intervellosas en que está embebida la placenta durante el embarazo (Ferriani and Silva de Sa 1988). El estímulo con LPS [500ng/mL] se utilizó para simular un escenario infeccioso ya que este antígeno es el principal componente membranal de las bacterias Gram-negativas como *E. coli* (Guha and Mackman 2001); razón por la cual esta molécula es un eficiente inductor de la inflamación vía TLR-4. El agente antiinflamatorio empleado en este modelo biológico fue la dexametasona (DXM) en una concentración de 300 nM. Para el caso del metotrexato (MTX), la concentración de trabajo fue de 50 μ M y se empleó como un inhibidor de pan-Jak. Los explantes incubados con el vehículo (Vh) fueron incubados con PBS, H₂O y 0.1% BSA. Los controles experimentales (C) únicamente se incubaron con medio de cultivo.

Para explorar la capacidad anti-inflamatoria de la PRL bajo un escenario de infección, se realizó la co-incubación de la PRL con LPS. Otros explantes fueron expuestos con DXM o MTX. Después de 24 horas de incubación con estos tratamientos, se recolectaron 500 μ L de medio de cultivo y se conservaron a -40°C hasta el análisis del perfil de secreción. Los explantes placentarios fueron homogenizados con buffer de lisis de proteínas para su posterior análisis por Western Blot.

7.6. Análisis microbiológico de los explantes placentarios

Para garantizar que las placentas colectadas durante ese protocolo se encontraran libres de patógenos, se sometieron a análisis microbiológico mediante su cultivo en caldo BHI (infusión cerebro corazón) el cual funciona como un caldo nutritivo que permite el crecimiento de microorganismos. Además, se utilizaron dos caldos para identificar características metabólicas, los cuales son Ca (caldo arginina) y Cu (caldo urea). El caldo arginina es una prueba bioquímica secundaria que nos permite identificar la capacidad de hidrolizar y después descarboxilar a la arginina dando como producto final a la putrescina (Moller 1955). Por último, el caldo urea evidencia la actividad enzimática de la ureasa,

capacidad que presentan bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (Forbes 2009; Farias 2015).

Se colocaron pequeños explantes en cada uno de los caldos antes mencionados y fueron incubados a 37 °C durante 8 días. El análisis permite la detección de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Lactobacillus sp*, *KleibSELLA sp*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*. Para el desarrollo de este proyecto se descartaron aquellas placentas en las que se detectó carga microbiana de cualquier índole.

7.7. Caracterización morfológica del cultivo de explantes placentarios por tinción de Hematoxilina y Eosina.

Con el fin de evaluar la morfología de la placenta humana se prepararon laminillas teñidas con hematoxilina y eosina, esta tinción es ampliamente utilizada debido a que la hematoxilina por ser de naturaleza catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas en tonos azul y púrpura, por ejemplo, los núcleos celulares, en cambio el uso de eosina tiñe componentes básicos en tonos color rosa gracias a su naturaleza ácida, un ejemplo es el citoplasma (Salazar 2016).

7.8. Caracterización del cultivo de explantes placentarios por secreción de gonadotropina coriónica humana (hCG)

Para caracterizar el cultivo de explantes placentarios se evaluó la secreción de hCG al medio de cultivo para corroborar el mantenimiento *in vitro* del fenotipo endocrino placentario. Se llevó a cabo la cuantificación de esta hormona mediante la técnica de ELISA con el estuche comercial R&D systems (DY9034-05) con un límite de detección de 8 pg/mL. El desarrollo de la técnica se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones sugeridas por el fabricante, tal como se describe con mayor detalle en la siguiente sección.

7.9. Cuantificación de citocinas pro-inflamatorias por ELISA

Para evaluar la secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α se utilizó el inmunoanálisis de ELISA tipo sandwich. La secreción de IL-1 β e IL-6 al medio de cultivo se cuantificó con el estuche comercial de Peprotech (900-K95 y 900-K16) con un límite de detección de 8 pg/mL y 46 pg/mL, respectivamente. La detección de TNF- α se evaluó con el estuche comercial de R&D systems (DY210) con un límite de detección de 31 pg/mL.

A continuación, se describe el desarrollo de esta técnica: Se emplearon placas de 96 pozos y se comenzó por la sensibilización con el anticuerpo de captura diluido en solución de fosfatos (PBS) (100 μ L por pozo) para cada una de las citocinas de interés: IL-1 β , IL-6 y TNF- α ; las concentraciones del anticuerpo que se utilizaron fueron de 0.5 μ g/mL, 1 μ g/mL y 4 μ g/mL, respectivamente. Las placas se incubaron durante toda la noche a 4 °C y al siguiente día se realizaron 4 lavados con buffer de lavado (PBS - 0.05% Tween 20) para eliminar los anticuerpos no adheridos. Después se continuó con el bloqueo de la placa al agregar 300 μ L por pozo del buffer de bloqueo (1% albúmina bovina sérica (BSA) diluida en PBS), con un periodo de incubación de al menos 1 hora y posteriormente se realizaron 4 lavados con el buffer de lavado. El siguiente paso fue la preparación de los 7 puntos de las curvas de calibración: para el caso de IL-1 β y TNF- α la curva fue de 15.62 – 2000 pg/mL y la curva de IL-6 fue de 46.87 - 3000 pg/mL. Se agregaron 100 μ L del estándar o de la muestra por duplicado y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Después se continuó con 4 lavados con buffer de lavado y se continuó la incubación con 100 μ L por pozo del anticuerpo de detección. En el caso de IL-1 β e IL-6 se trabajó con una concentración de 0.5 μ g/mL de anticuerpo de detección diluido en buffer de dilución (PBS - 0.05% Tween 20 y 0.1% BSA). En el caso de TNF- α la concentración trabajo del anticuerpo de detección fue de 300 ng/mL diluido en buffer de bloqueo. Al finalizar la incubación se realizaron los lavados correspondientes y se agregaron 100 μ L del conjugado de avidina-HRP diluido en buffer de dilución y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente evitando la exposición a la luz. La reacción colorimétrica se realizó con el sustrato o-fenilendiaminadihidrocloruro (OPD) de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) en buffer de Na₃PO₄ 0.2 M, ácido cítrico 0.1M, 0.05% H₂O₂ al 30%, pH 5.0. Las placas se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm con corrección a 650 nm para el caso de IL-6 e IL-1 β y para TNF- α a 540nm. La curva de calibración se

ajustó a 4 parámetros logísticos y la cuantificación final se ajustó al factor de dilución del medio de cultivo y se normalizó por g de tejido (peso húmedo).

7.10. Inmunodetección de citocinas pro-inflamatorias y marcadores de señalización intracelular por Western Blotting

Se realizó la extracción de proteínas totales de los explantes placentarios mediante la ruptura de la membrana celular con ayuda del homogenizador polytron (OMNI Internacional). Los explantes se homogenizaron en presencia del buffer de lisis de proteínas (HEPES 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM, Nonidet P-40 0.5%, Na₃VO₄ 5 mM, NaF 20 mM y el coctel de inhibidor de proteasas Sigma P8340, 1:1000). Después se continuó con 30 minutos de vórtex a 4°C y se cuantificó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford 1976). En la electroforesis se cargó de 45 a 50 µg de proteína/pozo para cada una de las muestras.

Los homogenizados se hirvieron durante 10 minutos con buffer de Laemmli 5X, el cual participa en la ruptura de puentes disulfuro en las proteínas por la presencia del β-mercaptoetanol. Este pre-tratamiento térmico permite que las proteínas se desnaturalicen y puedan migrar adecuadamente a través de los poros del gel cuando se aplica corriente eléctrica. Se emplearon geles de poliacrilamida al 10% y geles de SDS-tricina-PAGE con 1mm de grosor con 10 pozos cada uno. Se realizó la electroforesis a 120 V en buffer de corrida (Tris 5 mM, Glicina 38 mM y 0.1% SDS a pH 8.3) durante 3 horas aproximadamente, para la identificación de TLR-4 , p-JAK2 y p-IκB. Para el caso de IL-1β, IL-6 y TNF-α que tienen un peso de 31 kDa, 24 kDa y 26 kDa, respectivamente se empleó la técnica de SDS-tricina-PAGE para la identificación de proteínas con un peso menor a 30 kDa (Schagger 2006). La electroforesis se realizó a 30 V en buffer de cátodo (Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M, SDS 0.1% a pH teórico de 8.25) y en buffer de ánodo (Tris 0.2 M a pH 8.9) durante toda la noche.

Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida hacia una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm, la cual tiene una alta afinidad por las proteínas. La transferencia se corrió durante 1 hora y 30 minutos a 120V en una cámara con transfer buffer (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol 20%) y se utilizó el colorante de rojo de Ponceau para asegurar que la transferencia se realizará de manera correcta y el bandeado final no presentará ninguna interferencia.

Posteriormente se continuó con el bloqueo de la membrana con TBS y 5% de leche descremada en polvo baja en fosfatos (BioRad,170-6404). Después se continuó con 4 lavados de 5 minutos con TBS - 0.05% Tween20. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos contra IL-1 β hecho en conejo (Santa Cruz, sc-7884, 1:1000), IL-6 hecho en conejo (Santa Cruz, sc-7920, 1:350), TNF- α hecho en cabra (Santa Cruz, sc-1350, 1:350), p-Jak2 hecho en conejo (Cell signaling, Boston, MA, USA. 3771S, 1:1,500), p-I κ B hecho en conejo (Cell signaling 2859S, 1:1,500), y TLR4 hecho en ratón (Santa Cruz, sc-293072, 1:750). Se utilizaron como constitutivos los anticuerpos contra β -actina hecho en ratón (Abcam 8226, 1:10,000) y GAPDH hecho en ratón (Abcam, ab8245, 1:10,000). Al día siguiente se realizaron 4 lavados y se incubó a las membranas con su respectivo anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios fueron: cabra anti-IgG de conejo acoplado a HRP (Vector, PI-1000, 1:6,000), cabra anti-IgG de ratón acoplado a HRP (R&D Systems, HAF007, 1:6,000) y caballo anti-IgG de cabra acoplado a HRP (Vector, PI-9500, 1:6,000)

Finalmente se revelaron las membranas con el sustrato quimioluminiscente *Immobilon Western* (Millipore) en proporción 1:1 con ayuda del fotodocumentador ChemiDoc XRS System y con el programa especializado *Image Lab Software* (Bio-Rad, Hércules, California, USA) para el cálculo de la densidad óptica de las bandas de interés.

7.11. Activación de NF κ B por ensayo de ELISA

Tal como se describió previamente, los explantes se homogenizaron en presencia del buffer de lisis de proteínas (HEPES 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM, Nonidet P-40 0.5%, Na₃VO₄ 5 mM, NaF 20 mM y el coctel de inhibidor de proteasas Sigma P8340, 1:1000). Después se mantuvo durante 30 minutos de vórtex a 4°C y se centrifugó a 7000 rpm por 1 minuto. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en un buffer de lisis comercial del kit, adicionado con inhibidores de fosfatasas (Na₄P₂O₇, NaF, Na₃VO₄) e inhibidor de proteasas (Sigma P8340, 1:1000), después se mantuvo en agitación por vórtex a 4°C durante 25 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos. Se guardó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford y se ajustó el volumen para 35 μ g de proteína.

Posteriormente se utilizó el kit comercial NFκB p65 InstantOne ELISA (eBioscience, 85-86083) para detectar las formas fosforilada y total de NFκB en los extractos proteicos. El desarrollo de la técnica se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones sugeridas por el fabricante. La placa se leyó a 450nm con corrección a 650nm. Y la actividad de NFκB se expresó como fosforilada/total.

7.12. Análisis estadístico

Se compararon los ensayos de secreción por el método de ELISA y los perfiles de Western blotting por ANOVA de una vía. Los post hoc que se utilizaron para el análisis de las comparaciones múltiples pareadas fueron: Dunn, Dunnett o Holm-Sidak, dependiendo de la distribución de los datos; en el pie de las figuras se indica el post-hoc que se empleó. El análisis estadístico se realizó con el software especializado SigmaPlot 11.0 (Jandel Scientific). Se consideró como diferencia estadística significativa cuando el valor de P fue inferior a 0.05 ($P < 0.05$).

VIII. RESULTADOS

8.1. Validación del modelo experimental

8.1.1. Morfología placentaria

Para evaluar los efectos de la prolactina en la placenta humana se eligió utilizar el modelo biológico de explantes placentarios, los cuales se tomaron de la región central correspondiente a la vellosidad trofoblástica. Con el fin de evaluar que la morfología de la placenta se conservaba en el modelo, se prepararon laminillas con la tinción de Hematoxilina y Eosina. En la figura 6 se puede distinguir la morfología característica de los arboles vellosos delimitados por una monocapa de sinciotrofoblastos (SCT). Adyacente a los SCT se puede observar a los citotrofoblastos (CTF) inmersos en el mesénquima (M) del árbol velloso, integrado por fibroblastos y matriz extracelular. Además, en el interior se puede observar el paso de múltiples vasos que conforman a la red de capilares fetales (CF).

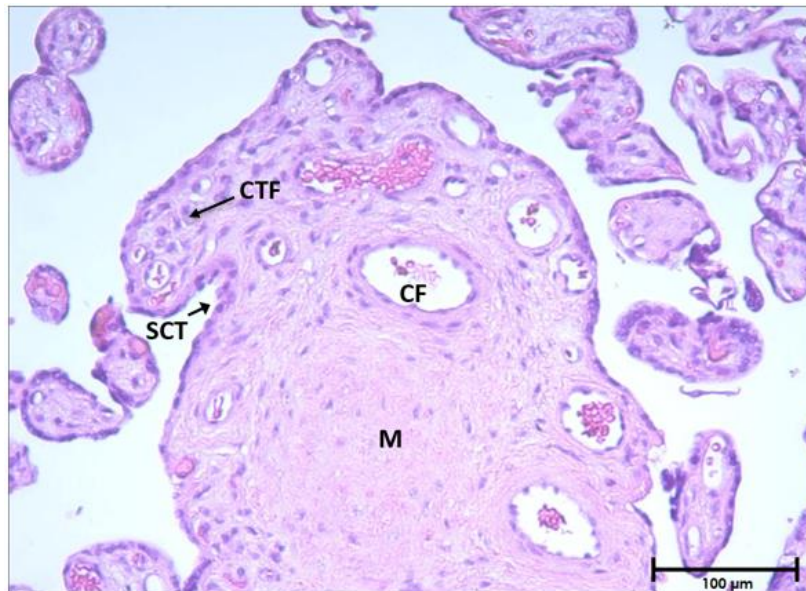


Figura 6. Corte transversal de explante placentario teñido con hematoxilina y eosina.

8.1.2. Fenotipo endocrino placentario

Con el objetivo de confirmar que los explantes placentarios conservaban su fenotipo endocrino después de la manipulación y su cultivo, se cuantificó la secreción de hCG durante 3 días. En la figura 7 se observa que existe un incremento significativo en la secreción de hCG en el día 2 y en el día 3 en comparación con la secreción detectada en el día 1 de cultivo. Por lo tanto, se puede concluir que el modelo de cultivo de explantes placentarios conserva de forma *in vitro* su naturaleza endocrina hasta por 3 días.

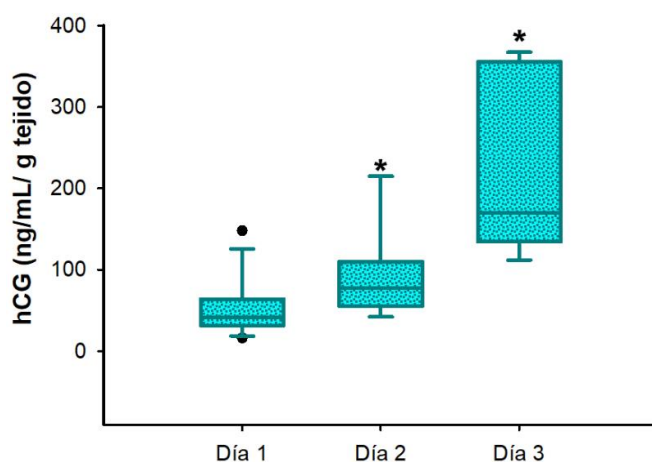


Figura 7. Evaluación del fenotipo endocrino del modelo de explantes placentarios en cultivo, mediante la secreción de hCG.

Los datos se presentan como cajas y bigotes. Las líneas de las cajas indican los percentiles 25, 50 y 75, los bigotes indican los percentiles 5 y 95. Los valores atípicos se indican en círculos. $n=8$ experimentos independientes en triplicado. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, y las comparaciones múltiples pareadas por el método de Dunn. *, $P<0.05$ vs Día 1.

8.2. Validación de la actividad biológica de la prolactina mediante la activación de fosfo-Jak-2

Después de comprobar que la funcionalidad endocrina se conserva en los explantes, se evaluó la actividad biológica de las moléculas que se usaron para los tratamientos experimentales. La actividad de la PRL se probó mediante su capacidad de inducir la fosforilación de Jak-2 (p-Jak-2). Tal como se describió en la sección 1.3.1, Jak-2 es una tirosina cinasa acoplada al receptor de prolactina en su dominio citoplasmático, y experimenta su fosforilación tras la unión de la PRL con su receptor (PRL-R) (Ignacak et al. 2012). En la figura 8 se observa que en los primeros 5 a 10 minutos de exposición con PRL 500 ng/mL comienza a acumularse significativamente esta fosfo-proteína y posteriormente decae su concentración. Este resultado indica que la PRL empleada en este proyecto es una hormona funcional, capaz de unirse con su receptor y de activar su vía de señalización por Jak-2 en el modelo experimental de los explantes placentarios en cultivo.

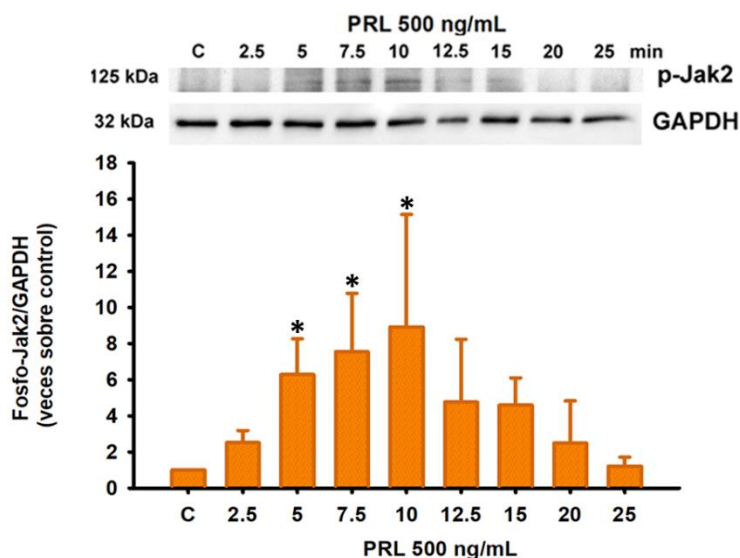


Figura 8. Ensayo de actividad biológica de la prolactina sobre explantes placentarios en cultivo, a partir de la activación de p-Jak-2.

En el recuadro superior se presenta el western blotting representativo para la inmunodetección de Jak-2 fosforilado y GAPDH como constitutivo en explantes placentarios expuestos a prolactina 500 ng/mL. El recuadro inferior muestra los datos integrados de la activación de p-Jak-2 normalizada contra GAPDH. Los datos son presentados como promedio \pm DE en 3 experimentos independientes. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples pareadas por Holm-Sidak. *, $P < 0.05$ vs. control.

8.3. Validación de la actividad biológica del LPS mediante la activación de fosfo-IkB

La capacidad del LPS para inducir una respuesta inflamatoria en los explantes placentarios se probó mediante su capacidad de inducir la fosforilación de IκB, el cual se trata de un complejo de señalización de la vía de NFκB que se activa río abajo por el reconocimiento del LPS con el receptor TLR-4, tal como se describió en la sección 1.5.1. En la siguiente figura 9 se observa que hay una acumulación significativa de la forma activa de IκB después de 10 a 15 minutos de exposición con LPS 500 ng/mL. Este resultado indica que el LPS es activo, puede unirse a TLR-4 y activar señalizaciones intracelulares que culminan con la fosforilación de IκB en el modelo experimental de los explantes placentarios en cultivo

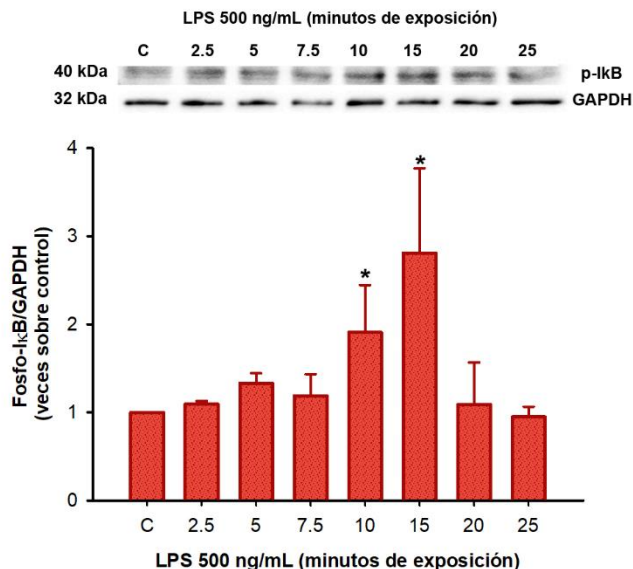


Figura 9. Ensayo de actividad biológica del LPS sobre explantes placentarios en cultivo, a partir de la activación de p-IκB.

En el recuadro superior se presenta el western blotting representativo para la inmunodetección de IκB fosforilado y GAPDH como constitutivo en explantes placentarios expuestos a LPS 500 ng/mL. El recuadro inferior muestra los datos integrados de la activación de p-IκB normalizada contra GAPDH. Los datos son presentados como promedio ± DE en 3 experimentos independientes. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples pareadas por Holm-Sidak. *, $P < 0.05$ vs. control.

8.4. La prolactina disminuye la secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en un ambiente de inflamación inducido por el LPS

Una vez que se comprobó la funcionalidad de los tratamientos experimentales, se evaluó el efecto de la prolactina sobre la secreción de citocinas proinflamatorias en un ambiente inflamatorio inducido por el LPS. Tal como se esperaba el LPS provocó un incremento significativo en la síntesis de IL-1- β , IL-6 y TNF α (figuras 10, 11 y 12) en comparación con el control (C) y el vehículo (Vh). Además, se exploró la capacidad de la prolactina *per se* (PRL 500 ng/mL) de modificar la secreción de las citocinas, sin embargo, podemos notar que en ninguno de los tres casos existió un cambio en las mismas, en comparación con los controles. En contraste, en los explantes tratados con LPS y co-incubados con PRL se observa la inhibición significativa de la secreción de IL-1- β , IL-6 y TNF- α en comparación con los explantes que fueron tratados solo con LPS. Se observó que dicha inhibición fue dosis dependiente y además específica para cada una de las citocinas, ya que IL-6 fue la más sensible al efecto antiinflamatorio de la prolactina (inhibición desde PRL 100 ng/mL), seguido de TNF- α (inhibición desde PRL 300 ng/mL) y finalmente IL-1 β (inhibición sólo con PRL 500 ng/mL). La DXM ejerció su esperada actividad anti-inflamatoria, e interesantemente su efecto fue comparable con el efecto anti-inflamatorio de la PRL sobre IL-1 β y TNF- α . Y para el caso de la co-incubación del LPS, PRL y el metotrexato se bloqueó el efecto anti-inflamatorio de la prolactina sobre la secreción de IL-1 β y TNF α .

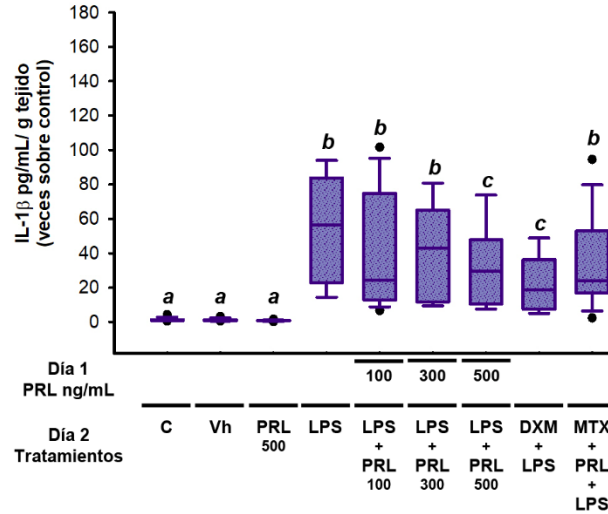


Figura 10. La PRL disminuye la secreción de IL- β inducida por el LPS.

Los datos se presentan como cajas y bigotes. Las líneas de las cajas indican los percentiles 25, 50 y 75, los bigotes indican los percentiles 5 y 95. Los valores atípicos se indican en círculos. $n=8$ experimentos independientes en triplicado. C=Control, Vh=vehículo, PRL=Prolactina 500 ng/mL a menos de que otras concentraciones se indiquen, LPS=Lipopolisacárido 500ng/mL, DXM= dexametasona 300nM, MTX= metotrexato 50 μ M. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, y las comparaciones múltiples pareadas por el método de Dunn. a, b y c indican diferencia significativa ($P<0.05$) entre ellos.

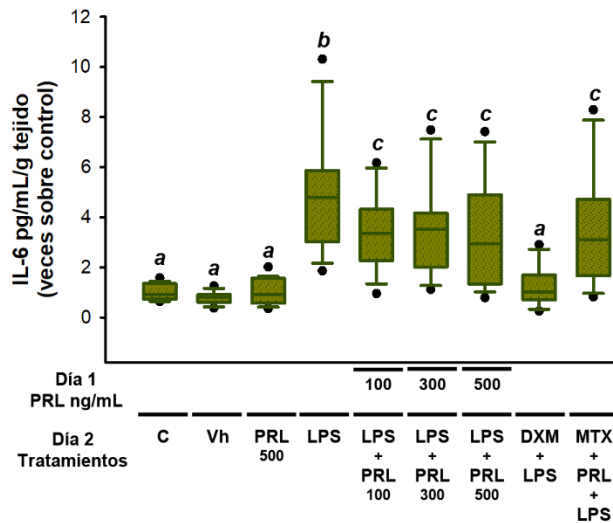


Figura 11. La PRL disminuye la secreción de IL-6 inducida por el LPS

Los datos se presentan como cajas y bigotes. Las líneas de las cajas indican los percentiles 25, 50 y 75, los bigotes indican los percentiles 5 y 95. Los valores atípicos se indican en círculos. $n=8$ experimentos independientes en triplicado. C=Control, Vh=vehículo, PRL=Prolactina 500 ng/mL a menos de que otras concentraciones se indiquen, LPS=Lipopolisacárido 500 ng/mL, DXM= dexametasona 300 nM, MTX= metotrexato 50 μ M. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, y las comparaciones múltiples pareadas por el método de Dunn. a, b y c indican diferencia significativa ($P<0.05$) entre ellos.

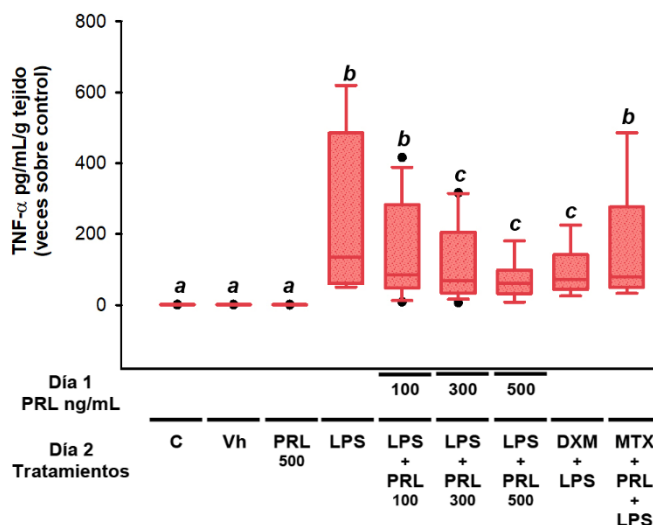


Figura 12. La PRL disminuye la secreción de TNF- α inducida por el LPS.

Los datos se presentan como cajas y bigotes. Las líneas de las cajas indican los percentiles 25, 50 y 75, los bigotes indican los percentiles 5 y 95. Los valores atípicos se indican en círculos. $n=8$ experimentos independientes en triplicado. C=Control, Vh=vehículo, PRL=Prolactina 500 ng/mL a menos de que otras concentraciones se indiquen, LPS=Lipopolisacárido 500 ng/mL, DXM= dexametasona 300 nM, MTX= metotrexato 50 μ M. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, y las comparaciones múltiples pareadas por el método de Dunn. a, b y c indican diferencia significativa ($P<0.05$) entre ellos.

8.5. La prolactina disminuye la síntesis intracelular de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en un ambiente de inflamación inducido por el LPS

Tomando en cuenta estos resultados se decidió evaluar la síntesis intracelular de estas citocinas pro-inflamatorias por medio de la técnica de Western blot. Como se observa en las siguientes figuras 13, 14 y 15, el LPS indujo nuevamente de manera significativa la síntesis de los precursores de IL-1 β y TNF α , así como de IL-6. De forma opuesta, la co-incubación con PRL resultó en la inhibición significativa de la expresión de estas 3 citocinas, en comparación con la observada en los explantes tratados solo con LPS. La inhibición que se presentó en IL-6 fue significativa desde la concentración de 100 ng/mL (figura 14), no siendo así para el caso de IL-1 β (figura 13) y TNF- α (figura 15) que mostraron inhibición solo con PRL 500 ng/mL. Tal y como se esperaba, el tratamiento con DMX disminuyó significativamente la síntesis de las 3 citocinas pro-inflamatorias. Y, por último, el MTX bloqueó el efecto de inhibición dependiente de PRL de pro-TNF- α , pro IL- β e IL-6.

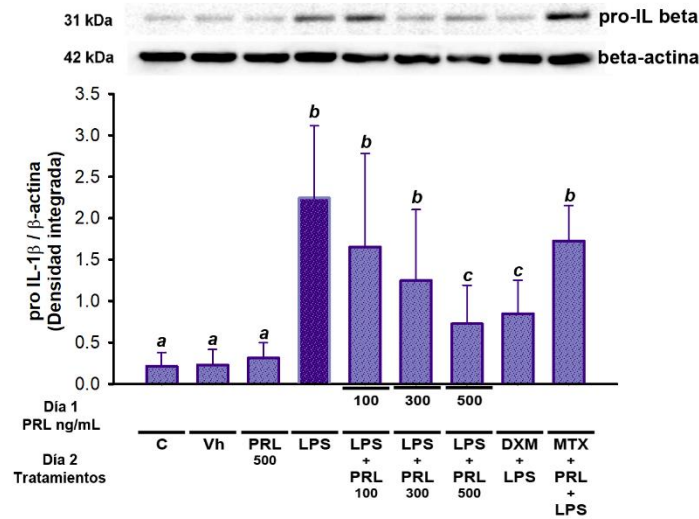


Figura 13. La PRL disminuye la síntesis intracelular de pro IL-1β en los explantes placentarios tratados con LPS.

En el recuadro superior se presenta el western blotting representativo para la inmunodetección de pro-IL-1β y β-actina como constitutivo. El recuadro inferior muestra los datos integrados de la síntesis de pro-IL-1β normalizada contra β-actina. Los datos son presentados como promedio ± DE en 4 experimentos independientes. C=Control, Vh=vehículo, PRL=Prolactina 500 ng/mL a menos de que otras concentraciones se indiquen, LPS= Lipopolisacárido 500 ng/mL, DXM= dexametasona 300 nM y MTX= metotrexato 50 μM. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples pareadas por Dunnett. a, b y c indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre ellos.

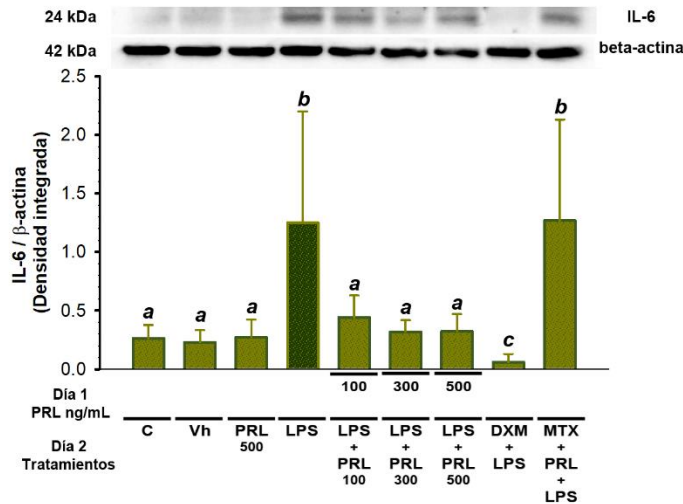


Figura 14. La PRL disminuye la síntesis intracelular de IL-6 en los explantes placentarios tratados con LPS.

En el recuadro superior se presenta el western blotting representativo para la inmunodetección de IL-6 y β-actina como constitutivo. El recuadro inferior muestra los datos integrados de la síntesis de IL-6 normalizada contra β-actina. Los datos son presentados como promedio ± DE en 4 experimentos independientes. C=Control, Vh=vehículo, PRL=Prolactina 500 ng/mL a menos de que otras concentraciones se indiquen, LPS= Lipopolisacárido 500 ng/mL, DXM= dexametasona 300 nM y MTX= metotrexato 50 μM. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples pareadas por Dunnett. a, b y c indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre ellos.

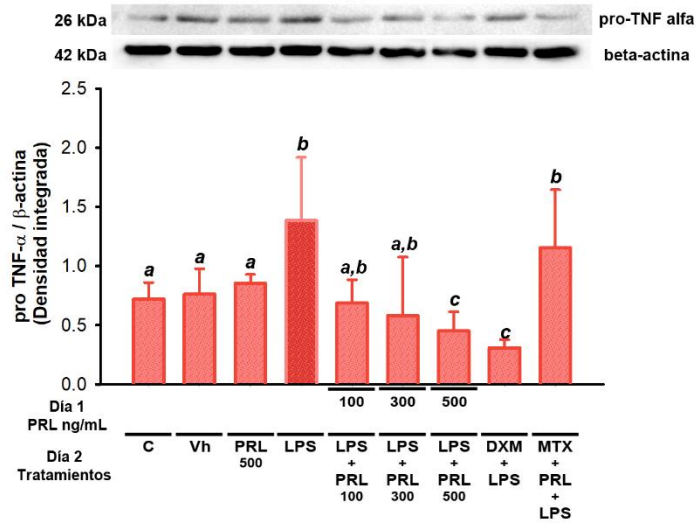


Figura 15. La PRL disminuye la síntesis intracelular de pro TNF- α en los explantes placentarios tratados con LPS.

En el recuadro superior se presenta el western blotting representativo para la inmunodetección de pro-TNF- α y β -actina como constitutivo. El recuadro inferior muestra los datos integrados de la síntesis de pro-TNF- α normalizada contra β -actina. Los datos son presentados como promedio \pm DE en 4 experimentos independientes. C=Control, Vh=vehículo, PRL=Pro lactina 500 ng/mL a menos de que otras concentraciones se indiquen, LPS= Lipopolisacárido 500 ng/mL, DXM= dexametasona 300 nM y MTX= metotrexato 50 μ M. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples pareadas por Dunnett. a, b y c indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre ellos.

8.6. Mecanismos anti-inflamatorios ejercidos por la prolactina en explantes placentarios tratados con LPS

Por último, para conocer la regulación de la actividad anti-inflamatoria ejercida por la PRL en un escenario de inflamación en la placenta humana, se evaluó la síntesis de TLR-4 y la actividad de fosfo-NFκB en contacto con los tratamientos de LPS, PRL, DXM y MTX. Y como resultado se observó que la PRL inhibió la síntesis de TLR-4, con un efecto significativo con la concentración de 500 ng/mL (Figura 16). De manera muy interesante, la DXM no inhibió la expresión de este receptor. Finalmente, el MTX sí fue efectivo para bloquear el efecto inhibitor de la PRL sobre la síntesis de TLR-4.

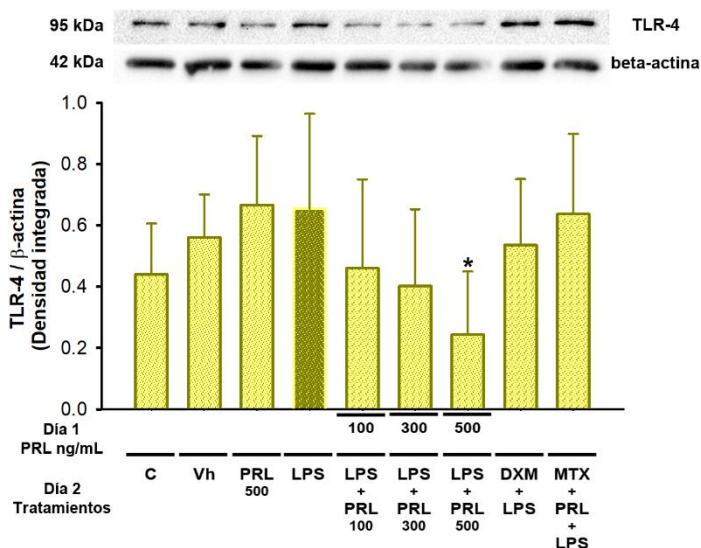


Figura 16. La PRL disminuye la síntesis intracelular de TLR-4 mediada por el LPS.

En el recuadro superior se presenta el western blotting representativo para la inmunodetección de TLR-4 y β -actina como constitutivo. El recuadro inferior muestra los datos integrados de la síntesis de TLR-4 normalizada contra β -actina. Los datos son presentados como promedio \pm DE en 4 a 6 experimentos independientes. C=Control, Vh=vehículo, PRL=Prolactina 500 ng/mL a menos de que otras concentraciones se indiquen, LPS= Lipopolisacárido 500 ng/mL, DXM=dexametasona 300 nM y MTX= metotrexato 50 μ M. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples pareadas por Holm-Sidak. *, $P < 0.05$ vs. LPS.

Con estos resultados se planteó la existencia de un posible efecto similar en la cascada de señalización de NFκB, dado que es dependiente de la activación por TLR-4. En el siguiente experimento se evaluó la fosforilación de NFκB y se observó, como era esperado, que el LPS indujo significativamente la acumulación de p-NFκB. Tal como se ha venido observando con los experimentos anteriores, la co-incubación de LPS y PRL resultó en la inhibición de p-NFκB en comparación con la actividad observada en los explantes tratados solo con LPS. El efecto significativo se observó sólo con la concentración de PRL 500 ng/mL, lo que coincide con lo observado a nivel de regulación de TLR-4. El tratamiento con DXM disminuyó significativamente la acumulación de p-NFκB. Sin embargo, el MTX no pudo prevenir la actividad anti-inflamatoria de la PRL a nivel de p- NFκB.

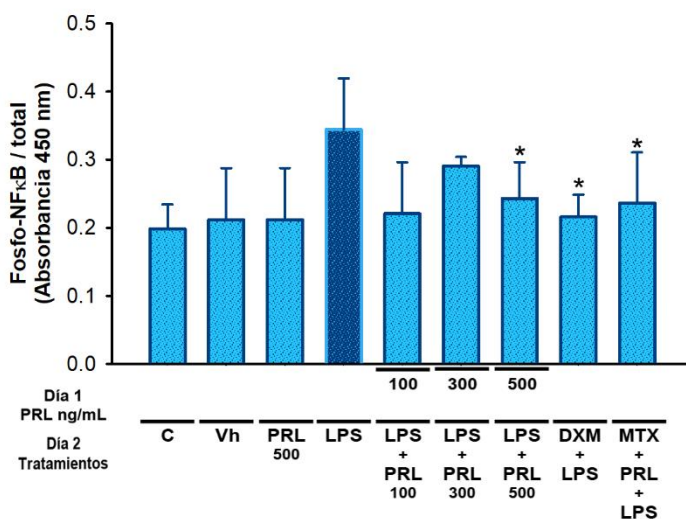


Figura 17. PRL bloquea la fosforilación de NFκB inducida por el LPS.

El ensayo de la actividad esta expresado en la relación NFκB fosforilado/total. Los datos son presentados como promedio \pm DE en 4-6 experimentos independientes. C=Control, Vh=vehículo, PRL=Prolactina 500 ng/mL a menos de que otras concentraciones se indiquen, LPS= Lipopolisacárido 500 ng/mL, DXM= dexametasona 300 nM y MTX= metotrexato 50 μ M. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples pareadas por Holm-Sidak. *, $P < 0.05$ vs LPS.

IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prolactina es una hormona pleiotrópica que está implicada en funciones tales como el crecimiento y desarrollo, en endocrinología y metabolismo, comportamiento, así como reproducción y lactancia (Costanza et al. 2015). Es importante resaltar que esta hormona también actúa como una citocina que regula la respuesta inmune (Díaz 2013). En el sistema inmune profesional, la PRL es sintetizada por macrófagos, linfocitos y células NK, donde ejerce efectos biológicos autocrinos y paracrinos tales como la diferenciación de monocitos, activación de células T y la producción de citocinas pro-inflamatorias (Díaz 2013).

Por otra parte, la PRL se secreta principalmente por las células deciduales y en menor cantidad también es producida por los trofoblastos. Incluso, la PRL se acumula en el líquido amniótico o en el espacio interveloso, lo que sugiere su participación clave en el mantenimiento del privilegio inmunológico; sin embargo, los efectos inmunomoduladores de la PRL sobre las células de origen placentario aún no se conocen completamente. La relación entre inflamación/infección y la producción de PRL ha sido bien documentada. Existen evidencias clínicas en mujeres que cursan con infecciones del tracto genito-urinario y en modelos animales de infección coriodecidual, en los que se ha demostrado que la concentración de prolactina se encuentra disminuida tanto en el suero materno como en el líquido amniótico en respuesta a la infección (Bethea et al. 1998; Mitreski and Radeka 2002).

El uso experimental del LPS como inductor del estado inflamatorio ha sido bien caracterizado, tanto en cultivos celulares como en modelos animales (Zavan et al. 2016; Zhou et al. 2017; Preciado-Martinez et al. 2018). La inflamación inducida por el LPS interacciona con distintos mecanismos celulares que culminan en numerosos desórdenes reproductivos, tales como parto pretérmino, abortos espontáneos, restricción de crecimiento intrauterino y defectos del tubo neural (Ingvorsen et al. 2015). Además del aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias, la reactividad asociada al LPS incluye también la producción de radicales libres que favorecen el estrés oxidante, el cual a su vez también impacta en la señalización de las vías NFκB y PPARγ (Hussain et al. 2017). Recientemente, se reportó que el LPS impacta negativamente en la programación del desarrollo ya que afecta el desarrollo cerebral y tiene efectos a largo plazo en el comportamiento y funciones neuro-endocrinas vía la degradación de neuronas serotoninérgicas (Izvol'skaia, Sharova, and Zakharova 2018).

En este proyecto, se exploró el efecto de la PRL en el cultivo de explantes placentarios inflamados con LPS, y se encontró fuerte evidencia que apoya el papel inmunomodulador de esta hormona en el compartimento fetal. De hecho, las concentraciones fisiológicas de PRL durante el embarazo que se emplearon en este proyecto, redujeron significativamente la síntesis de IL-1 β , IL-6 y TNF- α dependientes de LPS; más aún, este efecto fue similar a la acción observada por la dexametasona, un antiinflamatorio utilizado comúnmente en la práctica médica. Estos resultados de secreción también fueron corroborados a nivel de síntesis intracelular mediante ensayos de westerns blots. Se demostró que la PRL es capaz de disminuir el aumento de los precursores de IL-1 β y TNF- α , así como de IL-6 en los explantes incubados con LPS. En general, estos resultados coinciden con los reportados previamente por nuestro grupo de investigación, en donde se observó la actividad anti-inflamatoria de la PRL sobre IL-1 β y TNF- α en el modelo de cultivo de membranas fetales humanas inflamadas con LPS (Flores-Espinosa et al. 2017). De forma interesante, en ese modelo no se observó una regulación (ni de tipo positivo ni negativo) sobre la secreción de IL-6, mientras que en este proyecto justamente IL-6 fue la citocina más sensible al efecto inhibitorio de la PRL tanto a nivel intra- como extra-celular.

En conjunto, estos resultados son consistentes con el ciclo de retroalimentación negativo (*feedback*) en la unidad fetoplacentaria, dado que a su vez las citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-2, entre otras, inhiben la expresión decidual de la PRL (Jikihara and Handwerger 1994). Los resultados obtenidos en este trabajo también sugieren la existencia de una regulación tejido específica, debido a que la PRL preferencialmente estimula en vez de inhibir la expresión de citocinas proinflamatorias en células profesionales del sistema inmune (Sodhi and Tripathi 2008). Por lo tanto, en la interfase placentaria, parece ocurrir una interacción compleja entre la PRL decidual, los trofoblastos, las membranas fetales y las citocinas producidas por las células inmunes que residen o se infiltran en la placenta. Es importante resaltar que los resultados obtenidos son similares a los que se obtuvieron en un estudio que demostró que la prolactina inhibe la expresión de IL-6 en la decidua de un modelo murino (Bao et al. 2007).

Mecanicamente hablando, el efecto anti-inflamatorio dependiente de la PRL probablemente se encuentre relacionado con la inhibición de la cascada de señalización TLR-4/NF κ B, que es ampliamente conocida por promover la inflamación. Como apoyo de esta hipótesis, en este trabajo se demostró que la PRL previene la activación inducida por el LPS de ambos, la expresión de TLR-4 y la fosforilación de NF κ B. Estos resultados coinciden con los obtenidos por el grupo de Nardelli y

colaboradores en los que indujeron inflamación con IL-1 β e INF- γ en células β pancreáticas como modelo de diabetes mellitus, y observaron que la adición de PRL disminuyó la expresión génica de I κ B, el cual es un gen dependiente de la vía de NF κ B (Nardelli et al. 2018). Hasta ahora no existen trabajos que reporten la regulación de TLR-4 por la PRL en el humano, por lo que ésta es la primera evidencia de la actividad anti-inflamatoria de la prolactina en la placenta humana actuando como un regulador negativo de la señalización TLR-4/NF κ B. Tal como se esquematiza en la figura 18, el efecto inhibitor de la PRL sobre la síntesis de TLR-4 podría involucrar la señalización por STATs. Esta hipótesis se respalda por el efecto observado en células fibroblásticas, en las que la sobre-activación de STAT5 resultó en la inhibición de la señalización de NF κ B, lo que denota la interacción que existe entre estas dos vías (Luo and Yu-Lee 2000).

Si bien las evidencias reportadas por nuestro grupo de laboratorio apuntan a que la prolactina es un importante agente anti-inflamatorio en la interfase materno-fetal (Flores-Espinosa et al. 2017; Flores-Espinosa et al. 2019), aún no existe ninguna evidencia sólida que sugiera su co-tratamiento en mujeres con infección para disminuir la respuesta inflamatoria. Esto puede ser debido a que la inflamación *per se* es un evento fisiológico necesario para enfrentar a la infección en sí, y disminuir el perfil de citocinas pro-inflamatorias podría ser un evento colateral que favorezca el crecimiento y mantenimiento de la infección. Sin embargo, queda como perspectiva de este trabajo la posibilidad de considerar a la prolactina en estados inflamatorios no infecciosos durante el embarazo, como en la preeclampsia, hipertensión o diabetes gestacional. Para ello se requiere de más trabajos experimentales y ensayos clínicos aleatorios para poder desarrollar esta hipótesis.

En este proyecto, la endotoxina de LPS se utilizó para simular un escenario infeccioso, como se comprobó por el incremento de la síntesis y secreción de las citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 en los explantes tratados con LPS. Por lo tanto, considerando que la PRL pudo revertir este efecto, es razonable especular que esta hormona juega un importante papel fisiológico en la prevención de una reacción inmune descontrolada hacia la infección o inflamación en la interfase materno-fetal.

X. CONCLUSIONES

- a) El modelo biológico utilizado conserva su morfología y fenotipo endocrino después de su manipulación *in vitro*.
- b) La PRL y el LPS que se utilizaron como tratamientos experimentales conservaban su actividad biológica, a través del seguimiento de la acumulación de fosfo-Jak-2 y fosfo-I κ B, respectivamente.
- c) La prolactina tiene un efecto inmunoregulador sobre la secreción y síntesis intracelular de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el cultivo de explantes placentarios inflamados con LPS. La disminución de la secreción y síntesis de cada una de las citocinas ocurre de manera dosis dependiente. IL-6 es la citocina más sensible a la acción de la prolactina.
- d) La prolactina disminuye la expresión de TLR-4 y la fosforilación de N κ B, por lo que es altamente sugerible que en la placenta humana el efecto anti-inflamatorio dependiente de la PRL se encuentre relacionado con la inhibición de la cascada de señalización TLR-4/NF κ B.

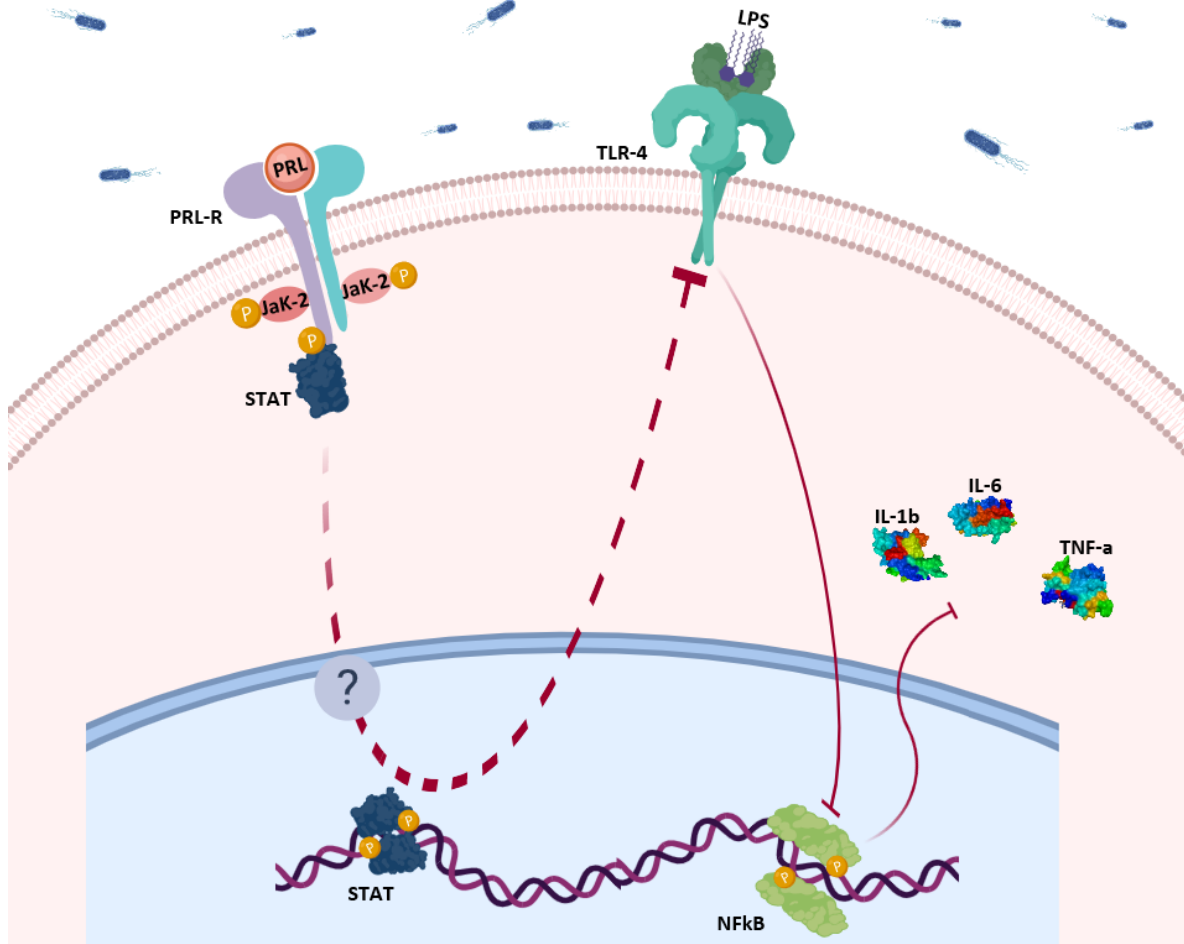


Figura 18. Mecanismo propuesto del efecto anti-inflamatorio de la PRL en la placenta humana.

Se concluye que el papel de la prolactina en la inhibición de citocinas pro-inflamatorias en un escenario de inflamación inducido por el LPS se encuentra relacionado con el bloqueo de la cascada de señalización de TLR-4/NFκB, quedando como interrogante el mecanismo a través del cual esta hormona ejerce su regulación sobre el receptor TLR-4. Figura realizada por Déciga-García, 2019.

XI. REFERENCIAS

- Abbas, A.K., A.H.H. Lichtman, and S. Pillai. (2015). *Inmunología celular y molecular* (Elsevier Health Sciences Spain).
- Amiri, M., Z. Lavasani, R. Norouzirad, R. Najibpour, M. Mohamadpour, A. R. Nikpoor, M. Raeisi, and H. Zare Marzouni. (2015). 'Prevalence of Urinary Tract Infection Among Pregnant Women and its Complications in Their Newborns During the Birth in the Hospitals of Dezful City, Iran, 2012 - 2013', *Iran Red Crescent Med J*, 17: e26946.
- Ander, S. E., M. S. Diamond, and C. B. Coyne. (2019). 'Immune responses at the maternal-fetal interface', *Sci Immunol*, 4.
- Bao, L., C. Tessier, A. Prigent-Tessier, F. Li, O. L. Buzzio, E. A. Callegari, N. D. Horseman, and G. Gibori. (2007). 'Decidual prolactin silences the expression of genes detrimental to pregnancy', *Endocrinology*, 148: 2326-34.
- Bethea, C. L., M. G. Gravett, D. W. Sadowsky, G. J. Haluska, M. K. Axthelm, and M. J. Novy. (1998). 'Amniotic fluid prolactin is decreased by experimental intrauterine infection or interleukin-1beta infusion but not via prostaglandins in pregnant rhesus macaques', *Biol Reprod*, 58: 1385-93.
- Binart, N. 2016. 'Prolactin and pregnancy in mice and humans', *Ann Endocrinol (Paris)*, 77: 126-7.
- Bradford, M. M. (1976). 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem*, 72: 248-54.
- Burton, G.J., D.J.P. Barker, A. Moffett, and K. Thornburg. (2010). *The Placenta and Human Developmental Programming* (Cambridge University Press).
- Calvert, A., and C. E. Jones. (2017). 'Placental transfer of antibody and its relationship to vaccination in pregnancy', *Curr Opin Infect Dis*, 30: 268-73.
- Carlson, B.M. (2014). *Embriología humana y biología del desarrollo* (Elsevier Health Sciences Spain).
- Challis, J. R., C. J. Lockwood, L. Myatt, J. E. Norman, J. F. Strauss, 3rd, and F. Petraglia. (2009). 'Inflammation and pregnancy', *Reprod Sci*, 16: 206-15.
- Chavez-Rueda, K., J. Hernandez, E. Zenteno, A. Leanos-Miranda, M. V. Legorreta-Haquet, and F. Blanco-Favela. (2005). 'Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes', *Clin Immunol*, 116: 182-91.
- Costa, M. A. (2016). 'The endocrine function of human placenta: an overview', *Reprod Biomed Online*, 32: 14-43.
- Costanza, M., N. Binart, L. Steinman, and R. Pedotti. (2015). 'Prolactin: a versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology', *Autoimmun Rev*, 14: 223-30.
- Dautt-Leyva, J. G., A. Canizalez-Roman, L. F. Acosta-Alfaro, F. Gonzalez-Ibarra, and J. Murillo-Llanes. (2018). 'Maternal and perinatal complications in pregnant women with urinary tract infection caused by Escherichia coli', *J Obstet Gynaecol Res*, 44: 1384-90.
- Deakin, J. E., A. T. Papenfuss, K. Belov, J. G. Cross, P. Coggill, S. Palmer, S. Sims, T. P. Speed, S. Beck, and J. A. Graves. (2006). 'Evolution and comparative analysis of the MHC Class III inflammatory region', *BMC Genomics*, 7: 281.
- Delzell, J. E., Jr., and M. L. Lefevre. (2000). 'Urinary tract infections during pregnancy', *Am Fam Physician*, 61: 713-21.
- Díaz, L. Díaz, M. M. González, L. Lira-Albarrán, S. Larrea, F. Méndez, I. (2013). 'Prolactin in the Immune System.' in M. N. Bela György, E. T. (ed.), *Prolactin* (Intech).

- Duval, C., M. E. Brien, V. Gaudreault, I. Boufaied, B. Baker, R. L. Jones, and S. Girard. (2019). 'Differential effect of LPS and IL-1beta in term placental explants', *Placenta*, 75: 9-15.
- Farias, E.M. . (2015). *Fundamentos de bacteriología* (Trillas: México).
- Ferriani, R. A., and M. F. Silva de Sa. (1988). 'Prolactin levels in blood from the intervillous space of the human placenta', *Gynecol Obstet Invest*, 26: 73-6.
- Flores-Espinosa, P., E. Preciado-Martinez, A. Mejia-Salvador, G. Sedano-Gonzalez, L. Bermejo-Martinez, A. Parra-Covarruvias, G. Estrada-Gutierrez, R. Vega-Sanchez, I. Mendez, B. Quesada-Reyna, A. Olmos-Ortiz, and V. Zaga-Clavellina. (2017). 'Selective immunomodulatory effect of prolactin upon pro-inflammatory response in human fetal membranes', *J Reprod Immunol*, 123: 58-64.
- Flores-Espinosa, P., R. Vega-Sanchez, I. Mancilla-Herrera, L. Bermejo-Martinez, E. Preciado-Martinez, A. Olmos-Ortiz, I. Mendez, G. Estrada-Gutierrez, B. Quesada-Reyna, C. Helguera-Repetto, C. Irlas, and V. Zaga-Clavellina. (2019). 'Prolactin selectively inhibits the LPS-induced chemokine secretion of human foetal membranes', *J Matern Fetal Neonatal Med*: 1-7.
- Forbes, B.A. (2009). *Diagnostico Microbiologico* (Editorial Medica Panamericana Buenos Aires).
- Garzia, E., R. Clauser, L. Persani, S. Borgato, G. Bulfamante, L. Avagliano, F. Quadrelli, and A. M. Marconi. 2013. 'Prolactin and proinflammatory cytokine expression at the fetomaternal interface in first trimester miscarriage', *Fertil Steril*, 100: 108-15 e1-2.
- Gilstrap, L. C., 3rd, and S. M. Ramin. (2001). 'Urinary tract infections during pregnancy', *Obstet Gynecol Clin North Am*, 28: 581-91.
- Goldenberg, R. L., J. C. Hauth, and W. W. Andrews. (2000). 'Intrauterine infection and preterm delivery', *N Engl J Med*, 342: 1500-7.
- Gomi, H., Y. Goto, M. Laopaiboon, R. Usui, and R. Mori. (2015). 'Routine blood cultures in the management of pyelonephritis in pregnancy for improving outcomes', *Cochrane Database Syst Rev*: CD009216.
- Gude, N. M., C. T. Roberts, B. Kalionis, and R. G. King. (2004). 'Growth and function of the normal human placenta', *Thromb Res*, 114: 397-407.
- Guha, M., and N. Mackman. (2001). 'LPS induction of gene expression in human monocytes', *Cell Signal*, 13: 85-94.
- Halperin, R. I. Camara, G. R. Garcia, M. M. Ollero, G. D. (2013). 'Clinical guidelines for diagnosis and treatment of prolactinoma and hyperprolactinemia', *Endocrinol Nutr*, 60: 308-19.
- Hanna, J., D. Goldman-Wohl, Y. Hamani, I. Avraham, C. Greenfield, S. Natanson-Yaron, D. Prus, L. Cohen-Daniel, T. I. Arnon, I. Manaster, R. Gazit, V. Yutkin, D. Benharroch, A. Porgador, E. Keshet, S. Yagel, and O. Mandelboim. (2006). 'Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface', *Nat Med*, 12: 1065-74.
- Hannan, T. J., T. M. Hooton, and S. J. Hultgren. (2013). 'Estrogen and recurrent UTI: what are the facts?', *Sci Transl Med*, 5: 190fs23.
- Hussain, T., B. Tan, G. Liu, G. Murtaza, N. Rahu, M. Saleem, and Y. Yin. (2017). 'Modulatory Mechanism of Polyphenols and Nrf2 Signaling Pathway in LPS Challenged Pregnancy Disorders', *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 8254289.
- Ignacak, A., M. Kasztelnik, T. Sliwa, R.A. Korbut, K. Rajda, and T.J. Guzik. (2012). 'Prolactin—not only lactotrophin. A “new” view of the “old” hormone', *J Physiol Pharmacol*, 63: 435-43.
- Ingvorsen, C., S. Brix, S. E. Ozanne, and L. I. Hellgren. (2015). 'The effect of maternal inflammation on foetal programming of metabolic disease', *Acta Physiol (Oxf)*, 214: 440-9.
- Ipe, D. S., E. Horton, and G. C. Ulett. (2016). 'The Basics of Bacteriuria: Strategies of Microbes for Persistence in Urine', *Front Cell Infect Microbiol*, 6: 14.

- Iwasaki, A., and R. Medzhitov. (2004). 'Toll-like receptor control of the adaptive immune responses', *Nat Immunol*, 5: 987-95.
- Izvolskaia, M., V. Sharova, and L. Zakharova. 2018. 'Prenatal Programming of Neuroendocrine System Development by Lipopolysaccharide: Long-Term Effects', *Int J Mol Sci*, 19.
- Jikihara, H., and S. Handwerger. (1994). 'Tumor necrosis factor-alpha inhibits the synthesis and release of human decidual prolactin', *Endocrinology*, 134: 353-7.
- Kalagiri, R. R., T. Carder, S. Choudhury, N. Vora, A. R. Ballard, V. Govande, N. Drever, M. R. Beeram, and M. N. Uddin. (2016). 'Inflammation in Complicated Pregnancy and Its Outcome', *Am J Perinatol*, 33: 1337-56.
- Kalinderi, K., D. Delkos, M. Kalinderis, A. Athanasiadis, and I. Kalogiannidis. (2018). 'Urinary tract infection during pregnancy: current concepts on a common multifaceted problem', *J Obstet Gynaecol*, 38: 448-53.
- Kaplan, C.G. (2007). *Color Atlas of Gross Placental Pathology* (Springer New York).
- Kawai, T., and S. Akira. 2010. 'The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors', *Nat Immunol*, 11: 373-84.
- Kay, H., D.M. Nelson, and Y. Wang. (2011). *The Placenta: From Development to Disease* (Wiley).
- Loke, Y.W. (2013). *Life's Vital Link: The Astonishing Role of the Placenta* (OUP Oxford).
- López-García, B., N. Ávalos-Antonio, and N. B. Díaz-Gómez. (2018). 'Incidencia de prematuros en el Hospital General Naval de Alta Especialidad 2015-2017', *Rev Sanid Milit Mex*, 72: 19-23.
- Lopez-Rincon, G., A. L. Pereira-Suarez, S. Del Toro-Arreola, P. E. Sanchez-Hernandez, A. Ochoa-Zarzosa, J. F. Munoz-Valle, and C. Estrada-Chavez. (2013). 'Lipopolysaccharide induces the expression of an autocrine prolactin loop enhancing inflammatory response in monocytes', *J Inflamm (Lond)*, 10: 24.
- Luo, G., and L. Yu-Lee. (2000). 'Stat5b inhibits NFkappaB-mediated signaling', *Mol Endocrinol*, 14: 114-23.
- Marano, R. J., and N. Ben-Jonathan. (2014). 'Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions', *Mol Endocrinol*, 28: 622-33.
- Martínez, S. M. A., and M. I. G. U. Peláez. (2017). *Embriología humana y biología del desarrollo* (Editorial Médica Panamericana: México).
- Matuszkiewicz-Rowinska, J., J. Malyszko, and M. Wieliczko. (2015). 'Urinary tract infections in pregnancy: old and new unresolved diagnostic and therapeutic problems', *Arch Med Sci*, 11: 67-77.
- Méndez, Isabel, Cecilia Cariño, and Lorenza Díaz. (2005). 'La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos', *Revista de investigación clínica*, 57: 447-56.
- Mitreski, A., and G. Radeka. (2002). 'Prostacyclin and hormone levels in patients with symptoms of miscarriage and infection', *Med Pregl*, 55: 371-9.
- Mittal, P., and D. A. Wing. (2005). 'Urinary tract infections in pregnancy', *Clin Perinatol*, 32: 749-64.
- Moller, V. 1955. 'Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system', *Acta Pathol Microbiol Scand*, 36: 158-72.
- Mor, G., P. Aldo, and A. B. Alvero. (2017). 'The unique immunological and microbial aspects of pregnancy', *Nat Rev Immunol*, 17: 469-82.
- Moreno, B. Obiols, G. Páramo, C. Zugasti, A. . (2005). 'Guía clínica del manejo del prolactinoma y otros estados de hiperprolactinemia', *Endocrinol Nutr*, 52: 9-17.
- Nardelli, T. R., E. C. Vanzela, K. C. Benedicto, F. Brozzi, A. Fujita, A. K. Cardozo, D. L. Eizirik, A. C. Boschero, and F. Ortis. (2018). 'Prolactin protects against cytokine-induced beta-cell death by NFkappaB and JNK inhibition', *J Mol Endocrinol*, 61: 25-36.
- Oclon, E., G. Solomon, Z. Hayouka, T. M. Salame, V. Goffin, and A. Gertler. (2018). 'Novel reagents for human prolactin research: large-scale preparation and characterization of prolactin

- receptor extracellular domain, non-pegylated and pegylated prolactin and prolactin receptor antagonist', *Protein Eng Des Sel*, 31: 7-16.
- Olmos-Ortiz, A., J. Garcia-Quiroz, E. Avila, F. Caldino-Soto, A. Halhali, F. Larrea, and L. Diaz. (2018). 'Lipopolysaccharide and cAMP modify placental calcitriol biosynthesis reducing antimicrobial peptides gene expression', *Am J Reprod Immunol*, 79: e12841.
- OMS. (2015). "WHO recommendations for prevention and treatment of maternal peripartum infections." In, edited by World Health Organization, 70.
- Ospelt, C., and S. Gay. (2010). 'TLRs and chronic inflammation', *Int J Biochem Cell Biol*, 42: 495-505.
- Park, B. S., and J. O. Lee. (2013). 'Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes', *Exp Mol Med*, 45: e66.
- Plant, T.M., and A.J. Zeleznik. (2014). *Anatomy and genesis of the placenta. IN: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Elsevier Science).
- Preciado-Martinez, E., G. Garcia-Ruiz, P. Flores-Espinosa, L. Bermejo-Martinez, A. Espejel-Nunez, G. Estrada-Gutierrez, G. Razo-Aguilera, M. Granados-Cepeda, A. C. Helguera-Repetto, C. Irlas, and V. Zaga-Clavellina. (2018). 'Progesterone suppresses the lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in primary mononuclear cells isolated from human placental blood', *Immunol Invest*, 47: 181-95.
- Ramachandran, G. (2014). 'Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review', *Virulence*, 5: 213-8.
- Rapacz-Leonard, A., M. Dabrowska, and T. Janowski. (2014). 'Major histocompatibility complex I mediates immunological tolerance of the trophoblast during pregnancy and may mediate rejection during parturition', *Mediators Inflamm*, 2014: 579279.
- Rosadini, C. V., and J. C. Kagan. (2017). 'Early innate immune responses to bacterial LPS', *Curr Opin Immunol*, 44: 14-19.
- Salazar, L. Moreno, F. (2016). 'Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar. ', *Salutem Scientia Spiritus*, 2: 12-23.
- Saleem, M., H. Martin, and P. Coates. (2018). 'Prolactin Biology and Laboratory Measurement: An Update on Physiology and Current Analytical Issues', *Clin Biochem Rev*, 39: 3-16.
- Schagger, H. (2006). 'Tricine-SDS-PAGE', *Nat Protoc*, 1: 16-22.
- Sodhi, A., and A. Tripathi. (2008). 'Prolactin and growth hormone induce differential cytokine and chemokine profile in murine peritoneal macrophages in vitro: involvement of p-38 MAP kinase, STAT3 and NF-kappaB', *Cytokine*, 41: 162-73.
- Stefanoska, I., M. Jovanovic Krivokuca, S. Vasilijic, D. Cujic, and L. Vicovac. (2013). 'Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro', *Placenta*, 34: 775-83.
- Szweda, H., and M. Jozwik. (2016). 'Urinary tract infections during pregnancy - an updated overview', *Dev Period Med*, 20: 263-72.
- Tilburgs, T., S. A. Scherjon, and F. H. Claas. (2010). 'Major histocompatibility complex (MHC)-mediated immune regulation of decidual leukocytes at the fetal-maternal interface', *J Reprod Immunol*, 85: 58-62.
- Tomás-Alvarado, E. Salas-Rubio, M.A. (2016). 'Prevalencia de bacteriuria en pacientes embarazadas de una unidad de medicina familiar del Estado de México', *Aten. Fam.*, 23: 80-83.
- Wooding, P., and G. Burton. (2008). *Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution* (Springer Berlin Heidelberg).
- Zaga-Clavellina, V., A. Parra-Covarrubias, J. Ramirez-Peredo, R. Vega-Sanchez, and F. Vadillo-Ortega. (2014). '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: 48 e1-6.
- Zavan, B., E. M. De Almeida, S. Salles Eda, A. M. do Amarante-Paffaro, and V. A. Paffaro, Jr. (2016). 'COX-2 plays a role in angiogenic DBA(+) uNK cell subsets activation and pregnancy protection in LPS-exposed mice', *Placenta*, 44: 34-45.
- Zheng, J. (2012). *Recent advances in research on the human placenta* (INTECH: Croatia).
- Zhou, J., H. Miao, X. Li, Y. Hu, H. Sun, and Y. Hou. (2017). 'Curcumin inhibits placental inflammation to ameliorate LPS-induced adverse pregnancy outcomes in mice via upregulation of phosphorylated Akt', *Inflamm Res*, 66: 177-85.

ANEXO 1. Carta de consentimiento informado



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del estudio: Caracterización del mecanismo inmuno-endócrino de la prolactina en el inicio y progresión del trabajo de parto

Ciudad de México a ____ de _____ del 20____.

No. De Registro: _____

Justificación y objetivo del estudio. Estimada señora, la estamos invitando a participar en este estudio cuyo objetivo es investigar el efecto que tiene la prolactina, una hormona indispensable para el mantenimiento del embarazo, sobre la placenta, las membranas fetales y las células de la sangre en cultivo. Tomando en cuenta que usted es una paciente sana y su embarazo no tuvo ninguna complicación importante consideramos muy valiosa su participación en este estudio.

Es muy importante aclarar que su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea toda la información que le proporcionamos y haga todas las preguntas que desee antes de decidir si participa o no en el estudio.

Procedimientos: Su participación en este estudio consistirá únicamente en donar la placenta y membranas fetales expulsadas después del nacimiento de su bebé. La muestra de sangre que le solicitamos (20 ml/ 3 tubos de 7 ml c/u) se obtendrán mediante la toma de una vena en el brazo y se hará al momento en que usted acepte participar.

Posibles riesgos y molestias: Es importante aclarar que los tejidos serán utilizados exclusivamente para los fines que fueron señalados y es obligación del personal que participa en este proyecto aclarar todas las dudas presentes e informarle que la donación de estos tejidos implica un riesgo mínimo y puede solamente generarle una molestia local al momento de la toma de la muestra de sangre.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio: Su participación no generará ningún gasto extra ni obligación alguna, así como tampoco recibirá nada a cambio de la donación.

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento: Los datos obtenidos en este estudio no tienen ninguna utilidad clínica para usted, por lo que no tendrá acceso a ninguno de los resultados generados.

Participación o retiro: En el caso de que se considere conveniente, usted puede negar su participación en el estudio. Además, si usted acepta participar puede retirar su consentimiento y abandonar el estudio en cualquier momento que lo desee, sin que ello afecte la atención que recibe en este Hospital.



Privacidad y confidencialidad: Todos sus datos personales y clínicos serán manejados y resguardados de manera confidencial y ninguno de sus datos aparecerá en presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio.

No autorizo a que se tome la muestra	
Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio	

Beneficios al término del estudio: La información y resultados derivados de este estudio derivara únicamente en productividad de orden científico, usted no tendrá o recibirá ningún tipo de beneficio por su participación en el estudio.

También nos permitimos informarle que toda la información y resultados generados en este proyecto no tendrán ningún uso de tipo comercial.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigadores Responsables.

Dr. Braulio Quesada Reyna. Tel.: 55 50 64 22 Ext. 20070, 28032
braulio.quesada@imss.gob.mx

Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina. Tel.: 55209900 Ext. 478, 344
v.zagaclavellina@gmail.com

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a:
Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso
Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono
56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com

Nombre y firma de la paciente

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Nombre y firma del Testigo 1
Relación/Parentesco con la paciente:

Nombre y firma del Testigo2
Relación/Parentesco con la paciente: