



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES**

**ESCHERICHIA COLI MODULA LA EXPRESIÓN DEL miR-372-
5p Y DE LA IL-1 β EN EL TEJIDO DE LA CORIODECIDUA
HUMANA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCIÓN.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

**ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA
Y OBSTETRICIA**

P R E S E N T A

HÉLÈNE CLÉMENTE MONTOYA

**DR. NORBERTO REYES PAREDES
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE
ESPECIALIZACIÓN EN GINECOLOGÍA Y
OBSTETRICIA**

**M. en C. MAURICIO OSORIO CABALLERO
ASESOR DE TESIS**



INPer IER

Ciudad de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

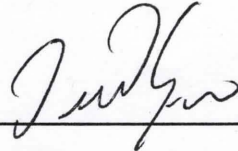
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

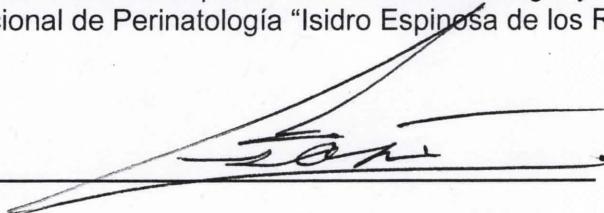
“ESCHERICHIA COLI MODULA LA EXPRESIÓN DEL MIR -372-5P Y DE LA IL-1BETA EN EL TEJIDO DE LA CORIODECUIA HUMANA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCIÓN”



DRA. VIRIDIANA GORBEA CHÁVEZ
Directora de Educación en Ciencias de la Salud
Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”



DR. NORBERTO REYES PAREDES
Profesor Titular del Curso de Especialización en Ginecología y Obstetricia
Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”



M. EN C. MAURICIO OSORIO CABALLERO
Director de Tesis
Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”



M. EN C. HECTOR FLORES HERRERA
Asesor Metodológico
Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

DEDICATORIAS

A mi madre, padre y hermanos por el cariño y apoyo de toda la vida.

A mis amigas de vida Montse y Teri por su apoyo incondicional.

A mi tutor Dr. Mauricio Osorio y a mi asesor metodológico Dr. Hector Flores por su paciencia, compromiso y enseñanza.

A mi querida Cris, Fina, Sarita, Jorge, Grace, Fran, Gabriel y Lety por su paciencia y aliento en mi vida.

A todos mis queridos maestros que por más años que pasen siempre serán mi ejemplo a seguir.

A mis amigos de carrera; Tere, Mariane, Shany, Ursula, Leidy, Zaira, Ernesto, Pam, Fer, Gabriel, Marco, Maya, Mario, Jessi, Ynna, Cris, Rubí, Julio, Juan por estar siempre presentes en los buenos y malos momentos.

Finalmente, a todas los pacientes de este Instituto ya que son el impulso y la motivación para seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se desarrolló con fondos federales al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) mediante el proyecto con número de registro 2017-2-82 (otorgado a HFH). Hélène Clément Montoya es becaria del programa de Impulso a la Investigación en Salud 2019-2020.

INFORMACIÓN DE LOS AUTORES

Hélène Clément Montoya

Médico Residente

Especialidad de Ginecología y Obstetricia,

Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes".

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, 11000.

Ciudad de México, México

Correo electrónico: clementehelene88@gmail.com

Contribución y aportaciones del autor en el desarrollo del presente trabajo

1) obtención de las membranas fetales humanas a término; 2) procesamiento y montaje de las membranas fetales en el modelo de Transwell; 3) cuantifico la expresión del miR-372-5p y cuantificación de la IL-1 β en el medio de cultivo de las diferentes condiciones experimentales; 3) escritura de la tesis.

Mauricio Osorio Caballero

Médico Adscrito.

Maestro en Ciencias Médicas.

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel Candidato.

Departamento de Salud Sexual y Reproductiva.

Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes".

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, 11000.

Ciudad de México, México

Correo electrónico: dr_osorio@yahoo.com

Contribución y aportaciones del autor en el desarrollo del presente trabajo

1) diseño y ejecución experimental; 2) asesoramiento para la expresión del miR-372-5p mediante RT-PCR y cuantificación de la IL-1 β mediante el ensayo de ELISA; 3) revisión de la tesis.

Héctor Flores Herrera

Investigador en Ciencias Médicas nivel C

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel 1

Departamento de Inmunobiología

Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes".

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, 11000.

Ciudad de México, México

Correo electrónico: h.flores@inper.gob.mx

Contribución y aportaciones del autor en el desarrollo del presente trabajo

1) análisis estadístico de las diferentes condiciones experimentales; y 2) obtención del financiamiento para el desarrollo del presente trabajo.

INDICE

	Página
AUTORIZACIÓN DE TESIS	2
DEDICATORIAS	3
AGRADECIMIENTO	3
INFORMACIÓN DE LOS AUTORES	4
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1.0 INTRODUCCIÓN	9
2.0 ANTECEDENTES	
2.1 <i>Epidemiología y etiología de los nacimientos prematuros</i>	11
2.2 <i>Las infecciones durante el embarazo</i>	15
2.3 <i>Tipos de RNA</i>	17
2.4 <i>Los miRNAs</i>	19
2.5 <i>Biogénesis de los miRNAs</i>	19
2.6 <i>Relación de los miRNAs y la respuesta inflamatoria</i>	21
3.0 JUSTIFICACION	23
4.0 HIPÓTESIS	24
5.0 OBJETIVOS GENERAL	25
5.1 <i>Objetivos particulares</i>	25
6.0 MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1 <i>Aspectos éticos</i>	26
6.2 <i>Características de las pacientes</i>	26
6.3 <i>Diseño del estudio</i>	27
6.3.1 <i>Características del estudio</i>	27
6.3.2 <i>Unidades de observación</i>	27
6.3.3 <i>Tamaño de la muestra</i>	27
6.3.4 <i>Criterios de selección</i>	27
6.3.5 <i>Criterios de inclusión</i>	27
6.3.6 <i>Criterios de exclusión</i>	28
6.3.7 <i>Criterios de eliminación</i>	28
6.3.8 <i>Variables de estudio</i>	28
6.4 <i>Obtención de las membranas fetales</i>	28
6.4.1 <i>Procesamiento y montaje de las membranas fetales en el sistema de Transwell</i>	28
6.4.2 <i>Procedimiento de estimulación</i>	28
6.5 <i>Determinación de la expresión del miR372-5p por el método de RT-PCR</i>	
6.5.1 <i>Extracción del RNA total</i>	30
6.5.2 <i>Reacción de RT</i>	30
6.5.3 <i>Reacción de PCR</i>	30
6.5.4 <i>Expresión del miR-372-5p</i>	30
6.5.5 <i>Determinación de la IL-1β</i>	30
6.6 <i>Análisis estadístico</i>	31

7.0 RESULTADOS	
7.1 Características de la población de estudio	32
7.2 Perfil de expresión del miR-372-5p	
7.2.1 Expresión a las 3-horas	33
7.2.2. Expresión a las 6-horas	33
7.2.3. Expresión a las 24-horas	34
7.2.4	
7.3 Secreción de la IL-1 β	
7.3.1 Cuantificación de la IL-1 β a las 3-horas	35
7.3.2 Cuantificación de la IL-1 β a las 6-horas	36
7.3.3. Cuantificación de la IL-1 β a las 24-horas	37
8.0 DISCUSIÓN	39
9.0 CONCLUSIONES	40
10.0 BIBLIOGRAFÍA	40

TABLAS

1. Factores de riesgo asociados a parto pretérmino espontáneo	15
2. Características maternas y neonatales de la población de estudio	32

FIGURAS

1. Estimación de nacimientos pretérmino por región y edad gestacional en el año 2010	11
2. Tasa de muerte neonatal antes de 28 días	12
3. Número de nacimientos por edad gestacional en el INPer del 2014 al 2018	13
4. Número de recién nacidos pretérmino muertos en el INPer del 2014 al 2018.	13
5. Causas de muerte en recién nacidos pretérmino en el INPer del 2014 al 2018.	14
6. Mecanismo de inducción de trabajo de parto pretérmino por microorganismos	16
7. Tipos de RNA clásicos y no-clásicos	18
8. Biogénesis y maduración de los miRNAs	20
9. Función del miR-146a	21
10. Función del miR-451	22
11. Perfil de expresión del miR-372-5p a 3 horas de estimulación	33
12. Perfil de expresión del miR-372-5p a 6 horas de estimulación	34
13. Perfil de expresión del miR-372-5p a 24 horas de estimulación	35
14. Perfil de secreción de la IL-1 β a 3 horas de estimulación	35
15. Perfil de secreción de la IL-1 β a 6 horas de estimulación	36
16. Perfil de secreción de la IL-1 β a 24 horas de estimulación	37

ANEXOS

1. Registro del proyecto institucional	44
2. Consentimiento informado	45

RESUMEN

Introducción: La coriodecidua humana (CDH) regula en el embarazo la actividad inmunológica. Se ha demostrado en otros sistemas celulares que los pequeños RNA no codificantes participan en la respuesta inflamatoria. El principal objetivo en este estudio fue identificar la expresión diferencial del miR-372-5p en el tejido de la coriodecidua humana después de la estimulación con *Escherichia coli*.

Material y Métodos: El tejido de la CDH fue estimulado con *E. coli* (10^2 , 10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/ml) y el medio de cultivo fue recuperado a las 3, 6, y 24 horas. El RNA se obtuvo a partir de 500 μ L del medio de cultivo al cual se le adicionó el mismo volumen del reactivo de TRIzol y se determinó el perfil de expresión del miR-372 mediante la retrotranscripción (RT) obteniendo el cDNA y posteriormente se realizó la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR). Las bandas de expresión fueron determinadas mediante el programa de ImageJ. La cuantificación de la IL-1 β se realizó mediante el ensayo inmunoenzimático de ELISA. Los datos son presentados como la media \pm desviación estándar y se tomó una diferencia significativa menor a 0.05.

Resultados: Al estimular por 3-horas al tejido de la CDH con *E. coli* (10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL) observamos el incremento 1.14-, 1.2-, y 1.2-veces la expresión del miR-372-5p respectivamente; sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p = 0.189$; fig. 10B). A las 6-horas de estimulación con *E. coli* (10^4 , y 10^5 UFC/mL) observamos un aumento significativo en la expresión del miR-372-5p en la CDH de 1.1-, y 1.4-veces con respecto al grupo control ($p < 0.05$, fig. 11B). A las 24 horas de estimulación con *E. coli* 10^2 , 10^4 , 10^5 y 10^6 UFC/mL observamos una disminución significativa en la expresión del miR-372-5p de 1.2-, 1.2-, 1.6-, y 1.7-veces con respecto al grupo control ($p < 0.05$, fig. 12B). En estos mismos ensayos demostramos que a las 3-horas de estimulación *E. coli* 10^5 y 10^6 UFC/mL aumenta significativamente la concentración de IL-1 β en 1.6- y 3.5-veces respectivamente con respecto al grupo control ($p \leq 0.05$). A las 6-horas de la estimulación con *E. coli* 10^2 , 10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL se incrementó 1.2-, 1.2-, 6.19-, y 9.5-veces respectivamente la secreción de la IL-1 β con respecto al grupo control ($p \leq 0.05$). Finalmente, a las 24-horas de la estimulación con *E. coli* 10^2 , 10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL se incrementó 2.8-, 5.1-, 11.7-, y 24.8-veces respectivamente la secreción de la IL-1 β con respecto al grupo control ($p \leq 0.001$).

Conclusión: *Escherichia coli* induce la expresión del miR-372-5p modulando la secreción de la IL-1 β con respecto al tiempo de estimulación.

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

ABSTRACT

Introduction: Choriodecidua (CHD) regulates immunological activity during pregnancy. It has been demonstrated in other cellular systems that non-coding small RNAs are involved in the inflammatory response. The main objective in this study was to identify the differential expression of the miR-372-5p in the tissue of the human CHD after its stimulation with *Escherichia coli*.

Material and Methods: CHD tissue was stimulated with *E. coli* (10^2 , 10^4 , 10^5 , and 10^6 CFU/ml) and the culture medium was recovered at 3, 6, and 24 hours after. RNA was obtained from 500 μ L of this culture medium adding the same volume of TRIzol reagent. Expression of miR-372 was determined by retrotranscription (RT), obtaining in this way the cDNA. Subsequently its amplification was carried out through PCR. The expression bands were determined with the ImageJ program. The quantification of the IL-1 β was carried out by means of ELISA technic. Data are presented as the mean \pm standard deviation taking into account a $P < 0.05$ as significant difference.

Results: When stimulating for 3 h the CHD tissue with *E. coli* (10^4 , 10^5 , and 10^6 CFU/mL) a 1.14-, 1.2-, and 1.2-fold increase in miR-372-5p expression respectively was observed; although these changes were not statistically different to the control group ($p = 0.189$; fig. 10B). Contrarily, 6 h after stimulating with *E. coli* (10^4 , and 10^5 CFU/mL) a significant increase in miR-372-5p expression in CHD of 1.1-, and 1.4-fold in comparison to the control group ($p < 0.05$, fig. 11B) was evident. By contrast, 24 h after bacterial stimulation (10^2 , 10^4 , 10^5 and 10^6 CFU/mL) a significant decrease in miR-372-5p expression of 1.2-, 1.2-, 1.6-, and 1.7-times with respect to the control group ($p < 0.05$, fig. 12B) was found. In these same trials we demonstrated that 3-hour of stimulation with *E. coli* (10^5 and 10^6 CFU/mL) are sufficient to increase the concentration of IL-1 β in 1.6- and 3.5-times respectively regarding the control group ($p \leq 0.05$). Similarly, at 6-hour of such a stimulation (10^2 , 10^4 , 10^5 , and 10^6 CFU/mL), the secretion of IL-1 β increased by 1.2-, 1.2-, 6.19-, and 9.5-fold, respectively versus the control group ($p \leq 0.05$). Finally, 24-hours after the stimulation (10^2 , 10^4 , 10^5 , and 10^6 CFU/mL), the secretion of IL-1 β showed an increase of 2.8-, 5.1-, 11.7-, and 24.8-fold respectively with respect to the control group ($p \leq 0.001$).

Conclusion: The stimulation with *Escherichia coli* of CHD tissues induces miR-372-5p expression by modulating the IL-1 β secretion as a time-dependent function.

Key words: Chorio-decidua, *Escherichia coli*, microRNAs, innate immune response.

1.0 INTRODUCCIÓN

El parto pretérmino se define como el nacimiento previo a las 37 semanas de gestación y se estima que afecta del 5 al 18% de los embarazos. Es la primera causa de muerte neonatal y la segunda causa de muerte infantil en niños menores de 5 años, debido al aumento del riesgo de complicaciones a corto plazo resultantes de la inmadurez del sistema multiorgánico así como a desordenes en el neurodesarrollo, como son la parálisis cerebral, deficiencias intelectuales así como alteraciones visuales y auditivas (1, 2). Económicamente, representa una causa importante de discapacidad ajustada por años de vida (número de años perdidos por enfermedad, discapacidad o muerte temprana) y en Estados Unidos, el costo estimado por año generado por este problema alcanza los 26 billones de dólares (3).

Aproximadamente, dos tercios de los nacimientos prematuros ocurren después del inicio espontáneo del trabajo de parto, mientras que el resto está inducido médicamente debido a complicaciones maternas o fetales tales como la preeclampsia, la restricción fetal del crecimiento intrauterino entre otras (4). Se ha descrito que el parto pretérmino espontáneo es un síndrome asociado no solo a un evento sino a un conjunto de mecanismos patológicos responsables de desencadenar un incremento en las contracciones uterinas, una dilatación cervical y una ruptura prematura de las membranas (figura 1). Sin embargo de estos, solo la infección intraamniótica se ha relacionado causalmente con el parto prematuro espontáneo (5).

Las membranas fetales humanas (MFH) se forman a partir de las células del epiblasto del embrión en desarrollo y da origen tanto al epitelio amniótico como al tejido de la coriodecidua (6). Las MFH, son una entidad altamente organizada y dinámica que proporcionan protección mecánica e inmunológica al desarrollo fetal (7-9). A lo largo del embarazo las MFH se encuentran en un estado latente, caracterizado por diferentes mediadores entre los que se encuentran las interleucinas (IL- 4, IL-10), el factor de crecimiento tumoral tipo 1-beta (7), así como de la progesterona (P₄) (10, 11); sin embargo, este perfil cambia hacia el final del embarazo hacia un tipo proinflamatorio caracterizado por la secreción de citocinas como la interleucina de tipo 1-beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF- α), quimiocinas (IL-8), marcadores uterotónicos como la prostaglandina (PGE) los cuales promoverán en su conjunto la secreción de las metaloproteasas de matriz extracelular de tipo

colagenolítica (MMP-2 y -9) que comprometerán la fuerza y organización de las MFH (11). Recientemente, se ha demostrado la participación de una clase de RNA pequeños no-codificantes denominados microRNAs (miRNAs) los cuales están implicados con la regulación de la respuesta inflamatoria (12, 13). Los miRNAs constituyen una amplia familia de moléculas de RNA con un tamaño de aproximadamente 21 nucleótidos, estas pequeñas moléculas controlan la expresión génica post transcripcional al silenciar la traducción del RNA mensajero o al promover su degradación en el citoplasma. Se sabe que varios miRNAs intervienen en la traducción de proteínas que participan en la respuesta inmunológica innata asociadas a los receptores de tipo Toll como son el complejo de MyD88, TRAF6/IRAK1 y en la proteína de NF- κ B (14, 15).

2. ANTECEDENTES

2.1 Epidemiología y etiología de los nacimientos prematuros

En la actualidad, la estimación de la tasa de nacimientos prematuros a nivel mundial resulta complicada debido a la falta de registros sistemáticos de los nacimientos, a estimaciones imprecisas de la edad gestacional y a errores en la clasificación de los recién nacidos con o sin vida. Se estima que en el 2014, la tasa global de recién nacidos pretérmino vivos fue de 10.6% (UI 9.0-12.0), equivalente a 14.84 millones, similar a la tasa calculada en 2010 (16). Aproximadamente el 85 % de los recién nacidos prematuros corresponden a la prematuridad tardía (32-37 sdg), el 10% a la prematuridad extrema (28-31 sdg) y el 5 % a la prematuridad muy extrema (<28 sdg) (17) y de estos se estima que más del 80% resultaron de países asiáticos y de Africa Sub-Sahariana (figura 1).

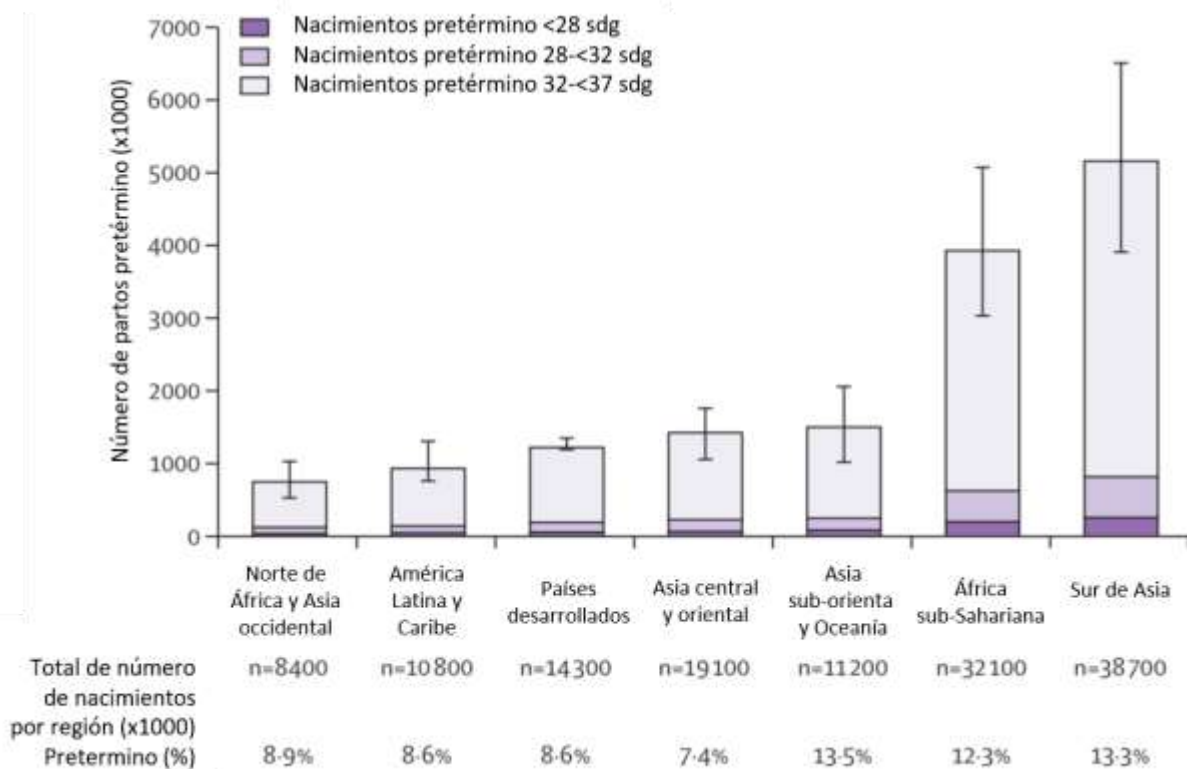


Figura 1. Estimación de nacimientos pretérmino por región y edad gestacional en el año 2010. imagen tomada de Blencowe (17).

En un estudio Canadiense se evaluó la mortalidad neonatal asociada al nacimiento pretérmino y al peso pequeño para la edad gestacional. Se observó que la tasa de mortalidad resultó inversamente proporcional a la edad gestacional y esta fue 100 veces mayor en infantes pretermino con un peso pequeño para edad gestacional en comparación con aquellos nacidos a término con un peso al nacimiento mayor al percentil 5. Este riesgo fue especialmente prominente en infantes menores de 29 sdg (18) (figura 2). En la estadística del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) del 2014 al 2018 se encontró que del total de nacimientos, el 43 % fueron pretérminos (figura 3) y de esos recién nacidos, el 79% fueron pretérminos tardíos, el 15% entre las 29-32 sdg y el 6% correspondían a la prematuridad extrema (<28-26 sdg) (figura 4). Las causas más frecuentemente asociadas a la muerte de los recién nacidos fueron las malformaciones congénitas incompatibles con la vida (cardiopatías, trisomias, hernias diafragmáticas, etc..), complicaciones de la prematuridad e infecciones (figura 5).

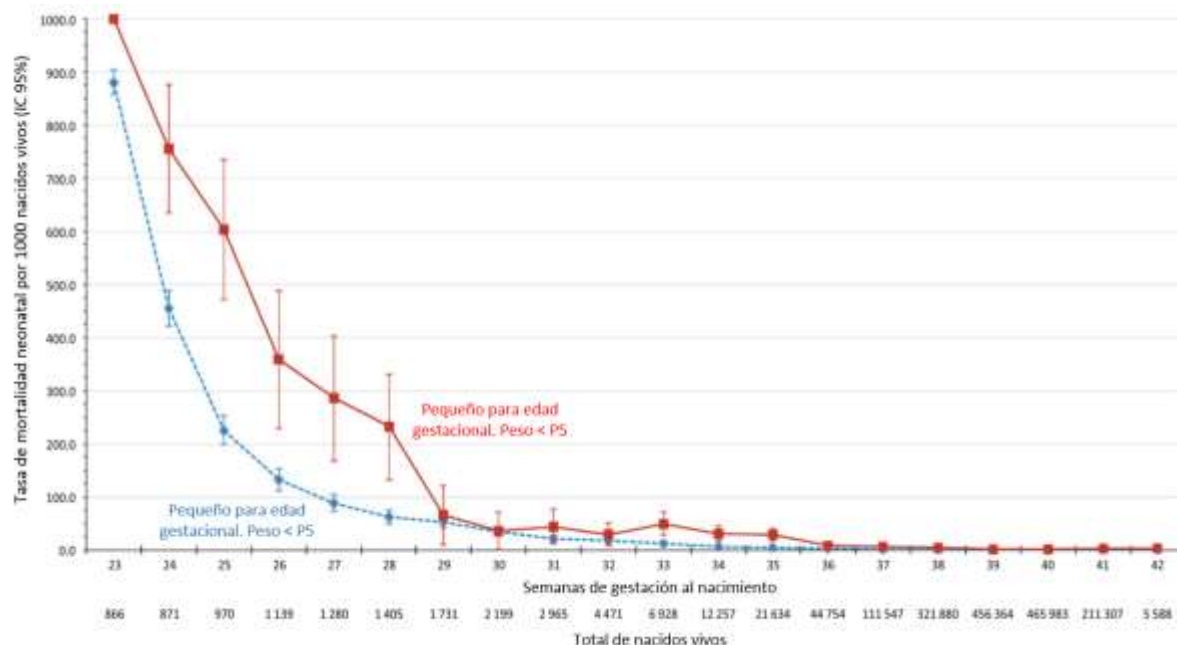


Figura 2. Tasa de muerte neonatal antes de 28 días entre los nacidos vivos únicos por edad gestacional y en la presencia (rojo) o ausencia (azul) de recién nacidos pequeños para edad gestacional con un peso menor al percentil 5. Imagen modificada de Ray (18).

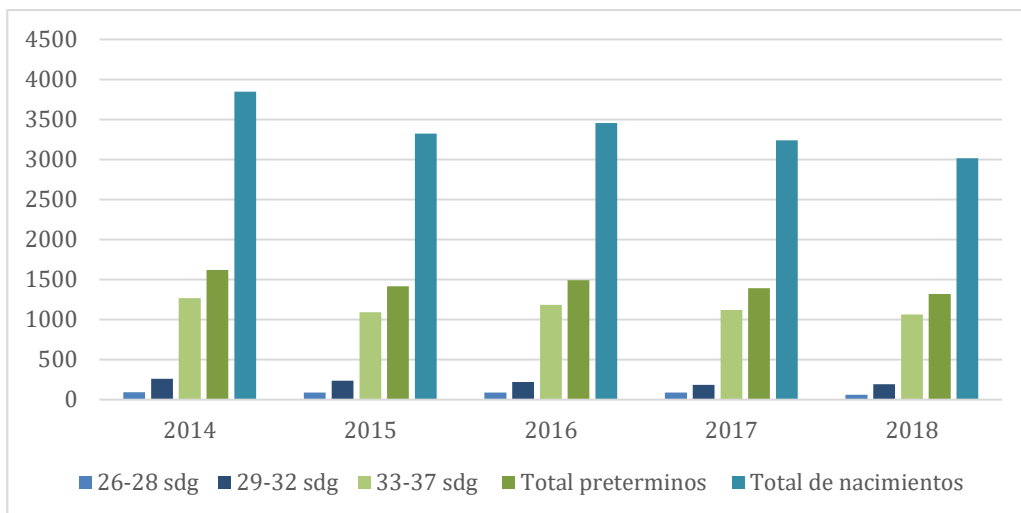


Figura 3. Número de nacimientos por edad gestacional en el INPer del 2014 al 2018

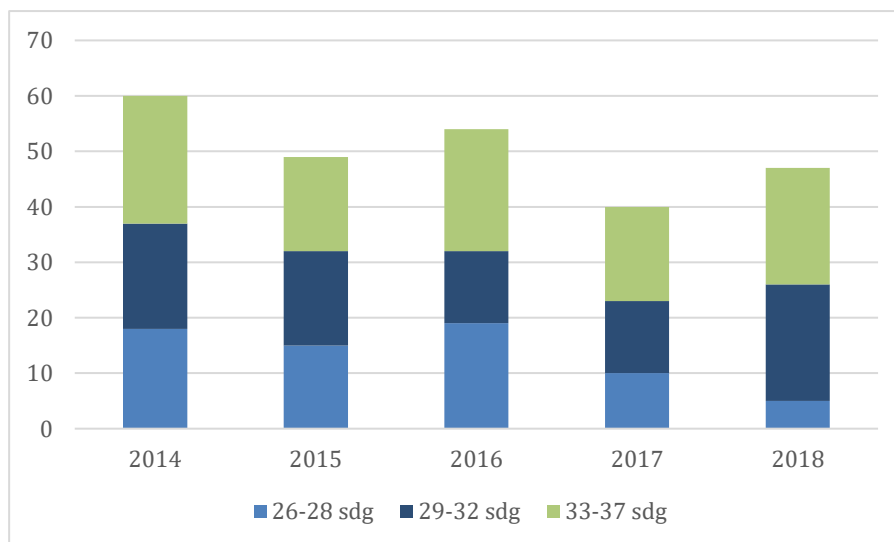


Figura 4. Número de recién nacidos pretérmino muertos en el INPer del 2014 al 2018

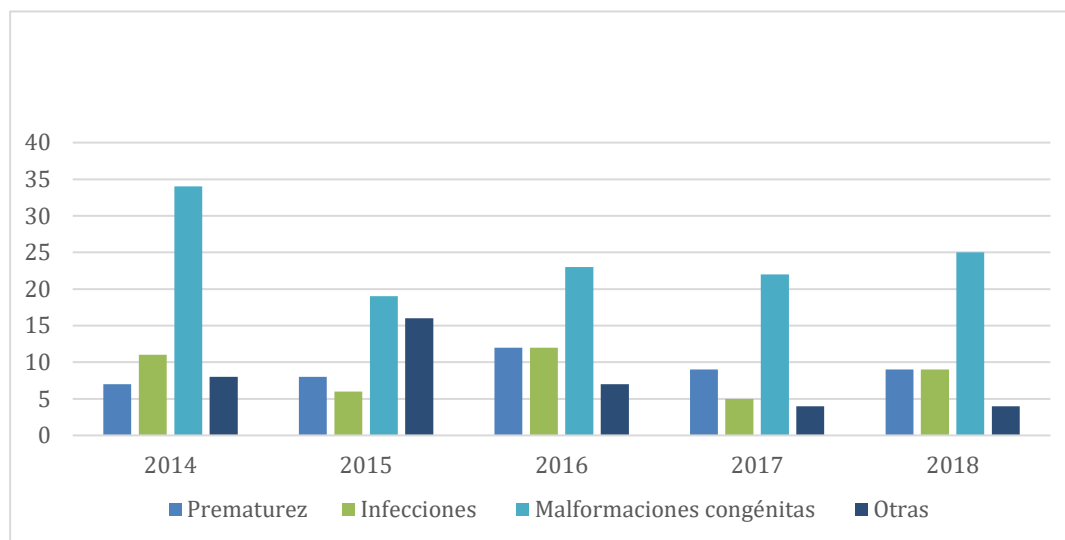


Figura 5. Causas de muerte en recién nacidos pretérmino en el INPer del 2014-2018

Comprender la causalidad del parto pretérmino espontáneo requiere entenderlo como un síndrome asociado al desenlace de diferentes vías fisiopatológicas y el desencadenamiento de estos mecanismos podrían estar a su vez asociados a diferentes factores de riesgo socio-demográficos y ambientales como; la edad materna, el nivel socio-económico bajo, la raza étnica, los antecedentes personales o familiares de parto pretermino, el consumo de sustancias tóxicas, el intervalo intergestacional corto (<6 semanas) (19) (tabla 1). Sin embargo, la infección intrauterina es la única asociada causalmente con el parto pretérmino espontáneo (5, 20).

Tabla 1. Factores de riesgo asociados a parto pretérmino espontáneo.

Factor de riesgo	RR para Parto pretérmino < 37 sdg (IC 95%)
Antecedente de parto pretérmino	2.62 (1.99-3.44)
Intervalo intergenésico corto (<6 meses)	1.40 (1.24-1.58)
Peso bajo pregestacional IMC	1.32 (1.10-1.57)
Nivel socio económico bajo	1.66 (1.06-2.61)
Malformación congénita uterina (defectos de canalización)	2.14 (1.48-3.11)
Ej. Septo uterino	
Malformación congénita uterina (defectos de unión)	2.97 (2.08-4.23)
Ej. Útero Bicornes	
Tabaquismo materno	1.27 (1.21-1.33)
Consumo de cocaína	3.53 (1.65-7.56)
Consumo de opioides	2.86 (1.11-7.36)
Factores de riesgo del embarazo	
- Acortamiento de la longitud cervical en 2do trimestre	6.9 (4.3-11.1)
- Desprendimiento de placenta o sangrado transvaginal en el 1er o 2do trimestre	1.62 (1.22-2.17)

RR: riesgo relativo, IC: intervalo de confianza, IMC: índice de masa corporal.

2.2 Las infecciones durante el embarazo

Se estima que uno de cada cuatro bebés prematuros nace de madres con una infección intraamniótica (21), y aproximadamente el 50% de los nacimientos pretermino y el 70% de las rupturas prematuras de membranas se asocian a una infección intraamniótica e inflamación (22, 23). Del mismo modo, una "inflamación intrauterina estéril" también se describe como un posible desencadenante del parto prematuro y la RPM (24). Se han encontrado microorganismos aislados del líquido amniótico similares a los encontrados en el tracto genital inferior, por lo tanto, la vía ascendente se considera la vía de infección más frecuente. Del mismo modo se han encontrado bacterias involucradas en enfermedades periodontales en el líquido amniótico, lo que sugiere que también puede ocurrir diseminación hematógena con pasaje transplacentario (25). En efecto, el cambio del miometrio de un estado quiescente a un estado contráctil se acompaña de un cambio en la señalización de las vías antiinflamatorias por vías proinflamatorias; activando quimiocinas (Interleucina-8), citocinas (Interleucinas-1 y 6) y producción de proteínas asociadas a la contracción como prostaglandinas, conexina 43 y la expresión de receptores de oxitocina. La maduración cervical está mediada por cambios en las proteínas de la

matriz extracelular que incluyen una pérdida en la reticulación del colágeno y un aumento en los glicosamino-glicanos, así como cambios en la barrera epitelial. La activación decidua/membrana se refiere a los eventos anatómicos y bioquímicos involucrados en la separación de las membranas corioamnióticas de la decidua y, eventualmente, la ruptura de la membrana (RPM). El conjunto de señalizaciones se acompaña por un aumento tanto en la expresión de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , y -6), metaloproteasas de matriz extracelular (MMP-8 y MMP-9), así como de la fibronectina oncofetal y apoptosis celular (figura 6) (26).

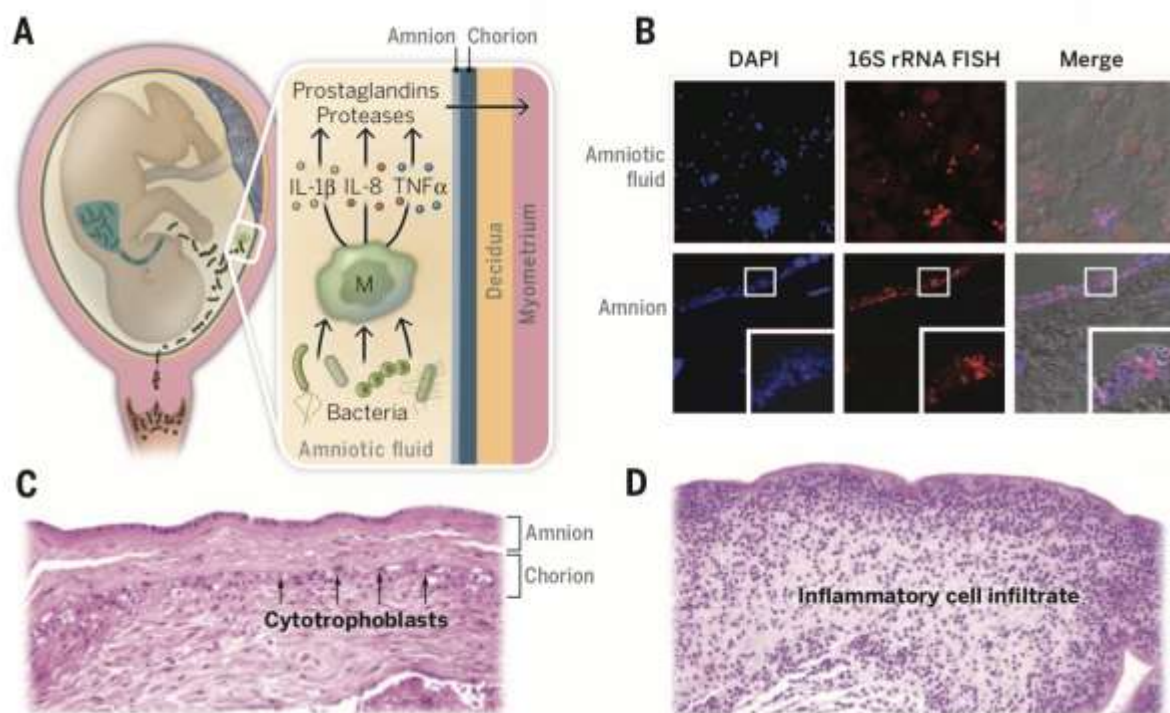


Figura 6. Mecanismos de inducción de trabajo de parto pretérmino por microorganismos. (A) Bacterias provenientes del tracto genital bajo ascienden a la cavidad intramniótica y estimulan la producción de quimiocinas (IL-8) y citocinas (IL-1 β y TNF- α), a su vez estas estimulan la producción de otros mediadores de inflamación (prostaglandinas y especies reactivas de oxígeno) y metaloproteasas. Estos productos pueden desencadenar las contracciones del miometrio y favorecer la ruptura de las membranas. **(C)** Membranas corioamnióticas sin evidencia de inflamación. **(D)** Membranas corioamnióticas de un paciente con infección intraamniótica. Infiltración de células inflamatorias maternas al corion y amnios. Imagen tomada de Romero (5)

En el 30 % de los casos de infecciones intraamnióticas, las bacterias fueron identificadas en la circulación fetal resultando en una respuesta inflamatoria sistémica fetal. Estos fetos desarrollan un compromiso multiorgánico que incrementa los riesgos de complicaciones a largo plazo como la parálisis cerebral y enfermedad pulmonar

crónica. Este hecho subraya que las complicaciones de los bebés prematuros no solo son causa de la inmadurez sino también a causa del proceso inflamatorio. Esto tiene implicaciones importantes ya que se ha visto que el uso de agentes antiinflamatorios durante el periodo neonatal pudiera revertir estas condiciones (27).

Pero ¿por qué algunas mujeres desarrollan una infección intraamniótica mientras la mayoría no lo hace? Estudios recientes han demostrado que la heterogeneidad en la respuesta inflamatoria (citocinas, quimiocinas y receptores tipo Toll) y en el microambiente bacteriano están asociados con los factores de riesgo para la infección intraamniótica y el parto pretérmino, de ahí que se identifiquen ciertos grupos étnicos propensos a desarrollar estas condiciones (28, 29).

2.3 Tipos de RNA

El ácido ribonucleico (RNA) es una molécula de síntesis celular conocida principalmente por su papel en la exportación de información genética desde el núcleo hacia el citoplasma donde normalmente se traduce a proteínas (fig. 6) (30).

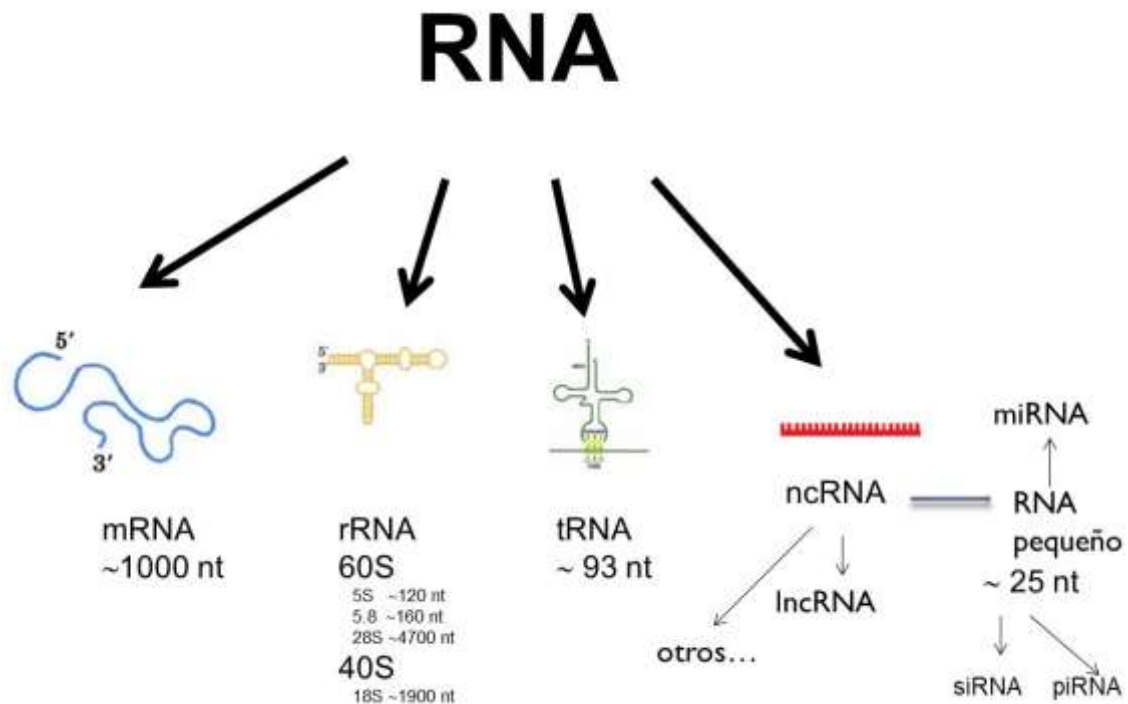


Figura 7. Tipos de RNA clásicos y no-clásicos. Se muestra la estructura y número de nucleótidos aproximados del RNA clásicos: mensajero (mRNA), ribosomal (rRNA), de transferencia (tRNA) y no-clásicos RNA no codificante (ncRNA) entre los que se encuentra el de interferencia (siRNA) y los microRNAs (miRNAs).

El ácido ribonucleico (RNA) comprende una gran variedad de moléculas con distinta longitud, estructura y funciones. En términos generales los RNA clásicos o codificantes están implicados directamente con la síntesis de proteínas, y estos incluyen 3 subtipos: 1) RNA mensajero, que transporta la información génica desde el núcleo hacia el citoplasma, en un proceso denominado transcripción (31) éstas moléculas miden alrededor de 1000 nt (32); 2) RNA ribosomal que constituye la estructura fundamental de los ribosomas, (2/3 rRNA y 1/3 proteína) en eucariontes se agrupa en subunidades 60S (Subunidad grande o LSU) y 40S, (Subunidad Pequeña o SSU). La LSU actúa como Ribozima, catalizando la formación de enlaces peptídicos; los ribosomas tienen 3 sitios de unión denominados A, P y E, el sitio A se une a un aminoacil-tRNA, el sitio P contiene el enlace éster del peptidil-tRNA del último aminoácido en la cadena en crecimiento, y el sitio E, que recibe al tRNA que estaba sujeto dentro del último aminoácido (32) los ribosomas pueden fragmentarse en subunidades S (la S representa unidades Svedberg, una unidad no-métrica del coeficiente de sedimentación, que mide la velocidad a la que una partícula se

sedimenta) (33); y 3) RNA de transferencia, una molécula adaptadora de 76-90 nucleótidos que funciona como un vínculo físico entre el mRNA y los aminoácidos [63]. Intercambiar triplete de nucleótidos por el aminoácido correspondiente de acuerdo a la complementariedad de pares de bases con el RNA mensajero, (codón-anti-codón) (34) (fig. 6); sin embargo, recientemente se han descubierto nuevos tipos de RNA, denominado RNA no codificante con funciones novedosas.

2.4 Los miRNAs

Los microRNAs (miRNAs) constituyen una amplia familia de moléculas de RNA no codificante de alrededor de 21 nucleótidos. Estos se descubrieron hace más de 20 años como reguladores post transcripcionales clave de la expresión génica (35). El papel regulador de estas pequeñas moléculas de RNA ha comenzado a ser explorada en el sistema reproductor humano. Originalmente descubiertos en el nematodo *Caenorabditis elegans*, estas pequeñas moléculas controlan la expresión génica post transcripcional al silenciar la traducción del RNA mensajero o al promover su degradación en el citoplasma (35).

2.5 Biogénesis de los miRNAs

Los miRNAs se transcriben mediante la RNA polimerasa II y/o RNA polimerasa III como un transcrito largo inicial de 100-1000 nucleótidos, denominado pri-miRNAs, o miRNA primario, el cual está usualmente encapuchado en el extremo 5' y poliadenilado en el extremo 3'. Los pri-miRNAs son procesados secuencialmente mediante las ribonucleasas Drosha y Pasha (DGCR8) para generar un pre-miRNA de 60-70 nucleótidos, el cual tiene un fosfato 5' y un segmento sobresaliente de 2 nucleótidos en el extremo 3' (fig. 7) (12). Estos productos son posteriormente exportados al citoplasma mediante la exportina-5 (36) donde se unen a la ribonucleasa Dicer y son procesados para generar una doble cadena miRNA:miRNA (37). Por último, se propone que una helicasa (aún no caracterizada) desdobla el dúplex y forma los miRNA maduros (fig. 7) (33).

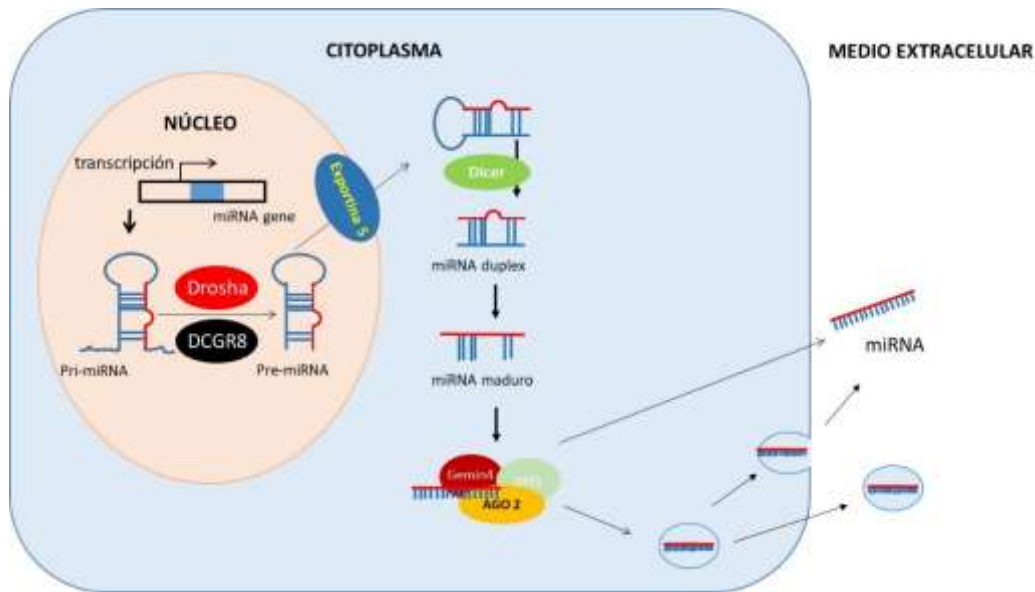


Figura 8 Biogénesis y maduración de los miRNAs. El proceso se inicia en el núcleo al activarse las secuencias genéticas del miRNA activado mediante la RNA polimerasa de tipo II (transcripción) generando el transcrito primario (pri-miRNAs) el cual es procesado por el complejo de Drosha y (RNAasa III) y la proteína DGCR8 (DiGeorge syndrome critical región gene 8) y forman un complejo llamado microprocesador como se muestra. La RNAasa III (Drosha) a través de su dominio de unión a RNA de doble cadena (dsRBD) reconoce al sustrato del pri-miRNA, y mediante sus dominios de RNAasa III (RIIId5 a-b) escinden las cadenas laterales del pri-miRNA para formar un pre-miRNA. Posteriormente, la exportina 5 junto con el cofactor RAN transportan los pre-miRNA del núcleo al citoplasma. En el citoplasma, la RNAasa de tipo III (Dicer) procesa al pre-miRNA generando al miRNA dúplex de aproximadamente 22 pares de bases. Posteriormente el miRNA dúplex es reconocido por secuencias del complejo de argonata tipo 2 (AGO2) los cuales concluyen con las ediciones dando lugar al miRNA maduro el cual regulará diversas señales en la misma célula o en células vecinas o incluso ser transportadas a otros sitios mediante la circulación sanguínea. Cuando Dicer ha generado a la molécula de miRNA madura este permanece unido y posteriormente es liberado por una helicasa. Modificado de Bartel (38).

Estos miRNAs maduros se incorporan al complejo silenciador inducido por RNA (RISC) y se unen a la secuencia complementaria 3'UTR de su blanco de mRNA específico. Esto resulta en la inhibición de la traducción de mRNA o promueve su degradación y conduce al silenciamiento génico post transcripcional, (PTGS) (39). Además, el silenciamiento génico post transcripcional inducido por RNA (RITS) que utiliza AgoII en lugar de AgoI en su complejo efector, fue descrito hace más de una década (40). Dicho complejo ejerce modificaciones DNA/Histona, (por ejemplo, metilación) en el genoma y por lo tanto desencadena el silenciamiento génico. Aunque se ha identificado el RITS en diversas especies, su presencia aún no se ha demostrado en el ser humano. En la mayoría de los casos, la región "semilla" (las 7-8 pares de bases después de la primera o segunda base del extremo 5' del miRNA) complementa de forma perfecta la secuencia blanco de mRNA. El apareamiento de

bases de nucleótidos también ocurre en el extremo 3' del miRNA, aunque se cree que es más débil y de menor importancia que el apareamiento 5'. Los desajustes del dúplex miRNA:miRNAs ocasionan la generación de estructuras protuberantes en la región central, lo cual podría ser útil en la regulación de mRNA. Debido a lo pequeño de los elementos de reconocimiento, el mismo miRNA puede reconocer cientos de genes blanco, y así, cada gen puede ser blanco de varios miRNAs (41).

2.6 Relación de los miRNAs y la respuesta inflamatoria

Taganov y colaboradores demostraron que al estimular a monocitos humanos (THP-1) con 1 µg/mL de lipopolisacárido (LPS-*Escherichia coli*) se incrementa la expresión del miR-132, -146, y -155 los cuales estuvieron asociados con el aumento en la expresión del factor nuclear de tipo $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$) asociado a la secreción de la IL-1 β y del TNF α (42). Hoy en día se sabe que miR-146a es un regulador importante en la señalización de TLR-4 por medio de la cascada de señalización de MyD88 como parte de una respuesta inmune inflamatoria (fig. 8).

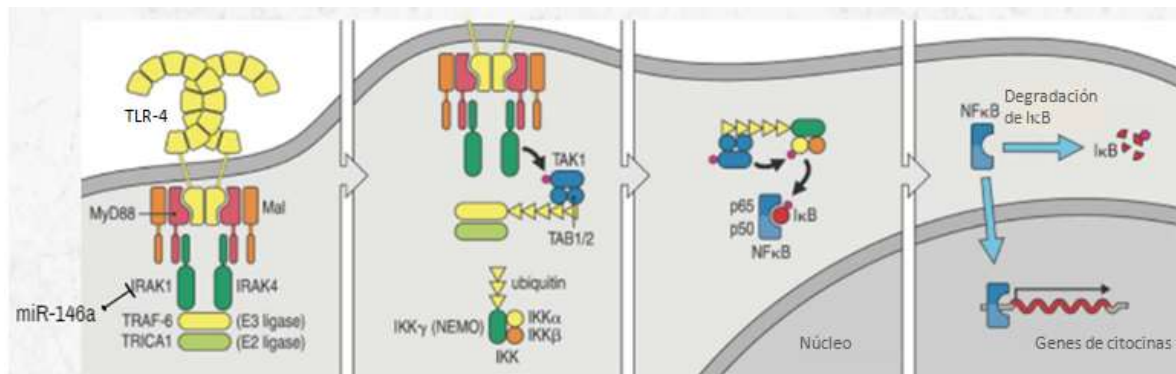


Figura 9. Función del miR-146a La cascada de señalización que se activa en presencia de LPS comienza por un receptor de tipo toll (comúnmente TLR-4), continúa con las proteínas citosólicas a partir de MyD88 y a partir de fosforilaciones activa al factor de transcripción NF- κ B, quien activa los genes de citocinas. IRAK1 es parte de esta transducción y miR-146 inhibe a su RNA mensajero, impidiendo su síntesis y consecuentemente no se lleva a cabo toda la señalización. miR-146 actúa como inhibidor de la expresión de genes de citocinas, específicamente IL-8 e IL-1b. Imagen modificada de Janeway (2012).

Wang y colaboradores (2015) demostraron que al transfectar a células de fibroblasto sinovial con miR-451 se reduce la vía de señalización de la p38 MAPK involucrada con la secreción de las citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) (fig. 9) (9).

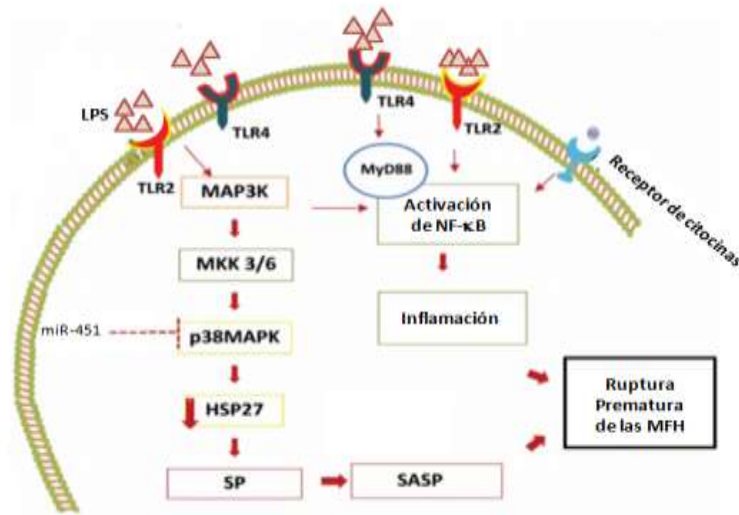


Figura 10. Función del miR-451. La cascada de señalización que se activa en presencia de LPS comienza por un receptor de tipo toll (comúnmente TLR-2), continúa con las proteínas citosólicas a partir de MAP3K y a partir de fosforilaciones puede conducir al desarrollo del fenotipo de senescencia (SP) en células fetales humanas. Las células senescentes causan una respuesta inflamatoria única que se conoce como fenotipo secretor asociada a la senescencia (SASP). Con SASP, un conjunto único de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos y enzimas degradadoras de ECM. miR-451 puede actuar como inhibidor de la expresión de p38 MAPK y su consecuente respuesta inflamatoria. La imagen fue modificada de Bredeson y cols. (43).

3.0 JUSTIFICACIÓN

Las infecciones durante el embarazo explican el 12% de los nacimientos prematuros, la ruptura prematura de las membranas fetales, el bajo peso de los recién nacidos y la mortalidad materno fetal (20, 44-46). Las bacterias patógenas que se establecen en el canal cérvico vaginal ascienden a la cavidad uterina y de esta forma contactan a las diferentes poblaciones celulares que conforman a las membranas fetales humanas activando la respuesta inflamatoria (47-52) y la secreción de diferentes metaloproteasas de matriz extracelular (53, 54).

En nuestro grupo de investigación hemos demostrado mediante un modelo experimental de infección que al incubar a las membranas fetales humanas con *Escherichia coli* se incrementa la secreción de diferentes citocinas inflamatorias como la interleucina (IL)-1 β , -6, -8 y, TNF α asociadas con la ruptura prematura de las membranas fetales humanas (53, 55).

En este escenario infeccioso/inflamatorio se ha demostrado la participación de una clase particular de RNA pequeños no-codificantes denominados microRNAs (miRNAs) los cuales regulan la secreción inflamatoria (15, 56).

Los miRNAs controlan la expresión de genes específicos mediante la represión del RNAm, ya sea por desestabilización del transcrito, inhibición transcripcional o ambas; sin embargo, recientes investigaciones han demostrado que también pueden unirse a otras regiones como los exones codificadores de proteínas. También se encuentran involucrados en muchos procesos biológicos como el desarrollo, funciones celulares y control metabólico. Se ha demostrado que los miRNAs se encuentran asociados y participa activamente en numerosas patologías, incluyendo diferentes tipos de cáncer y patologías asociadas al embarazo. Además, se han identificado concentraciones de miRNAs en el suero y plasma sanguíneo con alta correlación respecto a los tejidos donde son producidos.

Recientemente García-Rodríguez y colaboradores (2018) demostraron en pacientes con evidencias clínicas de corioamnionitis la expresión diferencial del miRNA-106, -126 y, -146 con respecto a pacientes sanas con y sin trabajo de parto activo. En éste mismo estudio se demostró que éste aumento está asociado con la secreción de IL-1 β ; sin embargo, en este estudio no se demostró si el epitelio amniótico o el tejido de la coriodecidua participan activamente en la regulación de la expresión de estos

miRNAs, por lo que en el presente estudio nos propusimos evaluar la expresión del miR-372 y la secreción de la IL-1 β durante la estimulación del tejido de la coriodecidua con *Escherichia coli* en un modelo de infección.

4.0 HIPÓTESIS

H1 *Escherichia coli* aumentará la expresión del miR-372-5p en el tejido de la coriodecidua de manera dosis dependiente con respecto al grupo control sin estimulación.

H2 La modulación del miR-372-5p activará la secreción de la IL-1 β en el tejido de la coriodecidua humana.

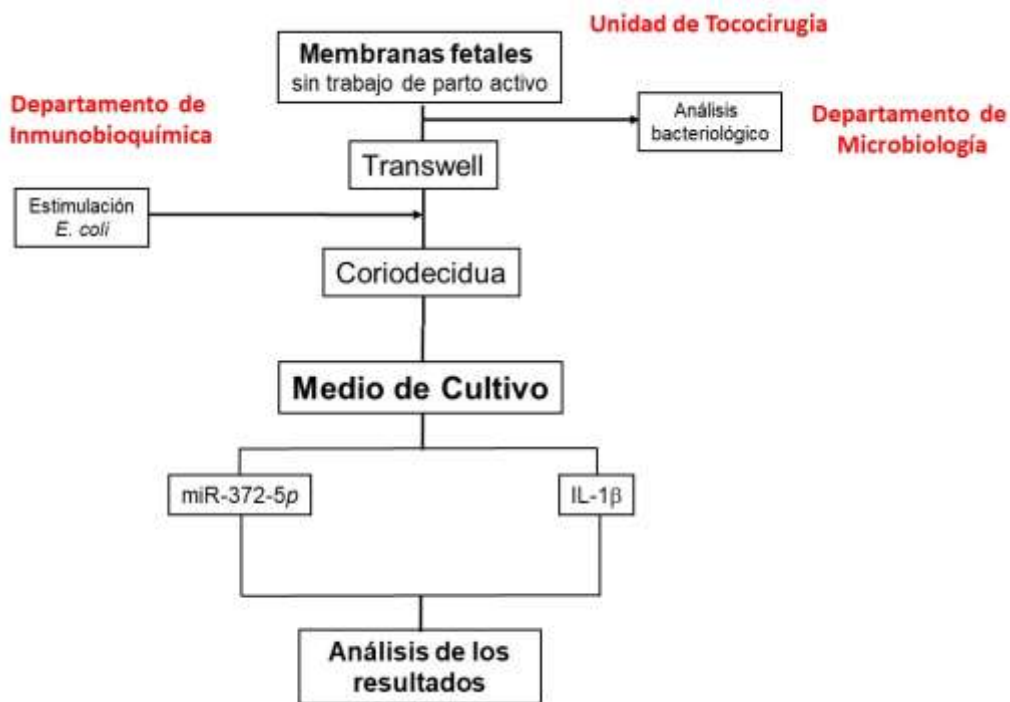
5. OBJETIVO GENERAL

Identificar la expresión del miR-372-5p en el tejido de la coriodecidua humana después de la estimulación con *Escherichia coli*

5.1 Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión del miR-372-5p en el tejido de la coriodecidua a las 3, 6, y 24 horas después de la estimulación con diferentes unidades formadoras de *Escherichia coli*.
2. Cuantificar la secreción de la IL-1 β en el tejido de la coriodecidua a las 3, 6, y 24 horas después de la estimulación con diferentes unidades formadoras de *Escherichia coli*.
3. Asociar los niveles de expresión del miR-372 y la concentración de la IL-1 β a los mismos intervalos de tiempo y de concentración.

6.0 MATERIALES Y MÉTODOS



Procedimiento general del estudio. La toma de las membranas fetales se efectuó en la unidad de tococirugía, el análisis microbiológico se determinó en el departamento de Microbiología y el desarrollo experimental se realizó en el Departamento de Inmunobioquímica.

6.1 Aspectos éticos

Previo al manejo experimental de las MFH se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes en donde se les explicó la finalidad del proyecto de investigación, el cual fue aprobado por los comités de investigación y ética institucionales y cuenta con número de registro institucional 2017-2-82 (anexo 1). Se les informó que la obtención de las MFH será tomada por la médico especialista (HCM) después del nacimiento de su bebé y que este procedimiento no afectará con el bienestar de ella ni el de su bebé. Finalmente, se le entregó la carta de consentimiento informado para que la paciente firmará de manera libre (anexo 2).

6.2 Características de las pacientes

Las membranas fetales humanas (MFH) fueron seleccionadas de pacientes con embarazo único a término mayor o igual a 37 semanas de gestación, sin trabajo de

parto e intervenidas quirúrgicamente por cesárea y que no presenten signos y síntomas evidentes de infección u otras patologías obstétricas asociadas a la respuesta inflamatoria.

6.3 Diseño del estudio

Tipo de investigación: Experimental

Tipo de diseño: Experimental biomédico.

6.3.1 Características del estudio

- a) Por la participación del investigador: Analítico
- b) Por la temporalidad del estudio: Transversal
- c) Por la lectura de los datos: Prolectivo
- d) Por el análisis de datos: Analítico.

6.3.2 Unidades de observación:

6.3.3 Tamaño de la muestra

Para cubrir con los objetivos planteados en el desarrollo del presente trabajo hemos considerado obtener 9 membranas fetales humanas. Este número, fue designado como resultado de la experiencia de nuestro grupo de investigación, demostrado por las publicaciones con respecto al uso del modelo de infección García-López (53, 54); y la expresión de los miRNAs en las membranas fetales humanas (García-Rodríguez, 2018).

6.3.4 Criterios de selección

Las membranas fetales humanas (MFH) fueron seleccionadas de pacientes con embarazo único a término mayor o igual a 37 semanas de gestación, que sean intervenidas quirúrgicamente por cesárea y que no presenten signos y síntomas evidentes de infección u otras patologías obstétricas asociadas a la respuesta inflamatoria.

6.3.5 Criterios de inclusión

Membranas fetales humanas a término igual o mayor a 37 semanas de gestación, cuyo embarazo sea único y resuelto por cesárea. Que no tuvieron datos clínicos de trabajo de parto activo y/o ruptura de membranas fetales. Que no presentaron datos clínicos de corioamnionitis y/o patologías asociadas a procesos inflamatorios.

6.3.6 Criterios de exclusión

Membranas fetales humanas procedentes de pacientes que hayan recibido tratamiento antimicrobiano por lo menos antes de 20 días antes de la cirugía. La cual se revisará en el expediente clínico y cuestiona a la paciente.

6.3.7 Criterios de eliminación

Membranas fetales humanas que después del análisis microbiológico se reporte la identificación de bacterias Gram-negativas, Gram-positivas o bacterias atípicas.

6.3.8 Variables de estudio

Variable independiente

Tejido de la coriodecidua estimulada con diferentes unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* (10^2 , 10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL).

Variable dependiente

Expresión del miR-372-5p y secreción de la IL-1 β .

6.4 Obtención y procesamiento de las membranas fetales

En la unidad de tococirugía, las MFH y la placenta fueron depositadas en el contenedor quirúrgico y se separaron mediante un bisturí. Posteriormente, las MFH, fueron depositadas en un frasco estéril para muestras biológicas que contiene 20 mililitros de medio D-MEM y fueron inmediatamente transportadas para su procesamiento en el cuarto de cultivo que se localiza en el tercer piso de la torre de investigación.

6.4.1 Procesamiento y montaje de las membranas fetales humanas en el sistema de Transwell.

La sangre adherida a las MFH fue quitada mediante una gasa estéril. Las MFH fueron cortadas en piezas de aproximadamente 2 cm² y montadas en el sistema de Transwell las cuales fueron cultivadas en cajas de 12 pozos como ha sido previamente reportado (57).

6.4.2 Procedimiento de estimulación

La región del tejido de la coriodecidua humana (CDH) fue estimulada con diferentes cantidades de unidades formadoras de colonias de *E. coli* y realizamos una cinética

de estimulación a las 3, 6 y 24-horas. Se utilizaron UFC/mL de *E. coli* utilizamos como referencia de turbidez el tubo número 0.5 de MacFarland que representa aproximadamente 10^8 UFC/mL. Se realizaron diferentes diluciones hasta obtener la concentración de bacterias requeridas.

La estimulación de la CDH se realizó considerando los siguientes grupos experimentales: 1) CDH sin estimular; 2) CDH estimulada *E. coli* (10^2 UFC/ml), 3) CDH estimulada *E. coli* (10^4 UFC/ml), 4) CDH estimulada *E. coli* (10^5 UFC/ml), y 5) CDH estimulada *E. coli* (10^6 UFC/ml).

En cada intervalo de tiempo el medio de cultivo fue recuperado y en cada caso las muestras fueron centrifugadas a 5 000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado en tubo Eppendorf y almacenado a -70 °C hasta el análisis de expresión mediante la retrotranscripción (RT) y amplificación (PCR) a punto final, y para la cuantificación de la IL-1 β mediante el ensayo inmuno-enzimático tipo sándwich (ELISA)

6.5 Determinación de la expresión del miR-372-5p por el método de RT-PCR

6.5.1 Extracción del RNA total

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

6.5.2 Reacción de RT

Para la obtención del cDNA se utilizó el kit Access RT-PCR System (Promega Madison WI, USA). Se tomaron 7 ng de cada una de las muestras y se preparó el mix de RT con 5 µL de Buffer AMV-Tfi 5X, 1 µL dNTP [10 mM], 2 µL MgSO₄ [50 mM], 10 µL agua libre de RNAsas, 1 µL de AMV RT y 1 µL de iniciador específico del miR-372-5p cuya secuencia es 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGAATA-3' [20 pmol]. El iniciador fue diseñado a partir de la secuencia de humano hsa-miR-372 maduro obtenida por el sitio web www.miRBase.org. La síntesis del cDNA se realizó durante 45 minutos a una temperatura de 45°C.

6.5.3 Reacción de PCR

A partir del cDNA obtenido se trabajó con 10 µL del mismo y con un mix de PCR el cual contenía 5 µL de Buffer AMV-Tfi 5X, 1 µL dNTP [10 mM], 2 µL MgSO₄ [50 mM], 10 µL agua libre de RNAsas, 1 µL de Tfi, 1 µL de iniciador específico para PCR miR-372-5p cuya secuencia es 5'-CGGCCGCCTCAAATGTG-3' [20 pmol] y 1 µL iniciador universal [20 pmol]. Cada uno de los tubos fueron procesados en el termociclador con el siguiente programa: 94°C para una elongación inicial durante un minuto y 40 ciclos con 94°C durante 30 segundos, 56°C en 30 segundos, 72°C durante 30 segundos. Se realizó una elongación final de 72° durante 10 minutos.

6.5.4 Expresión del miR-372

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

6.5.5 Determinación de la IL-1β

Para determinar la concentración de IL-1β (DY201; R&D Systems) en el medio de cultivo de los diferentes grupos experimentales se utilizó el ensayo de ELISA con las recomendaciones de la casa comercial y como ha sido reportado previamente por nuestro grupo de investigación (53).

La preparación de las microplacas (Nunc-Immuno Brand products, Denmark) consistió en la adición del anticuerpo de captura para la IL- β (4.0 μ g/mL) y fue sellada con membrana adhesiva (SealPleat; EXCEL Scientific) y fue incubada a temperatura ambiente toda la noche a 4°C. Al finalizar la incubación la placa fue lavada tres veces con solución de lavado que contiene Tween-20 al 0.05% en PBS (TPBS, pH 7.2).

A cada pozo de la placa se le añadieron 300 μ L de solución bloqueadora (0.1% BSA, 0.05 % NaN₃, PBS pH 7.2) y fue incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Al terminar la incubación, la placa fue lavada nuevamente con la solución de PBS.

La curva estándar para cada placa fue de 7 puntos con diluciones seriadas (2-veces) teniendo la concentración más alta de 10,000 pg/mL para la Hsp-70. En el resto de los pozos de la placa se colocaron 100 μ L de cada una de las muestras de los diferentes procedimientos experimentales. La placa fue incubada por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionaron 100 μ L por pozo del anticuerpo de detección Hsp-70 (100 ng/mL), se incubó nuevamente por dos horas a temperatura ambiente. La placa fue lavada dos veces, y posteriormente se adicionaron 100 μ L por pozo de estreptavidina-HRP e incubadas nuevamente a temperatura ambiente por 20 minutos y en oscuridad. La placa fue lavada con TPBSA, se le adicionaron 100 μ L por pozo de la mezcla 1:1 del sustrato colorimétrico (R&D; DY999) que consiste en el reactivo A (H₂O₂) y B (tetrametilbenzidina), la placa fue incubada por 20 minutos. La reacción fue detenida mediante la adición de 50 μ L por pozo de H₂SO₄ 2N. La placa fue leída a 450 nm (Dynatech MR5000). Los resultados fueron expresados en unidades de pg/mL.

6.9 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante la prueba de varianza (ANOVA). La comparación post hoc fue realizada mediante la medición de Tukey. Se usó el software de SigmaPlot (versión 11.0; USA). Todos los valores son presentados como la media \pm error estándar y en cada caso las mediciones se realizaron por duplicado. Se tomó como diferencia estadísticamente significativa el valor menor a $p=0.05$.

7.0 RESULTADOS

7.1 Características de la población de estudio.

La tabla 3 muestra las características maternas y neonatales procedentes de las 9 MFH incluidas en el presente estudio. Los datos fueron obtenidos del archivo clínico.

Tabla 2 Características maternas y neonatales de la población de estudio.

Variables Maternas	Embarazo a término (n=9)	
Edad materna años, media (min, max)	25 (17,44)	
Número de gestas		
1 n (%)	4 (44)	
2 n (%)	2 (22)	
3 n (%)	2 (22)	
4 n (%)	1 (11)	
Variables neonatales	Niñas (n=5)	Niños (n=4)
Edad gestacional semanas promedio (min, max)	38.8 (37-40)	37.6 (37.5-39.5)
Peso Kg, promedio (min, max)	2989 (2265-3480)	2735 (2520-3130)
Talla cm, promedio (min, max)	48.6 (47-50)	48.0 (47-49)

Número de muestras (n), porcentaje (%), valor mínimo (min), valor máximo (max).

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la edad gestacional, peso, y talla de los recién nacidos (tabla 3).

7.2 Perfil de expresión del miR372-5p

7.2.1 Expresión a las 3-horas

La figura 10 muestra la banda de expresión (A) y su densidad óptica (B) en la región estimulada de la CDH con *Escherichia coli*.

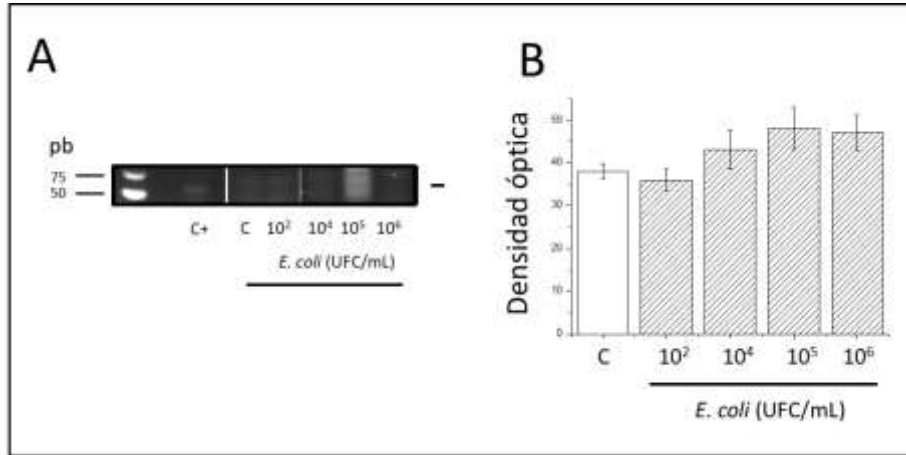


Figura 11. Perfil de expresión del miR-372-5p a 3 horas de estimulación con diferentes unidades de *Escherichia coli* sobre el tejido de la coriodescudia. Se muestra la banda de expresión del miR-372-5p (A). En cada caso se determinó la densidad óptica (unidades relativas) de la banda de expresión (B). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar.

A las 3 horas observamos que la expresión del miR-372-5p en la CDH sin estimulación fue de 38.0 ± 3.0 (fig. 10B). La estimulación con *E. coli* (10^2 UFC/mL) mostró una disminución de 1.05-veces (36.33 ± 4.5); sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p=0.189$). En la estimulación con 10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL observamos un incremento en la expresión del miR-372-5p de 1.14-, 1.2- y 1.2-veces; sin embargo, en todos los casos no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p=0.189$; fig.10B).

7.2.2 Expresión a las 6-horas

La figura 11 muestra la banda de expresión (A) y su densidad óptica (B) en la región estimulada de la CDH con *Escherichia coli*.

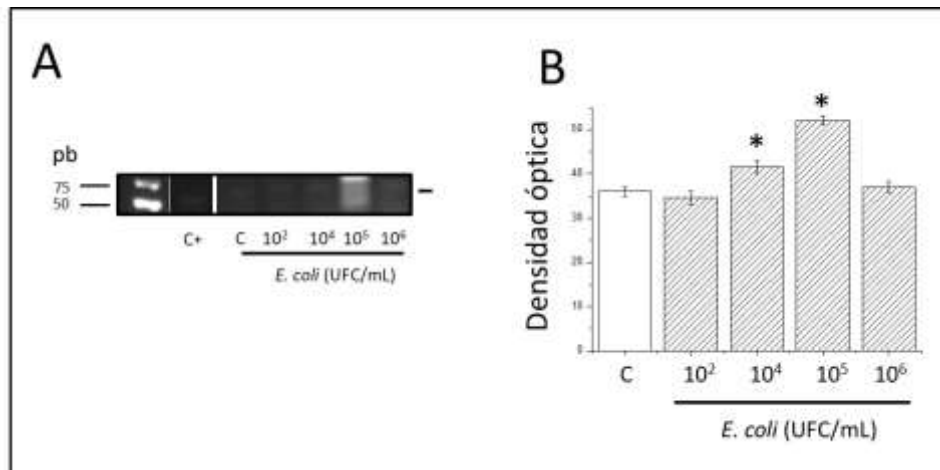


Figura 12. Perfil de expresión del miR-372-5p a 6 horas de estimulación con diferentes unidades de *Escherichia coli* sobre el tejido de la coriodecidua. Se muestra la banda de expresión del miR-372-5p (A). En cada caso se determinó la densidad óptica (unidades relativas) de la banda de expresión (B). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. Se muestra la diferencia estadística con respecto al grupo control (* $p \leq 0.05$).

A las 6 horas de estimulación con *E. coli* 10⁴, y 10⁵ UFC/mL observamos un aumento en la expresión del miR-372-5p en la CDH de 1.1-, y 1.4-veces con respecto al grupo control (36.0; $p < 0.05$, fig. 11B). De manera interesante la estimulación con *E. coli* 10⁶ UFC/mL disminuyó la expresión del miR-372-5p (37.3 \pm 1.0).

7.2.3 Expresión a las 24-horas

La figura 12 muestra la banda de expresión (A) y su densidad óptica (B) en la región estimulada de la CDH con *Escherichia coli*.

A las 24 horas de estimulación con *E. coli* 10², 10⁴, 10⁵ y 10⁶ UFC/mL observamos una disminución en la expresión del miR-372-5p en la CDH de 1.2-, 1.2-, 1.6-, y 1.7-veces con respecto al grupo control (36.0; $p < 0.05$, fig. 12B).

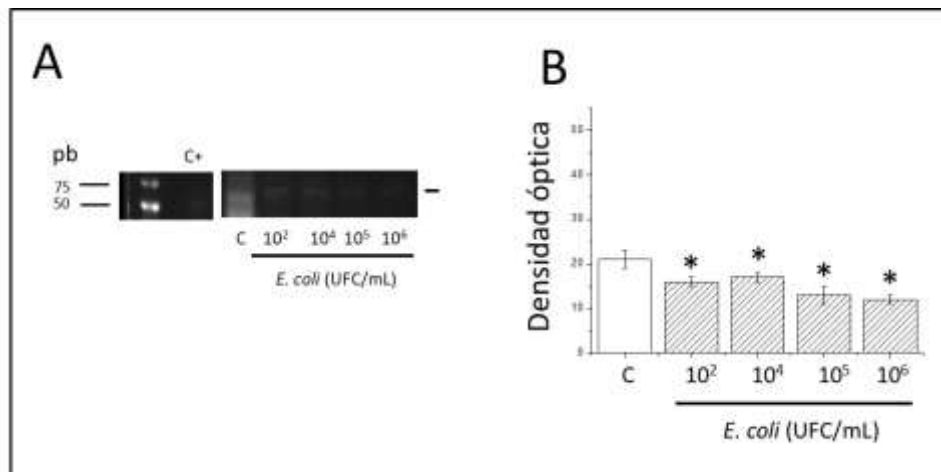


Figura 13. Perfil de expresión del miR-372-5p a 24 horas de estimulación con diferentes unidades de *Escherichia coli* sobre el tejido de la coriodecidua. Se muestra la banda de expresión del miR-372-5p (A). En cada caso se determinó la densidad óptica (unidades relativas) de la banda de expresión (B). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. Se muestra la diferencia estadística con respecto al grupo control (* $p \leq 0.05$).

7.3. Perfil de secreción de la IL-1 β

Después de realizar los ensayos de expresión del miR-372-5p el cual está asociado con la repuesta inflamatoria se determinó la secreción de la IL-1 β producida por el tejido de la coriodecidua a las 3 (fig. 13), 6 (fig. 14), y 24 horas (fig. 15) con las diferentes condiciones de estimulación.

7.3.1 Cuantificación de la IL-1 β a las 3-horas

La concentración de la IL-1 β en el tejido de la CDH sin estimulación fue de 5.7 ± 0.35 ng/mL (grupo control; fig. 13). Después de la estimulación con *E. coli* 10^2 , 10^4 , UFC/mL se incrementó 1.1- y 1.3-veces la secreción de la IL-1 β ; sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p = 0.06$). La estimulación con *E. coli* 10^5 , 10^6 , UFC/mL aumento significativamente la concentración de IL-1 β en 1.6- y 3.1-veces respectivamente con respecto al grupo control ($p \leq 0.05$; fig.13).

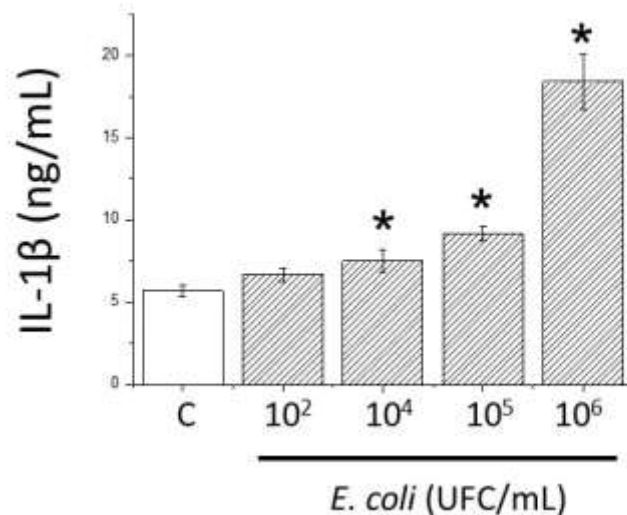


Figura 14. Perfil de expresión del miR-372-5p a 24 horas de estimulación con diferentes unidades de *Escherichia coli* sobre el tejido de la coriodecidua. Se muestra la banda de expresión del miR-372-5p (A). En cada caso se determinó la densidad óptica (unidades relativas) de la banda de expresión (B). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. Se muestra la diferencia estadística con respecto al grupo control (* $p \leq 0.05$).

7.3.2 Cuantificación de la IL-1 β a las 6-horas

La concentración de la IL-1 β en el tejido de la CDH sin estimulación fue de 6.33 ± 0.04 ng/mL (grupo control; fig. 14). Después de la estimulación con *E. coli* 10^2 , 10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL se incrementó significativamente 1.2-, 1.2-, 3.8-, y 8.2-veces respectivamente la secreción de la IL-1 β con respecto al grupo control ($p \leq 0.05$; fig. 14).

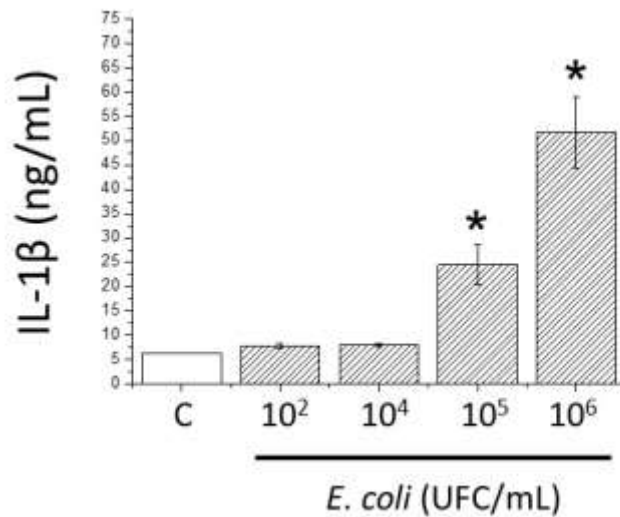


Figura 15. Perfil de expresión del miR-372-5p a 24 horas de estimulación con diferentes unidades de *Escherichia coli* sobre el tejido de la coriodesidua. Se muestra la banda de expresión del miR-372-5p (A). En cada caso se determinó la densidad óptica (unidades relativas) de la banda de expresión (B). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. Se muestra la diferencia estadística con respecto al grupo control (* $p \leq 0.05$).

7.3.3 Cuantificación de la IL-1 β a las 24-horas

La concentración de la IL-1 β en el tejido de la CDH sin estimulación fue de 7.09 ± 0.16 ng/mL (grupo control; fig. 15). Después de la estimulación con *E. coli* 10^2 , 10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL se incrementó 2.8-, 5.1-, 11.7-, y 13.2-veces respectivamente la secreción de la IL-1 β con respecto al grupo control ($p \leq 0.001$; fig. 15).

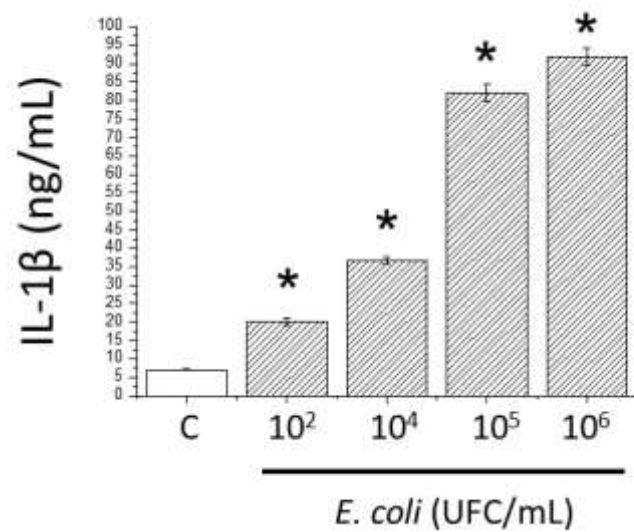


Figura 16. Perfil de expresión del miR-372-5p a 24 horas de estimulación con diferentes unidades de *Escherichia coli* sobre el tejido de la coriodecidua. Se muestra la banda de expresión del miR-372-5p (A). En cada caso se determinó la densidad óptica (unidades relativas) de la banda de expresión (B). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. Se muestra la diferencia estadística con respecto al grupo control (* $p \leq 0.05$).

8.0 DISCUSIÓN

Se ha demostrado que *Escherichia coli* activa en las membranas fetales la respuesta proinflamatoria caracterizada por el incremento de IL-1 β y de TNF α los cuales han sido asociadas a los partos prematuros (58, 59). En el proceso proinflamatorio, los miRNAs son moléculas reguladoras en diferentes patologías como son el cáncer, diabetes y otras enfermedades inflamatorias. El miR-372-5p ha sido asociado a la respuesta inflamatoria (60), sin embargo, aún no se tiene claro la participación de este miRNA en las infecciones de las membranas fetales humanas que llevan a un parto prematuro.

En el presente trabajo, nuestros resultados sugieren 1) que la expresión del miR-372-5p en las primeras 6 horas estaría inhibiendo la producción de la IL-1 β ; y 2) la disminución en la expresión del miR-372-5p a las 24 horas de estimulación aumenta la concentración de la IL-1 β .

Recientemente, Lu-Qin y colaboradores (2018) demostraron en células de carcinoma de colon (HCT116) y en células embrionarias de riñón (293FT) las cuales fueron transfectadas con el miRNA-372 (50nM) observaron la disminución en la actividad de numerosas vías de señalización entre las que se encuentra como blanco molecular a la proteína del factor nuclear de tipo kappa (NF κ B) (60). El NF- κ B es activado por el sistema de MyD88/IRAK/TRAF lo que permite la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), IL-1 β , IL-6 y del TNF α (61). Taganov y colaboradores (2006) demostraron que al estimular a células leucémicas de monocitos humanos (HTP-1) con LPS-*E. coli* (100ng/mL) por 8 horas se induce la fosforilación de la proteína IRAK lo que incrementa la secreción de la IL-1 β . En este mismo sistema al transfectar a las células con el miR-146 observaron una disminución en la fosforilación de la proteína IRAK reduciendo la secreción de IL-1 β (42). Nuestros resultados demuestran que la concentración de la IL-1 β se da a partir de las 6 horas de estimulación (fig. 14) incrementándose a las 24 horas (fig. 15) coincidiendo con la disminución en la expresión del miR-372-5p.

9.0 CONCLUSIÓN

Escherichia coli regula en el tejido de la coriodecidua humana, la expresión del miR-372-5p modulando la secreción de la IL-1 β con respecto al tiempo de estimulación.

10.0 BIBLIOGRAFIA

1. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012;379(9832):2151-61.
2. Mwaniki MK, Atieno M, Lawn JE, Newton CR. Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. *Lancet*. 2012;379(9814):445-52.
3. Committee on Practice Bulletins-Obstetrics TACoO, Gynecologists. Practice bulletin no. 130: prediction and prevention of preterm birth. *Obstet Gynecol*. 2012;120(4):964-73.
4. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75-84.
5. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*. 2014;345(6198):760-5.
6. Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(3):25.
7. Hunt JS, Langat DL. HLA-G: a human pregnancy-related immunomodulator. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(4):462-9.
8. Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, Botelho MF. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res*. 2012;349(2):447-58.
9. Menon R. Human fetal membranes at term: Dead tissue or signalers of parturition? *Placenta*. 2016;44:1-5.
10. Goldman S, Weiss A, Almalah I, Shalev E. Progesterone receptor expression in human decidua and fetal membranes before and after contractions: possible mechanism for functional progesterone withdrawal. *Mol Hum Reprod*. 2005;11(4):269-77.
11. Mazor M, HersHKovitz R, Chaim W, Levy J, Sharony Y, Leiberman JR, et al. Human preterm birth is associated with systemic and local changes in progesterone/17 beta-estradiol ratios. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;171(1):231-6.
12. Lee HM, Kim TS, Jo EK. MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Rep*. 2016;49(6):311-8.
13. Park H, Huang X, Lu C, Cairo MS, Zhou X. MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins. *J Biol Chem*. 2015;290(5):2831-41.
14. Montenegro D, Romero R, Pineles BL, Tarca AL, Kim YM, Draghici S, et al. Differential expression of microRNAs with progression of gestation and inflammation in the human chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197(3):289 e1-6.

15. Oglesby IK, McElvaney NG, Greene CM. MicroRNAs in inflammatory lung disease--master regulators or target practice? *Respir Res.* 2010;11:148.
16. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health.* 2019;7(1):e37-e46.
17. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet.* 2012;379(9832):2162-72.
18. Ray JG, Park AL, Fell DB. Mortality in Infants Affected by Preterm Birth and Severe Small-for-Gestational Age Birth Weight. *Pediatrics.* 2017;140(6).
19. Glover AV, Manuck TA. Screening for spontaneous preterm birth and resultant therapies to reduce neonatal morbidity and mortality: A review. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2018;23(2):126-32.
20. Romero R, Quintero R, Oyarzun E, Wu YK, Sabo V, Mazor M, et al. Intraamniotic infection and the onset of labor in preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159(3):661-6.
21. Moore RM, Mansour JM, Redline RW, Mercer BM, Moore JJ. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta.* 2006;27(11-12):1037-51.
22. Menon R, Taylor RN, Fortunato SJ. Chorioamnionitis--a complex pathophysiologic syndrome. *Placenta.* 2010;31(2):113-20.
23. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11(5):317-26.
24. Musilova I, Kutova R, Pliskova L, Stepan M, Menon R, Jacobsson B, et al. Intraamniotic Inflammation in Women with Preterm Prelabor Rupture of Membranes. *PLoS One.* 2015;10(7):e0133929.
25. Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *J Periodontol.* 2013;84(4 Suppl):S170-80.
26. Di Renzo GC, Tosto V, Giardina I. The biological basis and prevention of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;52:13-22.
27. Kannan S, Dai H, Navath RS, Balakrishnan B, Jyoti A, Janisse J, et al. Dendrimer-based postnatal therapy for neuroinflammation and cerebral palsy in a rabbit model. *Sci Transl Med.* 2012;4(130):130ra46.
28. Abrahams VM, Potter JA, Bhat G, Peltier MR, Saade G, Menon R. Bacterial modulation of human fetal membrane Toll-like receptor expression. *Am J Reprod Immunol.* 2013;69(1):33-40.
29. Peltier MR, Drobek CO, Bhat G, Saade G, Fortunato SJ, Menon R. Amniotic fluid and maternal race influence responsiveness of fetal membranes to bacteria. *J Reprod Immunol.* 2012;96(1-2):68-78.
30. Merrick WC. Eukaryotic protein synthesis: still a mystery. *J Biol Chem.* 2010;285(28):21197-201.
31. Latchman DS. Eukaryotic transcription factors. *Biochem J.* 1990;270(2):281-9.
32. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet.* 2004;36(1):40-5.
33. Lebowitz J, Lewis MS, Schuck P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci.* 2002;11(9):2067-79.

34. Maraia RJ, Arimbasseri AG. Factors That Shape Eukaryotic tRNAsomes: Processing, Modification and Anticodon-Codon Use. *Biomolecules*. 2017;7(1).
35. Thomas MF, Ansel KM. Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing. *Methods Mol Biol*. 2010;667:93-111.
36. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 2003;17(24):3011-6.
37. Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006;71:59-66.
38. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
39. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005;123(4):631-40.
40. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005;436(7051):740-4.
41. Kim DH, Saetrom P, Snove O, Jr., Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(42):16230-5.
42. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481-6.
43. Bredeson S, Papaconstantinou J, Deford JH, Kechichian T, Syed TA, Saade GR, et al. HMGB1 promotes a p38MAPK associated non-infectious inflammatory response pathway in human fetal membranes. *PLoS One*. 2014;9(12):e113799.
44. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med*. 2000;342(20):1500-7.
45. Parry S, Strauss JF, 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med*. 1998;338(10):663-70.
46. Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Kalache K. Infection and prematurity and the role of preventive strategies. *Semin Neonatol*. 2002;7(4):259-74.
47. Gomez-Lopez N, Laresgoiti-Servitje E, Olson DM, Estrada-Gutierrez G, Vadillo-Ortega F. The role of chemokines in term and premature rupture of the fetal membranes: a review. *Biol Reprod*. 2010;82(5):809-14.
48. Holst RM, Mattsby-Baltzer I, Wennerholm UB, Hagberg H, Jacobsson B. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical fluid in a population of Swedish women in preterm labor: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2005;84(6):551-7.
49. Hunt JS, Pace JL, Gill RM. Immunoregulatory molecules in human placentas: potential for diverse roles in pregnancy. *Int J Dev Biol*. 2010;54(2-3):457-67.
50. Kelly RW. Inflammatory mediators and parturition. *Rev Reprod*. 1996;1(2):89-96.
51. Romero R, Durum S, Dinarello CA, Oyarzun E, Hobbins JC, Mitchell MD. Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion. *Prostaglandins*. 1989;37(1):13-22.
52. Splichal I, Trebichavsky I. Cytokines and other important inflammatory mediators in gestation and bacterial intraamniotic infections. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001;46(4):345-51.
53. Flores-Herrera H, Garcia-Lopez G, Diaz NF, Molina-Hernandez A, Osorio-Caballero M, Soriano-Becerril D, et al. An experimental mixed bacterial infection induced differential secretion of proinflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha) and proMMP-9 in human fetal membranes. *Placenta*. 2012;33(4):271-7.

54. Garcia-Lopez G, Vadillo-Ortega F, Merchant-Larios H, Maida-Claros R, Osorio M, Soriano-Becerril D, et al. Evidence of in vitro differential secretion of 72 and 92 kDa type IV collagenases after selective exposure to lipopolysaccharide in human fetal membranes. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(6):409-18.
55. Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Pliego A, Merchant-Larios H, Vadillo-Ortega F. In vitro secretion and activity profiles of matrix metalloproteinases, MMP-9 and MMP-2, in human term extra-placental membranes after exposure to *Escherichia coli*. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:13.
56. Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(6):703-11.
57. Osorio-Caballero M, Perdigon-Palacio C, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera O, Olvera-Sanchez S, Morales-Mendez I, et al. *Escherichia coli*-induced temporal and differential secretion of heat-shock protein 70 and interleukin-1beta by human fetal membranes in a two-compartment culture system. *Placenta.* 2015;36(3):262-9.
58. Modi BP, Teves ME, Pearson LN, Parikh HI, Haymond-Thornburg H, Tucker JL, et al. Mutations in fetal genes involved in innate immunity and host defense against microbes increase risk of preterm premature rupture of membranes (PPROM). *Mol Genet Genomic Med.* 2017;5(6):720-9.
59. Monroe D. Patient teaching for X-ray and other diagnostics. *Intravenous pyelogram. RN.* 1990;53(9):42-4.
60. Wang LQ, Yu P, Li B, Guo YH, Liang ZR, Zheng LL, et al. miR-372 and miR-373 enhance the stemness of colorectal cancer cells by repressing differentiation signaling pathways. *Mol Oncol.* 2018;12(11):1949-64.
61. O'Neill LA. The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 3):643-7.

ANEXO 1

Registro del proyecto institucional



INSTITUTO NACIONAL
DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

DIRECCIÓN GENERAL

INPER-DG - 000900 -2017

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

CIUDAD DE MÉXICO, A 29 DE SEPTIEMBRE DE 2017.

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

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

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

Registro: 2017-2-82

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

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

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

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

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

ATENTAMENTE


DR. JORGE ARTURO CARDONA PÉREZ
DIRECTOR GENERAL

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

ANEXO 2

Consentimiento informado



INSTITUTO
NACIONAL DE
PERINATOLOGÍA
Isidro Espinosa de los Reyes

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

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimada señora:

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

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

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

El estudio básicamente consiste en lo siguiente:

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

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

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

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

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

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

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



TEXTO DECLARATORIO

YO _____

(Nombre del participante o de su representante legal)

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

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

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

México D.F. a _____ de _____ del _____

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