

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA BIOMEDICINA

## ACTIVIDAD QUIMIOTÁCTICA DE LA PLACENTA HUMANA ANTE LA

INFECCIÓN POR Escherichia coli y Streptococcus agalactiae EN UN MODELO

**DE DIABETES MELLITUS GESTACIONAL** 

# TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** 

PRESENTA:

### Q.F.B JIMÉNEZ ESCUTIA RODRIGO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANDREA GUADALUPE OLMOS ORTIZ FACULTAD DE MEDICINA, UNAM COMITÉ TUTOR: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. JULIO, 2024



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

#### DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

## PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo a lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

ACTIVIDAD QUIMIOTÁCTICA DE LA PLACENTA HUMANA ANTE LA INFECCIÓN POR Escherichia coli y Streptococcus agalactiae EN UN MODELO DE DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

Que presenté para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, es original, de mí autoría y lo realicé con rigor metodológico exigido por el Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referenciadas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de obtención de mi grado académico.

Atentamente

JIMÉNEZ ESCUTIA RODRIGO No de cuenta UNAM: 314094034

(Nombre, firma y número de cuenta del estudiante)



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA BIOMEDICINA

ACTIVIDAD QUIMIOTÁCTICA DE LA PLACENTA HUMANA ANTE LA

INFECCIÓN POR Escherichia coli y Streptococcus agalactiae EN UN MODELO

**DE DIABETES MELLITUS GESTACIONAL** 

# TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B JIMÉNEZ ESCUTIA RODRIGO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANDREA GUADALUPE OLMOS ORTIZ FACULTAD DE MEDICINA, UNAM COMITÉ TUTOR: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. JULIO, 2024





COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA) OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0438/2024 ASUNTO: Oficio de Jurado

#### M. en C. Ivonne Ramírez Wence Directora General de Administración Escolar, UNAM P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de abril de 2024 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de Biomedicina del estudiante JIMÉNEZ ESCUTIA RODRIGO con número de cuenta 314094034 con la tesis titulada "ACTIVIDAD QUIMIOTÁCTICA DE LA PLACENTA HUMANA ANTE LA INFECCIÓN POR *Escherichia coli* Y *Streptococcus agalactiae* EN UN MODELO DE DIABETES MELLITUS GESTACIONAL", realizada bajo la dirección de la DRA. ANDREA GUADALUPE OLMOS ORTIZ, quedando integrado de la siguiente manera:

DR. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ
DRA. LORENZA DÍAZ NIETO
DRA. BERENICE PALACIOS GONZÁLEZ
DRA. ERIKA CHAVIRA SUÁREZ
DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA

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

#### A T E N T A M E N T E "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de mayo de 2024

#### COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO



c. c. p. Expediente del alumno

ACBB/RCHT/EARR/rcht

#### COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

#### AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM** por aceptarme en su programa y permitirme seguir mi desarrollo académico y científico.

Agradezco al **Consejo Nacional de Humanidades**, **Ciencias y Tecnologías** (**CONAHCyT**) por otorgarme la beca **No. 817380**, durante el periodo Febrero 2022-Enero 2024 de la convocatoria de **Becas Nacionales 2022-1**, la cual me permitió obtener el grado de Maestro en Ciencias y continuar con mi desarrollo personal y científico. Este proyecto contó con el apoyo CONAHCyT con número de registro CB-A1S-27832 perteneciente a la Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz. Agradezco al **Instituto Nacional de Perinatología** por las instalaciones brindadas para el desarrollo experimental de este proyecto de tesis y por el financiamiento del proyecto **2018-1-152**.

Agradezco a mi tutora, la **Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz** por aceptarme como su alumno de maestría, guiarme siempre a través de todo el proceso, su tiempo, apoyo, y enseñanzas que culminan en el desarrollo de este trabajo de tesis.

Agradezco a mi comité tutor, conformado por la **Dra. Marcia Hiriart Urdanivia** y la **Dra. Miriam Rodríguez Sosa**, por su guía, tiempo, apoyo y consejos durante los comités tutórales y a lo largo del desarrollo de este trabajo de tesis.

#### AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Verónica Zaga Clavellina, por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo y desarrollar mi proyecto en su laboratorio, por su apoyo y guía durante mi aprendizaje y por sus enseñanzas durante mi formación científica.

A la Dra. Andrea Olmos, por haberme acogido como su alumno, por la confianza que ha depositado en mí, por su apoyo y guía durante todos estos años, por siempre apoyarme cuando necesitaba ayuda y consejo. Nuevamente me ha acompañado en otro paso de mi formación científica, hemos culminado el proceso para convertirme en Maestro en Ciencias, lo logramos. Ahora, vamos por el doctorado.

A mis compañeros de laboratorio, por todos los momentos divertidos que hemos vivido.

A mi familia, por toda su paciencia, amor, cariño, apoyo, comprensión y apoyo que me permiten culminar este trabajo de tesis, gracias por siempre acompañarme a lo largo de toda mi vida, guiarme, amarme y darme la tranquilidad y herramientas necesarias para seguir avanzando en mi proyecto de vida. Los quiero mucho.

A Addí, Shaddai, por tu apoyo incondicional, por tu compañía, por siempre reconfortarme, por escuchar, por tu paciencia, por tu cariño, tu comprensión y amor.

/	
IIN	л.г

	Índice de figuras	
	Índice de tablas	
	Resumen	1
	Abstract	3
I.	Marco teórico	5
	<b>1.1</b> La placenta humana y su capacidad de defensa inmune	5
	<b>1.1.1</b> Morfología de la placenta humana	5
	<b>1.1.2</b> Sistema inmune en la placenta humana	8
	<b>1.1.2.1</b> Respuesta inmune innata en la placenta	8
	<b>1.1.2.2</b> Células inmunes en la placenta	12
	<b>1.2</b> Diabetes mellitus gestacional (DMG)	15
	<b>1.2.1</b> DMG en México	16
	<b>1.2.2</b> Fisiopatología de la DMG	17
	<b>1.2.3</b> Meta-inflamación durante la DMG	19
	<b>1.2.4</b> Desregulación de la expresión de quimiocinas durante la DMG	20
	<b>1.3</b> Infecciones genitourinarias asociadas a la DMG	21
	1.3.1 Streptoccocus agalactiae	23
	1.3.2 Escherichia coli	24
II.	Antecedentes	27
III.	Hipótesis	28
IV.	Objetivos	28
	4.1 Objetivo general	28
	4.2 Objetivos particulares	28
V.	Metodología	29
	5.1 Consideraciones éticas	29
	5.2 Toma de muestras	30
	5.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	30
	5.4 Variables de estudio	31
	5.5 Preparación de medios de cultivo para generar hiperglucemia	32
	<b>5.6</b> Modelo <i>ex vivo</i> : cultivo de explantes placentarios	33

	5.7 Aislamiento de células mononucleares intervellosas	33
	5.8 Análisis microbiológico de las muestras	34
	5.9 Tratamientos experimentales	35
	5.10 Estandarización del modelo de hiperglucemia	36
	5.10.1 Secreción placentaria de citocinas pro-inflamatorias	36
	5.10.2 Tinción Periódica-Ácida de Schiff (PAS)	37
	<b>5.10.3</b> Ensayo de viabilidad tisular	38
	5.10.4 Ensayo de osmolaridad	38
	5.11 Identificación de las cepas de S. agalactiae y E. coli	39
	5.12 Modelo de infección de explantes placentarios	40
	5.13 Tinción modificada de Gram para observar la invasividad de	
	S. agalactiae o E. coli	41
	5.14 Secreción placentaria de quimiocinas	41
	5.15 Ensayo de migración de IVMCs en respuesta a la infección	
	por S. agalactiae o E. coli	43
	5.16 Fenotipificación de células migrantes en respuesta a la	
	infección por <i>S. agalactiae</i> o <i>E. coli</i>	44
	5.17 Expresión placentaria de TLR-2	48
	5.18 Análisis estadístico	48
VI.	Resultados	49
	6.1 Características clínicas	49
	6.2 Estandarización del modelo <i>ex vivo</i> de hiperglucemia	49
	6.3 Identificación de la cepa de <i>S. agalactiae</i>	54
	6.4 Efecto de la hiperglucemia sobre la capacidad de defensa de la	
	placenta frente a la infección por <i>S. agalactiae</i>	55
	6.5 Invasión placentaria de S. agalactiae en el modelo de alta glucosa	56
	6.6 Secreción de quimiocinas por parte de la placenta humana pretratada	
	con medio de hiperglucemia y en respuesta a la infección por	
	S. agalactiae	57
	6.7 Migración de células mononucleares intervellosas en respuesta	
	a la infección por <i>S. agalactiae</i> en placentas cultivadas en	

	condiciones de hiperglucemia	. 59
	6.8 Caracterización fenotípica de las células inmunes que migran en	
	respuesta a la infección por <i>S. agalactiae</i>	. 61
	6.9 La infección por S. agalactiae no disminuye la viabilidad de	
	explantes placentarios tras 8 horas de infección	63
	6.10 La hiperglucemia en conjunto con una infección por S. agalactiae	
	disminuyen la expresión placentaria de TLR-2	. 64
	6.11 Identificación de la cepa de <i>E. coli</i>	66
	6.12 Efecto de la hiperglucemia sobre la capacidad de defensa de la	
	placenta frente a la infección por <i>E. coli</i>	67
	6.13 Invasión placentaria de <i>E. coli</i> en el modelo de alta glucosa	. 68
	6.14 Secreción de quimiocinas por parte de la placenta humana pretratada	
	con medio de hiperglucemia y en respuesta a la infección	
	por <i>E. coli</i>	68
	6.15 Migración de células mononucleares intervellosas en respuesta	
	a la infección por <i>E. coli</i> en placentas cultivadas en condiciones	
	de hiperglucemia	. 70
	6.16 Caracterización fenotípica de las células inmunes que migran en	
	respuesta a la infección por <i>E. coli</i>	71
	6.17 La infección por <i>E. coli</i> no disminuye la viabilidad de explantes	
	placentarios tras 8 horas de infección	. 73
VII.	Análisis de resultados y discusión	74
VIII.	Conclusión	. 84
IX.	Referencias bibliográficas	. 86
Х.	Anexos	100
	Anexo 1. Artículo publicado	100
	Anexo 2. Carta de aceptación del protocolo de investigación por los	
	Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del INPer	101
	Anexo 3. Carta de aceptación para recolección de muestras en el Hospital	
	de Gineco Obstetricia Número 4 Luis Castelazo Ayala	102

Anexo 4. Carta de aceptación para recolección de muestras en el			
	Hospital Ángeles México	103	
Anexo 5.	Carta de consentimiento informado INPer	104	
Anexo 6.	Carta consentimiento informado Hospital de Gineco Obstetricia		
	Número 4 Luis Castelazo Ayala	106	
Anexo 7.	Carta de consentimiento informado Hospital Ángeles México	109	

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la placenta y de las vellosidades placentarias	. 7
Figura 2. La respuesta inmune innata de la placenta humana	11
Figura 3. Factores de virulencia de S. agalactiae	25
Figura 4. Factores de virulencia de <i>E. coli</i> uropatogénica	26
Figura 5. Cámara de Boyden	44
Figura 6. Plots representativos de la estrategia y parámetros utilizados	
para el análisis de citometría de flujo	47
Figura 7. Validación del modelo ex vivo de explantes placentarios cultivados	
en medio de alta glucosa	52
Figura 8. La presión osmótica no induce la secreción de las citocinas	
A) TNF-α, B) IL-6 y C) IL-1β	53
Figura 9. Identificación microscópica, macroscópica y molecular de	
S. agalactiae	54
Figura 10. El conteo de UFC/mL de S. agalactiae es mayor cuando la	
placenta se cultiva en condiciones de hiperglucemia	56
Figura 11. La hiperglucemia promueve una mayor invasividad de S. agalactiae	Э
en la vellosidad placentaria tras 8 horas de infección	57
Figura 12. La hiperglucemia disminuye la secreción placentaria de las	
quimiocinas A) CCL-2, B) CCL-3, C) CCL-5, D) CXCL-8,	
E) CXCL-10 y F) CXCL-16 en respuesta a la infección con S.	
agalactiae	58
Figura 13. La hiperglucemia disminuye la capacidad de quimioatraer células	
mononucleares intervellosas en respuesta a la infección por S.	
agalactiae	60
Figura 14. Atracción de IVMCs por medios condicionados de placenta infectad	la
por S. agalactiae	62
Figura 15. La infección por S. agalactiae no disminuye la viabilidad de los	
explantes placentarios en cultivo	64
Figura 16. La hiperglucemia disminuye la expresión de TLR-2 en respuesta	
a una infección por <i>S. agalactiae</i>	65

Figura 17.	Identificación microscópica y molecular de <i>E. coli</i>	66
Figura 18.	El conteo de UFC/mL de <i>E. coli</i> es mayor cuando la placenta	
	se cultiva en condiciones de hiperglucemia	67
Figura 19.	La hiperglucemia promueve una mayor invasividad de E. coli en la	
	vellosidad placentaria	68
Figura 20.	Secreción placentaria de las quimiocinas A) CCL-2, B) CCL-3,	
	C) CCL-5 D) CXCL-8, E) CXCL-10 y F) CXCL-16 en respuesta a	
	la hiperglucemia y la infección por <i>E. coli</i>	69
Figura 21.	La hiperglucemia no disminuye la capacidad de quimioatraer	
	células mononucleares intervellosas en respuesta a la	
	infección por <i>E. coli</i>	71
Figura 22.	Atracción de IVMCs por medios condicionados de placenta	
	infectada por <i>E. coli</i>	72
Figura 23.	La infección por <i>E. coli</i> no disminuye la viabilidad de explantes	
	placentarios	73
Figura 24.	Conclusión gráfica	85

## ÍNDICE DE TABLAS

. 9
14
14
21
37
. 39
46
. 49

#### RESUMEN

La diabetes mellitus gestacional (DMG) es una complicación del embarazo caracterizada por resistencia periférica a la insulina, hiperglucemia e intolerancia a los hidratos de carbono.

Esta complicación provoca la desregulación del sistema inmune innato tanto de la madre como del feto en desarrollo, lo cual se refleja en la alteración de la expresión y secreción de marcadores pro-inflamatorios, quimiocinas y péptidos antimicrobianos. Esta desregulación se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar infecciones genitourinarias respecto a embarazos normoevolutivos. *S. agalactiae* y *E. coli* representan la segunda y tercera causa de infecciones bacterianas en mujeres con DMG.

Desafortunadamente, ambas bacterias pueden infectar al producto por vía ascendente y por tanto aumentan el riesgo de ruptura prematura de membranas y parto pretérmino. Las mujeres con DMG presentan niveles alterados de las quimiocinas séricas. Sin embargo, aún no es claro si esta desregulación modifica la quimioatracción de células inmunes hacia la placenta en el escenario de una infección en una paciente con DMG.

Por lo tanto, este trabajo se centró en estudiar el efecto de la hiperglucemia sobre la capacidad quimiotáctica de la placenta humana durante una infección por *S. agalactiae* o *E. coli*. Para ello se utilizó un modelo *ex vivo* de explantes placentarios, obtenidos de mujeres con embarazo normoevolutivo, sometidos a glucosa control (10 mM) o alta glucosa (50 mM), y posteriormente se infectaron con 1x10<sup>5</sup> UFC/mL de *S. agalactiae* o *E. coli*.

Al término de los tiempos de infección (4 y 8 h) se cuantificó la secreción de quimiocinas, se evaluó la capacidad de defensa placentaria mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) y se observó la invasividad de las bacterias en los explantes placentarios. Además, se aislaron células mononucleares intervellosas (IVMCs) procedentes de sangre placentaria para realizar ensayos funcionales de migración en respuesta a los medios condicionados de explantes

placentarios. Se realizó la identificación fenotípica de las células migrantes. Finalmente, se cuantificó la expresión del TLR-2.

Como resultado se observó que la hiperglucemia disminuye la capacidad de defensa placentaria, lo cual se reflejó en mayores conteos de UFC (tanto de *S. agalactiae* como de *E. coli*) y mayor invasividad o adherencia de las bacterias en el tejido. Asimismo, la infección con *S. agalactiae* aumentó significativamente la secreción de las quimiocinas CCL-2, CCL-3, CXCL-8 y CXCL-16. Sin embargo, la condición combinada de infección por *S. agalactiae* e hiperglucemia resultó en la reducción significativa en la capacidad de secretar las quimiocinas analizadas. A su vez, esta menor secreción de quimiocinas resultó en menor migración de IVMCs hacia los medios condicionados de placenta (p < 0.05), sin observarse cambios fenotípicos en las poblaciones de estas células.

Por otro lado, la hiperglucemia no modificó el perfil de secreción de quimiocinas ni la migración de IVMCs en respuesta a la infección con *E. coli.* 

En conjunto, estos resultados indican que la placenta es un órgano sensible a la hiperglucemia, y que la pre-exposición a altas concentraciones de glucosa compromete las capacidades de defensa innata contra las infecciones bacterianas, lo que resulta en mayor crecimiento e invasividad placentaria por *S. agalactiae* y *E. coli*, y reducción en la capacidad placentaria para secretar quimiocinas y por consiguiente atraer IVMCs al sitio de infección por *S. agalactiae* debido a la menor expresión de TLR-2.

Estos resultados subrayan la importancia del control glucémico en mujeres con DMG durante el embarazo para prevenir complicaciones asociadas con las infecciones bacterianas.

#### ABSTRACT

Gestational diabetes mellitus (GDM) is a pregnancy complication characterized by peripheral insulin resistance, hyperglycemia, and carbohydrate intolerance.

This complication deregulates both the innate immune system of the mother and the developing fetus, leading to dysregulation in the expression and secretion of proinflammatory markers, chemokines, and antimicrobial peptides. This deregulation has been associated with a higher risk of developing genitourinary infections compared to healthy mothers. *S. agalactiae* and *E. coli* represent the second and third causes of bacterial infections in women with GDM.

Unfortunately, both bacteria can infect the fetus via ascending route, thereby increasing the risk of premature rupture of membranes and preterm delivery. Mothers with GDM have dysregulated levels of serum chemokines. However, it is still unclear if this alteration modifies the chemotactic attraction of immune cells to the placenta in the scenario of an infection in a patient with GDM.

Therefore, this work focused on studying the effect of hyperglycemia on the chemotactic capacity of the human placenta during an infection by *S. agalactiae* or *E. coli* in an *ex vivo* model of placental explants, obtained from mothers with normal pregnancy, subjected to control glucose (10 mM) or high glucose (50 mM) conditions was used, and subsequently infected with  $1 \times 10^5$  CFU/mL of *S. agalactiae* or *E. coli*.

At the end of the infection times (4 and 8 h), chemokine secretion was quantified, placental defense capacity was evaluated by colony-forming unit (CFU) counting, and bacterial invasiveness in placental explants was observed. Additionally, intervillous mononuclear cells (IVMCs) were isolated from placental blood to conduct functional migration assays in response to conditioned media culture. Phenotypic identification of migrating cells was performed. Finally, TLR-2 expression was quantified.

Results showed that hyperglycemia decreases placental defense capacity, reflected in higher CFU counts (both for *S. agalactiae* and *E. coli*) and increased bacterial invasiveness or adherence to the tissue. Furthermore, infection with *S. agalactiae* 

significantly increased secretion of the chemokines CCL-2, CCL-3, CXCL-8, and CXCL-16. However, the combined condition of *S. agalactiae* infection and hyperglycemia resulted in a significant reduction in the ability to secrete the analyzed chemokines, which resulted in decreased migration of IVMCs towards placental conditioned media (p < 0.05), without phenotypic changes observed in these cell populations.

On the other hand, hyperglycemia did not modify the chemokine secretion profile or the migration of IVMCs in response to *E. coli* infection.

Taken together, these results indicate that the placenta is affected by hyperglycemia, and pre-exposure to high glucose compromises innate defense capabilities against bacterial infections, resulting in increased placental growth and invasiveness by *S. agalactiae* and *E. coli*, and a reduction in placental capacity to secrete chemokines, consequently reducing the attraction of IVMCs to the site of *S. agalactiae* infection due to lower TLR-2 expression.

These findings underscore the importance of glycemic control in women with GDM during pregnancy to prevent complications associated with bacterial infections.

#### I. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 La placenta humana y su capacidad de defensa inmune

La placenta es un órgano de origen fetal compuesto por diferentes estirpes celulares entre las que encontramos a los trofoblastos, células mesenquimales, células endoteliales, células de Hofbauer (macrófagos placentarios), entre otras (Knöfler et al., 2019). La placenta está especializada en el intercambio continuo de nutrientes y gases entre la madre y el feto (Huppertz, 2008); además, tiene funciones inmunológicas y endocrinas que permiten el desarrollo del producto durante la gestación (Carrasco-Wong et al., 2020).

Por ejemplo, la placenta produce y secreta hormonas como el lactógeno placentario (Cattini et al., 2020), la leptina (Pérez-Pérez et al., 2020) o la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Joya et al., 2015), las cuales median procesos importantes para el establecimiento y mantenimiento del embarazo tales como la angiogénesis, la inmunotolerancia, la decidualización del endometrio y el desarrollo fetal (Costa, 2016); a su vez, la placenta participa en la inmunidad, ya que funciona, junto con las membranas corioamnióticas, como una barrera física que limita el ingreso de patógenos hacia el feto al separar el compartimento materno del compartimento fetal (Heerema-McKenney, 2018). También participa como una segunda línea de defensa al secretar mediadores inmunes como citocinas, quimiocinas o péptidos antimicrobianos en respuesta a diferentes estímulos como una infección bacteriana (Bukowska-Ośko et al., 2021; Robbins & Bakardjiev, 2012).

#### 1.1.1 Morfología de la placenta humana

La unidad funcional de la placenta humana son las vellosidades placentarias, estructuras formadas por la mesénquima, una capa de trofoblastos vellosos y, finalmente, una barrera o "escudo" de sinciciotrofoblasto (STB) (Gude et al., 2004).

Estas vellosidades están rodeadas por las cámaras intervellosas, espacios que se llenan con sangre materna que entra en contacto directo con el STB, permitiendo el intercambio de nutrientes y gases entre la mamá y el feto (Huppertz, 2008; Turco & Moffett, 2019). Debido al contacto directo entre las vellosidades placentarias y la sangre materna, en el humano la placentación es de tipo hemocorial (Roberts et al., 2016).

Como ya se mencionó, la vellosidad placentaria tiene una región estructural llamada mesénquima, esta región se compone de células endoteliales fetales (capilares fetales), células mesenquimales, células de Hofbauer y fibroblastos (Bushway et al., 2014; Zhou et al., 2022); estos últimos proporcionan el soporte y la microarquitectura tridimensional de la vellosidad placentaria (Burton & Fowden, 2015).

Siguiendo de adentro hacia fuera, la siguiente capa que compone a la vellosidad placentaria son los citotrofoblastos vellosos (CTBs), estos forman una capa de células mononucleares alineada con la mesénquima, y al ser células proliferativas, su función es dar origen al STB y a los trofoblastos extravellosos (EVTs), permitiendo así un recambio continuo de estas estirpes celulares no proliferativas (Gamage et al., 2016).

Por último, el STB son células de origen velloso (CTBs) fusionadas, dando lugar a una única estructura que recorre y envuelve a toda la vellosidad placentaria, teniendo alrededor de 58 billones de núcleos y un área de 12-14 m<sup>2</sup> al término del embarazo (Liu et al., 2018).

En la **Figura 1** se muestra un esquema de la anatomía de la placenta y de las vellosidades placentarias, para ilustrar lo anteriormente descrito.



**Figura 1. Anatomía de la placenta y de las vellosidades placentarias.** La placenta está conformada por las vellosidades placentarias, las cámaras intervellosas y el trofoblasto extravelloso. Este órgano permite el intercambio de nutrientes y gases desde la madre hacia el feto, y viceversa. La placenta humana se encuentra en contacto directo con la sangre materna a través de las vellosidades placentarias; por lo que se considera que su placentación es de tipo hemocorial. A su vez, cada vellosidad está conformada por citotrofoblastos rodeados por una capa multinucleada de sinciciotrofoblastos. Además de los trofoblastos, en las vellosidades se encuentran células endoteliales que forman los capilares fetales, células de Hofbauer y la mesénquima placentaria (fibroblastos junto con fibras de colágeno). Afuera de la vellosidad, se encuentran los citotrofoblastos extravellosos, los cuales migran hacia la decidua y el primer tercio del miometrio, para permitir la remodelación de las arterias espiraladas. Figura creada por Rodrigo Jiménez con BioRender.com

#### 1.1.2 Sistema inmune en la placenta humana

El sistema inmune es el encargado de mantener la homeostasis en nuestro cuerpo y responder ante estímulos, lo cual logra realizando dos acciones principales: reconocimiento y respuesta (Kindt et al., 2007).

El reconocimiento lo realiza a través de receptores de patrones moleculares (PRRs) como los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores tipo NOD (NLRs), los receptores tipo RIG-1 (RLRs), etc. (Rumpret et al., 2022). Estos receptores son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como el ácido lipoteicoico (LTA) de las bacterias gram positivas (Fournier, 2013) o el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram negativas (Chen et al., 2021); así como, patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) como el ácido desoxirribonucleico (DNA) o la proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) (Sattler, 2017). Posterior al reconocimiento del estímulo, se desencadena la función efectora o respuesta inmune.

Es importante entender que la respuesta inmune durante del embarazo es un equilibro complejo, ya que el sistema inmune de la madre debe tolerar la presencia del feto semi alogénico y permitirle desarrollarse, a la vez que mantiene su capacidad de montar una respuesta rápida frente a una infección (Yang et al., 2019). En estas secciones se describen los principales aspectos de la capacidad de defensa inmunológica de la placenta humana.

#### 1.1.2.1 Respuesta inmune innata en la placenta

Como ya se explicó al inicio de esta sección, el sistema inmune primero tiene que reconocer el estímulo a través de los PRRs; en este sentido, se ha descrito que en la placenta humana los TLRs se expresan de una manera espacio-temporal dependiente. Así pues, la placenta es capaz de sensar los PAMPs asociados a una gran variedad de patógenos, como bacterias, virus, hongos y parásitos. En la **Tabla 1** se presentan los TLRs (TLR1-10) descritos en la placenta humana, así como sus ligandos y su expresión relativa a lo largo de la gestación.

			Expresión relativa de TLRs		
	Principales ligandos	1 <sup>er</sup>	2 <sup>do</sup>	3 <sup>er</sup>	
		trimestre	trimestre	trimestre	
TLR1	Lipopéptidos triacetilados y lipoproteínas de bacterias Gram positivas. Cuando el TLR1 forma heterodímero con TLR2, también reconoce peptidoglicanos y lipoproteínas triacetiladas	++	++	-	
TLR2	Ácido lipoteicoico y lipoproteínas de bacterias Gram positivas, lipoarabinomananos de micobacterias y zimosanos de levaduras. Puede reconocer lipopéptidos diacetilados o triacetilados dependiendo de su perfil de heterodimerización	++	++	+++	
TLR3	RNA de doble cadena	++	++	+++	
TLR4	Lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas, paclitaxel, proteínas de choque térmico, heparano sulfato, especies reactivas de oxígeno, fibrinógeno y fibronectina	++	+++	+++	
TLR5	Flagelina de bacterias Gram positivas y Gram negativas	++	++	++	
TLR6	Lipopéptidos diacetilados de micoplasmas. El TLR6 heterodimeriza con TLR2	-/+	+	++	
TLR7	RNA de cadena sencilla y pequeños compuestos sintéticos como análogos de guanosina o imidazoquinolina	+	++	+	
TLR8	RNA de cadena sencilla y pequeños compuestos sintéticos como análogos de guanosina o imidazoquinolina	+	++	+++	
TLR9	Elementos CpG no metilados de DNA viral de cadena sencilla y DNA fetal	-	+	+	
TLR10	RNA de doble cadena	+	+	+	

#### Tabla 1. Patrón temporal de expresión de TLRs en el trofoblasto humano.

El nivel de expresión se presenta en unidades arbitrarias: - indetectable, + expresión baja, ++ expresión moderada, +++ expresión alta. Tomado de (Olmos-Ortiz, Flores-espinosa, et al., 2019). TLR: Receptor tipo Toll.

\_\_\_\_\_

En esta tesis nos centraremos principalmente en el TLR4, capaz de sensar la infección por *Escherichia coli* (*E. coli*) ya que detecta el LPS presente en su pared celular; y en el dímero TLR2/TLR6 ya que detecta la presencia de *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) a través del reconocimiento del LTA (Sacre et al., 2007).

Cuando la placenta detecta la presencia de patógenos inicia una respuesta mediada por la secreción de citocinas pro-inflamatorias como interleucina 6 (IL-6), el factor necrótico tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (Duval et al., 2019; Xiao et al., 2022); quimiocinas con motivo C-C ligando 2, 3 y 5 (CCL-2, CCL-3, CCL-5) o quimiocinas con motivo C-X-C ligando 8, 10, y 16 (CXCL-8, CXCL-10, CXCL-16), etc. (Argueta et al., 2022; Fan et al., 2019; Guo et al., 2022; Ma et al., 2007; Megnekou et al., 2023).

Además, el STB tiene la capacidad de secretar constitutivamente péptidos antimicrobianos, vesículas cargadas con microRNAs con propiedades antimicrobianas (Bayer et al., 2018; Delorme-Axford et al., 2013), e interferón gamma (INF- $\gamma$ ) con propiedades antivirales (Bayer et al., 2016).

En conjunto, la capacidad para producir y secretar estos mediadores inmunológicos demuestra que la placenta es capaz de montar una respuesta innata ante un reto infeccioso a través de los péptidos antimicrobianos, mientras favorece la migración y activación de células inmunes como monocitos, macrófagos y células natural killer (NKs) en el sitio de infección.

Además, la placenta funge como una barrera física que impide la entrada de microorganismos hacia el feto. Específicamente, el STB es quien se encarga de mediar este fenómeno, por ejemplo, bloquea el ingreso del virus del herpes simple al disminuir la expresión de Hve A, Hve B y Hve C (mediadores del ingreso del virus) (Koi et al., 2002), y tiene una alta resistencia a la infección por *L. monocytogenes* (Robbins et al., 2010).

En la **Figura 2** se resumen los aspectos más importantes de la respuesta inmune innata en la placenta humana.



**Figura 2. La respuesta inmune innata de la placenta humana.** El sinciciotrofoblasto juega un papel importante en la inmunidad durante el embarazo, pues expresa los receptores tipo toll (TLR), permitiendo detectar patógenos y montar una respuesta inmune para evitar su invasión; en este sentido, la placenta es capaz de producir y secretar péptidos con actividad antimicrobiana, así como, citocinas y quimiocinas para permitir el reclutamiento y activación de células inmunes como monocitos, macrófagos y NKs. Figura creada por Rodrigo Jiménez con BioRender.com

#### 1.1.2.2 Células inmunes en la placenta

De forma clásica, se acepta que los linfocitos T, linfocitos B, células NK (NKs), células dendríticas y macrófagos que se encuentran presentes tanto la placenta como en la decidua, forman parte de la macroestructura conocida como interfase materno-fetal (Faas & de Vos, 2017).

Dentro de esta macroestructura se ha descrito que las NKs presentes en la decidua expresan un fenotipo diferente al de las NKs periféricas (CD16<sup>-</sup> CD56<sup>bright/superbright</sup> y CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>, respectivamente), y alcanzan una proporción del 70% de los leucocitos deciduales durante el primer trimestre. Estas células entran en contacto con los EVTs, permitiendo su invasividad y remodelación de las arterias espiraladas (Hanna et al., 2006).

En el caso de los macrófagos, se ha descrito que durante el primer trimestre conforman del 20% al 30% de los leucocitos deciduales (Faas & de Vos, 2017). En el periodo de pre-implantación y hacia el final del tercer trimestre expresan un fenotipo tipo M1 de forma mayoritaria; posteriormente, experimentan una transición a un perfil mixto M1/M2 que se mantiene desde los primeros contactos de los trofoblastos con el endometrio hasta que se completa la remodelación vascular de las arterias espiraladas. Cuando concluye la formación de la placenta y la remodelación vascular, su fenotipo tiende a ser M2; por lo que regulan funcionas tan diversas como permitir la implantación del blastocisto o contribuir al estado de inmunotolerancia (Liu et al., 2017).

Actualmente no se ha podido determinar completamente el papel de los linfocitos T en la interfase materno fetal. Se sabe que durante el primer trimestre pueden estar presentes en una proporción del 10 al 20% en la decidua (Nancy & Erlebacher, 2014), y se les ha asociado tanto con la invasividad de los EVTs hacia la decidua y el miometrio materno, como en la formación de la placenta; asimismo, su desregulación ha sido descrita en patologías del embarazo como la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino (Yang et al., 2019). Sin embargo, sólo hemos hablado de las estirpes presentes en la decidua materna, ya que hasta el momento existe poca información sobre la proporción y función de células inmunes embebidas en la propia placenta. Al respecto, es de esperar que estas células se encuentren de forma transitoria junto a las vellosidades placentarias gracias al continuo flujo de sangre entre la madre y el bebé, ya que se sabe que el volumen de sangre se recambia de dos a tres veces cada minuto (Wang & Zhao, 2010).

Un estudio demostró que en placentas de embarazo a término (semana 39) es posible encontrar y aislar células MAIT (células T asociadas a mucosas) de origen materno; además, estas células son capaces de responder ante un reto infeccioso por *E. coli* de forma más potente al secretar más INF-γ, granzima B y perforina que las células MAIT aisladas de sangre periférica (Solders et al., 2017). Además, el mismo grupo de trabajo ha demostrado que estas células son capaces de migrar en respuesta a quimiocinas secretadas por la placenta (Solders et al., 2019).

En otro estudio se reportó que es posible aislar células mononucleares como macrófagos, monocitos, linfocitos T, linfocitos B y NKs de la sangre placentaria, y que éstas tienen un fenotipo diferente a las encontradas en sangre periférica (Vega-Sanchez et al., 2010). En la **Tabla 2** se muestra la proporción de estas células en la sangre placentaria proveniente de placentas de tercer trimestre y sangre materna periférica, de acuerdo con los resultados obtenidos por estos autores (Vega-Sanchez et al., 2010). Además de las células previamente mencionadas, también es posible encontrar células NKT en la sangre intervellosa. Se trata de una subclase de linfocitos T que expresan el receptor de células T- $\alpha\beta$ , así como los marcadores CD56 y CD16, típicos de las células NK. De ahí la combinación en el nombre NKT. Estas células expresan el CD1 por lo que reconocen antígenos lipídicos presentados por moléculas CD1d (Bayatipoor et al., 2022).

Tabla 2. Subpoblaciones de células mononucleares intervellosas en placenta a término (semana 39 de gestación). Adaptada de Vega-Sánchez et. al, 2010.

Subpoblación de IVMCs	Sangre periférica (%)	Sangre placentaria (%)
Linfocitos T Totales (CD3 <sup>+</sup> )	43.2 (13.6 – 80.0)	29.2 (8.4 – 58.8)
Linfocitos T CD4+	30.7 (8.6 – 63.0)	31.5 (5.0 – 73.0)
Linfocitos T CD8⁺	23.9 (11.0 – 62.0)	24.0 (7.5 – 61.6)
Monocitos/Macrófagos (CD14 <sup>+</sup> )	3.0 (2.0 – 6.7)	5.2 (3.0 – 17.5)
Células NK (CD56 <sup>+</sup> )	12.3 (3.2 – 28.8)	7.4 (0.7 – 20.9)
Linfocitos B (CD19 <sup>+</sup> )	3.6 (0.1 – 10.8)	4.9 (0.3 – 13.9)

IVMCs: células mononucleares de sangre intervellosa. Datos presentados como promedio (mínimo-máximo). El promedio se obtuvo con valores agregados de 10 experimentos independientes.

Por su parte, Solders et. al., (2017), también reportaron la proporción de células inmunes presentes en sangre intervellosa de placentas a término; en su caso, estas son las proporciones encontradas.

Tabla 3. Subpoblaciones de células mononucleares intervellosas en placenta a término (semana 39 de gestación). Adaptada de Solders et. al, 2017.

Subpoblación de IVMCs	Sangre periférica (%)	Sangre placentaria (%)
Linfocitos T Totales (CD45 <sup>+</sup> / CD3 <sup>+</sup> )	63.7 (54.3 – 71.5)	58.5 (30.2 – 70.4)
Linfocitos T (CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> )	65.4 (40.0 – 82.6)	52.5 (26.0 – 73.5)
Linfocitos T (CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> )	27.2 (14.3 – 54.8)	35.3 (19.4 – 55.9)
Monocitos/Macrófagos (CD45+/CD14+)	23.2 (13.2 – 26.8)	15.9 (5.8 – 45.7)
Linfocitos B (CD45 <sup>+</sup> /CD19 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup> )	5.1 (3.6 – 11.6)	12.4 (3.8 – 28.7)
Células NK clásicas (CD45⁺/CD56 <sup>dim</sup> CD3⁻)	3.7 (1.4 – 6.1)	4.6 (2.2 – 18.3)
Células NKT (CD45 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> )	2.2 (0.8 – 5.4)	3.9 (0.9 – 9.7)

Datos presentados como promedio (mínimo-máximo). n = 10 experimentos independientes.

Con estos reportes, podemos notar que la población más abundante de células mononucleares en la sangre intervellosa placentaria son los linfocitos T, existiendo discrepancia entre la abundancia de monocitos y células NK; mientras que los linfocitos B son la población menos abundante.

#### 1.2 Diabetes mellitus gestacional (DMG)

La diabetes mellitus gestacional es una patología del embarazo caracterizada por hiperglucemia, resistencia periférica a la insulina e intolerancia a los carbohidratos (De Luccia et al., 2020). Esta enfermedad es definida como un tipo de diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo que no era claramente una diabetes (American Diabetes Association, 2023). Se considera que el principal factor de riesgo para el desarrollo de la DMG es que la paciente presente sobrepeso u obesidad pre-gestacional, junto con un aumento rápido de peso durante el embarazo (Olmos-Ortiz et al., 2021). Sin embargo, existen otros factores de riesgo, entre los que encontramos: antecedentes familiares de diabetes mellitus tipo 2 o DMG, edad avanzada de la madre o padecer otras enfermedades que favorecen la resistencia periférica a la insulina como el ovario poliquístico (Alejandro et al., 2020; Moon et al., 2017).

Desafortunadamente, el padecer DMG condiciona la salud tanto de la madre como del neonato. A corto plazo, las mamás con DMG presentan mayor riesgo de padecer hipertensión gestacional, preeclampsia, infecciones de vías urinarias, parto pretérmino y ruptura prematura de membranas (Giuliani et al., 2022; Lorenzo-Almorós et al., 2019; O'Sullivan et al., 2011), mientras que, a largo plazo se ha descrito mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares; por su parte, el recién nacido tiene mayor riesgo de: nacimiento prematuro, presentar depresión respiratoria, hipoglicemia neonatal, macrosomía y distocia de hombros. Además, en el futuro aumenta la probabilidad de desarrollo de DM2 en la adolescencia o la vida adulta (Chiefari et al., 2017; Giuliani et al., 2022).

Hasta el momento no se cuenta con una única prueba estandarizada para el diagnóstico de la DMG. Esto se debe a que cada organización, como el colegio americano de obstetras y ginecólogos (ACOG), la asociación internacional de

grupos de estudio de diabetes y embarazo (IADPSG), el Instituto Nacional para la Excelencia en Salud y Atención del Reino Unido (NICE), etc., presentan diferentes criterios diagnósticos (Lende & Rijhsinghani, 2020). Un estudio de 2018 analizó las prácticas implementadas para el diagnóstico de esta patología en México, y encontró que en nuestro país principalmente se utiliza la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) de un paso utilizando 75 g de glucosa como carga inicial (Dainelli et al., 2018), criterio recomendado por la IADPSG. En este estudio se mide la concentración de glucosa disuelta en un vaso de agua; tras una y dos horas nuevamente se mide la concentración de glucosa en sangre. Se considera que el resultado es anormal si una sola medición está por encima de las concentraciones corte (92 mg/dL en ayuno, 180 mg/dL a la hora, o 153 mg/dL a las 2 h post-glucosa) (Chiefari et al., 2017).

#### 1.2.1 DMG en México

En 2021, la Federación Internacional de Diabetes (IDF) reportó que a nivel mundial el 16.7% de los embarazos cursaron con hiperglucemia. De este porcentaje, el 80.3% fue debido a diabetes mellitus gestacional. En el caso de América del Norte, se reportó una prevalencia del 17.2% (International Diabetes Federation, 2021).

En el caso específico de México, aún no se cuenta con la tasa oficial de prevalencia (Sosa-Rubi et al., 2019; Vázquez-Martínez et al., 2023); sin embargo, existen algunos reportes que estiman este dato. Por ejemplo, en 2014 se estimó una prevalencia de 8.7% a 17.7% (González-Ruiz et al., 2014), mientras que para 2018 la prevalencia reportada fue de 23.7% (Dainelli et al., 2018). Además, se cuenta con reportes de la prevalencia de DMG en diversas regiones del país o en institutos de salud. Por ejemplo, en 2023 en Tamaulipas se reportó una prevalencia de 44.5% (Violante-Ortíz et al., 2023); en otro estudio realizado en el centro-sur del país se reportó una prevalencia de 13.7% de DMG en mamás con obesidad pregestacional (Hernández-Ruiz et al., 2023); finalmente, en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer), en 2022, se reportó una tasa combinada de DMG y diabetes preexistente de 9.8%.

Desafortunadamente, se espera que la prevalencia de DMG en el país continúe en aumento en un futuro. Esto debido a que se ha observado aumento en la proporción de mujeres en edad fértil que padecen obesidad, y tal como se describió previamente, éste es un factor de riesgo para el desarrollo de DMG. El aumento en obesidad en nuestro país se puede observar comparando las Encuestas Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) desde 2006 hasta 2022. En 2006, se reportó una proporción de 34.6%, en 2012 este valor fue de 37.5%, en 2016 aumentó a 38.6% y finalmente, en 2022 se reportó una prevalencia del 41.0% (Campos-Nonato et al., 2023; Shamah-Levy et al., 2020).

#### 1.2.2 Fisiopatología de la DMG

A modo de resumen, la DMG se genera cuando la madre es incapaz de responder a la resistencia fisiológica a la insulina generada durante el embarazo, desencadenando un estado de hiperglucemia crónica (Sweeting et al., 2022).

Fisiológicamente es necesario que la sensibilidad a la insulina varíe a lo largo de la gestación (Filardi et al., 2019), entendiendo esta sensibilidad como la capacidad celular de responder a esta hormona a través de la señalización por su receptor, especialmente en células insulino-dependientes como los adipocitos y los miocitos (Lee et al., 2022). Durante el primer trimestre, la sensibilidad a la insulina incrementa permitiendo la absorción y almacenamiento de glucosa como una fuente de energía que se utilizará conforme el embarazo progrese (Plows et al., 2018).

Posteriormente, la sensibilidad a la insulina decrece y los niveles maternos de insulina aumentan alrededor del 50% (Stern et al., 2021a). Esta disminución en la sensibilidad o el aumento en la resistencia a la insulina está mediada por la producción de hormonas maternas y hormonas placentarias, como estrógenos, leptina, cortisol, lactógeno placentario, progesterona o la hormona de crecimiento placentaria (Kamińska et al., 2022). En un embarazo normoevolutivo, este aumento en la resistencia a la insulina es necesario para aumentar los niveles de glucosa en sangre materna y permitir su transporte a través de la placenta hacia el feto y favorecer su rápido crecimiento (Simpson et al., 2018). Finalmente, al término de la gestación desaparece esta resistencia fisiológica a la insulina y vuelve a los niveles

observados antes del embarazo (Stern et al., 2021b). En la mayoría de los embarazos, el cuerpo materno puede compensar de forma exitosa el aumento de la resistencia a la insulina mediante la hiperplasia e hipertrofia de las células  $\beta$ -pancreáticas, promoviendo una mayor síntesis y secreción de insulina (Plows et al., 2018).

Aún no se cuenta con un modelo integral y definitivo que explique la fisiopatología de la DMG, sin embargo, se ha apuntado que la hiperglucemia es producto de la resistencia a la insulina y una inadecuada generación de esta hormona debido a una mala adaptación y disfunción de las células β-pancreáticas (Catalano, 2014). En el caso de la resistencia a la insulina, se ha relacionado con el bloqueo de uno o más procesos a lo largo de su vía de señalización como; síntesis, almacenamiento, secreción, unión con su receptor, bloqueo en la cascada de señalización o en la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) a la membrana celular (Tokarz et al., 2018)

Al respecto de la disfunción de las células  $\beta$ -pancreáticas, se ha descrito que pacientes con diabetes mellitus tipo 2 o con DMG presentan aumento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias, como el factor necrótico tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que disminuyen la función y diferenciación de estas células, además de disminuir la sensibilidad de los tejidos a la insulina (Yang et al., 2018). Asimismo, se ha descrito que la continua exposición de estas células a altos niveles de lípidos en pacientes con obesidad conlleva a un estado de lipotoxicidad afectando la producción de insulina, siendo éste otro posible mecanismo del desarrollo de DMG en mujeres con obesidad pregestacional. Finalmente, otra posible explicación a la disfunción de las células  $\beta$ -pancreáticas es la desregulación de las citocinas secretadas por el tejido adiposo (adipocinas). Por ejemplo, la leptina, la cual se ha demostrado que disminuye la secreción de insulina en respuesta a la hiperglucemia y su capacidad de proliferación celular (Tessier et al., 2013; Wang et al., 2010).

Como resultado de la resistencia a la insulina y la disfunción de las células  $\beta$ pancreáticas, se establece un estado de hiperglucemia crónica después de la semana 24 de la gestación y con ello inicia el cuadro de la DMG.

#### 1.2.3 Meta-inflamación durante la DMG

Durante la DMG, las pacientes presentan un estado de inflamación de bajo grado conocido como meta-inflamación (Catalano, 2014). La meta-inflamación se ha descrito en pacientes con padecimientos crónicos que alteran la respuesta inflamatoria (incluida la DMG), y se caracteriza por aumento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en sangre periférica y en la placenta (Huang et al., 2022), así como aumento en la infiltración y activación de células inmunes como macrófagos o neutrófilos en ausencia de daño tisular (McElwain et al., 2021). Además, la concentración de marcadores anti-inflamatorios como adiponectina e IL-10 se ve disminuida en estas pacientes (Huang et al., 2022).

Actualmente, se han descrito varios mecanismos que intentan explicar el aumento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias. Por ejemplo, la rápida hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos en las mujeres con obesidad pre-gestacional o con DMG genera zonas con pobre vasculatura y por tanto baja oxigenación. Estas microzonas hipóxicas aumentan la señalización por el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los DAMPs son reconocidos por los TLRs y esto activa al factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y la subsecuente síntesis y secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Ahmed et al., 2021; Nguyen-Ngo et al., 2019). Además del tejido adiposo, la propia placenta es responsiva a la hiperglucemia mediante la síntesis de citocinas pro-inflamatorias. Ensayos *in vitro* han mostrado que el aumento en el transporte de glucosa por los trofoblastos (mediante el transportador de glucosa 3 (GLUT3), deriva en mayor secreción de IL-1β, IL-6, IL-8 v HMGB1 (Heim et al., 2018). Finalmente, se ha observado que pacientes con DMG tienen mayor concentración de productos de glicación avanzada (AGEs) (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos glicosilados) debido de la hiperglucemia (Li & Yang, 2019); a su vez, estos AGEs y su receptor (RAGE), se han relacionado con inflamación vascular a través de la vía AGEs/PKC BII/ ERK1/2/ EGR-1 durante la DMG (Rajaraman et al., 2019). La unión de los AGEs con RAGE deriva en inflamación e

inmunosupresión a través de la generación de citocinas, ROS e intermediarios reactivos de nitrógeno (Shen et al., 2020). En consecuencia, la generación de AGEs debido a la hiperglucemia es otro mecanismo que explica el aumento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias en mamás con DMG.

#### 1.2.4 Desregulación de la expresión de quimiocinas durante la DMG

Desafortunadamente, la DMG no sólo implica una desregulación a nivel de citocinas pro-inflamatorias sino que también está alterada la síntesis periférica de quimiocinas (Liu et al., 2022).

Las quimiocinas son importantes mediadores en la respuesta inmune pues se encargan de reclutar células inmunes innatas y adaptativas (Sokol & Luster, 2015). En el contexto de la DMG, diversos autores se han dado a la tarea de cuantificar la concentración o expresión de quimiocinas en sangre periférica y en la placenta de madres con esta enfermedad (Darakhshan et al., 2019; Lekva et al., 2017; Pan et al., 2021; Świrska et al., 2018; Zhang et al., 2017). Los resultados que se han obtenido son contrastantes, por lo que no se ha podido esclarecer el papel de las quimiocinas en el desarrollo de la DMG.

Recientemente un metaanálisis que incluyó 17 artículos publicados entre 2004 y2021 demostró que la DMG conlleva al aumento en la concentración de CCL-2, CXCL-8 y CXCL-12 en sangre periférica, mientras que a nivel de tejido no se encontró diferencia en la concentración de quimiocinas en placentas de madres con DMG respecto a la de madres normoevolutivas (Liu et al., 2022).

Sin embargo, hasta ahora no se ha estudiado cómo la hiperglucemia asociada a la DMG modifica la secreción de quimiocinas ante un reto infeccioso en la placenta humana. En este sentido, el presente trabajo se centrará en estudiar el efecto combinado de la hiperglucemia y una infección por *Streptococcus agalactiae* o *Escherichia coli* sobre la secreción placentaria de las quimiocinas CCL-2, CCL-3-CCL-5, CXCL-8, CXCL-10 y CXCL-16, ya que como se ha mencionado anteriormente, estas quimiocinas son secretadas por la placenta y se han relacionado con patologías del embarazo como DMG, ruptura prematura de

membranas y parto pretérmino (Gomez-Lopez et al., 2010; Jaworska et al., 2021; Lin et al., 2023; Liu et al., 2022; Shi et al., 2020). Asimismo, también se estudiará el efecto de la hiperglucemia en la capacidad placentaria de quimioatraer células inmunes hacia la placenta para montar una respuesta inmune ante un reto infeccioso por *S. agalactiae* o *E. coli*.

En la siguiente tabla se describe a cuál estirpe celular atrae cada quimiocina, así como su receptor asociado.

Quimiocina	Célula quimioatraída	Receptor asociado
CCL-2	Monocitos y células NK	CCR-2
CCL-3	Linfocitos T, macrófagos y monocitos	CCR-1 y CCR-5
CCL-5	Células NK, macrófagos, Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> y monocitos	CCR-1, CCR-3 y CCR-5
CXCL-8	Neutrófilos	CXCR-2
CXCL-10	Linfocitos T, linfocitos B y células NK	CXCR-3
CXCL-16	Monocitos y células NKT	CXCR-6

Tabla 4. Células inmunes atraídas por las quimiocinas en estudio

Fuentes: (Arck & Hecher, 2013; Bao et al., 2023; Jaworska et al., 2021; Nagarsheth et al., 2017; Sokol & Luster, 2015).

#### 1.3 Infecciones genitourinarias asociadas a la DMG

A lo largo del embarazo se desarrollan varios cambios anatómicos y funcionales del tracto urinario. Por ejemplo, la disminución del tono y peristalsis en la uretra y el aumento en el volumen de la orina promoviendo estasis urinaria y reflujo úterovesical. Además, se ha observado cambio en el pH, la osmolaridad y la concentración de glucosa en la orina, favoreciendo el crecimiento bacteriano e infecciones del tracto urinario (ITU) (Kalinderi et al., 2018).

Aproximadamente el 20% de los embarazos se ven complicados por una ITU (Kalinderi et al., 2018; Yan et al., 2018). Dentro de las ITU, la bacteriuria sintomática se define como aquella con síntomas urinarios en conteos arriba de 1x10<sup>5</sup> unidades formadoras de colonia (UFC) por cada mililitro de orina. La sintomatología de una ITU comprende: alta frecuencia de micción (polaquiuria), dolor en la micción

(disuria), comezón, dolor, fiebre, y en casos graves puede complicarse hacia un cuadro de pielonefritis o cistitis aguda (Bahadi et al., 2010).

Hasta hace poco se pensaba que la DMG no aumentaba el riesgo de desarrollar una ITU respecto a pacientes sin DMG (Mekapogu et al., 2016; Schneeberger et al., 2018). Sin embargo, un reciente metaanálisis reportó que las mujeres que padecen DMG tienen aproximadamente 34% mayor riesgo de desarrollar una ITU (Yefet et al., 2023). Además, la DMG aumenta el riesgo de desarrollar infecciones vulvares y cervicovaginales (Rafat et al., 2021; Zhang et al., 2018) y se ha demostrado que estas mujeres presentan infecciones persistente o recurrentes durante el segundo y tercer trimestre.

Dentro de las infecciones bacterianas durante el embarazo, *S. agalactiae* es el principal agente etiológico del grupo gram positivo, y se encuentra presente en el tracto genitourinario del 18% de las mujeres embarazadas (Russell et al., 2017). Desafortunadamente, esta bacteria puede infectar al producto por vía ascendente y esto se ha relacionado con ruptura prematura de membranas (RPM) y parto pretérmino (PP) (Armistead et al., 2019). Además, de ese 18% de mujeres colonizadas, el 50% la transmitirán a su hijo/hija durante el parto, por lo que es la principal bacteria causante de sepsis en el recién nacido (ACOG, 2018). Por otro lado, los estreptococos del grupo B son la principal causa de las infecciones cervicovaginales, seguido por *Candida spp* (Lukic et al., 2017).

Por otro lado, *E. coli* es la principal bacteria gram negativa durante el embarazo, y se asocia con 86% de las ITU y el 11% de las infecciones cervicovaginales. Esta bacteria es capaz de infectar al producto por vía ascendente, y aumenta el riesgo de desarrollar RPM y PP (Kalinderi et al., 2018; Monroy-Pérez et al., 2020). En años recientes, esta bacteria ha despertado la alarma de la comunidad científica y hospitalaria debido al aumento de cepas resistentes a antibióticos (Mazzariol et al., 2017; Rashki, 2014).

Finalmente, en la literatura se ha descrito que los estreptococos del grupo B son la segunda causa de infecciones bacterianas en madres con DMG, mientras que *E. coli* ostenta el tercer puesto (Rafat et al., 2021).
En conjunto, las ITU y las infecciones cervicovaginales condicionan un embarazo normoevolutivo, ya que se han relacionado con complicaciones obstétricas como PP, RPM, restricción de crecimiento intrauterino y bajo peso al nacer (Benedetto et al., 2004; Kalinderi et al., 2018; Rafat et al., 2021). Teniendo en cuenta que la DMG por sí sola ya aumenta el riesgo de padecer estas complicaciones, resulta imperante la oportuna detección y tratamiento de infecciones bacterianas en pacientes complicadas con diabetes mellitus gestacional.

### 1.3.1 Streptococcus agalactiae

*S. agalactiae* es el principal patógeno gram positivo asociado con infecciones genitourinarias, siendo causa de RPM, PP y sepsis neonatal. Además, es la segunda bacteria asociada con infecciones bacterianas en madres con DMG.

Se trata de una bacteria gram positiva con morfología de coco y que forma agrupaciones en forma de cadenas de perlas. *S. agalactiae* se divide en nueve serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII) basado en su polisacárido capsular (Edwars & Baker, 2015). En México, la información epidemiológica respecto a la infección por este patógeno es limitada, sin embargo, se ha reportado que el 20% de las mujeres embarazadas presentan colonización vaginal por esta bacteria (Palacios-Saucedo et al., 2017). Además, en la década de 1980 se documentó que en pacientes atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología el serotipo predominante fue el I (33%), con una baja presencia del serotipo III (3%) (Solorzano-Santos et al., 1989, 1990). Un estudio más reciente de 2007 describió que el serotipo predominante en el centro y occidente de México es el serotipo II (5.8-61.3%), a la vez que observó un aumento en la participación del serotipo III (5.9-12.8%) (Palacios et al., 2007).

S. agalactiae expresa varios factores de virulencia que le permiten la adhesión, colonización e invasión de las células del huésped como las proteínas de unión a fibrinógeno o la hialuronato liasa, factores que permiten la evasión de la respuesta inmune como la serina proteasa CspA o la peptidasa C5a (Zastempowska et al., 2022). Esta bacteria es  $\beta$ -hemolítica por lo que expresa la  $\beta$ -hemolisina, relacionada con el daño tisular y permite a la bacteria ingresar a células epiteliales y endoteliales

(Doran et al., 2003). De forma interesante, se ha descrito que la serina proteasa CspA es capaz de degradar quimiocinas por lo que directamente interfiere con el reclutamiento de células inmunes (Bryan & Shelver, 2009). La **Figura 3** resume sus principales factores de virulencia.

### 1.3.2 Escherichia coli

*E. coli* es el principal patógeno causante de ITU en las embarazadas. Además, es la tercera bacteria presente en madres complicadas con DMG, y en México se ha reportado que provoca del 80 al 90% de las ITU durante el embarazo (Dautt-Leyva et al., 2018). Por lo tanto, se trata de una bacteria de gran interés en salud pública.

*E. coli* es un bacilo gram negativo que puede encontrarse formando parte de la microbiota intestinal; sin embargo, presenta 6 patotipos asociados a diferentes manifestaciones clínicas. De estos seis patotipos, el que nos interesa es la *E. coli* uropatogénica (UPEC), ya que es el principal patotipo identificado en las ITU e infecciones cervicovaginales (Kot, 2019). Este patotipo expresa varios factores de virulencia que le permiten evadir los mecanismos de defensa del hospedero como el flujo de orina, factores antimicrobianos o la actividad de células inmunes como los neutrófilos (Joshua & Raymond, 2014). Algunos de sus factores de virulencia son: la fimbria Curli o la adhesina H (fimH) que le permiten invadir y adherirse a las células del huésped; la  $\alpha$ -hemolisina (hylA), una toxina que destruye la integridad celular y le permiten una mayor invasividad; la aerobactina (aerJ) que le permite adquirir hierro; y una cápsula bacteriana que le permite evadir al sistema inmune (Lüthje & Brauner, 2014). La **Figura 4** resume los principales factores de virulencia de las UPEC.



**Figura 3. Factores de virulencia de S. agalactiae.** Esta bacteria expresa proteínas que le permiten la adhesión a células del huésped como las proteínas de unión a fibrinógeno FbsA y FbsB, para posteriormente invadir el tejido mediante la hialuronato liasa, la β-hemolisina, principal causa del daño tisular, y la serina proteasa CspA que, además, le permite degradar quimiocinas. Por su parte, la peptidasa C5a le permite la inactivación específica del componente C5a del sistema del complemento, que en conjunto con la proteasa C5a le permite evadir al sistema inmune. Además, el ácido lipoteicoico de esta bacteria es capaz de inducir la apoptosis de las células del huésped junto con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Finalmente, este patógeno cuenta con un antígeno capsular por lo que es posible tipificarlo dentro de 10 serotipos. En conjunto estos mecanismos contribuyen a la evasión del sistema inmune del huésped (Zastempowska et al., 2022). Figura creada por Rodrigo Jiménez con BioRender.com



**Figura 4. Factores de virulencia de** *E. coli* **uropatogénica.** *E. coli* expresa varios factores de virulencia que le permiten invadir las células del huésped mientras evade a su sistema inmune. Particularmente las UPEC expresan las adhesinas Curli o las adhesinas afimbriales que, como su nombre lo indica, le permiten adherirse e invadir el tejido epitelial; también expresan toxinas como la  $\alpha$ -hemolisina o el LPS que le permiten escapar del complemento. Debido a la importancia del hierro en sus vías metabólicas, esta bacteria expresa múltiples factores que le ayudan a adquirir este mineral como los sideróforos o las aerobactinas. Finalmente, posee una cápsula que le permite escapar de factores presentes en el suero. LPS: lipopolisacárido. Modificado de Lüthje y Brauner (2014). Figura creada por Rodrigo Jiménez con BioRender.com

#### **II. ANTECEDENTES**

En el mundo, el 16.7% de los embarazos cursan con hiperglucemia, donde el 80.3% de los casos son debido al desarrollo de DMG (International Diabetes Federation, 2021). En México, debido a la heterogeneidad en las prácticas clínicas para su diagnóstico, no se cuenta con una cifra oficial de prevalencia en el país (Sosa-Rubi et al., 2019; Vázquez-Martínez et al., 2023). Sin embargo, las más recientes estimaciones la sitúan en 23.7% (Dainelli et al., 2018) con casos extremos como los detectados en el norte del país donde se reportó una prevalencia de 44.5% (Violante-Ortíz et al., 2023).

Desafortunadamente, se espera que este valor siga en aumento ya que dos de los factores de riesgo para el desarrollo de DMG son el sobrepeso y la obesidad pregestacional (Olmos-Ortiz et al., 2021), dos rubros que muestran un ligero pero constante aumento desde hace 20 años en la población femenina en edad reproductiva (Campos-Nonato et al., 2023; Shamah-Levy et al., 2020). Por lo tanto, es de esperar que en el futuro aumente la prevalencia de DMG ocasionando un severo impacto sobre el sistema nacional de salud, no sólo porque las mamás complicadas con DMG tienen mayor riesgo de presentar ruptura prematura de membranas y parto pretérmino (Giuliani et al., 2022; Lorenzo-Almorós et al., 2019; O'Sullivan et al., 2011), sino que tanto la madre como el neonato tienen mayor probabilidad de desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2 a largo plazo (Chiefari et al., 2017; Giuliani et al., 2022), afectando su calidad de vida.

Adicionalmente, las mujeres con DMG tienen mayor riesgo de presentar infecciones genitourinarias durante el embarazo (Yefet et al., 2023). Una infección, a su vez, aumenta el riesgo de ruptura prematura de membranas y parto pretérmino (Armistead et al., 2019; Kalinderi et al., 2018; Monroy-Pérez et al., 2020), por lo que el escenario de una paciente complicada con DMG e infectada impacta en la supervivencia y salud tanto materna como fetal.

En vista de lo anterior, se ha planteado estudiar el impacto de la hiperglucemia sobre la capacidad quimiotáctica de la placenta humana ante una infección por *S*. agalactiae o *E. coli,* las principales bacterias gram positiva y gram negativa, respectivamente, asociadas en infecciones genitourinarias durante el embarazo. Esto con el objetivo de determinar si la placenta en medio hiperglucémico es capaz de mantener la respuesta frente a una infección secretando factores quimiotácticos (quimiocinas) para posteriormente reclutar células inmunes al sitio de infección. Esto con la finalidad de ir dilucidando los mecanismos responsables del porqué las pacientes con DMG tienen mayor susceptibilidad de desarrollar infecciones genitorurinarias durante su embarazo.

# **III. HIPÓTESIS**

La exposición de explantes placentarios a alta concentración de glucosa (50 mM) inducirá la secreción de las quimiocinas CCL-2, CCL-3, CCL-5, CXCL-8, CXCL-10, y CXCL-16 en respuesta a la infección por *S. agalactiae o E. coli*, comparado con explantes placentarios cultivados en medio control (glucosa 10 mM). Este aumento en la secreción de quimiocinas por parte de la placenta derivará en mayor migración de monocitos, células NK y linfocitos T presentes en sangre intervellosa hacia el foco de infección.

## **IV. OBJETIVOS**

## 4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad quimiotáctica de la placenta humana ante el reto infeccioso por *S. agalactiae* y *E. coli* en condiciones de cultivo de alta glucosa.

## 4.2 Objetivos particulares

- a) Evaluar la capacidad de defensa de explantes placentarios ante la infección por *S. agalactiae* y *E. coli.*
- b) Evaluar el perfil de secreción de las quimiocinas CCL-2, CCL-3, CCL-5, CXCL-8, CXCL-10 y CXCL-16 en explantes placentarios cultivados en condiciones de hiperglucemia y ante la infección por *S. agalactiae* y *E. coli.*

- c) Cuantificar la tasa de migración de células mononucleares intervellosas ante el estímulo con medios condicionados de explantes placentarios cultivados en medio de hiperglucemia y ante la infección por *S. agalactiae* y *E. coli.*
- d) Identificar el fenotipo de las células mononucleares intervellosas capaces de migrar ante el estímulo con medios de cultivo de explantes placentarios en condiciones de hiperglucemia y ante la infección por *S. agalactiae* y *E. coli*.

# V. METODOLOGÍA

Para cumplir los objetivos de este proyecto, se realizó un estudio de investigación biomédica básica empleando un modelo *ex vivo* de cultivo de explantes placentarios en el cual se simuló la condición *in vitro* de hiperglucemia; así como el aislamiento de células mononucleares intervellosas para ensayos funcionales de migración. Se evaluó el crecimiento logarítmico de *S. agalactiae* y *E. coli* en explantes placentarios cultivados en condiciones de hiperglucemia, así como la producción de quimiocinas ante estos retos infecciosos. Asimismo, se evaluó la capacidad de los explantes para quimioatraer células mononucleares intervellosas para ensayos, y se determinó si eran monocitos, células NK, linfocitos T o linfocitos B mediante citometría de flujo.

#### 5.1 Consideraciones éticas

Este proyecto de tesis se llevó a cabo en el marco del protocolo con título "Evaluación del efecto de la insulina y la metformina sobre el perfil inflamatorio y la inmunidad innata de la placenta humana en un modelo *in vitro* de diabetes mellitus gestacional", el cual fue aprobado en noviembre de 2018 por el Comité de Investigación, Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), con número de registro 2018-1-152 (Anexo 2). Este protocolo también fue aprobado en abril de 2020 por los vocales del Comité de Ética en Investigación y el Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS con número de registro R-2020-785-043 para toma de muestras en el Hospital de Gineco Obstetricia Número 4 Luis Castelazo Ayala (Anexo 3). Asimismo, este protocolo también fue aprobado en marzo de 2021 por el Director General y el Director de Servicios Clínicos del Hospital Ángeles México para la recolección de muestras biológicas en dicho hospital (Anexo 4). También se contó con financiamiento CONAHCYT de la convocatoria Ciencia Básica (CB-A1-S-27832).

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 de 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 (Anexos 5, 6 y 7).

## 5.2 Toma de muestras

La toma de muestras biológicas se realizó en el Hospital Ángeles México ubicado en Agrarismo 208, colonia Escandón II Sección, delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México, C.P. 11800; así como en el Hospital de Gineco Obstetricia Número 4 ubicado en Río de la Magdalena 289, colonia Tizapán San Ángel, delegación Álvaro Obregón, Ciudad de México, C.P. 01090. Posteriormente las muestras se transportaron hacia el INPer para su procesamiento experimental en el Laboratorio de Inmunología de la Unidad Feto-Placentaria. El INPer se localiza en la calle Montes Urales 800, colonia Lomas de Chapultepec IV Sección, delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México, C.P. 11000.

# 5.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Se recolectó la placenta de aquellas pacientes que cumplieron con criterios de inclusión. Estos tejidos biológicos fueron procesados con la finalidad de realizar cultivos para el modelo *ex vivo* de explantes placentarios y aislamiento de células mononucleares intervellosas.

# Criterios de inclusión

Para el desarrollo de este proyecto se recolectaron muestras biológicas de un grupo con embarazo normoevolutivo a término (37 a 41 sdg). Los criterios de inclusión considerados son: mujeres con edad entre 18 y 38 años, sin enfermedades metabólicas o endocrinas, sin consumo de medicamentos diferentes a los propios del embarazo, con estudios laboratoriales recientes dentro de parámetros normales, sin infecciones cervicovaginales durante el tercer trimestre del embarazo, sin evidencia clínica de trabajo de parto y programadas a operación cesárea.

# Criterios de exclusión

Se excluyeron de este proyecto aquellas pacientes alérgicas a penicilina o aminoglucósidos, que presentaron alteraciones reflejadas en los laboratoriales de rutina, con embarazo múltiple, con parto eutócico vaginal, con enfermedades metabólicas o endocrinas o que presentaron infección cervicovaginal durante el tercer trimestre.

# Criterios de eliminación

Se eliminaron del estudio aquellas pacientes que presentaron hiperglucemia (>95 mg/dL) durante el parto, aquellas muestras que dieron positivo al test microbiológico y las muestras con niveles detectables de IgM anti SARS-CoV2 (lo que indica una infección reciente por este virus).

# 5.4 Variables de estudio

## Variables independientes

- Glucosa en el medio de cultivo (10 y 50 mM)
- Infección con *E. coli* o *S. agalactiae* (1x10<sup>5</sup> UFC/mL)

# Variables dependientes

- Concentración de los marcadores inflamatorios IL-6, TNF-α e IL-1β secretados por los explantes placentarios. Nivel de medición: escalar (pg/mL/g de tejido o ng/mL/g de tejido).
- Viabilidad de los explantes placentarios. Nivel de medición: escalar (abs/g de tejido).
- Crecimiento de S. agalactiae y E. coli en el sobrenadante de explantes placentarios tras 4 y 8 horas de infección. Nivel de medición: escalar (UFC/mL/g de tejido).
- Invasividad de *S. agalactiae* y *E. coli* en la vellosidad placentaria tras 8 horas de infección. Análisis cualitativo.

- Concentración de las quimiocinas CCL-2, CCL-3, CCL-5, CXCL-8, CXCL-10 y CXCL-16 secretadas por los explantes placentarios. Nivel de medición: escalar (pg/mL/g de tejido).
- Migración de células mononucleares intervellosas en respuesta a los medios condicionados de explantes infectados con *S. agalactiae* o *E. coli*. Nivel de medición: escalar (número de células migrantes / 500,000 células).
- Cantidad de monocitos, células NK, linfocitos T, linfocitos B o NKT que migran en respuesta a los medios condicionados de explantes infectados con *S. agalactiae* o *E. coli*. Nivel de medición: escalar (número de células / 500, 000 células).
- Expresión de TLR-2 en las vellosidades placentarias. Nivel de medición: escalar (ng/mL/mg de proteína)

# 5.5 Preparación de medios de cultivo para generar hiperglucemia

De acuerdo con los criterios de diagnóstico de la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo (IADPSG), se considera como normoglucemia durante el embarazo una concentración < 92 mg/dL, lo cual equivale a 5.1 mM. En este proyecto se utilizó como medio base el medio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) bajo en glucosa (Marca: Biowest. Catálogo: L0060-500), el cual ya se encuentra ajustado a una concentración 5 mM de D-Glucosa. Sin embargo, se considera que esta es una concentración restringida en el cultivo de tejidos extraembrionarios (Basak et al., 2019), por lo que se adicionó D-glucosa anhidra al medio de cultivo para semejar concentraciones de 10 mM (equivalente a la concentración fisiológica máxima esperada a 1 hora post-carga de glucosa en el estudio OGTT), ya que es una concentración reportada en la literatura para el cultivo de células trofoblásticas (Zhang et al., 2021). Además, se adicionó D-Glucosa anhidra al medio de cultivo para obtener una concentración de glucosa 50 mM como concentración de hiperglucemia severa. El uso de esta concentración de glucosa ya ha sido reportado previamente por nuestro grupo de trabajo para simular un medio hiperglucémico (Jiménez-Escutia et al., 2023).

#### 5.6 Modelo ex vivo: cultivo de explantes placentarios

Tras el alumbramiento se recolectó la placenta y las membranas corioamnióticas de las pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. Las muestras biológicas se transportaron en un contenedor estéril hacia el laboratorio de Inmunología de la Unidad feto-placentaria del INPer para su procesamiento. Para asegurar que el proceso se realizó en condiciones de esterilidad se trabajó en una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel II. Primero, con ayuda de material guirúrgico estéril se eliminaron las membranas corioamnióticas y se tomó una gota de sangre del cordón umbilical para el casete de anticuerpos nCoV19. Posteriormente, la placenta se lavó con solución salina tibia con el objetivo de retirar la sangre presente. Tras estos lavados, se cortó el cotiledón central (localizado en la parte posterior al sitio de inserción del cordón umbilical), y con ayuda de material quirúrgico se retiró la decidua, los vasos sanguíneos y coágulos. El cotiledón limpio se cortó en explantes de 3 a 5 mm<sup>3</sup>, los cuales se mantuvieron en una caja Petri con solución salina y medio DMEM. Una vez se cortaron los explantes requeridos se procedió a colocarlos en una caja de cultivo de 24 pozos de acuerdo con el tratamiento experimental (ver sección 5.9). El medio base de tratamiento consistió en DMEM Low Glucose (ajustado a la concentración de glucosa deseada), suplementado con suero de ternera neonatal inactivado (STNi), piruvato de sodio 1 mM, y 1% de antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL). Los explantes se mantuvieron en un incubador a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Los tratamientos experimentales se colocaron por triplicado en cajas de cultivo de 24 pozos; en cada pozo se depositaron 3 explantes con 1.5 mL de medio con los tratamientos. Los tratamientos experimentales se renovaron a las 24 horas de cultivo y se mantuvieron hasta un total de 48 horas.

#### 5.7 Aislamiento de células mononucleares intervellosas

Tras el alumbramiento, la placenta completa fue transportada hacia el INPer. El proceso se realizó dentro de una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel II con la finalidad de mantener la esterilidad. Con ayuda de material quirúrgico se retiraron las membranas corioamnióticas y el cordón umbilical. Se realizaron cortes

en la cara materna de la placenta con ayuda de una hoja de bisturí, y se transfirió la placenta a una bolsa estéril con la cara materna en prono. Se mantuvo la placenta en la bolsa durante 10 minutos para permitir el eflujo de sangre intervellosa por gravedad. Se recuperó la sangre con una pipeta de transferencia estéril y se colocó en tubos con heparina. La sangre heparinizada se transfirió a tubos cónicos de 50 mL y se diluyó en una proporción 1:3 con solución balanceada de Hank 1X suplementada con HEPES 10 mM y NaHCO<sub>3</sub> 4.2 mM. En otro tubo cónico de 50 mL se colocó una cama de 15 mL de Lymphoprep<sup>™</sup> (Marca: STEMCELL Technologies. Catálogo: 07851); con gentileza se agregaron 30 mL de sangre diluida sobre la cama de Lymphoprep. Este tubo se centrifugó durante 40 minutos a 400 g a temperatura ambiente. A continuación, se recuperó el anillo asociado a las células mononucleares de sangre intervellosa (IVMCs). Las células se lavaron con solución de Hank 1X y se centrifugaron a 550 g durante 10 minutos. Para eliminar la contaminación con eritrocitos, las células se colocaron durante 5 minutos en buffer de lisis de eritrocitos (NH<sub>4</sub>Cl [155 mM], KHCO<sub>3</sub> [10 mM], y EDTA [0.1 mM]). Al término de los 5 minutos se detuvo la reacción agregando solución de Hank 1X y se centrifugó a 550 g durante 10 minutos. El botón resultante se lavó 2 veces más con solución de Hank 1X. Las IVMCs obtenidos se resuspendieron en medio RPMI-1640 y se mantuvieron a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% hasta el momento de ser utilizados en el ensayo funcional de migración.

#### 5.8 Análisis microbiológico de las muestras

Para asegurarnos de la esterilidad de los tejidos, todas las muestras se procesaron para su análisis microbiológico. Se utilizó el caldo infusión cerebro corazón (BHI) ya que permite el crecimiento de diversas especies microbiológicas. Además, se utilizaron dos caldos para identificar características metabólicas: caldo urea y caldo arginina. El caldo urea evidencia la actividad enzimática de la ureasa, enzima característica de la familia *Enterobacteriacea* (Jawetz et al., 1990). El caldo arginina permite identificar la capacidad de hidrolizar y descarboxilar a la arginina dando como producto final putrescina (Møller, 1955).

Este ensayo consistió en colocar un explante placentario en los caldos antes mencionados e incubarlos a 37°C durante 5 días. Este análisis permite detectar microorganismos anaerobios facultativos (*Streptoccocus agalactiae, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Gardnerella vaginalis, Lactbacillus sp, Klebsiella sp.),* aerobios (*Candida albicans, Neisseria gonorrhoae*), así como *Ureoplasma uraelyticum* y *Mycoplasma hominis*. Sólo se utilizaron los datos generados por muestras de tejidos en los que se comprobó su esterilidad mediante estas pruebas.

# 5.9 Tratamientos experimentales

El medio de cultivo para los explantes placentarios fue DMEM bajo en glucosa y suplementado, ajustado a las siguientes concentraciones de glucosa:

- Glucosa 10 mM
- Glucosa 50 mM

La suplementación del medio se realizó con STNi al 10%, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL.

Los explantes se mantuvieron en estos tratamientos durante 48 horas, refrescando el tratamiento cada 24 horas. Al término de este tiempo de cultivo se procedió a realizar el ensayo de infección con *S. agalactiae* o *E. coli*. Dependiendo del agente infeccioso en estudio se probaron los siguientes tratamientos:

- Streptococcus agalactiae 1x10<sup>5</sup> UFC/mL
- Escherichia coli 1x10<sup>5</sup> UFC/mL

La elección de la concentración de *S. agalactiae* y *E. coli* para infectar a la placenta se determinó porque es la concentración detectada en orina durante una bacteriuria sintomática en una ITU (Nicolle et al., 2019).

#### 5.10 Estandarización del modelo de hiperglucemia

La estandarización de nuestro modelo de hiperglucemia (Jiménez-Escutia et al., 2023) consistió en realizar una curva dosis-respuesta de glucosa para evaluar: a) la secreción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6); b) los depósitos tisulares de glucógeno (tinción de PAS); c) la viabilidad del tejido, utilizando el reactivo XTT y d) osmolaridad en el medio de cultivo. A continuación, se describe brevemente cada uno de estos ensayos.

#### 5.10.1 Secreción placentaria de citocinas pro-inflamatorias

El objetivo de este ensayo fue definir la concentración de glucosa (25, 35 o 50 mM) necesaria para observar un aumento significativo en la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 respecto a nuestro grupo control (glucosa 10 mM), ya que se ha reportado el aumento de estas citocinas en el suero y en la placenta de pacientes con DMG.

Para llevar a cabo este ensayo se incubaron los explantes placentarios durante 48 horas en medio DMEM ajustado a las diferentes concentraciones de glucosa (10, 25, 35 o 50 mM) refrescando el medio cada 24 horas. Al término del tiempo de incubación se recolectaron los sobrenadantes y se congelaron a -40°C hasta el momento de su análisis.

Para la cuantificación de TNF- $\alpha$  se utilizó un kit comercial de ELISA de la marca R&D Systems (Catálogo: DY210); en el caso de IL-1 $\beta$  e IL-6 se utilizaron kits de ELISA de la marca PeproTech (Catálogo: 900- K95 y 900-K16, respectivamente). En la Tabla 5 se enlista la concentración de los anticuerpos de captura, detección y del estándar de referencia.

36

Citocina o quimiocina	Anticuerpo de captura	Anticuerpo de detección	Curva estándar de referencia
TNF-α	4.00 μg/mL	50.0 ng/mL	15.6 – 2000 pg/mL
IL-1β	0.5 μg/mL	0.5 μg/mL	15.6 – 2000 pg/mL
IL-6	0.5 μg/mL	1.0 μg/mL	46.9 – 3000 pg/mL
CCL-2	0.25 μg/mL	0.5 μg/mL	15.6 – 2000 pg/mL
CCL-3	0.5 μg/mL	0.5 μg/mL	31.25 – 4000 pg/mL
CCL-5	0.5 μg/mL	0.25 μg/mL	15.6 – 2000 pg/mL
CXCL-8	4.0 μg/mL	20 ng/mL	15.6 – 2000 pg/mL
CXCL-10	0.5 μg/mL	0.25 μg/mL	15.6 – 2000 pg/mL
CXCL-16	400 ng/mL	100 ng/mL	7.8 – 1000 pg/mL

Tabla 5. Concentraciones del estándar de referencia y de los anticuerpos de captura y detección utilizados para la cuantificación de citocinas y quimiocinas

El procedimiento se realizó en concordancia con las instrucciones del fabricante. Se utilizó el producto Sigma-Fast OPD como substrato colorimétrico (P9187, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las placas se leyeron en un espectrofotómetro xMark (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) a una longitud de onda de 405 nm con corrección a 650 nm. La concentración de cada citocina y quimiocina se calculó respecto a una curva estándar ajustada a 4 parámetros logísticos y se ajustó por el factor de dilución o de concentración empleado. La concentración final se normalizó por gramo de tejido.

## 5.10.2 Tinción Periódica-Ácida de Schiff (PAS)

Se realizó la tinción de PAS para verificar el aumento en los depósitos de carbohidratos en la vellosidad placentaria debido a la alta glucosa, ya que éste es otro fenómeno bien conocido que ha sido reportado en placentas de madres con DMG (Li et al., 2020).

Para cumplir este objetivo se cultivaron explantes placentarios en medio de glucosa control o medio de hiperglucemia durante 48 horas. Al término del tiempo de incubación se recolectaron los explantes y se colocaron en formol hasta el momento de su análisis. La tinción de PAS se realizó de acuerdo con la metodología previamente descrita (Myers et al., 2008).

#### 5.10.3 Ensayo de viabilidad tisular

El siguiente paso fue verificar que el tratamiento de hiperglucemia no modificara la viabilidad de los explantes placentarios respecto a aquellos cultivados en el medio de glucosa control. Asimismo, se verificó que este modelo permitiera mantener la viabilidad de los explantes hasta 96 horas de cultivo para asegurarnos que nuestros experimentos se realizan dentro de la ventana de tiempo adecuada.

Para llevar a cabo este ensayo se incubaron explantes placentarios en medio de glucosa control o medio de hiperglucemia durante 24, 48, 72 o 96 horas refrescando el medio cada 24 horas. Al término de cada tiempo de incubación se recolectaron los explantes y se colocaron en medio DMEM suplementado con hidrolisado de lactoalbúmina al 0.2%; se adicionó el reactivo XTT (Marca: Roche. Catálogo: 11465015001) en una proporción 1:10 adicionado con el acoplador de electrones en una proporción 1:50. Los explantes se incubaron durante dos horas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. Al término del tiempo de incubación se recolectaron los explantes para registrar su peso, y los sobrenadantes se leyeron en el espectrofotómetro xMark (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) a 450 nm. Los resultados se expresaron como absorbancia a 450 nm por gramo de tejido.

#### 5.10.4 Ensayo de osmolaridad

Finalmente, para verificar que la inflamación observada en el grupo de hiperglucemia no era debido al aumento de la presión osmótica, se decidió llevar a cabo un ensayo de osmolaridad utilizando manitol, un azúcar no metabolizable y que ha sido utilizado previamente como control de presión osmótica (Lam et al., 2021). Para llevar a cabo este ensayo se prepararon medios DMEM ajustados a diferentes concentraciones de glucosa y manitol **(Tabla 6)**. La presión osmótica de los medios se midió con ayuda de un osmómetro y se expresó en miliosmoles (mOsm).

38

Tratamiento	mOsm	Equivale a
Glucosa 5 mM	316	NA
Glucosa 10 mM	320	NA
Glucosa 50 mM	353	NA
Glucosa 5 mM + Manitol 5 mM	320	Glucosa 10 mM
Glucosa 5 mM + Manitol 45 mM	346	Glucosa 50 mM
Glucosa 10 mM + Manitol 40 mM	346	Glucosa 50 mM

Tabla 6. Presión osmótica en el medio DMEM ajustado a diferentes concentraciones de glucosa y/o manitol.

Los explantes placentarios se incubaron durante 48 horas en medio DMEM ajustado a las diferentes concentraciones de glucosa (5, 10 o 50 mM) y/o manitol (5, 40 ó 45 mM), refrescando el medio cada 24 horas. Al término del tiempo de incubación se recolectaron los sobrenadantes y se congelaron a - 40°C hasta el momento de su análisis. Finalmente, se cuantificó la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 con la metodología de ELISA previamente descrita (Sección 5.10.1). Los resultados se normalizaron por gramo de tejido.

#### 5.11 Identificación de las cepas de S. agalactiae y E. coli

La cepa de *S. agalactiae* con la que se realizó esta tesis se adquirió de la ATCC (27956); esta cepa presenta  $\beta$ -hemólisis y los genes de virulencia *hylB* (hialuronidasa), *scpA* (proteasa de C5a), *sodA* (superóxido dismutasa), *CPS* (antígeno capsular), *bca* (proteína alfa C) y *gpaN* (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa). Se verificó que se tratara de *S. agalactiae* mediante la identificación de su gen *CpsG* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final; este gen codifica para una hexosiltransferasa (Uniprot: Q8VLK2). Adicionalmente, se comprobó mediante siembra en placa (agar sangre) con la técnica de estría que sus colonias fueran puras y tuvieran actividad  $\beta$ -hemolítica. Finalmente, de las colonias que crecieron se realizó la tinción de Gram para observar su morfología de coco y que formara su característico collar de perlas.

En el caso de *E. coli*, la cepa utilizada se aisló de la sangre de un neonato con sepsis y cuya madre fue diagnosticada en el INPer con RPM y corioamnionitis. Esta cepa se identificó mediante Vitek® y se confirmó a través de la secuenciación de su subunidad 16S ribosomal. Su genotipo se determinó mediante PCR múltiple como parte del filogrupo-B2 y se detectaron los genes de virulencia *fimH* (fimbria H), *hlyA* (alfa hemolisina) y *aerJ* (aerobactina). Asimismo, se sembró en placas de agar Luria para observar su morfología de colonia y se realizó tinción de Gram.

#### 5.12 Modelo de infección de explantes placentarios

Con la finalidad de estudiar el efecto de la hiperglucemia sobre la capacidad de respuesta de la placenta humana ante un reto infeccioso por *S. agalactiae* o *E. coli* se evaluó el crecimiento de colonias, la invasividad bacteriana intervellosa, la secreción de quimiocinas al medio de cultivo, la quimioatracción de IVMCs y el perfil de células quimioatraídas.

Tras las 48 horas de incubación en los tratamientos descritos en la sección 5.9, se procedió a infectar los explantes con *S. agalactiae* o *E. coli* (1x10<sup>5</sup> UFC/mL) durante 4 u 8 horas. Al término de estos tiempos de infección se cuantificó el crecimiento bacteriano mediante la técnica de dilución en placa y se tomaron los medios de cultivo para cuantificación de quimiocinas mediante técnica de ELISA.

Para el conteo en placa se tomaron 100  $\mu$ L de los sobrenadantes y se realizaron diluciones seriadas en solución salina + Tween 80 al 0.05%. Cada dilución se sembró por triplicado (10  $\mu$ L) en placas de agar sangre (*S. agalactiae*) o agar Luria-Bertani (*E. coli*). Las cajas de agar se dejaron incubando durante 24 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se cuantificó el número de colonias que habían crecido en cada dilución. El experimentó se descartaba si se observaba otra morfología de colonia. Finalmente, el resultado se expresó como UFC/mL/ gramo de tejido.

Adicionalmente, al término del tiempo de 8 horas de infección se verificó la viabilidad del explante placentario mediante la técnica de XTT previamente descrita en la sección 5.10.3.

# 5.13 Tinción modificada de Gram para observar la invasividad de *S. agalactiae* o *E. coli*

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los explantes placentarios de retener la infección en la capa exterior de la vellosidad (sinciciotrofoblasto), se prepararon laminillas teñidas con la tinción modificada de Gram o Tinción de Brown-Hopps con los explantes que previamente estuvieron infectados durante 8 horas (Becerra et al., 2016). Al término del ensayo de infección, se guardaron dos explantes placentarios de cada tratamiento experimental en formol.

Posteriormente, el tejido se embebió en bloques de parafina y se hicieron cortes con ayuda de un microtomo. Los cortes se colocaron sobre un portaobjetos y se desparafinó. El portaobjetos se colocó en una solución al 1% de cristal violeta durante dos minutos. Se agregó el mordente (yodo de Gram) durante 5 minutos y se enjuagó con agua destilada. Luego se destiñó con una solución de acetonaalcohol por 10 segundos. Posteriormente, se agregó fucsina básica al 0.5% durante cinco minutos y se volvió a enjuagar. Sobre esta tinción se agregó ácido pícrico al 0.1% el tiempo necesario para observar una ligera coloración amarilla y se enjuagó rápidamente con xilol. Finalmente, la tinción se cubrió con un cubreobjetos.

En esta tinción, el tejido se observa de una tonalidad amarillenta por la adición del ácido pícrico, mientras que las bacterias gram positivas se observan de un color azul-morado y las gram negativas de color rojo (Procop & Wilson, 2001).

## 5.14 Secreción placentaria de quimiocinas

Con el objetivo de cuantificar la secreción de quimiocinas en respuesta a la infección, se utilizó la técnica de ELISA tipo sandwich. Para esta técnica se utilizaron los estuches comerciales de anticuerpos de PeproTech: CCL-2 (Catálogo: 900-K31), CCL-3 (Catálogo: 900-K35), CCL-5 (Catálogo: 900-K33) y CXCL-10 (Catálogo:900-K39); así como los estuches comerciales de R&D Systems: CXCL-8 (Catálogo: DY208) y CXCL-16 (Catálogo: DY9034-05).

En la Tabla 5 se indicaron las concentraciones de trabajo de todos los reactivos utilizados para cada ELISA. Primero se sensibilizó la placa de 96 pozos con el

anticuerpo de captura diluido en PBS (volumen de 100  $\mu$ L por pozo). Se mantuvo a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavó 3 veces con buffer de lavado (PBS + Tween 20 al 0.05%) utilizando un lavaplacas automático (BIO-RAD) y se bloqueó con 300 μL de solución de bloqueo (PBS + albúmina bovina sérica (BSA) al 1%) durante una hora a temperatura ambiente. Durante el tiempo de incubación se prepararon las curvas de calibración de cada quimiocina en buffer diluyente (PBS) + BSA 0.1% + Tween 20 al 0.05%) o buffer de bloqueo según correspondía (diluyente para anticuerpos de la marca PeproTech o bloqueo para anticuerpos de la marca R&D Systems). Todas las curvas estándar de referencia se prepararon con 8 puntos de diluciones seriadas de acuerdo con el rango indicado en la tabla 5 y de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Al término del tiempo de bloqueo, se lavó 3 veces cada placa y se agregó 100 µL de muestra o de cada punto de la curva y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Al término del tiempo de incubación se procedió a lavar 3 veces cada placa y se agregó el anticuerpo de detección diluido en reactivo diluyente/bloqueo (volumen de 100 µL por pozo), y se mantuvo en incubación durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las placas y se adicionó 100 µL/pozo de estreptavidina-peroxidasa de rábano (HRP) diluido en reactivo diluvente/bloqueo; se protegió de la luz y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las placas se lavaron 3 veces y se adicionó el sustrato diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) diluido en buffer de fosfato de sodio (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0.2 M, ácido cítrico 0.1 M, 0.05% peróxido de hidrógeno al 30%, pH 5.0 para realizar la reacción colorimétrica. Se utilizó ácido sulfúrico 2N como solución de paro. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm con corrección a 650 nm. La curva de calibración se ajustó a 4 parámetros logísticos y la cuantificación final se normalizó por gramo de tejido.

# 5.15 Ensayo de migración de IVMCs en respuesta a la infección por S. agalactiae o E. coli

Después de que se obtuvieron los medios condicionados de placenta cultivada en condiciones de hiperglucemia e infectada por las bacterias en estudio, se procedió a aislar células mononucleares intervellosas (Sección 5.7) para realizar los ensayos funcionales de migración en respuesta a estos medios condicionados.

Previo al ensayo de migración, las IVMCs se marcaron con el fluorocromo CellTracker<sup>™</sup> Green CMFDA (Número de catálogo: C2995. Invitrogen). Las células necesarias para el ensayo de migración se diluyeron en 2 mL de medio RPMI y se agregó el fluorocromo en una proporción 1:1000. Las células se incubaron durante 45 minutos a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% en obscuridad. Al término del tiempo de incubación las células se centrifugaron durante 5 minutos a 550 g. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en solución de Hank. Se repitió este proceso de centrifugación y resuspensión en solución de Hank para un total de 3 lavados. Finalmente, las células se resuspendieron en medio RPMI-1640.

Para este ensayo se utilizó el modelo de cámara de Boyden (Figura 5), con una membrana porosa de 5  $\mu$ m. Como control positivo de quimioatracción se utilizó medio RPMI suplementado con SFBi al 20%. El ensayo se realizó de la siguiente forma: en la cámara inferior se colocaron los medios condicionados de placenta como agente quimiotáctico y en la cámara superior se colocaron 300  $\mu$ L de medio RPMI ajustado a una concentración de 1.66x10<sup>6</sup> IVMCs/mL. Se permitió que las células migraran durante dos horas manteniéndolas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.



Figura 5. Cámara de Boyden. Modificado de (Lautenschlaeger, 2011)

Al término de las dos horas de migración se recolectaron 150 µL de medio de la cámara inferior por duplicado y se colocó en una caja de 96 pozos para su lectura en un espectrofotómetro de fluorescencia a 492/517 nm (Synergy 2 microplate reader, Marca: Biotek). Para contabilizar el número de células migrantes se construyó una curva de calibración relacionando el número de células con la fluorescencia emitida gracias a la internalización del CellTracker™. Esta curva se construyó realizando diluciones seriadas a partir de un stock de 125,000 células marcadas con el fluorocromo; los puntos de la curva en orden decreciente fueron: 125,000, 62,500, 31,250, 15,625, 7,812, 3,906 y 1,953 células. El blanco de la curva fue medio RPMI sin suplementar. De esta forma fue posible cuantificar el número de células que pasaron desde la cámara superior hacia la cámara inferior. Además, se restó un control de células con migración espontánea debido a la gravedad. De esta forma, la fórmula aplicada para el cálculo de células migrantes fue la siguiente:

#Células migrantes

= #células (cámara inferior)<sub>tratamiento</sub> - #células (cámara inferior)<sub>control negativo</sub>

# 5.16 Fenotipificación de células migrantes en respuesta a la infección por *S. agalactiae* o *E. coli*

Con el objetivo de identificar cuáles poblaciones dentro de las IVMCs migran en respuesta a los medios condicionados de placenta, se decidió utilizar la técnica de citometría de flujo para determinar su fenotipo.

Primero se realizó el ensayo de migración tal como se describió en la sección pasada, con la modificación de que las células no se marcaron con el fluorocromo CellTracker<sup>™</sup>, sino que inmediatamente se colocaron en la cámara de Boyden y se dejaron migrar durante 2 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Al término del tiempo de migración se recolectaron los sobrenadantes de la cámara inferior y se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL. Adicionalmente, se colocaron dos tubos con 300,000 IVMCs cada uno; de estos dos tubos, uno se utilizó como control de auto fluorescencia y el otro se utilizó para determinar la proporción inicial de monocitos, linfocitos T, linfocitos B, células NK y células NKT en la muestra de IVMCs aislados. Estos tubos se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos. Los anticuerpos utilizados fueron: un mix de anticuerpos anti-CD3-FITC para la detección de linfocitos T, anti-CD16 y -CD56-PE para la detección de células NK y Multitest™ anti-CD19-APC para la detección de linfocitos В (BD CD3/CD16+CD56/CD45/CD19, Catálogo: 340500), además se agregó el anticuerpo anti-CD14-PE-Cy7 (BD Pharmingen™, Catálogo: 562898) para la detección de monocitos; se utilizaron las concentraciones recomendadas por el fabricante. Se retiró el sobrenadante cuidando de no eliminar el botón celular. Luego, el botón celular se resuspendió y se agregó 1.65 μL del mix de anticuerpos en cada tubo, exceptuando el de auto fluorescencia. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos protegidos de la luz. Después de la incubación, las células se fijaron utilizando 250 µL de solución FLS 1X (BD FACS™ Lysing Solution 10X concentrate Catálogo: 349202) y se dejaron incubar durante otros 10 minutos protegidos de la luz. Tras esto, las células se lavaron con buffer de fosfatos 1X y se centrifugaron a 400 gravedades durante 5 minutos. Finalmente, se retiró el sobrenadante, las células se resuspendieron en 100 µL de PBS 1X y se leveron en el citómetro de flujo o se almacenaron a 4°C protegidos de la luz por un tiempo máximo de 3 días.

Se utilizó el citómetro FACSAria<sup>™</sup> III (Marca: BD Biosciences). Se analizaron 25,000 eventos por muestra, de los cuales, primero se seleccionó los eventos únicos y de estos eventos se seleccionaron aquellos que estuvieran en la región de mononucleares. Las células CD14<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> fueron detectadas considerando la región de células mononucleares, mientras que las células CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> fueron detectadas utilizando como región parental la región de células CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>. En la **Figura 6** se muestra el análisis Batch con la estrategia de selección, los parámetros utilizados para el análisis y plots representativos. Así mismo, en la **Tabla 7** se resume la información de los anticuerpos y filtros utilizados.

Anticuerpo	Antígeno	Clona	Fluorocromo	Filtro utilizado
Anti-CD3	CD3	SK7	FITC	502LP, 530/30
Anti-CD14	CD14	ΜφΡ9	PE-Cy7	735LP, 780/60
Anti-CD19	CD19	SJ25C1	APC	660/20
Anti-CD16	CD16	B73.1	PE	556LP, 585/42
Anti-CD56	CD56	NCAM16.2	PE	556LP, 585/42

Tabla 7. Anticuerpos utilizados para la detección de monocitos CD14<sup>+</sup>, linfocitos T CD3<sup>+</sup>, células NK CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, linfocitos B CD19<sup>+</sup> y células NKT CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>.



Figura 6. Plots representativos de la estrategia y parámetros utilizados para el análisis de citometría de flujo.

### 5.17 Expresión placentaria de TLR-2

Con el objetivo de estudiar el efecto de la hiperglucemia sobre la respuesta inmune frente a una infección por *S. agalactiae,* se procedió a cuantificar la abundancia de TLR-2 en los lisados de vellosidades placentarias. Se utilizó un kit de ELISA para detección de TLR-2 humano de la marca Invitrogen (Catálogo: EH459RB).

Tras las 8 horas de infección de los explantes placentarios con *S. agalactiae* en condiciones de hiperglucemia o glucosa control, se recolectaron los explantes y se colocaron en buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, NP-40 0.25%, Deoxicolato de sodio 1%, NaCl 150 mM, SDS 0.1%) adicionado con inhibidor de proteasas (Roche. Catálogo: 11697498001), las muestras se almacenaron a -40°C hasta el momento de su procesamiento.

Posteriormente, las muestras se lisaron con ayuda de un polytron (Marca: OMNI International. Modelo: Tissue Master 125), y se centrifugaron a 2851 g durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteína. Cada muestra se ajustó con 25 µg de proteína en 100 µL.

La ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La curva estándar se preparó a partir de un vial de estándar de TLR-2 con una concentración de 80 ng/mL; los puntos de la curva fueron: 80, 32, 12.8, 5.12, 2.048, 0.819, 0.328 ng/mL y blanco. Como substrato se utilizó 100  $\mu$ L de TMB (3,3',5,5'-Tetrametillbenzidina) y como solución de paro se agregó 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 N. Las muestras se leyeron a 450 nm sin corrección.

#### 5.18 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 10.1.1 (GraphPad Software Inc). Se consideró como diferencia estadística significativa el valor de *p* inferior a 0.05 (p < 0.05). Mediante la prueba de Shapiro-Wilk se determinó la distribución de los datos como normal o no normal y en consecuencia se eligió la prueba estadística paramétrica o no paramétrica para comparación entre grupos. En el pie de las figuras se indica la prueba estadística y el post-hoc empleado.

# **VI. RESULTADOS**

# 6.1 Características clínicas

En la **Tabla 8** se resumen las características clínicas de las madres donadoras de placenta y los recién nacidos. Todas las pacientes cumplieron con los criterios de inclusión.

Característica	Promedio ± DE	Intervalo (mín – máx)				
Características clínicas maternas						
Edad (años)	32 ± 5	19 - 40				
IMC pregestacional (kg/m <sup>2</sup> )	24.9 ± 3.3	18.7 - 29.9				
Número de gestas	2 ± 1	1 - 5				
Semanas de gestación	38.5 ± 0.8	37.0 - 40.4				
Presión sistólica (mm Hg)	116 ± 10	99 - 130				
Presión diastólica (mm Hg)	74 ± 7	60 - 90				
Ganancia de peso (kg)	11 ± 4	3 - 20				
Características clínicas de los recién nacidos						
Peso al nacer (kg)	3.14 ± 0.36	2.30 - 3.91				
Talla (cm)	48.9 ± 1.8	45 - 52				
Perímetro cefálico (cm)	34.9 ± 1.7	32 - 42				
APGAR 1 min	9 ± 2	7 - 9				
APGAR 5 min	9 ± 2	8 - 10				
Peso de la placenta (g)	534.43 ± 218.08	328.20 - 685.90				
Sexo	27 mujeres (48.2%) 29 hombres (51.8%)	NA				

Tabla 8. Características clínicas de las pacientes que aceptaron donar su placenta

APGAR: Aspecto, pulso, irritabilidad (del inglés *grimace*), actividad y respiración; prueba para evaluar la salud del neonato al minuto y a los cinco minutos de vida. IMC: Índice de masa corporal. NA: No aplica. n = 56 placentas

# 6.2 Estandarización del modelo ex vivo de hiperglucemia

En primer término, se estandarizó el modelo de hiperglucemia. Para lo cual se construyó una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones de glucosa (10, 25, 35 y 50 mM) y se midió la secreción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 por parte de explantes placentarios cultivados durante 48 horas en estas condiciones. El estímulo con alta concentración de glucosa favoreció la síntesis de las 3 citocinas pro-inflamatorias; únicamente la concentración de 50 mM mostró diferencias significativas respecto a la glucosa control (**Figura 7 A-C**). Por esta razón, se decidió utilizar esta concentración como medio de hiperglucemia ya

que reproduce un fenómeno asociado a la DMG y la inflamación de bajo grado. Cabe señalar que la inflamación asociada a la hiperglucemia es de bajo grado, si se compara con la inducida por un estímulo inflamatorio agudo como el LPS, que induce una inflamación de mayor magnitud.

Posteriormente se realizaron ensayos de viabilidad celular para asegurarnos que el tejido placentario es viable dentro de los tiempos experimentales. Como se observa en la **Figura 7D**, la exposición de los explantes placentarios con el medio de alta glucosa no modifica significativamente la viabilidad del tejido hasta las 96 horas de cultivo, respecto a la viabilidad observada con medio de glucosa control.

En paralelo, se montó la tinción de PAS para observar la acumulación de glucógeno intratejido (marca en magenta). Como se puede observar en la **Figura 7E y F**, los explantes cultivados en condiciones de hiperglucemia muestran mayores depósitos de glucógeno intravelloso, lo que coincide con este hallazgo histopatológico reportado en placentas de pacientes con DMG (Li et al., 2020).



Figura 7. Validación del modelo ex vivo de explantes placentarios cultivados en medio de alta glucosa. El cultivo de vellosidades placentarias en medio suplementado con glucosa 50 mM durante 48 horas induce la secreción de A) TNF-α, B) IL-6 e C) IL-1β. El tratamiento con LPS se aplicó una sola vez con 500 ng/mL. n = 8 experimentos independientes en triplicado. Prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn's como post hoc. Los datos se representan como la media y el rango intercuartil. Todas las comparaciones se hicieron contra el tratamiento de glucosa 10 mM: \*, p < 0.05. \*\*, p < 0.01. \*\*\*, p < 0.001. (D) Ensayo de viabilidad con XTT de explantes placentarios cultivados durante 96 horas con glucosa control o alta glucosa. n = 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA de dos vías (análisis de efecto combinado) seguido del post hoc de Tukey y Sídák para comparaciones múltiples pareadas. No se encontró diferencia significativa entre grupos. Los datos se presentan como media y desviación estándar. (E, F) Examen histológico de los depósitos de glucógeno mediante la tinción de PAS en explantes placentarios cultivados en medio de glucosa control (glucosa 10 mM) o hiperglucemia (glucosa 50 mM). Las flechas indican los depósitos de glucógeno. Micrografías representativas de cuatro experimentos independientes. En la esquina inferior derecha la escala indica 20 µm.

Posteriormente, se optó por verificar el efecto de la presión osmótica. El medio con glucosa 50 mM tiene una mayor presión osmótica que el medio con glucosa 10 mM, por lo que fue necesario asegurarnos que la inflamación observada era debido al metabolismo de la glucosa y no debido a la alta presión osmótica. Para comprobar esto se llevó a cabo un ensayo de osmolaridad, previamente descrito en la **sección 5.10**, por lo que a continuación se presentan los resultados en la **Figura 8**.



**Figura 8. El aumento en la presión osmótica no induce la secreción de las citocinas A) TNF-α, B) IL-6 e C) IL-1**β. Explantes cultivados durante 48 horas con distintas concentraciones de glucosa y manitol. n = 5 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan como media y desviación estándar. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey como post-hoc para comparaciones múltiples pareadas: \*, p < 0.05. \*\*, p < 0.01. \*\*\*\*, p < 0.001.

El manitol es un azúcar no metabolizable por lo que es utilizado para ensayos de osmolaridad. Como ya se mostró en la **Tabla 6**, la presión osmótica ejercida por los medios con manitol 40 o 45 mM es muy parecida a la presión osmótica del medio

con glucosa 50 mM (alrededor de los 350 mOsm). Sin embargo, como se observa en la **Figura 8,** ninguno de los medios ajustados con manitol induce la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6; de hecho, las concentraciones de estas citocinas son muy parecidas a las detectadas cuando el tejido se cultiva en medio con glucosa control. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de glucosa 5 y 10 mM. Sólo el cultivo de explantes placentarios en medio de glucosa 50 mM indujo la secreción de estos mediadores inflamatorios, y esto sólo debido al metabolismo de la glucosa y no debido a la presión osmótica ejercida por el medio.

## 6.3 Identificación de la cepa de S. agalactiae

Como ya se mencionó en la metodología, la cepa de *S. agalactiae* se obtuvo de la ATCC (27956), por lo que contábamos con su secuenciación genómica y la identificación de sus principales factores de virulencia. Sin embargo, decidimos confirmar mediante PCR que se tratara de una cepa pura *S. agalactiae*. A continuación, se presentan los resultados en la **Figura 9**.



Gen CpsG. S. agalactiae. MW: 87 pb

**Figura 9.** Identificación microscópica, macroscópica y molecular de *S. agalactiae*. A) Amplificación del *Gen CpsG* (peso molecular: 87 pb), mediante la técnica de PCR de punto final. El control positivo corresponde a una *S. agalactiae* previamente aislada en el INPer; se utilizó agua como control negativo. B) Morfología macroscópica de las colonias de *S. agalactiae*. Crecimiento de colonias  $\beta$ -hemolíticas en agar sangre. C) Tinción de Gram donde se observa la morfología de bacterias gram positivas con forma de coco y con agrupaciones de cadenas de perlas (señalado con flechas). En la esquina inferior derecha, la escala indica 10  $\mu m.$ 

En la literatura se indica que *S. agalactiae* es una bacteria gram positiva con morfología de coco y que forma agrupaciones en forma de cadenas de perlas. Además, su morfología de colonia se describe como pequeñas colonias que semejan gotas de rocío, translúcidas, redondas con bordes bien definidos (Edwars & Baker, 2015). Como podemos observar en la **Figura 9**, esta bacteria cumple con dicha descripción y no se observa contaminación por otras bacterias. Por lo que podemos afirmar que trabajamos con una bacteria pura. Además, mediante PCR confirmamos que se trata de *S. agalactiae* pues expresa el *Gen CpsG*, el cual codifica para una hexosiltransferasa previamente descrita en esta especie bacteriana (Uniprot: Q8VLK2).

# 6.4 Efecto de la hiperglucemia sobre la capacidad de defensa de la placenta frente a la infección por *S. agalactiae*

La placenta humana en condiciones de hiperglucemia tiene menor capacidad de defensa ante la infección por *S. agalactiae.* Lo anterior se refleja en el aumento significativo en el conteo de UFC/mL, tanto a las 4 como a las 8 horas post-infección (**Figura 10**).

De forma paralela, se realizó el conteo de la bacteria libre, es decir sin la presencia de explantes placentarios. Como puede observarse, el crecimiento libre bacteriano es muy similar al crecimiento con explantes que se mantuvieron en condiciones de glucosa control.

Por lo tanto, se puede concluir que la hiperglucemia debilita los mecanismos de defensa placentarios y favorece el crecimiento extracelular de *S. agalactiae*.



Figura 10. El conteo de UFC/mL de *S. agalactiae* es mayor cuando la placenta se cultiva en condiciones de hiperglucemia. Tras 48 horas de cultivo en medio de glucosa control (barras de color morado) o hiperglucemia (barras de color azul rey), se infectaron explantes placentarios con una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL de *S. agalactiae* durante 4 u 8 horas. Las barras de color azul claro indican el crecimiento libre de *S. agalactiae* sin explantes placentarios. n = 6 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan en forma de cajas (mediana y rango intercuartil) y bigotes (mínimo – máximo). Test de Mann-Whitney. \*, p < 0.05. \*\*\*, p < 0.001.

#### 6.5 Invasión placentaria de S. agalactiae en el modelo de alta glucosa

Además de cuantificar la carga bacteriana en el medio de cultivo de los explantes placentarios, se realizó la tinción de Brown-Hopps para observar la capacidad de invasión de *S. agalactiae* en la vellosidad placentaria. A continuación, se presentan microfotografías de la vellosidad placentaria invadida por *S. agalactiae*.



Figura 11. La hiperglucemia promueve una mayor invasividad de *S. agalactiae* en la vellosidad placentaria tras 8 horas de infección. Las flechas señalan a la bacteria retenida en la barrera sincitial. Microfotografías representativas de tres experimentos independientes. En la esquina inferior derecha se indica la escala de 50 µm.

Como se observa en la **Figura 11**, *S. agalactiae* presenta una coloración azul al ser una bacteria gram positiva. Las microfotografías se tomaron en explantes infectados durante 8 horas. Se observa que, en condiciones con altas concentraciones de glucosa, la bacteria tiene mayor adherencia por el sinciciotrofoblasto y se pueden apreciar múltiples cuerpos bacterianos delineando la vellosidad placentaria. Por lo tanto, la placenta puede contener la infección a nivel de la barrera sincitial, pero la hiperglucemia debilita esta capacidad de defensa.

# 6.6 Secreción de quimiocinas por parte de la placenta humana pretratada con medio de hiperglucemia y en respuesta a la infección por *S. agalactiae*

Después de observar la menor capacidad de defensa de la placenta contra *S. agalactiae,* proseguimos a estudiar el perfil de secreción de quimiocinas, ya que estas moléculas cumplen un rol primordial al orquestar la migración de células inmunes que ayudan a eliminar las bacterias (Sokol & Luster, 2015).



Figura 12. La hiperglucemia disminuye la secreción placentaria de las quimiocinas A) CCL-2, B) CCL-3, C) CCL-5, D) CXCL-8, E) CXCL-10 y F) CXCL-16 en respuesta a la infección con *S. agalactiae*. En morado se muestran los explantes cultivados en medio de glucosa control, y en azul aquellos cultivados en medio alto en glucosa. Las barras con puntos blancos indican los explantes infectados por *S. agalactiae*. Al término de los tiempos de infección (4 y 8 horas) se recolectó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de quimiocinas. n = 5 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan como media y desviación estándar. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey como posthoc para comparaciones múltiples pareadas. \*, p < 0.05. \*\*, p < 0.01. \*\*\*, p < 0.001.
Nosotros hipotetizamos que las placentas cultivadas en medio de hiperglucemia aumentarían la secreción de quimiocinas en respuesta a la infección por *S. agalactiae* ya que ambos (hiperglucemia e infección), por sí solos, constituyen estímulos inflamatorios, pero sorprendentemente el efecto observado fue opuesto. Como se observa en la **Figura 12**, la secreción de CCL-2, CCL-3, CXCL-8 y CXCL-16 se vio disminuida en placentas cultivadas en medio de hiperglucemia e infectadas con *S. agalactiae* a las 8 horas post infección. Por otra parte, la infección por *S. agalactiae* no aumentó la secreción de CCL-5 ni CXCL-10 con respecto a explantes sin infectar.

# 6.7 Migración de células mononucleares intervellosas en respuesta a la infección por *S. agalactiae* en placentas cultivadas en condiciones de hiperglucemia

La menor síntesis de quimiocinas podría modificar el perfil de atracción de células inmunes a la placenta, por lo que se decidió realizar ensayos funcionales de migración.

Para estos ensayos se aislaron células mononucleares intervellosas a partir de sangre placentaria.



Figura 13. La hiperglucemia disminuye la capacidad de quimioatraer células mononucleares intervellosas en respuesta a la infección por *S. agalactiae*. Para el ensayo de migración se utilizaron los medios condicionados de placenta tras 8 horas de infección por *S. agalactiae*. n = 5 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan como media y desviación estándar. Prueba T de Student no pareada. \*, p < 0.05. Control positivo: Medio RPMI 1640 + SFBi 20%.

Siguiendo en línea con lo observado en la sección anterior, donde las placentas cultivadas en medio de hiperglucemia e infectadas con *S. agalactiae* disminuyeron su producción de las quimiocinas CCL-2, CCL-3, CXCL-8, y CXCL-16, esperábamos observar una menor migración de células inmunes, lo cual, como se observa en la **Figura 13**, termina ocurriendo. Las placentas cultivadas en medio de hiperglucemia e infectadas con *S. agalactiae* atraen menos IVMCs que aquellas placentas cultivadas en medio control, e incluso el número de células migrantes es similar al tratamiento sin infección (Glucosa 50: 7794 células *vs* Glucosa 50 + *S. agalactiae*:

8293 células), por lo que, es de esperar que en estas condiciones la placenta no sea capaz de enfrentarse adecuadamente a una infección.

## 6.8 Caracterización fenotípica de las células inmunes que migran en respuesta a la infección por *S. agalactia*e

El siguiente paso fue determinar el fenotipo de las células migrantes, y determinar si una estirpe se ve más afectada que otra.



Figura 14. Atracción de IVMCs por medios condicionados de placenta infectada por *S. agalactiae*. Migración de A) monocitos, B) linfocitos T, C) linfocitos B, D) NKs, y E) NKTs. n = 4 experimentos independientes. Los datos se presentan como media y error estándar. Prueba T de Student no pareada. No se encontró diferencia significativa entre grupos. Control positivo: Medio RPMI 1640 + SFBi 20%.

Como se observa en la **Figura 14**, la hiperglucemia tiende a disminuir la migración de monocitos, linfocitos T, linfocitos B, células NK y células NKT de forma generalizada; sin embargo, no se observó diferencia estadística entre grupos.

Esto podría indicarnos que la disminución en la capacidad quimiotáctica de la placenta humana no afecta la migración de alguna estirpe celular en específico, sino que en general tiende a disminuir la migración de monocitos, linfocitos T, linfocitos B, células NK y células NKT.

### 6.9 La infección por *S. agalactiae* no disminuye la viabilidad de explantes placentarios tras 8 horas de infección

Después de observar que los explantes placentarios cultivados en medio de hiperglucemia y posteriormente infectados por *S. agalactiae* disminuyen la secreción de CCL-2, CCL-3, CXCL-8 y CXCL-16, y que muestran una reducida capacidad de quimioatraer células mononucleares intervellosas, nos preguntamos qué factores podrían ocasionar este fenómeno.

Una de las hipótesis es que la infección e hiperglucemia pueden disminuir la viabilidad de los explantes, y que, por lo tanto, la disminución en la secreción de quimiocinas fuera debido a una menor viabilidad del tejido. Para responder esta pregunta realizamos un ensayo de viabilidad con XTT.



Figura 15. La infección por *S. agalactiae* no disminuye la viabilidad de los explantes placentarios en cultivo. n = 3 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan como media y desviación estándar. ANOVA de una vía. No se encontró diferencia entre grupos.

Con este resultado podemos descartar que la disminución en la secreción de quimiocinas sea debido a que la infección, o la condición combinada de infección e hiperglucemia, disminuya la viabilidad del tejido. Por lo tanto, debe existir algún otro mecanismo que esté regulando la secreción de quimiocinas.

## 6.10 La hiperglucemia en conjunto con una infección por *S. agalactiae* disminuyen la producción placentaria de TLR-2

Tras asegurarnos que la infección por *S. agalactiae* no disminuye la viabilidad de los explantes placentarios, se planteó la posibilidad de una reducción en la síntesis de TLR-2 para explicar por qué disminuye la secreción de las quimiocinas antes descritas. Para responder a ello, se realizó la cuantificación intracelular de TLR-2 mediante un kit de ELISA.



Figura 16. La hiperglucemia disminuye la expresión de TLR-2 en respuesta a la infección por *S. agalactiae*. n = 4 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan como media y desviación estándar. Prueba T de Student no pareada. \*, p < 0.05.

Se observó que no hay cambios en la expresión de TLR2 con los tratamientos de glucosa control y alta glucosa sin infección, así como glucosa control e infección por *S agalactiae*. Sin embargo, la condición combinada de hiperglucemia e infección resultó en una reducción significativa de la abundancia intracelular de TLR2 (Figura 16). Con este resultado es posible sugerir que la disminución en la secreción de quimiocinas en respuesta a la infección por *S. agalactiae* en explantes cultivados en medio de hiperglucemia es debido a la disminución en la síntesis de TLR-2, ya que este receptor desencadena vías de señalización que promueven la síntesis y secreción de citocinas y quimiocinas.

#### 6.11 Identificación de la cepa de E. coli

En la literatura se indica que *E. coli* es una bacteria gram negativa con morfología de bacilo y que no forma agrupaciones; además, su morfología en cultivo se describe como: colonias de color blanco, opacas, redondas y con bordes bien definidos (Lüthje & Brauner, 2014). Como podemos observar en la Figura 17, esta bacteria cumple con la descripción de E. coli y no se observa contaminación por otras bacterias con diferente morfología bacteriana. Por lo que podemos afirmar que se trabajó con una bacteria pura. Además, mediante PCR se confirmó que se trata de *E. coli* pues expresa el *Gen OmpT*, el cual codifica para una aspartilproteasa de la membrana externa, previamente descrita en esta especie bacteriana (Uniprot: P09169).



Gen OmpT. E. coli. MW: 92 pb

Figura 17. Identificación microscópica, macroscópica y molecular de E. coli. Mediante la técnica de PCR y electroforesis en gel de agarosa se identificó A) el Gen OmpT con un peso molecular de 92 pb. El control positivo corresponde a una E. coli previamente aislada en el Instituto Nacional de Perinatología, y se utilizó agua como control negativo. Asimismo, se observó y se realizó B) tinción de Gram. En la esquina inferior derecha la escala indica 10 μm.

### 6.12 Efecto de la hiperglucemia sobre la capacidad de defensa de la placenta frente a la infección por *E. coli*

La placenta humana en condiciones de hiperglucemia tiene menor capacidad de defensa ante la infección por *E. coli,* reflejándose en el aumento en el conteo de UFC/mL tanto a las 4 como a las 8 horas post-infección (**Figura 18**). Por otra parte, el conteo de la bacteria libre fue mayor que el observado con cualquiera de los tratamientos en los explantes placentarios. Esto quiere decir que la placenta presenta una actividad microbicida importante contra este bacilo. Por lo tanto, se puede concluir que la hiperglucemia debilita los mecanismos de defensa placentarios y favorece el crecimiento extracelular de *E. coli*.



Figura 18. El conteo de UFC/mL de *E. coli* es mayor cuando la placenta se cultiva en condiciones de hiperglucemia. Tras 48 horas de cultivo en medio de glucosa control (barras de color verde) o hiperglucemia (barras de color rojo) se infectaron explantes placentarios con una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL de *E. coli* durante 4 u 8 horas. Las barras de color crema indican el crecimiento libre de *E. coli* sin explantes placentarios. *n* = 8 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan en forma de cajas (mediana y rango intercuartil) y bigotes (mínimo – máximo). Test U de Mann-Whitney. \*\*\*, *p* < 0.001. \*\*\*\*, *p* < 0.0001.

#### 6.13 Invasión placentaria de E. coli en el modelo de alta glucosa



Figura 19. La hiperglucemia promueve una mayor invasividad de *E. coli* en la vellosidad placentaria. Las flechas señalan zonas con cúmulos bacterianos. Microfotografías representativas de tres experimentos independientes. En la esquina inferior derecha se indica la escala de 50  $\mu$ m. Fotos tomadas en conjunto con Arumi Villafuerte. Incluidas en la tesis (Villafuerte Pérez, 2023).

Como se observa en la **Figura 19**, *E. coli* presenta una coloración roja al ser una bacteria gram negativa. Las microfotografías se tomaron en explantes infectados durante 8 horas. En condiciones de glucosa control, *E. coli* es detenida a nivel de la barrera sincitial. Sin embargo, cuando los explantes fueron incubados con glucosa 50 mM, la bacteria invadió la vellosidad placentaria, atravesó la barrera sincitial y llegó al mesénquima placentario. Este resultado nos indica que la capacidad de defensa de la placenta humana es menos eficiente contra *E. coli* que contra *S. agalactiae*, ya que en el caso de esta última sí fue capaz de retenerla en la barrera sincitial. En resumen, la hiperglucemia debilita la defensa de la placenta pues pierde la capacidad de retener la infección por *E. coli* en la barrera sincitial.

### 6.14 Secreción de quimiocinas por parte de la placenta humana pretratada con medio de hiperglucemia y en respuesta a la infección por *E. coli*

Después de observar la menor capacidad de defensa de la placenta contra *E. coli,* proseguimos a estudiar el perfil de secreción de quimiocinas.











Figura 20. Secreción placentaria de las quimiocinas A) CCL-2, B) CCL-3, C) CCL-5 D) CXCL-8, E) CXCL-10 y F) CXCL-16 en respuesta a la hiperglucemia y la infección por *E. coli.* Tras incubar explantes placentarios durante 48 horas en condiciones de glucosa control (barras verdes) o hiperglucemia (barras rojas), se infectaron con  $1\times10^5$  UFC/mL de *S. agalactiae* durante 4 u 8 horas. Las barras con puntos blancos indican los explantes infectados por *E. coli.* n = 5 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan como media y desviación estándar (A, C, D y F) o en forma de cajas (mediana y rango intercuartil) y bigotes (mínimo – máximo) (B y E). ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey como post-hoc, para el caso de A, C, D y F. Prueba de Krustal-Wallis seguido de la prueba de Dunn como post hoc, en el caso de B y E. \*, p < 0.05. \*\*, p < 0.01.

A diferencia de lo observado en el caso de *S. agalactiae*, los explantes cultivados en condiciones de hiperglucemia e infectados por *E. coli* no disminuyeron la secreción de ninguna quimiocina en estudio respecto a los explantes cultivados en medio control. Además, la infección por *E. coli* sólo indujo la secreción de CCL-3, CCL-5 y CXCL-8 respecto a explantes no infectados, a las 8 horas post-infección (**Figura 20**).

Estos resultados sugieren que la placenta es capaz de montar una respuesta patógeno-específica. Asimismo, dado que la condición combinada de infección con *E. coli* e hiperglucemia no disminuyó la secreción de ninguna quimiocina en comparación con los explantes infectados y con glucosa control, es de esperarse que no se modifique la capacidad de quimioatracción de la vellosidad placentaria.

### 6.15 Migración de células mononucleares intervellosas en respuesta a la infección por *E. coli* en placentas cultivadas en condiciones de hiperglucemia

Para comprobar si la capacidad placentaria para quimioatraer células inmunes no se veía afectada ante la infección por *E. coli,* se realizaron ensayos de migración de células mononucleares intervellosas.



Figura 21. La hiperglucemia no disminuye la capacidad de quimioatraer células mononucleares intervellosas en respuesta a la infección por *E. coli.* n=7 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan como media y desviación estándar. Prueba T de Student no pareada. \*, p < 0.05. Control positivo: Medio RPMI 1640 + SFBi 20%.

En concordancia con el aumento de la secreción de las quimiocinas CCL-3, CCL-5 y CXCL-8 en respuesta a la infección por *E. coli* en glucosa control (**Figura 20**), en esta **Figura 21** se puede observar mayor migración de IVMCs en el grupo infectado y con glucosa control. La condición combinada de hiperglucemia e infección no modificó lacapacidad de quimioatracción de IVMCs, en comparación con la infección en glucosa control.

### 6.16 Caracterización fenotípica de las células inmunes que migran en respuesta a la infección por *E. coli*

Después de determinar que la infección por *E. coli* induce la migración de IVMCs, el siguiente paso fue determinar si la placenta humana quimioatrae alguna estirpe celular en especial dentro de las IVMCs.



Figura 22. Atracción de IVMCs por medios condicionados de placenta infectada por *E. coli*. Migración de: A) monocitos, B) linfocitos T, C) linfocitos B, D) NKs, o E) NKTs. n = 3 experimentos independientes. Los datos se presentan como media y error estándar. Prueba T de Student no pareada. No se encontró diferencia significativa entre grupos. Control positivo: Medio RPMI 1640 + SFBi 20%.

En el caso de la infección por *E. coli*, como se muestra en la **Figura 22**, no se observó que la placenta pueda atraer selectivamente alguna estirpe celular. De

hecho, se observa que los explantes cultivados en hiperglucemia e infectados quimioatraen prácticamente la misma cantidad de monocitos, linfocitos T, células NK y células NKT respecto a las placentas cultivadas en medio control. Sólo se observa un ligero aumento en la migración de linfocitos B en placentas cultivadas en hiperglucemia e infectadas respecto a las placentas infectadas y cultivadas en glucosa control, aunque no mostró diferencia significativa.

### 6.17 La infección por *E. coli* no disminuye la viabilidad de explantes placentarios tras 8 horas de infección

Finalmente, se comprobó si la infección por *E. coli* no disminuye la viabilidad de los explantes placentarios, y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos después de 8 horas de infección (**Figura 23**). Por lo tanto, no se encuentra comprometida la viabilidad del tejido debido a la infección con este bacilo.



Figura 23. La infección por *E. coli* no disminuye la viabilidad de explantes placentarios. n = 3 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan como media y desviación estándar. ANOVA de una vía. No se encontró diferencia entre grupos.

#### VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El embarazo conlleva múltiples adaptaciones físicas, hormonales e inmunológicas que permitirán la supervivencia y desarrollo del feto (Kohlhepp et al., 2018).

Específicamente hablando de la adaptación inmunológica, desde los trabajos de Peter Medawar se ha hablado de una paradoja del embarazo, ya que a pesar del que el feto expresa antígenos paternos (por lo que se le considera un producto semi alogénico), el sistema inmune de la madre no lo rechaza (Medawar, 1961). Hoy en día se sabe que un actor principal en este estado de inmunotolerancia es la placenta, la cual participa activamente como un órgano inmunoregulador que permite el desarrollo del feto semialogénico a la vez que mantiene la capacidad de responder ante un reto infeccioso (Zaga-Clavellina et al., 2021).

Se conocen varios posibles mecanismos que ayudan a mantener este estado de inmunotolerancia durante el embarazo, por ejemplo: a) expresión del antígeno leucocitario humano G (HLA-G) en células trofoblásticas, el cual inhibe la citotoxicidad de las células NK; b) generación de células dNK con fenotipo CD56<sup>superbright</sup>CD16<sup>-</sup>, por lo que presentan menor actividad citotóxica que las NK periféricas (con fenotipo CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>); c) mayor producción de células T reguladoras en sangre periférica y en decidua; d) expresión de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en monocitos deciduales, lo que lleva a la apoptosis de células T reactivas; e) arresto de células dendríticas en un estado tolerogénico a través de la secreción de galectina 1 y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) por parte de células deciduales; entre otros (Arck & Hecher, 2013; Valencia-Ortega et al., 2020).

Sin embargo, esto no significa que la placenta y la madre queden desprovistos de la capacidad de montar respuestas inmunes frente a diversos patógenos como bacterias, virus, parásitos u hongos (Hoo et al., 2020). La expresión de TLRs en la placenta permite detectar la presencia de patógenos, con la subsecuente secreción de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6 (Xiao et al., 2022); quimiocinas como CCL-2, CCL-3, CCL-5, CXCL-8, CXCL-10, CXCL-12 o CXCL-16 (Argueta et al., 2022; Fan

et al., 2019; Guo et al., 2022; Ma et al., 2007; Megnekou et al., 2023); y péptidos antimicrobianos (Olmos-Ortiz, Flores-espinosa, et al., 2019).

Desafortunadamente, algunas condiciones patológicas del embarazo pueden vulnerar la capacidad de defensa placentaria, siendo una de estas condiciones la DMG. Por ejemplo, se ha descrito que pacientes con DMG ven alterado su perfil de secreción de quimiocinas como CCL-2, CXCL-8 y CXCL-12 (Liu et al., 2022). También se ha observado que la expresión y producción de péptidos antimicrobianos se ve disminuida en modelos murinos, *in vitro* y en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Andersen et al., 2016; Froy et al., 2007; Jiménez-Escutia et al., 2023; Lan et al., 2012; Lan et al., 2011). En conjunto con lo anterior, se ha descrito que pacientes con DMG tienen el doble de riesgo de desarrollar infecciones del tracto urinario e infecciones cervicovaginales (Rafat et al., 2021; Yefet et al., 2023; Zhang et al., 2018). Debido a lo anterior, en este trabajo se investigó el efecto que tiene la hiperglucemia sobre la secreción de quimiocinas ante un reto infeccioso por *S. agalactiae* o *E. coli*, así como su efecto sobre la capacidad placentaria para quimioatraer células inmunes en respuesta a estas infecciones.

En nuestro grupo de trabajo estandarizamos las condiciones experimentales para simular un estado de hiperglucemia severa las cuales consisten en incubar explantes placentarios durante 48 horas en medio DMEM ajustado a una concentración de glucosa 50 mM como medio hiperglucémico y medio DMEM ajustado a una concentración de glucosa 10 mM como medio control (Jiménez-Escutia et al., 2023). En este estudio, el medio de glucosa 50 mM induce la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6 y el aumento de depósitos de glucógeno en la vellosidad placentaria, ambos fenómenos previamente reportados a nivel periférico y de placenta de pacientes con DMG (Huang et al., 2022; Li et al., 2020). Es importante aclarar que el estímulo inflamatorio debido al cultivo de explantes en medio ajustado a glucosa 50 mM fue de menor grado que el observado con el tratamiento con LPS de *E. coli*, antígeno ampliamente utilizado como inductor de un proceso inflamatorio agudo tanto en cultivos celulares como en modelos animales (Olmos-Ortiz, Déciga-García, et al., 2019; Preciado-Martínez et al., 2018; Zavan et

al., 2016). La explicación de este fenómeno se encuentra en que el estado inflamatorio asociado a las enfermedades crónicas como la diabetes mellitus tipo 2 es conocido como meta-inflamación (inflamación metabólica), cuya principal característica es un estado inflamatorio de bajo grado sostenido a lo largo del tiempo, que puede ser por meses (como en la DMG) o años (diabetes mellitus tipo 2, hipertensión) (Catalano, 2014; Huang et al., 2022; Tagoma et al., 2022). Durante la estandarización del modelo no se consideró estudiar el efecto inflamatorio del LTA, estímulo que simula una infección por bacterias gram positivas, ya que este antígeno es menos inmunogénico que el LPS y lo que se buscaba con este control era observar una inflamación aguda asociada a una infección, por lo que se consideró que ese objetivo se alcanzaba con el solo estímulo con LPS.

Asimismo, verificamos mediante ensayos de viabilidad con el reactivo XTT que el medio con altas concentraciones de glucosa no modifica la viabilidad del tejido tras 96 horas de cultivo. Finalmente, verificamos que la inflamación tisular no fuera debido a la presión osmótica del medio y comprobamos que la inflamación es debido al metabolismo de la glucosa, ya que el aumento en la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6 solo se observó en explantes cultivados en medio de hiperglucemia y no en aquellos medios con manitol que simulaban la presión osmótica del medio ajustado a glucosa 50 mM. Con esto, planteamos un modelo capaz de replicar fenómenos observados clínicamente en pacientes con DMG y que nos permitió trabajar con un tejido vivo durante 96 horas.

Como ya se mencionó, las pacientes con DMG tienen mayor riesgo de padecer infecciones bacterianas, y entre los patógenos causantes de éstas podemos encontrar: a) *S. agalactiae*, una bacteria gram positiva que está presente en el 20% de las mujeres embarazadas; y b) *E. coli*, bacteria gram negativa causante del 80% al 90% de las infecciones de vías urinarias en embarazadas en México (Dautt-Leyva et al., 2018). A nivel mundial y en México, las infecciones por estos patógenos se relacionan con un mayor riesgo de presentar ruptura prematura de membranas y parto pretérmino (Kalinderi et al., 2018; Rafat et al., 2021). Sin embargo, aún no se

han estudiado a profundidad los mecanismos que provocan este mayor riesgo de padecer infecciones en una paciente con DMG.

En nuestro estudio, observamos que el cultivo de explantes placentarios en medio de hiperglucemia disminuye la capacidad de defensa placentaria frente a la infección por *S. agalactiae* o *E. coli*. Además, la hiperglucemia favoreció la proliferación y adherencia de *S. agalactiae* a la barrera sincitial de la vellosidad placentaria; mientras que en el caso de *E. coli*, la hiperglucemia permitió a esta bacteria atravesar el sinciciotrofoblasto e invadir la mesénquima placentaria. Cabe señalar que esto representa un escenario adverso, pues la infección que ha llegado al interior de la vellosidad podría cruzar directamente hacia el feto. Este doble escenario de infección más hiperglucemia severa es común en la práctica clínica (Beksac et al., 2019; Nicolle et al., 2019; Rafat et al., 2021; Yefet et al., 2023; Zhang et al., 2018).

Tras observar el debilitamiento de la defensa placentaria debido a la hiperglucemia, proseguimos a estudiar su efecto sobre la secreción de quimiocinas en la placenta durante la infección por *S. agalactiae* o *E. coli*. Las quimiocinas son importantes mediadores de la respuesta inmune ya que su principal función es la quimioatracción de células leucocitarias hacia el sitio de la infección para su eliminación y eventual resolución; por lo que la desregulación en estos importantes péptidos podría resultar en la atenuación de uno de los mecanismos naturales para eliminar a los patógenos.

En este estudio observamos que la hiperglucemia disminuyó la secreción de las quimiocinas CCL-2, CCL-3, CXCL-8 y CXCL-16, tras la infección con *S. agalactiae*. Estas quimiocinas son responsables de la quimioatracción de monocitos y células NK por parte de CCL-2; de linfocitos T, células NK y macrófagos por parte de CCL-3; de neutrófilos por parte de CXCL-8; y de monocitos y células NKT por parte de CXCL-16 (Arck & Hecher, 2013; Aslani et al., 2021; Nagarsheth et al., 2017; Sokol & Luster, 2015). Por lo que esta menor capacidad de la placenta humana para secretar quimiocinas en el contexto de hiperglucemia y una infección por *S*.

agalactiae conlleva, nuevamente, a un debilitamiento en su capacidad de defensa al no poder reclutar células inmunes.

Mediante un ensayo funcional de migración se verificó si este doble estímulo inflamatorio de hiperglucemia e infección, asociado con una menor producción de quimiocinas, efectivamente resultaba en una menor quimioatracción de células inmunes por parte de la placenta. En nuestro estudio decidimos utilizar a la células mononucleares intervellosas (IVMCs) población de compuesta mayoritariamente por linfocitos T, seguido de monocitos, células NK, y finalmente linfocitos B (Solders et al., 2017; Vega-Sanchez et al., 2010). Como su nombre lo indica, esta población se encuentra en la sangre intervellosa y se encuentra en contacto directo con la placenta. Además, son capaces de responder ante un gradiente de quimiocinas (Solders et al., 2019), siendo capaces de actuar contra patógenos en este tejido. Debido a esto y a su fácil obtención, se decidió trabajar con estas poblaciones leucocitarias.

Tras los ensayos de migración observamos que, de acuerdo con la secreción de quimiocinas y tal como se esperaba, la capacidad de la placenta para quimioatraer IVMCs disminuía cuando era expuesta a la hiperglucemia y la infección por *S. agalactiae*. Posteriormente, se evaluó si había alguna población en particular que migrara menos ante estos estímulos, pero ninguna de ellas fue afectada de forma específica, sino que todas disminuyeron su migración de forma generalizada.

Por otra parte, el escenario ante la infección placentaria por *E. coli* fue distinto. Si bien se observó que la hiperglucemia también disminuye la capacidad de defensa contra este bacilo (conteo de UFC/mL e invasividad en la vellosidad placentaria), la condición combinada de hiperglucemia e infección no modificó ni la secreción de quimiocinas, la migración de IVMCs ni de sus poblaciones.

Por otra parte, para entender qué mecanismos podrían explicar la menor secreción de quimiocinas y atracción de IVMCs ante la hiperglucemia y la infección placentaria por *S. agalactiae*, se consideraron 3 hipótesis: afectación de la viabilidad del tejido placentario, cambio en el perfil de expresión de TLR-2, o mecanismos de represión molecular para la expresión de quimiocinas.

Con los ensayos de XTT observamos que la infección por *S. agalactiae* no disminuye la viabilidad de los explantes placentarios expuestos a glucosa control o alta glucosa, al menos a la concentración empleada (1x10<sup>5</sup> UFC/mL) y durante 8 horas post-infección. Por lo tanto, este mecanismo no es responsable de la disminución en la secreción de quimiocinas y la atracción de IVMCs que se demostraron en esta tesis. De forma paralela, se comprobó que la infección por *E. coli* tampoco disminuye la viabilidad del cultivo de explantes placentarios.

Para el estudio de la segunda hipótesis, se debe considerar que *S. agalactiae* es una bacteria gram positiva y *E. coli* una gram negativa; esto implica que el principal antígeno de la primera sea el ácido lipoteicoico y que el principal antígeno del segundo sea el LPS (Becerra et al., 2016). El ácido lipoteicoico es reconocido en nuestras células a través del dímero TLR2/TLR6 (Santos- Sierra et al., 2006) mientras que el LPS es reconocido a través de TLR4 (Oliveira & Reygaert, 2021); ambos receptores al ser activados llevan a cabo cascadas de señalización que finalmente llevan a la producción y secreción de citocinas y quimiocinas (Kim et al., 2011; Ubanako et al., 2019). Por esta razón se consideró explorar si la hiperglucemia podría desregular la expresión de estos receptores en la placenta humana.

Se sabe que la placenta expresa los 10 TLRs a lo largo de toda la gestación, y específicamente los TLR2/TLR6 y TLR4 presentan una mayor abundancia durante el tercer trimestre del embarazo (Olmos-Ortiz et al., 2019), por lo que son perfectamente capaces de sensar y responder ante la infección por *S. agalactiae* o *E. coli*. Se ha descrito que las placentas provenientes de madres con DMG tienen una mayor expresión de TLR4, y esto se ha relacionado con la hiperglucemia (Li et al., 2020). Por otro lado, no fue posible encontrar en la literatura un antecedente sobre la expresión de TLR2 o TLR6 en placentas de madres con DMG, pero sí se encontró evidencia proveniente de un modelo de obesidad inducida en rata donde se detectó una disminución en la expresión de TLR-2 en el riñón y en el cerebro (Froy et al., 2007). Adicionalmente, se describió que en macrófagos provenientes de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y con infección grave por *M. tuberculosis*,

presentaron una menor expresión de TLR-2 respecto a pacientes con diabetes mellitus tipo 2 pero no infectados (Panda et al., 2022).

Mediante un ensayo de ELISA cuantificamos la expresión del TLR-2 en respuesta a los estímulos de hiperglucemia y/o infección por *S. agalactiae*. Tras 8 horas postinfección, el doble estímulo de hiperglucemia e infección resultó en una disminución significativa en la expresión del TLR-2. Este resultado concuerda con la disminución en la secreción de quimiocinas, ya que, si disminuye la expresión de TLR-2, también disminuye la detección de este patógeno y no se activan las vías de señalización, como la vía de NF-κB, involucradas en la síntesis de citocinas y quimiocinas (Kim et al., 2011).

Por ende, hasta el momento podemos proponer que el doble estímulo inflamatorio de hiperglucemia e infección por *S. agalactiae* disminuyen la expresión del TLR-2, lo que disminuye la activación de vías de señalización como NF-κB resultando en una menor síntesis y secreción de quimiocinas en respuesta a la infección. Finalmente, al disminuir la producción de quimiocinas la placenta, disminuye su capacidad de quimioatraer células inmunes, como las IVMCs, hacia el sitio de infección. Sin embargo, aún no es claro cuál es el mecanismo responsable de esta disminución en la expresión del TLR-2 placentario, por lo que es necesario seguir estudiando con mayor profundidad este fenómeno.

La tercera hipótesis planteada, que considera mecanismos de represión molecular, podría estar relacionada con el mecanismo de tolerización de citocinas. Este mecanismo ha sido descrito en macrófagos, en los que se observó que tras una primera exposición al LPS, éstos secretaban grandes cantidades de TNF- $\alpha$  (Foster et al., 2007). Sin embargo, si a las 24 horas estos mismos macrófagos eran re-estimulados con LPS, la producción de TNF- $\alpha$  era abatida y, en su lugar, se secretaban marcadores anti-inflamatorios y antimicrobianos (Foster et al., 2007). De esta forma, la re-exposición a estímulos inflamatorios (en este caso el LPS), abate la producción de citocinas inflamatorias. Interesantemente, este mismo fenómeno no sólo se ha observado con el LPS sino también ante la re-exposición a otros estímulos como el ácido lipoteicoico (Yoon et al., 2017). Dado que las quimiocinas

son consideradas marcadores pro-inflamatorios y la producción de muchas de ellas depende también del estímulo por TNF- $\alpha$  (Deshmane et al., 2009; Dutta & Bishayi, 2021; Fujita et al., 2004; Wang et al., 2021), es posible pensar que el doble estímulo inflamatorio, primero por la hiperglucemia y después por la infección, lleve a que la placenta disminuya la producción de TNF- $\alpha$  y de quimiocinas como un mecanismo de tolerización que evite una respuesta inmune exacerbada, y que finalmente provoque daños al feto en desarrollo como ruptura prematura de membranas o parto pretérmino. Esto abre camino a un nuevo trabajo de investigación que debe centrarse en explicar el mecanismo responsable de la disminución en la secreción de quimiocinas cuando la placenta se infecta con *S. agalactiae* en el contexto de hiperglucemia severa, pues podría derivar en un tratamiento clínico que ayude a disminuir el riesgo de infección en mamás con DMG.

Finalmente, es necesario mencionar las limitaciones y ventajas del presente trabajo. Como se mencionó en la metodología, un criterio de inclusión fue que las pacientes no presentaran enfermedades metabólicas, por lo que no se aceptaron muestras de placenta provenientes de mujeres con obesidad pregestacional. Sin embargo, sí se aceptaron muestras de placenta provenientes de mujeres con sobrepeso pregestacional.

Lo anterior es una limitación del modelo ya que se ha descrito que pacientes con sobrepeso presentan alta concentración de proteína C reactiva (10 µg/mL) (Morel et al., 2015). Además, se ha demostrado que las placentas provenientes de mujeres con sobrepeso pregestacional presentan un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Mele et al., 2014). Por ende, estas placentas pudieron presentar variaciones en su perfil de secreción de quimiocinas respecto a las placentas provenientes de mujeres sin sobrepeso pregestacional. La razón por la que se aceptó incluir estas pacientes en el estudio fue debido a que el sobrepeso es una condición muy común en nuestro país (35.8%), por lo que limitar el estudio a sólo pacientes con normopeso hubiera retrasado la obtención de muestras biológicas y lograr el tamaño de muestra deseado. Reconocemos esta limitante en

la presente tesis. Además, no se realizó un ajuste estadístico para evaluar el efecto de covariables como la ganancia de peso, el peso de la placenta o el sexo del bebé.

Otra limitación del modelo son las concentraciones de glucosa: 10 mM en el grupo control y 50 mM en el grupo de hiperglucemia, ya que equivalen a 180 mg/dL y 900 mg/dL respectivamente. En el caso del grupo de glucosa control, es equivalente a las concentraciones de glucosa observadas una hora posterior a la ingesta de 75 g de glucosa en la prueba oral de tolerancia a la glucosa. Mientras que la concentración de glucosa del grupo de hiperglucemia difícilmente se puede observar en la clínica. Las razones por las que se eligió estas concentraciones son las siguientes: a) para el cultivo de explantes placentarios se recomienda el uso de los medios DMEM-F12 o RPMI-1640 los cuales tienen una concentración de glucosa 11 mM, razón por la cual se decidió utilizar glucosa 10 mM como grupo control; b) la concentración de glucosa 50 mM en nuestro modelo reprodujo dos condiciones observadas en placentas provenientes de mujeres con DMG: aumento en la secreción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) y aumento en los depósitos intravellosos de glucosa y glucógeno, c) comprobamos que la concentración de glucosa 50 mM no disminuye la viabilidad del tejido y que la presión osmótica no es la desencadenante de la respuesta inflamatoria, sino que es debido al metabolismo de la glucosa.

Como ya se mencionó, una ventaja de nuestro modelo es que nos permitió reproducir *in vitro* dos fenómenos clínicos observados en placentas provenientes de mujeres con DMG: el aumento en la secreción de marcadores proinflamatorios y el aumento de depósitos de glucógeno. Además, este modelo de explantes placentarios nos permite trabajar con el tejido íntegro, manteniendo la microarquitectura tridimensional de las vellosidades placentarias, por lo que las respuestas que observamos son debido al conjunto de las interacciones de todas las estirpes celulares presentes en la vellosidad.

Otra ventaja adicional de nuestro modelo es que las líneas celulares inmortalizadas de trofoblasto y de coriocarcinoma presentan diferencias genéticas respecto al trofoblasto aislado de placentas, por lo que los resultados obtenidos con estas líneas

no necesariamente representan la realidad de lo que sucede *in vivo* y deben tomarse con cuidado. Además, al trabajar con explantes placentarios provenientes de placentas de diferentes mujeres podemos observar la natural heterogeneidad biológica entre pacientes, por lo que los resultados muestran un mayor acercamiento a lo que sucede en la práctica clínica que lo que podría mostrarse con una sola línea celular.

#### VIII. CONCLUSIÓN

Las placentas cultivadas en condiciones de hiperglucemia disminuyen su capacidad de defensa frente a la infección por *S. agalactiae* o *E. coli,* lo que se refleja en aumento en el conteo de colonias y mayor invasividad o adherencia al tejido. Asimismo, las placentas cultivadas en condiciones de hiperglucemia tienen menor secreción de las quimiocinas CCL-2, CCL-3, CXCL-8 y CXCL-16 en respuesta a la infección por *S. agalactiae*, lo cual repercutió en menor capacidad para quimioatraer células mononucleares intervellosas de forma generalizada. Además, la hiperglucemia no modifica el perfil de secreción de quimiocinas en respuesta a la infección por *E. coli* por lo que no altera la capacidad placentaria de quimioatraer células mononucleares intervellosas.

Por lo tanto, la hiperglucemia condiciona la capacidad de defensa placentaria ante la infección por *S. agalactiae,* resultando en una menor producción de quimiocinas y por lo tanto una limitada capacidad de atraer monocitos, linfocitos T, linfocitos B, células NK y células NKT al sitio de infección. En consecuencia, no se montan las respuestas de defensa innata celular contra este patógeno, lo que ayuda a explicar su mayor crecimiento e invasividad. En la **Figura 24** se presenta un gráfico integrador de las conclusiones obtenidas en esta tesis.

En conjunto, estos resultados nos permiten sugerir que las pacientes con diabetes mellitus gestacional y con infección durante el embarazo deben ser monitoreadas de manera más estrecha, en especial si la madre presenta descontrol glucémico. Nuestros resultados indican que estas pacientes presentan un peor pronóstico ante la infección, y tienen mayor vulnerabilidad y riesgo al desarrollo de complicaciones asociadas a la infección, incluida la ruptura prematura de membranas y el parto pretérmino.



**Figura 24. Conclusión gráfica.** En esta tesis se probaron 4 escenarios inflamatorios que desregulan el estado inmunotolerante del embarazo. Por una parte, las infecciones bacterianas representan un reto inflamatorio agudo que compromete la integridad física, de barrera e inmune placentaria. Y por otra parte, la hiperglucemia es un reto inflamatorio crónico que vulnera múltiples estrategias de defensa innata ejercidas por la placenta. A) Escenario de infección placentaria por *E. coli* en medio de glucosa control. B) Escenario de infección placentaria por *S. agalactiae* en medio de glucosa control. D) Escenario de infección placentaria por *S. agalactiae* en medio de diperglucemia. La regulación a la alta que se señala en los paneles A y C es en comparación con explantes sin infectar. La regulación a la baja señalada en los paneles B y D es en comparación con los explantes infectados y con glucosa control. Demostramos que todos estos escenarios son desfavorables para la homeostasis placentaria, y por lo tanto puede afectar directamente la salud de la madre y del feto. De ellos, el peor escenario fue la condición combinada de infección por S. agalactiae e hiperglucemia.

#### IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACOG. (2018). Gestational diabetes mellitus. ACOG Practice Bulletin No. 190. American College of Obstetricians and Gynecologists. Obstetrics and Gynecology, 131(2), e49–e64. <u>https://doi.org/10.1097/AOG.00000000002501</u>
- Ahmed, B., Sultana, R., & Greene, M. W. (2021). Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *137*, 111315. <u>https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111315</u>
- Alejandro, E. U., Mamerto, T. P., Chung, G., Villavieja, A., Gaus, N. L., Morgan, E., & Pineda-Cortel, M. R. B. (2020). Gestational diabetes mellitus: A harbinger of the vicious cycle of diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–21. https://doi.org/10.3390/ijms21145003
- Andersen, C. J., Murphy, K. E., & Fernandez, M. L. (2016). Impact of obesity and metabolic syndrome on immunity. *Advances in Nutrition*, 7(1), 66–75. <u>https://doi.org/10.3945/an.115.010207</u>
- Arck, P. C., & Hecher, K. (2013). Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nature Medicine*, 19(5), 548–556. <u>https://doi.org/10.1038/nm.3160</u>
- Argueta, L. B., Lacko, L. A., Bram, Y., Tada, T., Carrau, L., Rendeiro, A. F., Zhang, T., Uhl, S., Lubor, B. C., Chandar, V., Gil, C., Zhang, W., Dodson, B. J., Bastiaans, J., Prabhu, M., Houghton, S., Redmond, D., Salvatore, C. M., Yang, Y. J., ... Stuhlmann, H. (2022). Inflammatory responses in the placenta upon SARS-CoV-2 infection late in pregnancy. *IScience*, *25*(5), 104223. https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104223
- Armistead, B., Oler, E., Adams Waldorf, K., & Rajagopal, L. (2019). The Double Life of Group B Streptococcus: Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 431, Issue 16, pp. 2914–2931). Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.01.035
- Aslani, M., Mortazavi-Jahromi, S. S., & Mirshafiey, A. (2021). Cytokine storm in the pathophysiology of COVID-19: Possible functional disturbances of miRNAs. In *International Immunopharmacology* (Vol. 101). Elsevier B.V. <u>https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108172</u>
- Bahadi, A., El Kabbaj, D., Elfazazi, H., Abbi, R., Hafidi, M., & Hassani, M. (2010). Urinary tract infection in pregnancy. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 21(1), 342– 344. https://doi.org/10.1080/13518040701205365
- Bao, N., Fu, B., Zhong, X., Jia, S., Ren, Z., Wang, H., Wang, W., Shi, H., Li, J., Ge, F., Chang, Q., Gong, Y., Liu, W., Qiu, F., Xu, S., & Li, T. (2023). Role of the CXCR6/CXCL16 axis in autoimmune diseases. *International Immunopharmacology*, *121*, 110530. <u>https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110530</u>
- Basak, S., Vilasagaram, S., Naidu, K., & Duttaroy, A. K. (2019). Insulin-dependent, glucose transporter 1 mediated glucose uptake and tube formation in the human placental first trimester trophoblast cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 451(1–2), 91–106. <u>https://doi.org/10.1007/s11010-018-3396-7</u>
- Bayatipoor, H., Mehdizadeh, S., Jafarpour, R., Shojaei, Z., Pashangzadeh, S., & Motallebnezhad, M. (2022). Role of NKT cells in cancer immunotherapy—from bench to bed. *Medical Oncology*, 40(1), 29. https://doi.org/10.1007/s12032-022-01888-5

Bayer, A., Lennemann, N. J., Ouyang, Y., Bramley, J. C., Morosky, S., De, E. T., Marques, A., Cherry, S., Sadovsky, Y., & Coyne, C. B. (2016). Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe*, *19*, 705–712.

https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.008

- Bayer, A., Lennemann, N. J., Ouyang, Y., Sadovsky, E., Sheridan, M. A., Roberts, R. M., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2018). Chromosome 19 microRNAs exert antiviral activity independent from type III interferon signaling. *Placenta*, *61*, 33–38. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.11.004
- Becerra, S. C., Roy, D. C., Sanchez, C. J., Christy, R. J., & Burmeister, D. M. (2016). An optimized staining technique for the detection of Gram positive and Gram negative bacteria within tissue. BMC Research Notes, 9(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s13104-016-1902-0
- Beksac, A. T., Orgul, G., Tanacan, A., Uckan, H., Sancak, B., Portakal, O., & Beksac, M. S. (2019). Uropathogens and Gestational Outcomes of Urinary Tract Infections in Pregnancies that Necessitate Hospitalization. *Current Urology*, *13*(2), 70–73. <u>https://doi.org/10.1159/000499290</u>
- Benedetto, C., Tibaldi, C., Marozio, L., Marini, S., Masuelli, G., Pelissetto, S., Sozzani, P., & Latino, M. A. (2004). Cervicovaginal infections during pregnancy: Epidemiological and microbiological aspects. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, *16*(SUPPL. 2), 9–12. https://doi.org/10.1080/14767050410001727107
- Bryan, J. D., & Shelver, D. W. (2009). Streptococcus agalactiae CspA is a serine protease that inactivates chemokines. *Journal of Bacteriology*, *191*(6), 1847–1854. <u>https://doi.org/10.1128/JB.01124-08</u>
- Bukowska-Ośko, I., Popiel, M., & Kowalczyk, P. (2021). The immunological role of the placenta in sars-cov-2 infection—viral transmission, immune regulation, and lactoferrin activity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 11). MDPI. <u>https://doi.org/10.3390/ijms22115799</u>
- Burton, G. J., & Fowden, A. L. (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1663), 20140066. <u>https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0066</u>
- Bushway, M. E., Gerber, S. A., Fenton, B. M., Miller, R. K., Lord, E. M., & Murphy, S. P. (2014). Morphological and Phenotypic Analyses of the Human Placenta Using Whole Mount Immunofluorescence1. *Biology of Reproduction*, *90*(5). https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.115915
- Campos-Nonato, I., Galván-Valencia, Ó., Hernández-Barrera, L., Oviedo-Solís, C., & Barquera, S. (2023). Prevalencia de obesidad y factores de riesgo asociados en adultos mexicanos: resultados de la Ensanut 2022. Salud Pública de México, 65, s238–s247. <u>https://doi.org/10.21149/14809</u>
- Carrasco-Wong, I., Moller, A., Giachini, F. R., Lima, V. v., Toledo, F., Stojanova, J., Sobrevia, L., & San Martín, S. (2020). Placental structure in gestational diabetes mellitus. In *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease* (Vol. 1866, Issue 2). Elsevier B.V. <u>https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165535</u>
- Catalano, P. M. (2014). Trying to understand gestational diabetes. *Diabetic Medicine*, 31(3), 273–281. <u>https://doi.org/10.1111/dme.12381</u>

- Cattini, P. A., Jin, Y., Jarmasz, J. S., Noorjahan, N., & Bock, M. E. (2020). Obesity and regulation of human placental lactogen production in pregnancy. In *Journal of Neuroendocrinology* (Vol. 32, Issue 11). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/jne.12859
- Chen, S., Tan, Y., Xiao, X., Li, Q., Wu, Q., Peng, Y., Ren, J., & Dong, M. (2021). Deletion of TLR4 attenuates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting inflammation and apoptosis. *Acta Pharmacologica Sinica*, *42*(10), 1610–1619. https://doi.org/10.1038/s41401-020-00597-x
- Chiefari, E., Arcidiacono, B., Foti, D., & Brunetti, A. (2017). Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *Journal of Endocrinological Investigation*, *40*(9), 899–909. https://doi.org/10.1007/s40618-016-0607-5
- Costa, M. A. (2016). The endocrine function of human placenta: An overview. In *Reproductive BioMedicine Online* (Vol. 32, Issue 1, pp. 14–43). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.10.005
- Dainelli, L., Prieto-Patron, A., Silva-Zolezzi, I., Sosa-Rubi, S. G., Sosa, S. E. Y., Reyes-Muñoz, E., Lopez-Ridaura, R., & Detzel, P. (2018). Screening and management of gestational diabetes in Mexico: Results from a survey of multilocation, multi-health care institution practitioners. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, *11*, 105–116. <u>https://doi.org/10.2147/DMSO.S160658</u>
- Darakhshan, S., Fatehi, A., Hassanshahi, G., Mahmoodi, S., Hashemi, M. S., & Karimabad, M. N. (2019). Serum concentration of angiogenic (CXCL1, CXCL12) and angiostasis (CXCL9, CXCL10) CXC chemokines are differentially altered in normal and gestational diabetes mellitus associated pregnancies. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 18(2), 371-378.

https://doi.org/10.1007/s40200-019-00421-2

- Dautt-Leyva, J. G., Canizalez-Román, A., Acosta Alfaro, L. F., Gonzalez-Ibarra, F., & Murillo-Llanes, J. (2018). Maternal and perinatal complications in pregnant women with urinary tract infection caused by Escherichia coli. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 44(8), 1384–1390. https://doi.org/10.1111/jog.13687
- De Luccia, T. P. B., Pendeloski, K. P. T., Ono, E., Mattar, R., Pares, D. B. S., Yazaki Sun, S., & Daher, S. (2020). Unveiling the pathophysiology of gestational diabetes: Studies on local and peripheral immune cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, *91*(4), 1–8. https://doi.org/10.1111/sji.12860
- Delorme-Axford, E., Donker, R. B., Mouillet, J. F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., Wang, T., Stolz, D. B., Sarkar, S. N., Morelli, A. E., Sadovsky, Y., & Coyne, C. B. (2013). Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(29), 12048–12053. https://doi.org/10.1073/pnas.1304718110
- Doran, K. S., Liu, G. Y., & Nizet, V. (2003). Group B streptococcal β-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(5), 736–744. https://doi.org/10.1172/JCI17335
- Duval, C., Brien, M.-E., Gaudreault, V., Boufaied, I., Baker, B., Jones, R. L., & Girard, S. (2019). Differential effect of LPS and IL-1β in term placental explants. *Placenta*, *75*, 9–15. <u>https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.11.006</u>

- Edwars, M., & Baker, C. (2015). Streptococcus agalactiae (Group B Streptococcus). In J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. Blaser (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (8th ed., Vol. 2, pp. 2340–2348). EISEVIER.
- Faas, M. M., & de Vos, P. (2017). Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta*, *56*, 44–52. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.03.001
- Fan, M., Li, X., Gao, X., Dong, L., Xin, G., Chen, L., Qiu, J., & Xu, Y. (2019). LPS Induces Preeclampsia-Like Phenotype in Rats and HTR8/SVneo Cells Dysfunction Through TLR4/p38 MAPK Pathway. *Frontiers in Physiology*, *10*. <u>https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01030</u>
- Filardi, T., Panimolle, F., Crescioli, C., Lenzi, A., & Morano, S. (2019). Gestational diabetes mellitus: The impact of carbohydrate quality in diet. *Nutrients*, *11*(7), 1–9. https://doi.org/10.3390/nu11071549
- Fournier, B. (2013). The function of TLR2 during staphylococcal diseases. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2. <u>https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00167</u>
- Froy, O., Hananel, A., Chapnik, N., & Madar, Z. (2007). Differential effect of insulin treatment on decreased levels of beta-defensins and Toll-like receptors in diabetic rats. *Molecular Immunology*, 44(5), 796–802. <u>https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.04.009</u>
- Gamage, T. K., Chamley, L. W., & James, J. L. (2016). Stem cell insights into human trophoblast lineage differentiation. *Human Reproduction Update*, *23*(1), 77–103. <u>https://doi.org/10.1093/humupd/dmw026</u>
- Giuliani, C., Sciacca, L., Biase, N. Di, Tumminia, A., Milluzzo, A., Faggiano, A., Romana Amorosi, F., Convertino, A., Bitterman, O., Festa, C., & Napoli, A. (2022). Gestational Diabetes Mellitus pregnancy by pregnancy: early, late and nonrecurrent GDM. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 188, 109911. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2022.109911
- Gomez-Lopez, N., Laresgoiti-Servitje, E., Olson, D. M., Estrada-Gutiérrez, G., & Vadillo-Ortega, F. (2010). The role of chemokines in term and premature rupture of the fetal membranes: A review. In *Biology of Reproduction* (Vol. 82, Issue 5, pp. 809–814). https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080432
- González-Ruiz, M., Rodriguez-Bandal, C., Salcedo-Vargas, M., Martínez-Lara, E., Enríquez-Espinoza, F., Polo-Soto, S., Saldaña-Rivera, E., Araujo-Betanzos, S., & Floriano.Sánchez, E. (2014). Actualidades en diabetes gestacional. *Revista de Sanidad Militar*, *68*(5), 276–282. <u>https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=102662</u>
- Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B., & King, R. G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*, *114*(5-6 SPEC. ISS.), 397–407. <u>https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038</u>
- Guo, X., Semerci, N., De Assis, V., Kayisli, U. A., Schatz, F., Steffensen, T. S., Guzeloglu-Kayisli, O., & Lockwood, C. J. (2022). Regulation of Proinflammatory Molecules and Tissue Factor by SARS-CoV-2 Spike Protein in Human Placental Cells: Implications for SARS-CoV-2 Pathogenesis in Pregnant Women. *Frontiers in Immunology*, 13. <u>https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.876555</u>
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T. I., Manaster, I., Gazit, R., Yutkin, V., Benharroch, D., Porgador, A., Keshet, E., Yagel, S., & Mandelboim, O. (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature Medicine*, *12*(9),

1065–1074. https://doi.org/10.1038/nm1452

- Heerema-McKenney, A. (2018). Defense and infection of the human placenta. In *APMIS* (Vol. 126, Issue 7, pp. 570–588). Blackwell Munksgaard. https://doi.org/10.1111/apm.12847
- Heim, K. R., Mulla, M. J., Potter, J. A., Han, C. S., Guller, S., & Abrahams, V. M. (2018). Excess glucose induce trophoblast inflammation and limit cell migration through <scp>HMGB</scp> 1 activation of Toll-Like receptor 4. *American Journal of Reproductive Immunology*, 80(5). <u>https://doi.org/10.1111/aji.13044</u>
- Herández-Ruíz, S., Solano-Ceh, A., Villarreal-Ríos, E., Curiel Pérez, M. O., Galicia-Rodríguez, L., Elizarrarás-Rivas, J., & Jiménez-Reyes, O. H. (2023). Prevalencia de diabetes e hipertensión gestacional en embarazadas con obesidad pregestacional. *Ginecología y Obstetricia de México*, 91(2). https://doi.org/10.24245/gom.v91i2.8282
- Hoo, R., Nakimuli, A., & Vento-Tormo, R. (2020). Innate Immune Mechanisms to Protect Against Infection at the Human Decidual-Placental Interface. *Frontiers in Immunology*, *11*. <u>https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02070</u>
- Huang, X., Zha, B., Zhang, M., Li, Y., Wu, Y., Zhang, R., Sheng, L., Xu, J., Yu, Z., Gao, C., Chen, Z., Ding, H., Ma, L., Zhang, Y., Zang, S., Zhang, T.-N., & Liu, J. (2022). Decreased Monocyte Count Is Associated With Gestational Diabetes Mellitus Development, Macrosomia, and Inflammation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *107*(1), 192–204. <u>https://doi.org/10.1210/clinem/dgab657</u>
- Huppertz, B. (2008). The anatomy of the normal placenta. *Journal of Clinical Pathology*, *61*(12), 1296–1302. https://doi.org/10.1136/jcp.2008.055277
- International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas*. 34–55. https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/
- Jawetz, E., Melnick, J., Adelberg, E., Brooks, G., Butel, J., & Ornston, N. (1990). *Microbiología Médica* (13 edición). El Manual Moderno S.A de C.V.
- Jaworska, J., Ropka-Molik, K., Kowalczyk-Zięba, I., Boruszewska, D., Wocławek-Potocka, I., & Siemieniuch, M. (2021). Expression profile of proinflammatory mediators in the placenta of mares during physiological detachment and retention of fetal membranes. *Cytokine*, 137. <u>https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155307</u>
- Jiménez-Escutia, R., Vargas-Alcantar, D., Flores-Espinosa, P., Helguera-Repetto, A. C., Villavicencio-Carrisoza, O., Mancilla-Herrera, I., Irles, C., Torres-Ramos, Y. D., Valdespino-Vazquez, M. Y., Velázquez-Sánchez, P., Zamora-Escudero, R., Islas-López, M., Carranco-Salinas, C., Díaz, L., Zaga-Clavellina, V., & Olmos-Ortiz, A. (2023). High Glucose Promotes Inflammation and Weakens Placental Defenses against E. coli and S. agalactiae Infection: Protective Role of Insulin and Metformin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5243.

https://doi.org/10.3390/ijms24065243

- Joshua, M., & Raymond, M. (2014). Virulence factors and antibiotic resistance patterns of uropathogenic Escherichia coli. *African Journal of Microbiology Research*, *8*(43), 3678–3686. <u>https://doi.org/10.5897/ajmr2014.7034</u>
- Joya, X., Salat-Batlle, J., Velezmoro-Jáuregui, G., Clavé, S., Garcia-Algar, O., & Vall, O. (2015). Prenatal ethanol exposure and placental hCG and IGF2 expression. *Placenta*, *36*(8), 854–862. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.05.011

https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.05.011

- Kalinderi, K., Delkos, D., Kalinderis, M., Athanasiadis, A., & Kalogiannidis, I. (2018). Urinary tract infection during pregnancy: current concepts on a common multifaceted problem. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 38(4), 448–453. https://doi.org/10.1080/01443615.2017.1370579
- Kamińska, K., Stenclik, D., Błażejewska, W., Bogdański, P., & Moszak, M. (2022). Probiotics in the Prevention and Treatment of Gestational Diabetes Mellitus (GDM): A Review. *Nutrients*, *14*(20), 4303. https://doi.org/10.3390/nu14204303
- Kim, H. S., Go, H., Akira, S., & Chung, D. H. (2011). TLR2-Mediated Production of IL-27 and Chemokines by Respiratory Epithelial Cells Promotes Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *The Journal of Immunology*, *187*(8), 4007–4017. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101654
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007). *INMUNOLOGÍA de Kuby* (Six). McGraw-Hill Interamericana.
- Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J., Gamage, T. K. J. B., & James, J. (2019). Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *76*(18), 3479–3496. <u>https://doi.org/10.1007/s00018-019-03104-6</u>
- Kohlhepp, L. M., Hollerich, G., Vo, L., Hofmann-Kiefer, K., Rehm, M., Louwen, F., Zacharowski, K., & Weber, C. F. (2018). Physiologische Veränderungen in der Schwangerschaft. *Der Anaesthesist*, 67(5), 383–396. <u>https://doi.org/10.1007/s00101-018-0437-2</u>
- Koi, H., Zhang, J., Makrigiannakis, A., Getsios, S., MacCalman, C. D., Strauss, J. F., & Parry, S. (2002). Syncytiotrophoblast is a barrier to maternal-fetal transmission of herpes simplex virus. *Biology of Reproduction*, 67(5), 1572–1579. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004325
- Kot, B. (2019). Antibiotic Resistance among Uropathogenic Escherichia coli. Polish Journal of Microbiology, 68(4), 403–415. <u>https://doi.org/10.33073/PJM-2019-048</u>
- Lam, B., Nwadozi, E., Haas, T. L., Birot, O., & Roudier, E. (2021). High Glucose Treatment Limits Drosha Protein Expression and Alters AngiomiR Maturation in Microvascular Primary Endothelial Cells via an Mdm2-dependent Mechanism. *Cells*, *10*(4), 742. <u>https://doi.org/10.3390/cells10040742</u>
- Lan, C., Wu, S., Huang, S. M., Kuo, H. Y., Wu, I. H., Wen, C. H., Chai, C. Y., Fang, A. H., & Chen, G. S. (2011). High-glucose environment inhibits p38MAPK signaling and reduces human β-3 expression in keratinocytes. *Molecular Medicine*, *17*(7–8), 771–779. https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00091
- Lan, C., Wu, C., Huang, S., Kuo, H., Wu, I., Liang, C., & Chen, G. (2012). High-glucose environment reduces human β-defensin-2 expression in human keratinocytes: Implications for poor diabetic wound healing. *British Journal of Dermatology*, *166*(6), 1221–1229. <u>https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10847.x</u>
- Lautenschlaeger, F. (2011). Cell compliance: cytoskeletal origin and importance for cellular function. <u>https://www.researchgate.net/publication/280986778</u>
- Lee, S.-H., Park, S.-Y., & Choi, C. S. (2022). Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes & Metabolism Journal*, *46*(1), 15–37. <u>https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280</u>

- Lekva, T., Michelsen, A. E., Aukrust, P., Paasche Roland, M. C., Henriksen, T., Bollerslev, J., & Ueland, T. (2017). CXC chemokine ligand 16 is increased in gestational diabetes mellitus and preeclampsia and associated with lipoproteins in gestational diabetes mellitus at 5 years follow-up. *Diabetes and Vascular Disease Research*, *14*(6), 525–533. https://doi.org/10.1177/1479164117728011
- Lende, M., & Rijhsinghani, A. (2020). Gestational Diabetes: Overview with Emphasis on Medical Management. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(24), 9573. <u>https://doi.org/10.3390/ijerph17249573</u>
- Li, S., & Yang, H. (2019). Relationship between advanced glycation end products and gestational diabetes mellitus. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, *32*(17), 2783–2789. https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1449201
- Li, Y. X., Long, D. L., Liu, J., Qiu, D., Wang, J., Cheng, X., Yang, X., Li, R. M., & Wang, G. (2020). Gestational diabetes mellitus in women increased the risk of neonatal infection via inflammation and autophagy in the placenta. *Medicine*, *99*(40), e22152. <u>https://doi.org/10.1097/MD.0000000022152</u>
- Lin, Z., Shi, J.-L., Chen, M., Zheng, Z.-M., Li, M.-Q., & Shao, J. (2023). CCL2: An important cytokine in normal and pathological pregnancies: A review. *Frontiers in Immunology*, 13. <u>https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1053457</u>
- Liu, H., Liu, A., Kaminga, A. C., McDonald, J., Wen, S. W., & Pan, X. (2022). Chemokines in Gestational Diabetes Mellitus. *Frontiers in Immunology*, 13. <u>https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.705852</u>
- Liu, S., Diao, L., Huang, C., Li, Y., Zeng, Y., & Kwak-Kim, J. Y. H. (2017). The role of decidual immune cells on human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, 124, 44–53. <u>https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.10.045</u>
- Liu, Y., Fan, X., Wang, R., Lu, X., Dang, Y.-L., Wang, H., Lin, H.-Y., Zhu, C., Ge, H., Cross, J. C., & Wang, H. (2018). Single-cell RNA-seq reveals the diversity of trophoblast subtypes and patterns of differentiation in the human placenta. *Cell Research*, 28(8), 819–832. <u>https://doi.org/10.1038/s41422-018-0066-y</u>
- Lorenzo-Almorós, A., Hang, T., Peiró, C., Soriano-Guillén, L., Egido, J., Tuñón, J., & Lorenzo. (2019). Predictive and diagnostic biomarkers for gestational diabetes and its associated metabolic and cardiovascular diseases. *Cardiovascular Diabetology*, *18*(1), 140. https://doi.org/10.1186/s12933-019-0935-9
- Lukic, A., Napoli, A., Santino, I., Bianchi, P., Nobili, F., Ciampittiello, G., Nardone, M. R., Santomauro, M., Di Properzio, M., & Caserta, D. (2017). Cervicovaginal bacteria and fungi in pregnant diabetic and non-diabetic women a multicenter observational cohort studyCervicovaginal bacteria and fungi in pregnant diabetic and non-diabetic women: A multicenter observational cohort study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *21*(10), 2303–2315. https://www.europeanreview.org/article/12799
- Lüthje, P., & Brauner, A. (2014). Virulence Factors of Uropathogenic E. coli and Their Interaction with the Host. *Advances in Microbial Physiology*, *65*, 337–372. <u>https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.006</u>
- Ma, Y., Krikun, G., Abrahams, V. M., Mor, G., & Guller, S. (2007). Cell Type-specific Expression and Function of Toll-like Receptors 2 and 4 in Human Placenta: Implications in Fetal Infection. *Placenta*, 28(10), 1024–1031. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.05.003

- Mazzariol, A., Bazaj, A., & Cornaglia, G. (2017). Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *Journal of Chemotherapy*, 29, 2–9. https://doi.org/10.1080/1120009X.2017.1380395
- McElwain, C., McCarthy, F., & McCarthy, C. (2021). Gestational Diabetes Mellitus and Maternal Immune Dysregulation: What We Know So Far. International Journal of Molecular Sciences, 22(8), 4261. https://doi.org/10.3390/ijms22084261
- Medawar, P. B. (1961). Immunological Tolerance. *Nature*, *189*(4758), 14–17. <u>https://doi.org/10.1038/189014a0</u>
- Megnekou, R., Nana, C. M. M., Djontu, J. C., Bitye, B. M. Z., Nana, B. C., Zangue, B. K. T., Donkeu, C. J., Essangui, E., Salawiss, R. M., Seumko'o, R. N. M., Ayong, L., & Leke, R. G. F. (2023). Chemokine modulation in microscopic and submicroscopic Plasmodium falciparum malaria infection in women at delivery in Yaoundé, Cameroon. *PLOS ONE*, *18*(1), e0280615. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280615</u>
- Mekapogu, N. P., Gundela, S., & Avula, R. D. (2016). Diabetes mellitus has no significant influence on the prevalence of antenatal asymptomatic bacteriuria. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *10*(4), DC16–DC20. https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/14939.7632
- Mele, J., Muralimanoharan, S., Maloyan, A., & Myatt, L. (2014). Impaired mitochondrial function in human placenta with increased maternal adiposity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 307(5), E419–E425. <u>https://doi.org/10.1152/ajpendo.00025.2014</u>
- Møller, V. (1955). Simplified Tests for Some Amino Acid Decarboxylases and for the Arginine Dihydrolase System. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 36(2), 158–172. <u>https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1955.tb04583.x</u>
- Monroy-Pérez, E., Cerón, A. B., García Cortés, L. R., Alonso, N. N., Domínguez-Trejo, P., Hernández-Jaimes, T., Bustos-Martínez, J., Hamdan-Partida, A., Rojas Jiménez, E. A., Vaca, S., Vaca-Paniagua, F., & Paniagua-Contreras, G. L. (2020). Virulence gene transcription, phylogroups, and antibiotic resistance of cervico-vaginal pathogenic E. coli in Mexico. *PLoS ONE*, *15*(6 June), 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234730
- Moon, J. H., Kwak, S. H., & Jang, H. C. (2017). *DIAGNOSIS OF GDM AND POSTPARTUM DIA-BETES Gestational diabetes mellitus*. 26–41. https://www.kjim.org/upload/kjim-2016-203.pdf
- Morel, F. B., Dai, Q., Ni, J., Thomas, D., Parnet, P., & Fança-Berthon, P. (2015). α-Galactooligosaccharides Dose-Dependently Reduce Appetite and Decrease Inflammation in Overweight Adults. *The Journal of Nutrition*, *145*(9), 2052–2059. <u>https://doi.org/10.3945/jn.114.204909</u>
- Myers, R. B., Fredenburgh, J. L., & Grizzle, W. E. (2008). Carbohydrates. In *Theory and Practice of Histological Techniques* (pp. 161–186). Elsevier. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10279-0.50018-X</u>
- Nagarsheth, N., Wicha, M. S., & Zou, W. (2017). Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 17, Issue 9, pp. 559–572). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nri.2017.49
- Nancy, P., & Erlebacher, A. (2014). T cell behavior at the maternal-fetal interface. The International Journal of Developmental Biology, 58(2-3–4), 189–198. <u>https://doi.org/10.1387/ijdb.140054ae</u>

- Nguyen-Ngo, C., Jayabalan, N., Salomon, C., & Lappas, M. (2019). Molecular pathways disrupted by gestational diabetes mellitus. *Journal of Molecular Endocrinology*, *63*(3), R51–R72. <u>https://doi.org/10.1530/JME-18-0274</u>
- Nicolle, L. E., Gupta, K., Bradley, S. F., Colgan, R., DeMuri, G. P., Drekonja, D., Eckert, L. O., Geerlings, S. E., Köves, B., Hooton, T. M., Juthani-Mehta, M., Knight, S. L., Saint, S., Schaeffer, A. J., Trautner, B., Wullt, B., & Siemieniuk, R. (2019). Clinical Practice Guideline for the Management of Asymptomatic Bacteriuria: 2019 Update by the Infectious Diseases Society of Americaa. *Clinical Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1093/cid/ciy1121
- Olmos-Ortiz, A., Déciga-García, M., Preciado-Martínez, E., Bermejo-Martínez, L., Flores-Espinosa, P., Mancilla-Herrera, I., Irles, C., Helguera-Repetto, A. C., Quesada-Reyna, B., Goffin, V., Díaz, L., & Zaga-Clavellina, V. (2019). Prolactin decreases LPS-induced inflammatory cytokines by inhibiting TLR-4/NFkB signaling in the human placenta. *Molecular Human Reproduction*, *25*(10), 660–667. https://doi.org/10.1093/molehr/gaz038
- Olmos-Ortiz, A., Flores-espinosa, P., & Mancilla-herrera, I. (2019). Innate Immune Cells and Tolllike Receptor – Dependent Responses at the Maternal – Fetal Interface. *International Journal* of Molecular Sciences, 20(3654), 1–29. https://doi.org/10.3390/ijms20153654
- Olmos-Ortiz, A., Flores-Espinosa, P., Díaz, L., Velázquez, P., Ramírez-Isarraraz, C., & Zaga-Clavellina, V. (2021). Immunoendocrine Dysregulation during Gestational Diabetes Mellitus: The Central Role of the Placenta. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8087. <u>https://doi.org/10.3390/ijms22158087</u>
- O'Sullivan, E. P., Avalos, G., O'Reilly, M., Dennedy, M. C., Gaffney, G., & Dunne, F. (2011). Atlantic Diabetes in Pregnancy (DIP): the prevalence and outcomes of gestational diabetes mellitus using new diagnostic criteria. *Diabetologia*, *54*(7), 1670–1675. <u>https://doi.org/10.1007/s00125-011-2150-4</u>
- Palacios, G. C., Gonzalez, M. N., Beltran, M., Arredondo, J. L., Torres, J., & Solorzano, F. (2007). High-Virulence Clone of Group B Streptococci Unable to Grow at High Temperatures Is Present in Serotypes Other Than Type III. *Current Microbiology*, *54*(1), 42–47. https://doi.org/10.1007/s00284-006-0291-3
- Palacios-Saucedo, G. C., Hernández-Hernández, T. I., Rivera-Morales, L. G., Briones-Lara, E., Caballero-Trejo, A., Vázquez-Guillén, J. M., Amador-Patiño, G. I., García-Cabello, R., Solórzano-Santos, F., & Rodríguez-Padillacs, C. (2017). Group B streptococcal perinatal infection: A Global, Latin American and Mexican Overview. *Gaceta Medica de Mexico*, *153*(3), 361–370.

https://www.anmm.org.mx/GMM/2017/n3\_english/3942AX171\_153\_2017\_UK3\_329-338.pdf

- Pan, X., Jin, X., Wang, J., Hu, Q., & Dai, B. (2021). Placenta inflammation is closely associated with gestational diabetes mellitus. In *Am J Transl Res* (Vol. 13, Issue 5). <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8205654/pdf/ajtr0013-4068.pdf</u>
- Pérez-Pérez, A., Vilariño-García, T., Guadix, P., Dueñas, J. L., & Sánchez-Margalet, V. (2020). Leptin and nutrition in gestational diabetes. *Nutrients*, *12*(7), 1–18. <u>https://doi.org/10.3390/nu12071970</u>

Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 1–21. https://doi.org/10.3390/ijms19113342
- Preciado-Martínez, E., García-Ruíz, G., Flores-Espinosa, P., Bermejo-Martínez, L., Espejel-Nuñez, A., Estrada-Gutiérrez, G., Razo-Aguilera, G., Granados-Cepeda, M., Helguera-Repetto, A. C., Irles, C., & Zaga-Clavellina, V. (2018). Progesterone suppresses the lipopolysaccharideinduced pro-inflammatory response in primary mononuclear cells isolated from human placental blood. *Immunological Investigations*, 47(2), 181–195. https://doi.org/10.1080/08820139.2017.1413112
- Procop, G., & Wilson, M. (2001). Infectious disease pathology. *Clinical Infectious Diseases*, 32(11), 1589–1601. <u>https://doi.org/10.1086/320537</u>
- Rafat, D., Singh, S., Nawab, T., Khan, F., Khan, A. U., & Khalid, S. (2021). Association of vaginal dysbiosis and gestational diabetes mellitus with adverse perinatal outcomes. *International Journal of Gynecology and Obstetrics, April*, 1–9. https://doi.org/10.1002/ijgo.13945
- Rajaraman, B., Ramadas, N., Krishnasamy, S., Ravi, V., Pathak, A., Devasena, C. S., Swaminathan, K., Ganeshprasad, A., Kuppuswamy, A. A., & Vedantham, S. (2019).
  Hyperglycaemia cause vascular inflammation through advanced glycation end products/early growth response-1 axis in gestational diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *456*(1–2), 179–190.
  https://doi.org/10.1007/s11010-019-03503-0
- Rashki, A. (2014). Cervico-vaginopathogenic Escherichia coli in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Microbial Pathogenesis*, *75*, 29–34. <u>https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.08.004</u>
- Robbins, J. R., & Bakardjiev, A. I. (2012). Pathogens and the placental fortress. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 15, Issue 1, pp. 36–43). <u>https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.006</u>
- Robbins, J. R., Skrzypczynska, K. M., Zeldovich, V. B., Kapidzic, M., & Bakardjiev, A. I. (2010). Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of Listeria monocytogenes. *PLoS Pathogens*, 6(1). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000732
- Roberts, R., Green, J., & Schulz, L. (2016). The Evolution of the Placenta. *Reproduction*, 152(5), 179–189. https://doi.org/10.1530/REP-16-0325
- Rumpret, M., von Richthofen, H. J., Peperzak, V., & Meyaard, L. (2022). Inhibitory pattern recognition receptors. *Journal of Experimental Medicine*, *219*(1). https://doi.org/10.1084/jem.20211463
- Russell, N. J., Seale, A. C., O'Driscoll, M., O'Sullivan, C., Bianchi-Jassir, F., Gonzalez-Guarin, J., Lawn, J. E., Baker, C. J., Bartlett, L., Cutland, C., Gravett, M. G., Heath, P. T., Le Doare, K., Madhi, S. A., Rubens, C. E., Schrag, S., Sobanjo-ter Meulen, A., Vekemans, J., Saha, S. K., ... Majumder, S. (2017). Maternal Colonization With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clinical Infectious Diseases*, *65*(suppl\_2), S100–S111. https://doi.org/10.1093/cid/cix658
- Sacre, S. M., Lundberg, A. M. C., Andreakos, E., Taylor, C., Feldmann, M., & Foxwell, B. M. (2007). Selective Use of TRAM in Lipopolysaccharide (LPS) and Lipoteichoic Acid (LTA) Induced NFκB Activation and Cytokine Production in Primary Human Cells: TRAM Is an Adaptor for LPS and LTA Signaling. *The Journal of Immunology*, *178*(4), 2148–2154. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2148

- Sattler, S. (2017). The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection (pp. 3–14). https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8\_1
- Schneeberger, C., Erwich, J. J. H. M., van den Heuvel, E. R., Mol, B. W. J., Ott, A., & Geerlings, S. E. (2018). Asymptomatic bacteriuria and urinary tract infection in pregnant women with and without diabetes: Cohort study. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 222, 176–181. <u>https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.12.013</u>
- Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., Santaella-Castell, J., & Rivera-Dommarco, J. (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-2019: Resultados Nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública. <u>https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanutcontinua2020/doctos/informes/ensanutCovid19Res</u> ultadosNacionales.pdf
- Shen, C.-Y., Lu, C.-H., Wu, C.-H., Li, K.-J., Kuo, Y.-M., Hsieh, S.-C., & Yu, C.-L. (2020). The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases. *Molecules*, 25(23), 5591. https://doi.org/10.3390/molecules25235591
- Shi, J., Yang, H., Fan, D., Yang, S., Qiu, X., Wang, Y., Lai, Z., Ha, S., Ruan, L., Shen, H., Zhou, W., & Li, M. (2020). The role of CXC chemokine ligand 16 in physiological and pathological pregnancies. *American Journal of Reproductive Immunology*, 83(4). <u>https://doi.org/10.1111/aji.13223</u>
- Simpson, S., Smith, L., & Bowe, J. (2018). Placental peptides regulating islet adaptation to pregnancy: clinical potential in gestational diabetes mellitus. *Current Opinion in Pharmacology*, 43, 59–65. <u>https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.004</u>
- Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2015). The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), 1–20. <u>https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016303</u>
- Solders, M., Gorchs, L., Erkers, T., Lundell, A.-C., Nava, S., Gidlöf, S., Tiblad, E., Magalhaes, I., & Kaipe, H. (2017). MAIT cells accumulate in placental intervillous space and display a highly cytotoxic phenotype upon bacterial stimulation. *Scientific Reports*, 7(1), 6123. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-017-06430-6</u>
- Solders, M., Gorchs, L., Tiblad, E., Gidlöf, S., Leeansyah, E., Dias, J., Sandberg, J. K., Magalhaes, I., Lundell, A.-C., & Kaipe, H. (2019). Recruitment of MAIT Cells to the Intervillous Space of the Placenta by Placenta-Derived Chemokines. *Frontiers in Immunology*, 10. <u>https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01300</u>
- Solorzano-Santos, F., Diaz-Ramos, R. D., & Arredondo-Garcia, J. L. (1990). DISEASES CAUSED BY GROUP B STREPTOCOCCUS IN MEXICO. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 9(1), 66. https://doi.org/10.1097/00006454-199001000-00019
- Solorzano-Santos, F., Echaniz-Aviles, G., Conde-Glez, C. J., Calderon-Jaimes, E., Arredondo-Garcia, J. L., & Beltran-Zuniga, M. (1989). Cervicovaginal Infection with Group B Streptococci Among Pregnant Mexican Women. *Journal of Infectious Diseases*, *159*(5), 1003–1004. <u>https://doi.org/10.1093/infdis/159.5.1003</u>
- SosaRubi, S. G., Dainelli, L., Silva-Zolezzi, I., Detzel, P., Espino y Sosa, S., Reyes-Muñoz, E., Chivardi, C., Ortiz-Panozo, E., & Lopez-Ridaura, R. (2019). Short-term health and economic burden of gestational diabetes mellitus in Mexico: A modeling study. *Diabetes Research and*

*Clinical Practice*, *153*, 114–124. <u>https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.05.014</u>

Stern, C., Schwarz, S., Moser, G., Cvitic, S., Jantscher-Krenn, E., Gauster, M., & Hiden, U. (2021a). Placental Endocrine Activity: Adaptation and Disruption of Maternal Glucose Metabolism in Pregnancy and the Influence of Fetal Sex. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(23), 12722.

https://doi.org/10.3390/ijms222312722

Stern, C., Schwarz, S., Moser, G., Cvitic, S., Jantscher-Krenn, E., Gauster, M., & Hiden, U. (2021b). Placental Endocrine Activity: Adaptation and Disruption of Maternal Glucose Metabolism in Pregnancy and the Influence of Fetal Sex. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12722.

https://doi.org/10.3390/ijms222312722

- Sweeting, A., Wong, J., Murphy, H. R., & Ross, G. P. (2022). A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews*, *43*(5), 763–793. <u>https://doi.org/10.1210/endrev/bnac003</u>
- Świrska, J., Zwolak, A., Dudzińska, M., Matyjaszek-Matuszek, B., & Paszkowski, T. (2018). Gestational diabetes mellitus - literature review on selected cytokines and hormones of confirmed or possible role in its pathogenesis. *Ginekologia Polska*, 89(9), 522–527. <u>https://doi.org/10.5603/GP.a2018.0089</u>
- Tagoma, A., Haller-Kikkatalo, K., Oras, A., Roos, K., Kirss, A., & Uibo, R. (2022). Plasma cytokines during pregnancy provide insight into the risk of diabetes in the gestational diabetes risk group. *Journal of Diabetes Investigation*, *13*(9), 1596–1606. <u>https://doi.org/10.1111/jdi.13828</u>
- Tessier, D. R., Ferraro, Z. M., & Gruslin, A. (2013). Role of leptin in pregnancy: Consequences of maternal obesity. *Placenta*, 34(3), 205–211. <u>https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.11.035</u>
- Tokarz, V. L., MacDonald, P. E., & Klip, A. (2018). The cell biology of systemic insulin function. Journal of Cell Biology, 217(7), 2273–2289. https://doi.org/10.1083/jcb.201802095
- Turco, M. Y., & Moffett, A. (2019). Development of the human placenta. *Development (Cambridge)*, 146(22), 1–14. https://doi.org/10.1242/dev.163428
- Valencia-Ortega, J., Saucedo, R., Peña-Cano, M. I., Hernández-Valencia, M., & Cruz-Durán, J. G. (2020). Immune tolerance at the maternal-placental interface in healthy pregnancy and preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *46*(7), 1067–1076. <u>https://doi.org/10.1111/jog.14309</u>
- Vázquez Martínez, V. H., Martínez Bautista, H., Loera Morales, J. I., & Camarillo Coronado, J. D. (2023). Factores de riesgo asociados a diabetes mellitus gestacional en la región norte de México. Atención Primaria Práctica, 5(2), 100175. https://doi.org/10.1016/j.appr.2023.100175
- Vega-Sanchez, R., Gomez-Lopez, N., Flores-Pliego, A., Clemente-Galvan, S., Estrada-Gutierrez, G., Zentella-Dehesa, A., Maida-Claros, R., Beltran-Montoya, J., & Vadillo-Ortega, F. (2010). Placental blood leukocytes are functional and phenotypically different than peripheral leukocytes during human labor. *Journal of Reproductive Immunology*, *84*(1), 100–110. <u>https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.08.002</u>

- Villafuerte Pérez, A. A. (2023). Rol de la insulina y la metformina en la modulación del perfil inflamatorio de la placenta humana ante la hiperglucemia y la infección por Escherichia coli [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. http://132.248.9.195/ptd2023/septiembre/0847571/Index.html
- Violante Ortíz, R., Reyna-Beltrán, E., Requena-Rivera, C., & Tavera Tapia, A. (2023). Prevalencia, factores de riesgo y desenlaces asociados a la Diabetes Mellitus Gestacional según los criterios IADPSG y NICE en México. *Revista Del Centro De Investigación De La Universidad La Salle*, 15(60), 01–32.

https://revistasinvestigacion.lasalle.mx/index.php/recein/article/view/3506/3545

- Wang, L., Liu, Y., Yan Lu, S., Nguyen, K.-T. T., Schroer, S. A., Suzuki, A., Mak, T. W., Gaisano, H., & Woo, M. (2010). Deletion of Pten in Pancreatic β-Cells Protects Against Deficient β-Cell Mass and Function in Mouse Models of Type 2 Diabetes. *Diabetes*, *59*(12), 3117–3126. <u>https://doi.org/10.2337/db09-1805</u>
- Wang, Y., & Zhao, S. (2010). Vascular Biology of the Placenta. Morgan & Claypool Life Sciences. https://doi.org/10.4199/C00016ED1V01Y201008ISP009
- Xiao, Y., Li, M., Guo, X., Zeng, H., Shuai, X., Guo, J., Huang, Q., Chu, Y., Zhou, B., Wen, J., Liu, J., & Jiao, H. (2022). Inflammatory Mechanism of Brucella Infection in Placental Trophoblast Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13417. <u>https://doi.org/10.3390/ijms232113417</u>
- Yan, L., Jin, Y., Hang, H., & Yan, B. (2018). The association between urinary tract infection during pregnancy and preeclampsia. *Medicine*, 97(36), e12192. <u>https://doi.org/10.1097/MD.00000000012192</u>
- Yang, F., Zheng, Q., & Jin, L. (2019). Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. *Frontiers in Immunology*, 10. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02317
- Yang, Y., Liu, Iixiu, Liu, B., Li, Q., Wang, Z., Fan, S., Wang, H., & Wang, L. (2018). Functional Defects of Regulatory T Cell Through Interleukin 10 Mediated Mechanism in the Induction of Gestational Diabetes Mellitus. DNA and Cell Biology, 37(3), 278–285. <u>https://doi.org/10.1089/dna.2017.4005</u>
- Yefet, E., Bejerano, A., Iskander, R., Zilberman Kimhi, T., & Nachum, Z. (2023). The Association between Gestational Diabetes Mellitus and Infections in Pregnancy—Systematic Review and Meta-Analysis. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/microorganisms11081956
- Yoon, H. S., Kim, G., Ju, Y. J., Cheon, I. S., Hong, S. W., Kim, D. W., Park, B.-C., Han, S. H., & Yun, C.-H. (2017). Distinct pattern of immune tolerance in dendritic cells treated with
- lipopolysaccharide or lipoteichoic acid. *Molecular Immunology*, 91, 57–64. <u>https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.08.023</u>
- Zaga-Clavellina, V., Diaz, L., Olmos-Ortiz, A., Godínez-Rubí, M., Rojas-Mayorquín, A. E., & Ortuño-Sahagún, D. (2021). Central role of the placenta during viral infection: Immuno-competences and miRNA defensive responses. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1867*(10).

https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166182

Zastempowska, E., Twarużek, M., Grajewski, J., & Lassa, H. (2022). Virulence Factor Genes and Cytotoxicity of Streptococcus agalactiae Isolated from Bovine Mastitis in Poland. *Microbiology Spectrum*, *10*(3), e0222421. https://doi.org/10.1128/spectrum.02224-21

98

- Zavan, B., De Almeida, E. M., Salles, É. D. S. L., Do Amarante-Paffaro, A. M., & Paffaro, V. A. (2016). COX-2 plays a role in angiogenic DBA+ uNK cell subsets activation and pregnancy protection in LPS-exposed mice. *Placenta*, 44, 34–45. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.06.006
- Zhang, Chi, H., Xiao, H., Tian, X., Wang, Y., Yun, X., & Xu, Y. (2017). Interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF-α) single nucleotide polymorphisms (SNPs), inflammation and metabolism in gestational diabetes mellitus in inner mongolia. *Medical Science Monitor*, 23, 4149–4157. https://doi.org/10.12659/MSM.903565
- Zhang, L., Yu, X., Wu, Y., Fu, H., Xu, P., Zheng, Y., Wen, L., Yang, X., Zhang, F., Hu, M., Wang, H., Liu, X., Qiao, J., Peng, C., Gao, R., Saffery, R., Fu, Y., Qi, H., Tong, C., ... Baker, P. N. (2021). Gestational Diabetes Mellitus-Associated Hyperglycemia Impairs Glucose Transporter 3 Trafficking in Trophoblasts Through the Downregulation of AMP-Activated Protein Kinase. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.722024
- Zhang, X., Liao, Q., Wang, F., & Li, D. (2018). Association of gestational diabetes mellitus and abnormal vaginal flora with adverse pregnancy outcomes. *Medicine (United States)*, *97*(34). https://doi.org/10.1097/MD.00000000011891
- Zhou, W., Wang, H., Yang, Y., Guo, F., Yu, B., & Su, Z. (2022). Trophoblast Cell Subtypes and Dysfunction in the Placenta of Individuals with Preeclampsia Revealed by Single-Cell RNA Sequencing. *Molecules and Cells*, 45(5), 317–328. <u>https://doi.org/10.14348/molcells.2021.0211</u>

## X. ANEXOS

# Anexo 1. Artículo publicado

Parte de los resultados presentados en esta tesis se publicaron en forma de un artículo original en la revista *International Journal of Molecular Sciences* en el 2023.



Int. J. Mol. Sci. 2023, Volume 24, Issue 6, 5243

Cita del articulo: Jiménez-Escutia, R., Vargas-Alcantar, D., Flores-Espinosa, P., Helguera-Repetto, A. C., Villavicencio-Carrisoza, O., Mancilla-Herrera, I., Irles, C., Torres-Ramos, Y. D., Valdespino-Vazquez, M. Y., Velázquez-Sánchez, P., Zamora-Escudero, R., Islas-López, M., Carranco-Salinas, C., Díaz, L., Zaga-Clavellina, V., & Olmos-Ortiz, A. (2023). High Glucose Promotes Inflammation and Weakens Placental Defenses against *E. coli* and *S. agalactiae* Infection: Protective Role of Insulin and Metformin. *International journal of molecular sciences*, *24*(6), 5243. https://doi.org/10.3390/ijms24065243

# Anexo 2. Carta de aceptación del protocolo de investigación por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del INPer



INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA Isidro Espinosa de los reyes DIRECCIÓN GENERAL

INPER-DG - 000760 -2018

CIUDAD DE MÉXICO, A 02 DE OCTUBRE DE 2018.

DRA. ANDREA GUADALUPE OLMOS ORTIZ Investigador en Ciencias Médicas Adscrita al Departamento de Inmunobioquimica 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:

### Evaluación del efecto de la insulina y la metformina sobre el perfil inflamatorio y la inmunidad innata de la placenta humana en un modelo in vitro de diabetes mellitus gestacional

#### Registro: 2018-1-152

### Vigencia autorizada: **01/11/2018 al 30/10/2021**

### Monto autorizado: \$555,000.00

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.  $\chi$ 

DR. JORGE AUFURO CARDONA PÉREZ DIRECTOR GENERAL

ATENTAMENTE

Montes Urales 800, Col. Lomas Virreyes, Del. Miguel Hidalgo, Ciudad de México, C.P. 11000 Teléforos: 5520-9900 Ext. 108-109, e-mail: dirgral@inper.gob.mx

101

# Anexo 3. Carta de aceptación para recolección de muestras en el Hospital de Gineco Obstetricia Número 4 Luis Castelazo Ayala



Dirección de Prestaciones Médicas Unidad de Educación, Investigación y Politicas de Salud Coordinación de Investigación en Salud



Dictamen de Aprobación

Martes, 28 de abril de 2020

Ref. 09-B5-61-2800/202000/

Dra. Maria de la Caridad Carranco Salinas DIVISION DE GINECO-OBSTETRICIA, HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA NUM. 4 LUIS CASTELAZO AYALA D.F. Sur

Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: Efecto de la insulina y la metformina sobre la inflamación e inmunidad innata en tejidos de la interfase materno-fetal en un modelo de diabetes mellitus gestacional, fue sometido a la consideración de este Comité Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales del Comité de Ética en Investgación y del Comité de Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS, se ha emitido el dictamen de **APROBADO**, con número de registro: R-2020-785-043.

De acuerdo a la normatividad vigente, deberá informar a esta Comité en los meses de enero y julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo. Este dictamen sólo tiene vigencia de un año. Por lo que en caso de ser necesario requerirá solicitar una reaprobación al Comité de Ética en Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica, al término de la vigencia del mismo.

Atentamente, Malla

Dra. María Susana Navarrete Navarro Secretaria Ejecutiva Comité Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios: Se anexa dictamen SNN/ iah. F-CNIC-2020-016

### IMSS SEGURIDAD V SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos Av. Cuaultémoc 330 Col. Doctores Mérico 06720 56276900 est 21210 canise@cis gob ma

102

# Anexo 4. Carta de aceptación para recolección de muestras en el Hospital Ángeles México



DIRECCIÓN DE SERVICIOS CLINICOS



Ciudad de México, a 08 de Marzo del 2021

DRA. ANDREA GUADALUPE OLMOS ORTIZ INVESTIGADORA EN CIENCIAS MEDICAS SNI 1 INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA "ISIDRO ESPINOZA DE LOS REYES"

Por este medio, hacemos de su conocimiento que analizamos su invitación de participar en el proyecto de investigación "EFECTO DE LA INSULINA Y LA METFORMINA SOBRE LA INSULINA E INMUNIDAD INNATA EN TEJIDOS DE LA INTERFASE MATERNO-FETAL EN UN MODELO DE DIABETES MELLITUS GESTACIONAL", con registro, aprobación y financiamiento en el Instituto número 2018-1-152 y en CONACyT CB-A1-S-27832.

Informamos a usted, que decidimos participar y realizar la recolección de la muestra solicitada (46 placentas y membranas), acorde al cálculo de muestra de su proyecto y criterios de inclusión.

La Dra. Ma. Del Pilar Velázquez Sánchez, Jefa de la División de Ginecología y Obstetricia del Hospital Ángeles México, se encargará de realizar la selección de pacientes, firma de consentimientos, recolección de muestras y mantener la comunicación y enlace entre los investigadores y el hospital.

Sin otro particular.

ATENTAMENTE

DR. SERGIO A. SUCILLA PLASCENCIA.

DIRECTOR DE SERVICIOS CLÍNICOS

LIC. JORGE CABRERA ÁGUILA DIRECTOR GENERAL

Agrarismo no. 208, Col. Escandón Delegación Miguel Hidalgo C.P. 11800 Ciudad de México.

# Anexo 5. Carta de consentimiento informado INPer

## Nombre del estudio: EFECTO DE LA INSULINA Y LA METFORMINA SOBRE LAINFLAMACIÓN E INMUNIDAD INNATA EN TEJIDOS DE LA INTERFASE MATERNO-FETAL EN UN MODELO DE DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

Ciudad de México a\_\_\_\_\_de\_\_\_\_del 20

No. de Expediente:\_\_\_\_\_ Codificación:

**Justificación y objetivo del estudio**. Estimada señora, la estamos invitando a participar en este estudio cuyo objetivo es evaluar el efecto de la insulina y la metformina sobre el perfil inflamatorio y la inmunidad innata en los tejidos de la interfase materno-fetal en un modelo *in vitro* de hiperglucemia que semeje el ambiente de la DMG. Tomando en cuenta que usted es una paciente sana y su embarazo no tuvo ninguna complicación importante, consideramos muyvaliosa 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**: Para la realización de este estudio, no se tendrá contacto físico directo ni con usted ni con su bebé sino únicamente con la placenta después del alumbramiento. Tanto la placenta como las membranas corioamnióticas se colocarán en un recipiente de acero inoxidable estéril. Se podrá tomar una muestra de sangre de la vena de cordón umbilical (25 –35 mL), una vez expulsada la placenta. Todo el material punzocortante se colocará en el botede desechos correspondiente.

**Posibles riesgos y molestias**: Es importante aclarar que los tejidos serán utilizados exclusivamente para los fines que fueron señalados. Es obligación del personal que participa en este proyecto aclarar todas las dudas presentes e informarle que la donación de estos tejidosimplica un riesgo mínimo y no se asocia a ninguna molestia física.

**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 delos resultados generados.

**Participación o retiro**: En el caso de que lo considere conveniente, usted puede negar su participación en el estudio. Además, si usted acepta participar puede retirar su consentimientoy abandonar el estudio en cualquier momento que lo desee sin que ello afecte la atención querecibe 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	
Sí 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 tipode 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 la Investigadora responsable del proyecto:

Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz. Tel: 55209900 Ext. 478. Correo electrónico: nut.aolmos@gmail.com

Nombre y firma de la paciente

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Nombre y firma del Testigo 1

Nombre y firma del Testigo 2

# Anexo 6. Carta consentimiento informado Hospital de Gineco Obstetricia Número 4 Luis Castelazo Ayala





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

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

## Nombre del estudio: EFECTO DE LA INSULINA Y LA METFORMINA SOBRE LA INFLAMACIÓN E INMUNIDAD INNATA EN TEJIDOS DE LA INTERFASE MATERNO-FETAL EN UN MODELO DE DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

Ciudad de México a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 20\_\_\_\_\_

No. de Expediente: Codificación:

**Justificación y objetivo del estudio**. Estimada señora, la estamos invitando a participar en este estudio cuyo objetivo es evaluar el efecto de la insulina y la metformina sobre el perfil inflamatorio y la inmunidad innata en los tejidos de la interfase materno-fetal en un modelo in vitro de hiperglucemia que semeje el ambiente de la DMG. 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**: Se tomará una muestra de sangre de la vena de cordón umbilical (25 – 35 mL), para lo cual no se tendrá contacto físico ni con usted ni con su bebé sino únicamente con la placenta después del alumbramiento. Posteriormente se separarán las membranas corioamnióticas y se guardarán en un frasco estéril con tapa hermética. Finalmente, la placenta se colocará en un recipiente de acero inoxidable estéril. Todo el material punzocortante se colocará en el bote de desechos correspondiente. Adicionalmente, unas gotas de sangre de la vena umbilical se colocarán en una tira reactiva para glucómetro digital y se realizará la lectura de la glucemia.

**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.

**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 lo 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	
Sí 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 los Investigadores Responsables.

Dra. María de la Caridad Carranco Salinas. Tel.: 55 5550 6422 Ext. 28070, e-mail: charyti@hotmail.com

Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz. Tel: 55209900 Ext. 478. Correo electrónico: nut.aolmos@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 Testigo 2 Relación/Parentesco con la paciente

# Anexo 7. Carta de consentimiento informado Hospital Ángeles México

Título del protocolo: "Evaluación del efecto de la insulina y la metformina sobre el perfil inflamatorio y la inmunidad innata de la placenta humana en un modelo in vitro de diabetes mellitus gestacional"

Investigador principal: Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz

Teléfono en el INPer: 55 5520 9900 ext. 478. Teléfono celular: 55 4841 7666

Instituciones participantes: Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Hospital de Gineco Obstetricia no. 4 IMSS, Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga. Presidente del Comité de Ética en Investigación: Dr. Alejandro Martínez Juárez. Teléfono: 55 5520 9900 ext. 316

## Estimada señora:

El presente estudio para el cual le estamos solicitando su participación tiene como finalidad conocer algunas funciones inmunes que se desarrollan en la placenta de pacientes que cursan con diabetes mellitus gestacional (DMG). Estetrabajo consiste en estudiar si la insulina y la metformina, tratamientos convencionales en el manejo clínico de pacientes con DMG, modifica la respuesta inmune en la placenta y si esto se refleja en cambios en el perfil de inflamación y de defensa contra el desarrollo de infecciones oportunistas.

La DMG es una condición transitoria de intolerancia a los carbohidratos que se reconoce y diagnostica por primera vez durante el embarazo, comúnmente entre las 24 y 28 semanas de gestación. El ambiente inflamatorio asociado a laDMG pone en riesgo el desarrollo del embarazo y la salud del recién nacido a corto y a largo plazo. Por esta razón, deseamos estudiar la regulación de la inflamación y defensa placentaria en la DMG con la intención de promover lasalud perinatal en estas pacientes. Los resultados de esta investigación permitirán entender cómo la insulina y la metformina participan en los mecanismos de inmunidad placentaria en la DMG. Adicionalmente, los resultados obtenidos también pueden contribuir a futuro en la valoración clínica de la monoterapia (un solo medicamento) o laterapia combinada con insulina y metformina para las pacientes con DMG.

En este proyecto contaremos con dos grupos experimentales: 1) Pacientes con diagnóstico reciente de DMG y 2) Pacientes sanas sin DMG. Si usted pertenece al grupo con DMG, entonces su participación consistirá en aceptar una única donación de aproximadamente 30 mL de sangre periférica, que se tomarán en ayuno y por venopunción de su brazo. La toma se realizará después de confirmar el diagnóstico de DMG y antes de que inicie su terapia clínica y/ofarmacológica. Si usted pertenece al grupo sin DMG, entonces su participación se realizará al término del embarazo y consistirá en la donación voluntaria de su placenta ya expulsada. Es importante aclarar que la donación de estos tejidos se considera de riesgo mínimo y no resultará en beneficio alguno para usted o para su bebé.

Para el diseño de este estudio se requieren 30 mL de su sangre si usted tiene DMG; o bien se requiere de su placenta y la sangre que hay en ella si usted cursa con un embarazo sano. En caso de que el médico tratante considere conveniente enviar parte de estos tejidos a patología, la toma de esta muestra tendrá prioridad sobre la nuestra y sólo utilizaremos el tejido restante para ser trasladado, procesado y cultivado en el laboratorio del Departamento de Inmunobioquímica aquí en el INPer. Los residuos de todos los tejidos serán desechados siguiendo los lineamientos de la Ley General de Salud y de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Si usted no acepta donar los 30 mL de sangre o su placenta, ello no afectará de ninguna manera la calidad y calidez de la atención para usted y su bebé en este hospital. Para cualquier queja, pregunta o duda podrá dirigirse con la Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz, Tel. 55209900, Ext. 478 del Instituto Nacional de Perinatología, Depto. Inmunobioquímica, con la garantía de recibir respuesta y aclaración acerca de asuntos relacionados con la investigación. Es muy importante aclarar que toda la información de tipo clínico y así como sus datos personales sensibles y no sensibles se mantendrán y tratarán con estricta seguridad y confidencialidad.

declaro libremente que estoy

Yo\_\_\_\_\_ de acuerdo en donar voluntariamente los siguientes teiidos:

Pacientes con DMG	30 mL de sangre periférica
Pacientes sanas con embarazo	Placenta completa y la sangre que hay en ella
normoevolutivo	

Reconozco que he sido informada de forma verbal y por escrito del objetivo, procedimientos, beneficios y riesgos del presente estudio, tal como se especifica en el Apartado A de este documento.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han garantizado aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que, al momento de firmar la presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento de participar, hasta antes de que se envíe la placenta al centro de investigación, sin que ello signifique que la atención médica que se me proporcione se vea afectada por este hecho. Además, se me ha informado que no tendré acceso a los resultados de la investigación.

Se me ha informado que el participar en este estudio se considera de riesgo mínimo y no resultará en beneficio alguno para mí o para mi bebé y tampoco repercutirá en el costo de la atención médica que se me deba brindar. Me queda claro que no recibiré ningún beneficio económico o de otro tipo al donar mi placenta, y que este hecho no conllevariesgos a mi salud ni a la de mi bebé, ni tampoco implica la realización de procedimientos diferentes a los prescritos por el médico. Además se me ha informado que toda la información relacionada con mi identidad y participación será confidencial, de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares, capítulo I De los principios de protección de datos Personales, artículos 6, 7,8 y 9, y del aviso de privacidad institucional. Asimismo, es de mi conocimiento que los gastos que esta investigación genere serán absorbidos en su totalidad por el presupuesto del provecto.

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos.

de\_\_\_\_\_. Ciudad de México a de

Firma de la participante

Nombre y firma del testigo 1

Nombre y firma del testigo 2

Nombre y firma del investigador

Yo