



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

---

**CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL MODULADOR DE LA PROGESTERONA EN  
LA RESPUESTA FUNCIONAL DE EXPLANTES DE VELLOSIDADES  
PLACENTARIAS HUMANAS**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

**GUIDO ALEJANDRO GARCÍA RUIZ**

ASESOR:

**Dra. en C. CLAUDIA VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA**

CO-ASESOR:

**Dr. en C. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO. 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

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

**Caracterización del papel modulador de la progesterona en la respuesta funcional de explantes de Velloidades placentarias humanas.**

Que presenta el pasante: Guido Alejandro Garcia Ruiz

Con número de cuenta: 307139542 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Octubre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Marco Antonio Vega López	
VOCAL	Dr. Andrés Romero Rojas	
SECRETARIO	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
2do. SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Corenado	

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

HM/mmgm\*

# Agradecimientos

Con todo mi gratitud, admiración y respeto a la Dra. Claudia Verónica Zaga clavellina por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su asesoría, por su apoyo, paciencia y pasión pero sobre todo por creer en mí. Muchas gracias doctora.

A mis compañeros de laboratorio Eduardo, Luisa, Gabriela, Araceli y Karla, por su ayuda incondicional, los consejos, las experiencias y todos los buenos momentos que pasamos juntos.

Quiero agradecer de forma especial a la futura doctora Pilar Flores Espinosa por la ayuda que me brindaste desde el primer momento, tus aportaciones, tus enseñanzas y tu dedicación que enriquecieron enormemente este trabajo pero más allá de esto, por tu amistad. Gracias Pily

Al Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes por abrirme sus puertas para la realización de este proyecto, en especial al departamento del inmunobioquímica y todas las personas que en el laboran que sin su apoyo esto no habría sido posible.

El Dr. Marco Vega no solo por ser mi asesor y parte del jurado, también por haber participado en mi formación académica.

A mis amigos Laura, Michel, Xo, Coco y Mauricio, con quienes compartí la alegría de ser bioquímico, por los malos, pero sobre todo los buenos momentos, por su ayuda, su compañía y todas las aventuras que vivimos gracias por aguantarme todos estos años.

A todos y cada uno de los profesores que influyeron en mi formación académica, por su tiempo, dedicación y pasión que me motivaron siempre a seguir adelante y superarme, especialmente al MVZ. Ángel Martínez, al QFB Ladislao Palomar, a Dr. Andrés Romero y al Dr. Salvador Fonseca por formar parte del mi jurado y tomarse el tiempo de revisar, sugerir y corregir este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la FES Cuautitlán por permitirme el honor de formar parte de ellas y realizar uno de los sueños más grandes de mi vida.

## Dedicatorias

A la persona más importante en mi vida, mi madre por el amor incondicional que me das, porque siempre has creído en mí y todos los logros que he obtenido en mi vida son y serán siempre por ti y para ti. Muchas gracias mama te quiero mucho.

A los dos más grandes profesores en mi vida, a mis hermanos Emilio y José con quienes comparto la alegría y pasión de ser químicos, gracias por su ayuda, sus consejos, sus regaños y todos los buenos momentos que juntos hemos pasado.

A Irais, por todas las cosas buenas que me das, gracias por apoyarme incondicionalmente en cada decisión que he tomado, gracias por el amor que me brindas, tu tiempo, tu consejos, por ser mi mejor amiga, por siempre estar ahí y por cada una de las cosas increíbles que a tu lado he vivido, siempre estaré agradecido contigo. Te quiero mucho flaquita

A Verónica en quien encontré una amistad verdadera y que ha influido notablemente en mi vida, gracias por enseñarme con tu ejemplo tantas cosas y mostrarme que siempre hay que hacerlas con pasión.



El proyecto de investigación de esta tesis fue realizado en el departamento de inmunobioquímica del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” bajo la dirección de la Dra. en C. Claudia Verónica Zaga Clavellina

# ÍNDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>pagina</b>
Índice de abreviaturas.....	I
Índice de figuras.....	IV
Índice de tablas.....	VI
Resumen.....	VII
<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 La placenta; estructura y función.....	2
1.2 Vellosidades placentarias.....	3
1.3 La placenta como órgano productor de hormonas.....	7
1.3.1 Síntesis de hormonas esteroideas.....	8
1.4 La progesterona.....	8
1.4.1 Mecanismo de acción y funciones de la P4.....	10
1.4.2 Receptores de la P4.....	12
1.4.3 Efectos no genómicos de la P4.....	13
1.4.4 Bloqueo de la acción de la P4.....	14
1.5 Tolerancia inmune en el embarazo.....	14
1.5.1 Mecanismos de tolerancia inmunológica durante el embarazo .....	15
1.6 Papel inmunológico de la p4 en el embarazo.....	16
1.7 Trabajo de parto.....	17
1.8 Parto prematuro.....	18
1.9 Infección intrauterina.....	19

1.9.1 La infección como factor de riesgo en el parto prematuro.....	20
1.10 Inmunidad en el embarazo.....	22
1.10.1 Inmunidad innata durante el embarazo.....	22
1.11 Receptores tipo-Toll (TLR's).....	23
1.11.1 TLR-4.....	24
1.12 Vía de señalización de TLR-4 dependiente de MyD8826.....	25
<b>2 ANTECEDENTES.....</b>	<b>26</b>
2.1 inflamacion durante el embarazo.....	26
2.2 Presencia de receptores tipo-Toll en la interfase materno-fetal.....	29
2.3 Participación de las citocinas en el inicio del trabajo de parto.....	30
<b>3 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>4 HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>5 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>33</b>
<b>6 OBJETIVO PARTICULAR.....</b>	<b>33</b>
<b>7 METODOLOGÍA.....</b>	<b>34</b>
<b>8 RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
8.1 Validación del método.....	45
8.1.2 Viabilidad estructural.....	45
8.2 Cinética de producción de citocinas.....	47
8.3 secreción de TNF $\alpha$ IL-1 $\beta$ e IL-6.....	48



8.4 Secreción de IL-8 y MIP-1 $\alpha$ .....	52
8.5 Secreción de IL-10.....	55
8.6 secreción de MMP-9.....	56
<b>9 DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>11. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>71</b>
<b>12 BIBLIOGRAFÍAS.....</b>	<b>72</b>

## INDICEN DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
µM	Micromol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
AF-	Activador de la función-
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
CD- (del inglés <i>cluster of differentiation</i> )	Grupo de diferenciación
CK-7 (del inglés <i>cytokeratin-7</i> )	Citoqueratina-7
CSF (del inglés <i>Colony Stimulating Factor</i> )	Factor estimulante de colonias
DBP	Displasia broncopulmonar
DD	Dominio de muerte
DI	Dominio inhibitorio
DUD	Dominio de unión a DNA
DUL	Dominio de unión a ligando
E2	Estrógenos
ELISA (del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
G-CSF (del inglés <i>granulocyte-colony stimulating factor</i> )	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF (del inglés <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
h	Hora
HDL (del inglés <i>High-density lipoproteins</i> )	Lipoproteínas de alta densidad
hGC	Gonadotropina coriónica humana
HLA (del inglés <i>Human leukocyte antigen</i> )	Antígeno leucocitario humano

<b>HSP (del inglés <i>Heat-Shock protein</i>)</b>	Proteína de choque térmico
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IκBα (del inglés <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>)</b>	Inhibidor de NFκB
<b>IKK (del inglés <i>I kappa B kinase</i>)</b>	Cinasa I kappa B
<b>IL-</b>	Interleucina-
<b>IRAK (del inglés <i>IL-1β Receptor-associated kinase</i>)</b>	Cinasa asociada al receptor de IL-1 β
<b>IRF (del inglés <i>interferon regulatory factor</i>)</b>	Factor regulador de interferón
<b>kDa</b>	KiloDaltones
<b>LBP (del inglés <i>LPS binding protein</i>)</b>	Proteína de unión a LPS
<b>LDL (del inglés <i>low density lipoprotein</i>)</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LRR (del inglés <i>leucine-rich repeats</i>)</b>	Repeticiones ricas en leucina
<b>MAPKs (del inglés <i>Mitogen-activated protein kinases</i>)</b>	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
<b>MCP-1 (del inglés <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
<b>MHC (del inglés <i>Major histocompatibility complex</i>)</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>Min.</b>	Minutos
<b>MIP-1α (del inglés <i>Macrophage Inflammatory Proteins-1α</i>)</b>	Proteína inflamatoria de macrófagos-1α
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMP- (del inglés <i>matrix metalloproteases</i>)</b>	Metaloproteasas de matriz
<b>MyD88 (del inglés <i>myeloid differentiation 88</i>)</b>	Factor de diferenciación mieloide 88

<b>NF-κB (del inglés <i>enhancer nuclear factor kappa light chains of activated B cells</i>)</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>P4</b>	Progesterona
<b>PAF (del inglés <i>platelet activating factor</i>)</b>	Factor activador de plaquetas
<b>PAMPs (del inglés <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PBS</b>	Solución buffer de fosfatos
<b>PG</b>	Prostaglandinas
<b>PRR (del inglés <i>pattern recognition receptors</i>)</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>RG</b>	Receptor de glucocorticoides
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>RPM</b>	Ruptura prematura de membranas
<b>SDR</b>	Síndrome de distres respiratorio
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>Th- (del inglés <i>lymphocytes T helper</i>)</b>	Linfocitos T cooperadores
<b>TLR (del inglés <i>Toll-like receptor</i>)</b>	Receptor tipo Toll
<b>TNF (del inglés <i>tumor necrosis factor</i>)</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TRAF (del inglés <i>TNFα Receptor associated factor</i>)</b>	Factor asociado al receptor de TNFα
<b>U/mL</b>	Unidades por mililitro
<b>V</b>	Volts
<b>XTT</b>	(2,3-bis- (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) - 2H-tetrazolio-5-carboxanilida

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CONTENIDO

- Figura 1:** Distribución de las células trofoblásticas en la placenta humana.
- Figura 2:** Biosíntesis de progesterona a partir del colesterol.
- Figura 3:** Mecanismo de acción clásico de la P4.
- Figura 4:** Estructura de las dos principales isoformas del receptor de P4 humano.
- Figura 5:** Ruta hipotética de infección intra-amniótica.
- Figura 6:** Cascada de señalización de TLR-4 tras la unión con su ligando.
- Figura 7:** Esquema de la metodología de cultivo de explantes de vellosidades placentarias humanas.
- Figura 8:** Gradiente de hidratación para cortes de explantes de placenta humana desparafinados.
- Figura 9:** Prueba de viabilidad funcional de los explantes de vellosidades placentaria.
- Figura 10:** Integridad estructural de las vellosidades placentarias en cultivo.
- Figura 11:** Tinción inmunohistoquímica anti-CK7 en explantes de vellosidades placentarias.
- Figura 12:** Cinética de producción de citocinas por explantes de vellosidades placentarias humanas en cultivo tras un estímulo con 1000 ng/mL de LPS. Las gráficas representan los promedios  $\pm$  error estándar, n=2. (A) citocinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ . (B) citocina anti-inflamatoria IL-10. (C) citocinas quimiotácticas MIP-1 $\alpha$  e IL-8.
- Figura 13:** Concentración de TNF $\alpha$  determinada por ELISA en medio de cultivo de los explantes de vellosidades placentarias en los diferentes tratamientos.

**Figura 14:** Concentración de IL-1 $\beta$  determinada por ELISA en medio de cultivo de los explantes de vellosidades placentarias en los diferentes tratamientos.

**Figura 15:** Secreción de IL-6 medida por ELISA como respuesta a los diversos tratamientos de explantes de vellosidades placentarias en cultivo.

**Figura 16:** Concentración de IL-8 determinada por ELISA en medio de cultivo de los explantes de vellosidades placentarias en los diferentes tratamientos.

**Figura 17:** Concentración de MIP-1 $\alpha$  determinada por ELISA en medio de cultivo de los explantes de vellosidades placentarias en los diferentes tratamientos.

**Figura 18:** Concentración de IL-10 determinada por ELISA en medio de cultivo de los explantes de vellosidades placentarias en los diferentes tratamientos.

**Figura 19:** Concentración de MMP-9 determinada por ELISA en medio de cultivo de los explantes de vellosidades placentarias en los diferentes tratamientos.

## ÍNDICE DE TABLAS

### CONTENIDO

**Tabla 1:** Características generales de las mujeres que fueron incluidas en el estudio.

**Tabla 2:** Condiciones en que se realizaron las ELISAS para las diferentes citocinas.

## RESUMEN

El embarazo es una condición única, durante el cual se desarrollan tejidos extraembrionarios accesorios como las membranas fetales y la placenta que en conjunto crean condiciones adecuadas para el desarrollo y crecimiento del producto durante 40 semanas. La placenta constituye la interfase entre la madre y el feto, es un órgano cuyas funciones son indispensables para la creación de condiciones inmuno-endocrinas que eviten el rechazo del producto por parte del sistema inmune de la madre y de manera simultánea se mantenga en la unidad feto-placentaria condiciones que aseguren una defensa efectiva ante cualquier reto inmunológico y/o infeccioso.

Las infecciones intrauterinas durante el embarazo representan un riesgo para la continuidad de este. La presencia de una infección intrauterina es el primer factor causal asociado a parto pretérmino (término del embarazo antes de las 37 semanas de gestación) esta patología complica el 6-15 % del total de embarazos y es responsable del 75 % de las muertes perinatales en infantes prematuros. Bajo un escenario de infección los mecanismos de defensa maternos y fetales actúan en respuesta al estímulo infeccioso liberando diferentes moduladores pro-inflamatorios como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, e IL-8, citocinas con la capacidad de estimular positivamente la síntesis y secreción de otros moduladores como MMPs y prostaglandinas, si bien estos elementos pro-inflamatorios, pro-degradativos y uterotónicos juegan un papel indispensable en los mecanismos que inducen el comienzo del trabajo de parto normal, una secreción descontrolada de estos es incompatible con el embarazo al romper el fino equilibrio inmunológico en la unidad materno-fetal, por lo cual deben existir mecanismos que regulen estos elementos de respuesta inmunológica para permitir la progresión y el éxito del embarazo.

En este sentido, la progesterona (P4), una hormona indispensable para la gestación, ha sido propuesta como una hormona moduladora de la respuesta inmune en la unidad materno-fetal, con propiedades anti-inflamatorias que permiten la progresión y éxito del embarazo.



El objetivo de este trabajo fue caracterizar el papel modulador de la P4 sobre la síntesis y secreción de moduladores pro-inflamatorios (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ ) y pro-degradativos (MMP-9) y anti-inflamatorios (IL-10) en vellosidades placentarias humanas, tras el estímulo con LPS simulando una situación de infección intrauterina aguda.

Para lograr este objetivo se realizaron explantes de vellosidades placentarias humanas a término (37-39 SDG), de pacientes sin evidencia de trabajo de parto ni antecedentes de infecciones. Estos explantes fueron pre-tratados con concentraciones de 0.01, 0.1 y 1  $\mu$ M de P4 durante 12 h, posteriormente el tratamiento con P4 fue renovado y se co-trató con 1000 ng/mL de LPS durante 24 h. La concentración de las diversas citocinas y MMP-9 fueron determinadas por ELISA.

Los explantes de placenta humana son responsivos al LPS, el estímulo de este generó un aumento en la producción de TNF $\alpha$  (8.53 veces), IL-1 $\beta$  (26.04 veces), IL-6 (4.82 veces), IL-8 (6.93 veces), MIP-1 $\alpha$  (5.06 veces), IL-10 (21.3 veces) y en MMP-9 no generó efecto significativo. P4 mostró ejercer un efecto inhibitorio en la síntesis de todos estos marcadores, siendo la concentración de 0.01  $\mu$ M la que ejerció un efecto significativo al reducir la producción de estas citocinas.

En conclusión la P4 es capaz de ejercer un efecto modulador en la respuesta inmune de explantes de vellosidades placentarias humanas inducida por LPS, estos resultados pueden explicar parcialmente como la P4 puede ejercer un efecto protector en las vellosidades placentarias generando un mecanismo de supresión o limitación en la producción de moduladores pro-inflamatorios y pro-degradativos que pueden poner en riesgo la continuidad del embarazo.

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante el embarazo el embrión humano desarrolla tejidos extraembrionarios accesorios que incluyen a la placenta y a las membranas fetales (corioamnióticas), que en conjunto proveen al producto una variedad de mecanismos para el intercambio, producción y el control de las relaciones con su medio ambiente.

Las membranas corioamnióticas delimitan la cavidad amniótica y contiene al líquido amniótico y al producto, están constituidas por tres capas germinales primarias, mínimamente innervadas y participan solo como accesorios fetales que son genéticamente idénticos al feto pero tienen un tiempo de vida limitado; existen solamente hasta el punto en que el feto se desarrolla lo suficiente para ser funcionalmente individual (Bryant-Greenwood, 1998). Las membranas que rodean a la cavidad amniótica están compuestas por el amnios y el corion, que se encuentran estrechamente adheridas, están constituidas de diferentes tipos celulares incluyendo células epiteliales, mesenquimales, trofoblásticas, todas ellas embebidas en una densa matriz de colágeno (Parry y Strauss, 1998).

Estas membranas constituyen una entidad anatómica altamente dinámica y compleja, la estructura elástica y fuerza tensil de estas, permiten que absorban el estrés mecánico derivado del crecimiento fetal (Bryant-Greenwood, 1998).

El corion se forma a partir del blastocisto implantado en el polo hacia la cavidad endometrial que está cubierta por el corion frondoso y la decidua *capsularis*; el suministro de sangre se restringe a esta área. Por su parte el amnios se forma por separado tanto de componentes epiteliales como mesenquimales y se fusiona con el mesodermo del corion recibiendo el nombre de "corioamnios" (Bryant-Greenwood, 1998). La placenta por su parte como órgano de relación estrecha entre el feto y la madre comienza a formarse en la segunda semana y continúa su evolución a lo largo del embarazo aunque sus cambios son menores.

## 1.1 LA PLACENTA; ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

La placenta es un órgano altamente especializado del embarazo que junto con las membranas corioamnióticas y el líquido amniótico mantienen el crecimiento normal y el desarrollo del feto (Gude *et al.* 2004). A lo largo del embarazo, la placenta crece rápidamente y presenta cambios en su estructura morfológica de acuerdo al desarrollo fetal, la placenta es un órgano temporal, constituye la interfase entre la madre y el embrión/feto, que realiza una serie de funciones importantes durante toda la gestación; dentro de estas funciones se incluyen el anclaje del feto a la pared uterina, el intercambio  $O_2/CO_2$ , provee de nutrientes y remueve los productos de desecho que genera el embrión (Furukawa *et al.* 2014), por esta razón, se ha descrito a este tejido como aquel que anticipa las funciones que en un futuro cumplirán el riñón, hígado e intestino (Jansson y Powell, 2007).

El adecuado desarrollo y funcionamiento de la placenta es crítico para la supervivencia del feto. A pesar del hecho de que todas las placentas presentan características conservadas existen diferencias significativas en la forma de la placenta, la nomenclatura de la morfología de la placenta es basada en las contribuciones de las diferentes membranas extraembrionarias y en las capas de tejido intermedias entre la sangre maternal y la fetal, así como su forma (por ejemplo, difusa, cotiledones, sonaria, discoidal, bidiscoidal), el tipo de interfase placentar (por ejemplo, epiteliochorial, endoteliochorial, hemocorial), y la naturaleza de las interdigitaciones materno-fetal (por ejemplo, laminar, vellosa, trabecular, laberíntica o plegada). Las características anatómicas de la placenta humana incluyen una forma discoidea, una interfase hemocorial e interdigitaciones vellosas (Huppertz *et al.* 2013 y Enders y Blankenship, 1998).

La placenta humana presenta una organización progresiva y funcional, que de manera sincrónica se adapta a las necesidades del desarrollo de los compartimientos embrionario/fetal y maternos. El desarrollo de esta por parte del embrión depende de su implantación, lo que a su vez requiere que éste se encuentre metabólicamente activo y en presencia de un endometrio adecuadamente estimulado; preparado por estrógenos (E2) y progesterona (P4), y

ello solo puede ocurrir durante los días 20-24 del ciclo, las células del trofoectodermo del polo embrionario se adhieren directamente al endometrio proceso conocido como decidualización (Gallegos *et al.* 2008 y Purizaca-Benites, 2008) sitio en el cual se genera la interfase fisiológica entre la madre y el producto.

Previo a la implantación, el blastocisto está constituido por 100 a 250 células que se adhiere al endometrio por aposición, la misma que es regulada por interacciones paracrinas entre los dos tejidos; así, el trofoblasto que cubre el blastocisto expresa la L-selectina, que constituye un sistema que media la adhesión inicial del blastocisto al epitelio uterino (Purizaca-Benites, 2008).

El desarrollo de la placenta es un proceso altamente coordinado entre el feto y la madre, la invasión del trofoblasto al tejido uterino y el remodelado de las arterias espirales uterinas permite aportar sangre y transferir nutrientes, gases y remoción de desechos (Gude *et al.* 2004). Este proceso normalmente se completa entre la semana 16-18 de gestación y tiene como fin la transformación de las arterias espirales en vasos dilatados, que no responden a los vasoconstrictores (Jansson y Powell, 2007).

En el ser humano el lecho vascular materno útero-placentario está compuesto por cotiledones, lóbulos o placentomas, lo que es similar en muchas especies. Estos placentomas o cotiledones reciben la sangre de las arterias espirales maternas que, en aproximadamente un número de 80 a 100, atraviesan la lámina decidual y entran en los espacios intravellosos con intervalos más o menos regulares (Gallegos *et al.* 2008).

## **1.2 VELLOSIDADES PLACENTARIAS: CÉLULAS DEL TROFOBLASTO**

La unidad funcional y estructural de la placenta humana son las vellosidades coriónicas; estas se encuentran ancladas a la pared del útero o flotando en el espacio intravelloso (Tarrade *et al.* 2001), el desarrollo de estas vellosidades comienza entre los días 12 y 18 post-concepción; las trabéculas trofoblásticas

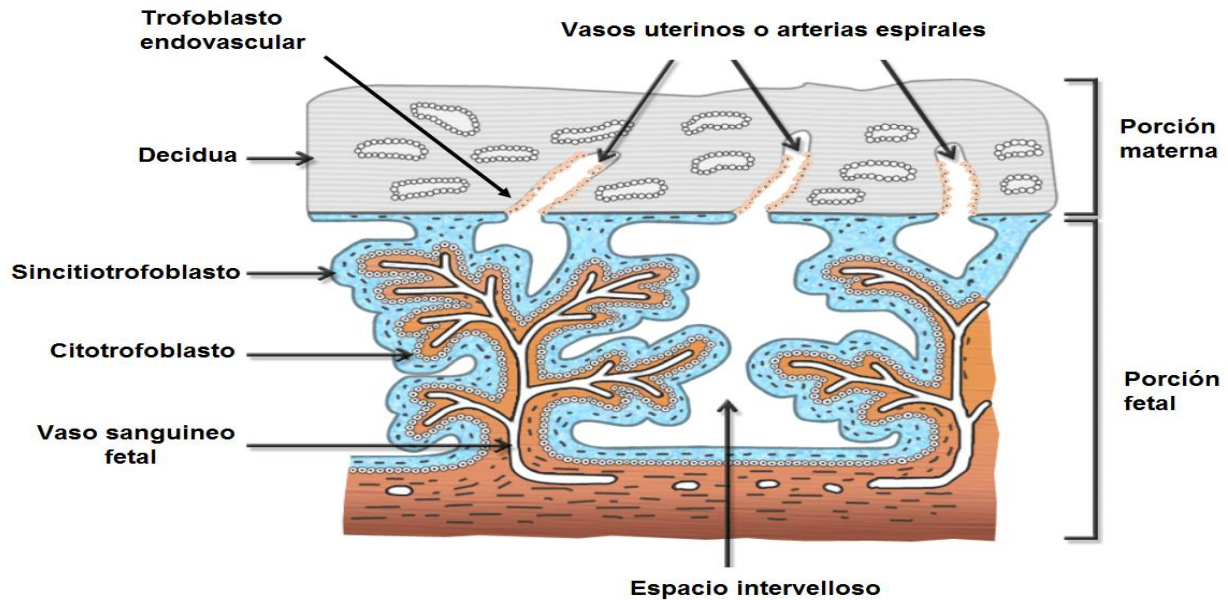
comienzan a proliferar masivamente formando protuberancias trofoblásticas conocidas como vellosidades primarias (Castellusi *et al.* 2000).

La placenta humana es caracterizada por una invasión extensiva del trofoblasto dentro del útero materno, seguido del contacto directo del trofoblasto con la sangre materna (Tarrade *et al.* 2001), solo dos días, después el tejido conectivo embrionario derivado del mesénquima extraembrionario invade estas vellosidades transformándolas en vellosidades secundarias.

Tras los días 18 y 20 post concepción los primeros capilares fetales se pueden observar en este mesénquima y la aparición de capilares en el estroma veloso marca el desarrollo de vellosidades terciarias (Castelluci *et al.* 2000). Es el trofoectodermo del blastocito el responsable del desarrollo de la placenta, en las primeras semanas después de la implantación, el linaje del trofoblasto rápidamente se diferencia en dos capas: el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto que a su vez cuenta con una variedad de subtipos:

- (i) Trofoblasto veloso: este tipo incluye el sincitiotrofoblasto que forma todo el revestimiento epitelial de los árboles vellosos, y las células del citotrofoblasto veloso que representa la principal población germinativa que da origen al sincitiotrofoblasto vía fusión sincitial que actúa tanto para proteger al feto de la respuesta inmune materna y como el intercambio de nutrientes y gases.
- (ii) Trofoblastoextraveloso: este tipo celular comprende células derivadas células del trofoblasto, columnas de anclaje de las vellosidades que no proliferan e invaden a los tejidos maternos en el lecho placentario de la pared uterina. (Huppertz *et al.* 2013; Donnelly y Campling, 2014 y Forbes y Westwood 2010).

Estas células placentales han sido subdivididas de acuerdo a la interacción con el tejido materno (Trundley *et al.* 2006) (Figura 1).



**Figura 1:** Distribución de las células trofoblásticas en la placenta humana. (Tomado y modificado de <http://www.bartleby.com/107/illus37.html>)

Durante la primera semana después de la implantación, es el sincitiotrofoblasto temprano el tejido embrionario que entra en contacto directo con los tejidos maternos, el fluido de las lagunas del sincitiotrofoblasto desarrollan un solo gran espacio que se convertirá en el espacio para la sangre de la madre al final del embarazo (espacio intervelloso) (Huppertz *et al.* 2013). Los espacios intervellosos son completamente rodeados por un sincitio multinucleado, llamado sincitiotrofoblasto, la circulación de la madre entra en estos espacios vía arterias espirales endometriales (Gude *et al.* 2004).

El trofoblasto veloso cubre la vellocidad coriónica y se involucra con el intercambio de gas y nutrientes entre la madre y el feto, el trofoblasto veloso por su parte invade profundamente dentro de la pared uterina (más allá del miometrio)

y está directamente implicado en el anclaje de la vellosidad coriónica en útero (Tarrade *et al.* 2001)

Casi todo el intercambio materno-fetal y feto-maternal tiene lugar en las vellosidades placentarias, solo hay una contribución limitada a este intercambio por las membranas extraplacentarias. Además la mayoría de las actividades metabólicas y endocrinas de la placenta se han localizado en las vellosidades (Castellucci, 2000).

- **ESTRUCTURA BÁSICA DEL ÁRBOL VELLOSO**

Además de la capa epitelial de células ininterrumpidas del sincitiotrofoblasto y la capa de células agregadas del citotrofoblasto la vellosidad placentaria está compuesta por: la membrana basal del trofoblasto que separa el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto del centro del estroma de la vellosidad, el estroma está compuesto por una numerosa variedad y tipos de células de tejido conectivo, fibras de tejido conectivo y sustancias fundamentales (Castellucci y Kaufmann, 2006).

Inicialmente la membrana placentaria está compuesta por cuatro capas; el sincitiotrofoblasto (en contacto con la madre), una capa de células de citotrofoblasto (que da origen al sincitiotrofoblasto), tejido conectivo de la vellocidad y el endotelio de los capilares del feto; a las 20 semanas el citotrofoblasto desaparece reduciendo la distancia entre el sincitiotrofoblasto y el endotelio fetal, así que la sangre materna está más cerca. (Gude *et al.* 2004) conforme el embarazo aumenta y la demanda de nutrientes también por lo cual el sincitiotrofoblasto va aumentando (Forbes *et al.* 2010).

### 1.3 LA PLACENTA COMO ÓRGANO PRODUCTOR DE HORMONAS

Los cambios endocrinológicos son esenciales para el inicio y mantenimiento de la gestación, además del correcto crecimiento y desarrollo fetal, las hormonas placentarias tienen blancos intrauterinos y extrauterinos y se ha demostrado que a pesar de que la placenta no es un órgano estrictamente dependiente de los sistemas maternos, puede estar regulado por los ejes hipotálamo-hipofisario-adrenal y el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal, teniendo cada célula placentaria una función endocrinológica diferente que varía no solo de célula a célula sino en los estados de la gestación (Rodríguez-Cortes y Mendieta-Zerón, 2014).

Durante el embarazo se interrumpe la producción hormonal de los ovarios y es la placenta quien funciona como glándula endócrina, que produce y secreta las hormonas necesarias para el mantenimiento de la gestación (Thellin *et al.* 2000), este es un sitio donde se sintetizan cantidades importantes de péptidos y hormonas esteroideas, así como factores de crecimiento y sus respectivos receptores.

Las hormonas placentarias son requeridas para el establecimiento y mantenimiento del embarazo, la adaptación del organismo materno para el embarazo, el crecimiento y bienestar fetal así como mecanismos involucrados en el parto (Evain-Brion y Malassiné, 2005), el tejido endocrino de la placenta es el sincitiotrofoblasto que recubre a las vellosidades coriónicas el sitio de intercambio materno-fetal.

El sincitiotrofoblasto es multifuncional, pero sus principales funciones son la absorción, el intercambio y funciones hormonales específicas, el sincitiotrofoblasto es altamente polarizado y secreta la mayoría de las hormonas polipeptídicas en la circulación (Huppertz *et al.* 2014 y Evain-Brion y Malassiné, 2005).

Cerca de la semana 6 del embarazo la placenta humana es el sitio más importante de producción de hormonas esteroideas (Evain-Brion y Malassiné, 2005), los factores endocrinos, paracrinos y/o autocrinos que son producidos por la placenta incluyen estrógenos (producidos en conjunto con la glándula adrenal y



posiblemente con el hígado fetal), P4, gonodotropina coriónica y lactógeno placentario (Gude *et al.* 2004).

### **1.3.1 SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDEAS**

Durante el segundo y tercer trimestre del embarazo los niveles de colesterol se elevan en la circulación materna, así como los triacilglicéridos, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL). La membrana apical del sincitiotrofoblasto de las vellosidades, en contacto directo con la sangre materna, presenta receptores específicos para estas lipoproteínas (Evain-Brion y Malassiné, 2005), tras la internalización, las LDL se degradan en los lisosomas y liberan el colesterol, el cual es empleado para la esteroidogénesis y la síntesis de la membrana celular.

Además de las acciones ya mencionadas de las hormonas producidas por la placenta, estas preparan a la madre para el parto y la lactación los dos principales esteroides secretados por la placenta son los estrógenos (principalmente estradiol) y la P4.

La P4 mantiene entre muchas otras funciones, la quiescencia del endometrio (Donnelly y Campling, 2014). La producción de P4 placentaria se lleva a cabo gradualmente a lo largo de la aparición de los diversos sistemas enzimáticos necesarios para su síntesis en el sincitiotrofoblasto (Evain-Brion y Malassiné, 2005).

## **1.4 LA PROGESTERONA**

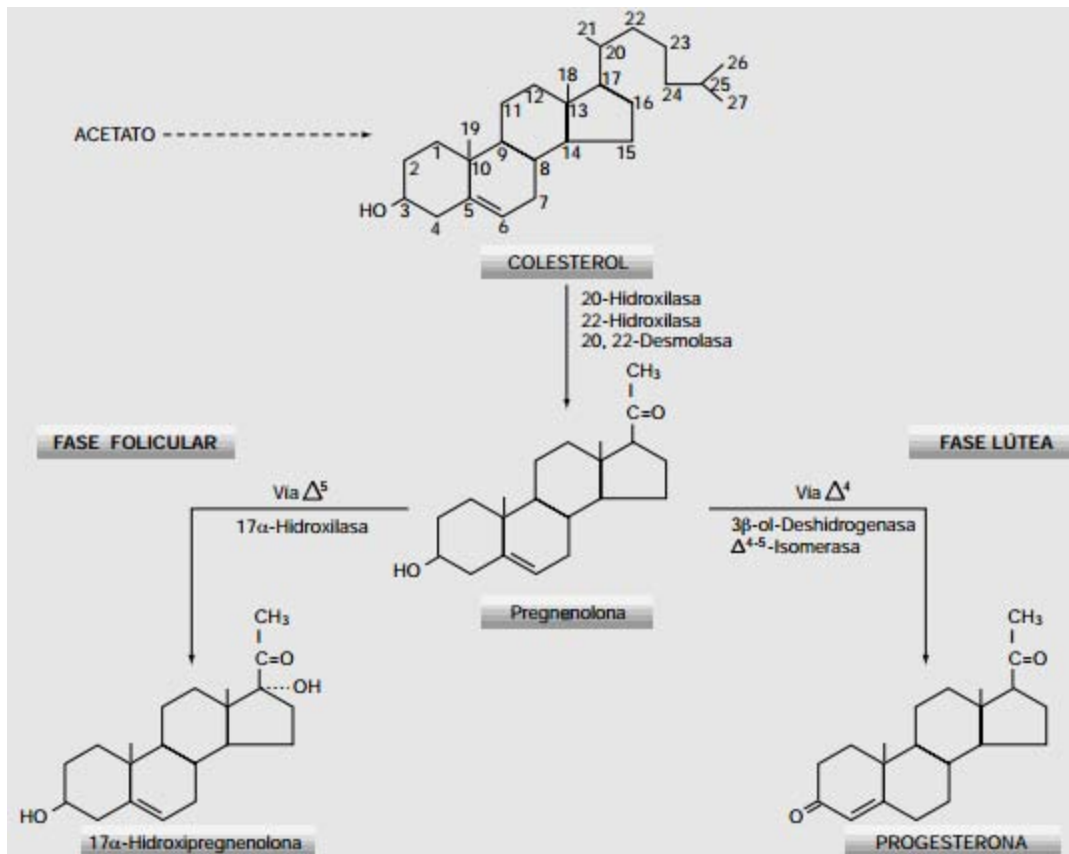
La P4 es producida por el ovario bajo la influencia de las hormonas hipotálamo-hipofisarias, principalmente por el cuerpo amarillo que presenta durante la segunda mitad del ciclo menstrual y a partir del tercer mes del embarazo por la placenta. La secreción de la P4 comienza antes de la ovulación, desde el folículo destinado a la liberación del óvulo, cuando no se produce el

embarazo, el cuerpo lúteo involucre, disminuyendo los niveles de P4 y comienza la menstruación.

Si el óvulo es fertilizado, el trofoblasto comienza a secretar hGC (gonadotropina coriónica humana) prolongando la vida funcional del cuerpo lúteo (Orizaba-Chávez *et al.* 2013), la P4 es crítica no solo para el establecimiento sino también para el mantenimiento del embarazo, entre sus funciones se encuentra el apoyo a la ovulación y el útero, así como el desarrollo de la glándula mamaria.

Durante el embarazo, la producción de P4 eventualmente es sostenida por la placenta, una vez que el trofoblasto se implanta comienza la producción creciente (Arck *et al.* 2007 y Karolicki, 1979). Se ha documentado que la placenta humana posee las enzimas necesarias para la conversión de acetato a colesterol *in vitro*, sin embargo, esto lo realiza en poca cantidad ya que *in vivo* usa el colesterol materno para sintetizar P4 (Karolicki, 1979).

En humanos la producción de P4 se eleva gradualmente durante la gestación para alcanzar niveles de 3µg/g de tejido placentario (1-10µM), mientras que en el suero la concentración se encuentra en un rango de 100 a 500 nM durante el embarazo (Arck *et al.* 2007 y Szekeres-Bartho *et al.* 2001) donde es acarreada tras su liberación en la sangre por la transcortina (globulina de unión a corticoesteroides), al término del embarazo las concentraciones oscilan entre 475-556 nmol/L (150-175 ng/ml) (Barrera *et al.* 2007).



**Figura 2:** Biosíntesis de progesterona a partir del colesterol (tomada de Amado y Flórez, 2013).

#### 1.4.1 MECANISMO DE ACCIÓN Y FUNCIONES DE LA P4

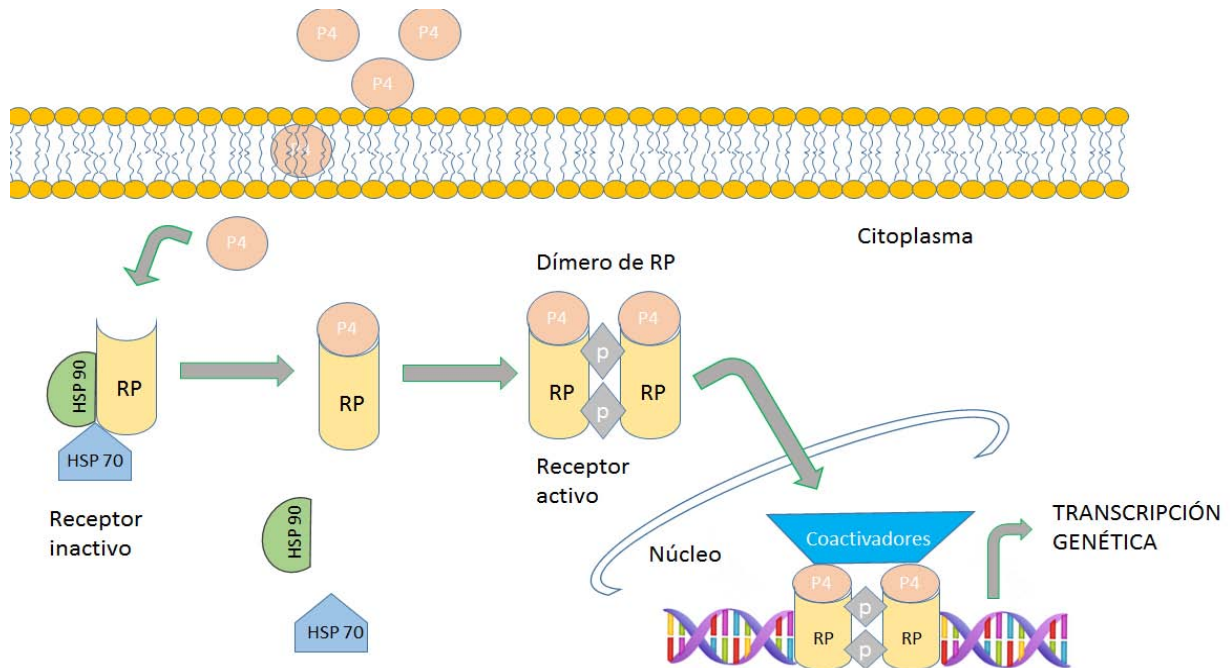
Entre los efectos fisiológicos de la P4 que mejor se han caracterizado en el humano son: a) en el útero y ovario induce la ovulación, facilita la implantación y el mantenimiento del embarazo en etapas tempranas; b) en la glándula mamaria: desarrollo alveolar-lobular en preparación para la secreción de leche; c) en el cerebro: la expresión neuro-conductual asociada con la respuesta sexual y d) en el hueso: previene la pérdida del hueso (Al-Asmakh, 2007) por mencionar algunas.

En el embarazo la P4 es esencial no solo para el establecimiento del embarazo sino también para el mantenimiento de este. Su mecanismo de acción es similar al de otras hormonas, esta mediado por receptores de P4 (RP) intracelulares, la unión P4-RP induce una cascada de señales que modulan la expresión de genes

específicos (Orizaba-Chávez *et al.* 2013 y Mendoza, 2008), cuyos productos intervienen en la regulación de diferentes procesos biológicos.

Los RP en ausencia de la P4 se encuentran formando un complejo oligomérico inactivo con las proteínas de choque térmico (heat shock protein-HSP) de 90 y 70kDa, inmunofilinas, y otras proteínas de identidad desconocida. En presencia de P4, capaz de ingresar a la célula mediante la difusión por la membrana debido a su naturaleza lipídica, este complejo se disocia y los receptores adquieren la capacidad de unirse a P4 y dimerizarse, induciendo la fosforilación del receptor, como consecuencia de esta interacción sitios de unión a otros esteroides se bloquean, por tanto, P4 presenta una actividad antiestrogénica, antiandrogénica, y antimineralocorticoide (Edwards *et al.* 1995 y Conneely *et al.* 2003).

El dímero ahora es capaz de unirse a secuencias específicas del DNA que actúan como elementos de respuesta a P4, en las regiones promotoras de diferentes genes blanco lo que produce el reclutamiento de co-activadores específicos o inhibidores que modulan la actividad transcripcional (Druckmann y Druckmann, 2005). (Figura 3)



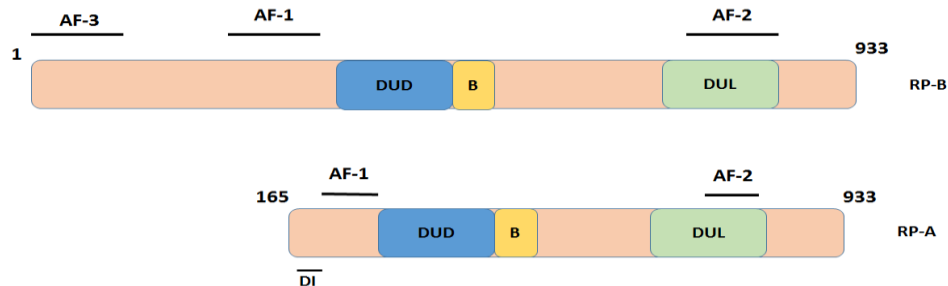
**FIGURA 3:** Mecanismo de acción clásico de la P4. La unión del receptor ligando provoca la liberación de los complejos de proteínas de choque térmico (HSP) HSP 70 y HSP 90 produciendo la liberación del receptor el cual se dimeriza y fosforila siendo capaz de unirse a elementos de respuesta a P4 induciendo la transcripción de genes específicos.

#### 1.4.2 RECEPTORES DE LA P4

La acción genómica de la P4 está mediada principalmente por dos receptores intracelulares; las isoformas RP-A (82 kDa) y RP-B (116 kDa), ambas proteínas son codificadas por un mismo gen localizado en el cromosoma 11 q22-q23 humano, pero son regulados por diferentes promotores. RP-A difiere de RP-B por la ausencia de los primeros 123-165 amino ácidos hacia el extremo amino-terminal (N-terminal) (Szekeres-Bartho *et al.* 2009, Mesiano *et al.* 2002., y Bottino y Lanari, 2010).

Ambas isoformas del RP forma parte de la súper familia de receptores nucleares, RP-A y RP-B constan de un dominio central de unión a DNA (DUD), que está flanqueado en el extremo N por un activador de la función 1 (AF-1) y en el carboxi-terminal (C-terminal) por una región bisagra, así como un dominio de unión a ligando (DUL) que contiene un segundo activador de la función 2 (AF-2). RP-B en

cambio cuenta con un AF-3 situado en la región N-terminal de tal manera que ha sido demostrado que RP-B ser más potente activador de la transcripción de varios genes; por otra parte RP-A puede reprimir la actividad RP-B al presentar un dominio inhibitorio (DI) actuando como el represor de RP-B (Al-Asmakh, 2007 y Vladic, 2012) (Figura 4)



**Figura 4:** Estructura de las dos principales isoformas del receptor de la P4 (RP) humano. **DUL** dominio de unión a ligando; **B** región de bisagra; **DUD** dominio de unión a DNA; **DI** (dominio inhibitorio); **AF-1**, **-2**, y **-3** activador de la función. (Tomado y modificado de Mulac-Jericevic y Conneely, 2004).

### 1.4.3 EFECTOS NO GENÓMICOS DE LA P4

Existe evidencia de que todas las hormonas esteroides inducen efectos que parecen no necesitar de la actividad transcripcional de los receptores clásicos, estas acciones son rápidas (segundos) a través de la activación de vías de señalización intracelular que resulta en alteraciones y la producción de segundos mensajeros como la tirosin-cinasa, MAPK's (Mitogen-Activated Protein Kinases), la elevación del calcio intracelular dado que estos efectos ocurren en tiempos muy cortos como para ser mediados por la síntesis de ribonucleic acid (RNA) o nuevas proteínas, se conocen como efectos no genómicos (Bottino y Lanari, 2010 y Stjernholm, 2012).

#### **1.4.4 BLOQUEO DE LA ACCIÓN DE LA P4**

Existen una variedad de ligandos sintéticos (tanto esteroides como no esteroides) que se unen al receptor de P4 y que al competir por la unión con la hormona natural para ocupar el receptor son capaces de inhibir la acción de la P4. El mecanismo por el cual estos antagonistas inactivan al receptor de la P4 es compleja y aun no entendida por completo, aunque se sabe que los pasos normales para la activación del receptor como la disociación de las HSP, la dimerización y la unión a elementos de respuesta a ligando no se ven alterados (Leonhardt *et al.* 2003).

Originalmente los antagonistas de la P4 fueron divididos en antagonistas tipo 1 y tipo 2. Los antagonistas tipo 1 fueron considerados como “puros” cuyo efecto antagonista de la acción de P4 es resultado de la unión únicamente al RP; en contraste los antagonistas tipo dos (como Mifepristona o RU486) pueden bloquear la acción de la P4 a través de la inhibición de la unión de esta al RP y al receptor de glucocorticoides (RG) a pesar de no contar los mismos contactos en el DUL y su acción varía dependiendo del tipo de célula, el contexto del promotor y otras vías de señalización (Spitz, 2003).

El RU486 fue el primer antagonista que exhibió actividad anti-P4 en humanos y ha sido extensamente usado como un método de contracepción post-coital y aborto (Leonhardt *et al.* 2003 y Edwards *et al.* 1995).

#### **1.5 TOLERANCIA INMUNE EN EL EMBARAZO**

El éxito del embarazo humano, donde el feto reside confortablemente dentro del útero materno durante 9 meses, desafía los preceptos de la inmunología, durante este estadio múltiples estrategias son desplegadas para mantener al feto en un medio ambiente inmunológicamente privilegiado en la cavidad amniótica. Los mecanismos propuestos incluyen una separación física de los tejidos maternos y fetales, falta de antígenos fetales que podrían estimular el rechazo del injerto y el desarrollo de la tolerancia (Levy, 2007).

El sistema inmune materno es claramente activo y bajo ciertas condiciones puede contribuir al daño fetal/muerte; procesos patológicos bien definidos incluyen infección en el embarazo que activa macrófagos que secretan altos niveles de citocinas tipo Th-1 que alteran el delicado balance de la interfase materno-fetal (Hunt *et al.* 2005).

Durante el embarazo el producto puede considerarse como un injerto semi-alogénico (aloinjerto), desde el punto de vista inmunológico debería ser rechazado por la madre (Baraño, 2011) sin embargo, madre y feto desarrollan una serie de estrategias conjuntas que permiten crear un ambiente inmunológicamente privilegiado y tolerogénico (Kumpel y Manoussaka, 2011).

### **1.5.1 MECANISMOS DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA DURANTE EL EMBARAZO**

Un proceso crítico para el establecimiento de la tolerancia inmunológica del producto es la generación de un punto de equilibrio entre los factores pro- y anti-inflamatorios. Múltiples grupos alrededor del mundo han propuesto que la interacción materno-fetal evita la secreción excesiva de factores pro-inflamatorios, lo que favorece una gestación exitosa.

A nivel de la placenta, una variedad de mecanismos están involucrados, ejerciendo su acción de forma individual o en interacción con otros; la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) clase I es reducida en el sincitiotrofoblasto pero expresan moléculas HLA (del inglés human leukocytes antigen) clase I no clásicas como HLA-C, HLA-E y HLA-G son secretadas activamente, esta última principalmente se cree que modula el desarrollo de la respuesta inmune *in situ*, ya que se ha reportado que la expresión de HLA-G disminuye la actividad de células NK y de linfocitos T citotóxicos (Thellin y Heinen, 2003 y Vázquez-Rodríguez *et al.* 2011).

Estudios recientes han sugerido que las extra vellosidades coriónicas del trofoblasto expresan el ligando de Fas (FasL o CD178), miembros de la familia



TNF (factor de necrosis tumoral) que también están altamente expresados en linfocitos activados. El sistema CD95/CD178 promueve la muerte celular por apoptosis de los linfocitos activados por antígenos fetales generando tolerancia inmunológica (Vázquez-Rodríguez *et al.* 2011)

Durante el embarazo una fuente adicional de citocinas Th1 y Th2 son: el epitelio y estroma decidual, cito y sincitiotrofoblasto, corión y amnios. Las citocinas originadas por estos tejidos participan desde su origen en la tolerancia materna al feto, además regulan la inmunidad local contra factores infecciosos, regulan la producción hormonal de la placenta y la remodelación del tejido durante la invasión del trofoblasto (Wilezyński, 2005).

La placenta actúa como una barrera inmunológica activa en el sentido que permite que organismos antigénicamente diferentes se toleren el uno al otro, por eso el embarazo es un desafío inmunológico único donde órganos especializados y hormonas como la P4 participan de forma marcada (Iglesias *et al.* 2002).

## **1.6 PAPEL INMUNOLÓGICO DE LA P4 EN EL EMBARAZO**

La P4 como hormona esteroide participa en el mantenimiento de la gestación en humanos aumentando considerablemente durante el embarazo y alcanza concentraciones que, *in vitro*, disminuyen la actividad de los linfocitos, regulando diferentes funciones, aspectos celulares y moleculares implicados en el proceso de la implantación, reduce la capacidad reactiva de la madre contra los antígenos fetales.

Es importante para el mantenimiento del embarazo porque controla la receptividad del endometrio, la implantación del blastocito, el desarrollo de la placenta y el reclutamiento de células NK de la decidua, regula el reconocimiento de antígenos del MHC paterno, la sensibilidad de células presentadoras de antígeno y suprime la actividad de macrófagos, todo lo anterior se lleva a cabo induciendo una inmuno-regulación a través de la producción de citocinas tipo Th2 (Rico-Rosillo, Vega-Robledo, 2012).

Además de sus efectos sobre el útero, la P4 media interacciones entre el aparato endocrino e el sistema inmune, con el fin de crear un entorno inmunológico favorable para el feto. La P4 se ha demostrado que bloquea la proliferación de linfocitos estimulada por mitógenos, prolonga la supervivencia del aloingerto, modula la producción de anticuerpos, disminuye la actividad oxidativa de los monocitos, reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a productos bacterianos y actúa sobre el patrón de citocinas durante el embarazo (Szekeres-Bartho *et al.* 2009).

## **1.7 TRABAJO DE PARTO**

El trabajo de parto representa el fin del privilegio inmunológico y el inicio de un complejo proceso para expulsar al producto hacia el ambiente extrauterino. El trabajo de parto normal requiere de la coordinación de una serie de eventos anatómicos, fisiológicos, bioquímicos, endocrinológicos e inmunológicos que preparan al binomio madre-producto para concluir exitosamente la gestación (Romero *et al.* 2006). Evidencia clínica y experimental indican que el proceso del trabajo de parto requiere al menos tres procesos fisiológicamente independientes: la activación del miometrio, que permite que el útero pase de un estado de quiescencia a uno de contractilidad rítmica y efectiva; el remodelado del cérvix que se caracteriza por el ensanchamiento del canal cervical derivado entre otras cosas de un acelerado proceso de degradación de matriz extracelular y en las etapas avanzadas del trabajo de parto, la ruptura de las membranas fetales que mantienen al producto en un ambiente privilegiado hasta que el cérvix está casi completamente dilatado y las contracciones garantizan la expulsión del producto (Patni *et al.* 2007 y Challis *et al.* 2000).

La progresión del trabajo de parto normal, requiere de la coordinación de los procesos de activación miometrial y dilatación cervical y en las etapas más avanzadas de la ruptura de las membranas corioamnióticas; en este sentido existe evidencia clínica y experimental que indica que estos eventos son precedidos por un cambio del ambiente inmunológico de la unidad materno-fetal inducido por el

incremento en la expresión, síntesis y secreción de diversas citocinas pro-inflamatorias como el TNF $\alpha$  y las Interleucinas-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e, IL-6 (Norman *et al.* 2007).

Estos moduladores inmunológicos inducen profundos cambios en las vías de señalización de tejidos maternos y fetales, así como de las células profesionales del sistema inmune que migran hacia la cavidad uterina induciendo la expresión de otros mediadores como prostaglandinas (PGs) con efectos uterotónicos (Ludin-Schiller y Mitchell 1991; Bowen *et al.* 2002), enzimas metaloproteasas con propiedades colagenasa y gelatinasas que degradan diferentes elementos de la matriz extracelular (Vadillo-Ortega, 1995), moduladores pro-apoptóticos que alteran la viabilidad y estructura de los tejidos y factores quimiotácticos como la IL-8, que juega un papel clave en la atracción selectiva, activación y degranulación de granulocitos neutrofilicos en el estroma cervical y miometrio (Elliot *et al.* 2000 y Kelly y *et al.* 2002).

## **1.8 PARTO PREMATURO**

El trabajo de parto prematuro representa la principal causa de prematurez (28-37 SDG) y extrema prematurez (20-28 SDG) asociadas a secuelas de corto y largo plazo que constituyen un serio problema en términos de mortalidad, discapacidad y costo social; esta patología gineco-obstétrica complica el 6-15 % del total de embarazos y es responsable del 75 % de las muertes perinatales que ocurren en infantes nacidos prematuramente (Goldenberg *et al.* 2008 y Slattery y Morrison, 2002).

La alta prevalencia de esta patología está directamente relacionada con la pobre caracterización de los mecanismos y/o señales que inducen el inicio y progresión del trabajo de parto normal, el cual está asociado con el establecimiento de un proceso inflamatorio encabezado por moduladores tales como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , MCP-1, MIP1 $\alpha$ , IL-8, y RANTES que modulan la síntesis de diferentes factores incluidos: los de actividad uterotónicos como las prostaglandinas (PG)-F2 $\alpha$  y PGE3; moduladores del recambio de matriz extracelular como metaloproteasas de matriz

(MMP)-9, MMP-1, MMP-13 y moduladores que modifican la viabilidad celular. En conjunto, estos factores generan un ambiente que modifica irreversiblemente el privilegio inmunológico de la unidad materno-fetal creando condiciones incompatibles con la continuidad del embarazo (Romero *et al.* 2006 y Patni *et al.* 2007).

## **1.9 INFECCION INTRAUTERINA**

Las infecciones intrauterinas durante el embarazo comprometen la salud del binomio madre-hijo y representan un factor que genera gastos de salud a corto y largo plazo (Robbins y Bakardjev, 2012). La infección subclínica del espacio corio-decidual y del líquido amniótico es considerada el primer factor causal asociado a parto pretérmino, la evidencia más directa proviene de laboratorios donde estudios hechos en modelos experimentales de infección intrauterina se asoció con el parto pretérmino y prematuro (McParland *et al.* 2004).

Las causas de ruptura prematura de membranas (RPM) en la mayoría de los casos es desconocido, sin embargo, la infección intrauterina asintomática se ha asociado como un precursor frecuente de esta complicación. Los factores de riesgo implicados en la RPM son generalmente similares a los del trabajo de parto prematuro con membranas intactas, no obstante las infecciones desempeñan un papel importante (Goldenberg *et al.* 2008).

En este mismo sentido la infección intraamniótica se define como la presencia de un cultivo positivo en líquido amniótico obtenido por amniocentesis y se denomina corioamnionitis caracterizada por una larga secuencia fisiopatológica, donde está involucrada la infección intraamniótica, y cuya consecuencia es la finalización del embarazo sin tomar en cuenta la edad gestacional (Koch *et al.* 2008).

La corioamnionitis histológica tiene elevada incidencia, aparece aproximadamente en 1 % de todas las gestaciones; se presenta de un 5 al 10 % en pacientes con RPM a término y en un 44 % de los casos precede a la ruptura de membranas. En

general la corioamnionitis clínica afecta un 10-30 % de las pacientes con ruptura prematura de membrana de pretérmino. En el grupo de embarazadas con edad estacional menor a las 26 semanas, esta cifra puede superar el 50 % de los casos (Koch *et al.* 2008).

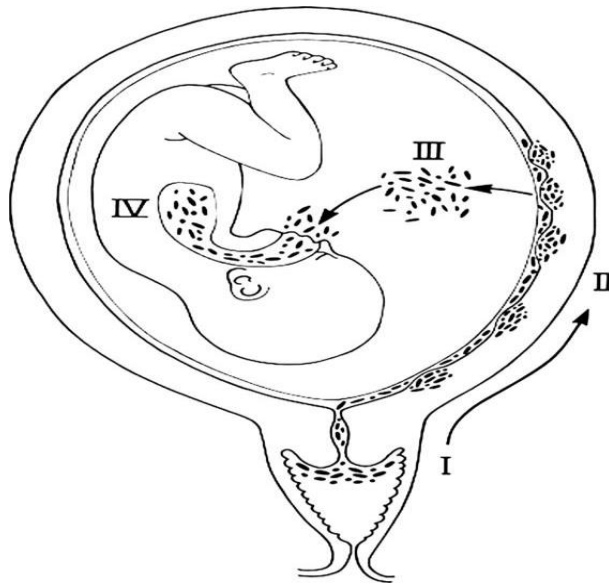
### **1.9.1 LA INFECCIÓN COMO FACTOR DE RIESGO EN EL PARTO PREMATURO**

Estudios clínicos han establecido una fuerte asociación entre complicaciones en el embarazo y el desarrollo de un proceso inflamatorio a nivel intrauterino. Las infecciones se han reportado como responsables de hasta 40 % de los casos de parto prematuro, además 80 % de los partos prematuros ocurren antes de las 30 semanas de gestación tienen evidencia de infección, lo que desencadena una respuesta inflamatoria y que ha sido asociada con el inicio prematuro del trabajo de parto así como daño al desarrollo de los pulmones y cerebro del feto (Koga *et al.* 2009; Waldor y McAdams, 2013), el parto prematuro asociado a una infección ha sido relacionado a una migración bacteriana desde el tracto genital bajo hasta el útero, aún se desconoce si este tráfico de bacterias ocurre de manera rutinaria en el embarazo o tan solo en ciertas condiciones (Figura 5) en algunos casos el cuello uterino puede fallar en su función como barrera y favorecer la infección ascendente; la corioamnionitis resultante puede desencadenar contracciones (McParland *et al.* 2004).

La infección intrauterina puede estar presente sin signos clínicos de la infección materna, lo que ha llevado a la hipótesis de síndromes inflamatorios fetales o coriodeciduals que inducen parto prematuro o aborto, sin evidencia objetiva de dicha infección (Slattery y Morrison, 2002).

Mediante el uso de la amniocentesis en mujeres con trabajo de parto prematuro y membranas intactas, una tasa media de cultivo de líquido amniótico positivo se encontró 12 % y 8 % de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* respectivamente, seguido por *Gardnerella vaginalis*. También han sido recobrados del fluido amniótico y membranas corioamnióticas organismos generalmente que

colonizan la vagina incluyendo Gram positivos y Gram negativos de los que destaca *E. coli* (Waldorf y McAdams, 2013 y Slattery y Morrison, 2002), este tipo de bacterias expresa altas cantidades de LPS en su membrana externa, la unión de esta endotoxina al receptor tipo-toll 4 (TRL-4) desencadena la síntesis de diversos mediadores proinflamatorios (Raetz y Whitfield, 2002). Por otro lado la corioamnionitis que resulta de la infección ascendente de la vagina y el cuello uterino se ha identificado en 20-33 % de las mujeres con parto prematuro y 10-18 % de las mujeres con parto a término mediante el análisis histológico de la placenta después del parto (Fumitaka *et al.* 2000).



**Figura 5:** Ruta hipotética descrita para la migración bacteriana desde espacio extra embrionario hasta el líquido amniótico (tomada de Romero *et al.* 2006).

Evidencia clínica y experimental indican que la inflamación asociada a un proceso infeccioso a nivel intrauterino/intramniótico pueden inducir displasia broncopulmonar (DBP) y una reducción en el síndrome de diestrés respiratorio (SDR), una infección fetal puede resultar en una respuesta inflamatoria sistémica que puede persistir después del nacimiento, lo que agrava la lesión de múltiples

órganos. La corioamnionitis se ha asociado con una mayor incidencia de lesiones en los niños prematuros incluyendo el cerebro (Waldorf y McAdams, 2013).

## **1.10 INMUNIDAD EN EL EMBARAZO**

El embarazo evoluciona satisfactoriamente gracias a la participación de mecanismos que favorecen la implantación y el desarrollo del embrión durante toda la gestación, el papel del sistema inmune en la interfase materno-fetal es clave ya que favorece el proceso de la implantación y el desarrollo de la placenta, además de promover la tolerancia fetal (Abrahams y Mor, 2005). Como se ha descrito anteriormente, el éxito del embarazo requiere de mantener inmunocompetencias suficientes para responder de manera efectiva ante cualquier reto inmune o infeccioso que pudieran vulnerar el equilibrio de la unidad materno-fetal.

### **1.10.1 INMUNIDAD INNATA DURANTE EL EMBARAZO**

El sistema inmune funciona vía dos brazos principales, es decir, respuestas inmunes innatas y adaptativas. Aunque las respuestas inmunes adaptativas son más específicas y robustas, la activación de respuestas antígeno específicas van de la mano con las respuestas inmunes innatas que reconocen microorganismos invasores como no propios representando la primera línea de defensa (Kannaki *et al.* 2011 y Arancibia *et al.* 2007). Durante el embarazo existe una fuerte presencia inmunológica en la interfase materno-fetal particularmente por el sistema inmune innato, en este sentido, estudios clínicos han mostrado una fuerte asociación entre ciertas complicaciones en el embarazo e infecciones intrauterinas, sugiriendo que las respuestas inmunes innatas pueden afectar el resultado del embarazo (Abrahams y Mor, 2005).

## 1.11 RECEPTORES TIPO-TOLL

Un mecanismo a través del cual el sistema inmune innato diferencia el reconocimiento de lo propio y lo no propio es a través de un sistema conservado evolutivamente de patrones de reconocimiento. Células del sistema inmune innato expresan una serie de receptores conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que reconocen y se unen a secuencias altamente conservadas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs) que son expresados únicamente en la superficie de microorganismos (Abrahams y Mor, 2004 y Koga y Mor, 2008).

Los receptores tipo-Toll son claves en la respuesta inmune innata, el primer receptor Toll fue descubierto en *Drosophila* donde tiene una función en el desarrollo de la polaridad dorso-ventral de la larva, subsecuentemente receptores Toll homólogos fueron identificados en mamíferos y designados como receptores tipo-Toll (Holmlund *et al.* 2002 y Takeda y Akira, 2004).

Todos los TLRs son evolutivamente conservados y pertenecen a la súper familia del receptor de interleucina-1 (IL-1R)/TLR. El ectodominio de moléculas TLR consta de 16-28 repeticiones ricas en leucina (LRR) que es necesario para la identificación de los PAMPs, la parte central de las LRR posee motivos más irregulares y varían entre los diferentes TLR's, esto implica que las partes centrales participan fundamentalmente en el reconocimiento del ligando. Las regiones citoplasmáticas de moléculas de los TLR poseen un dominio conservado llamado Toll/IL1-R (dominio TIR) que participa en la transducción de señales (Kannaki *et al.* 2011 y Holmlund *et al.* 2002).

Hasta la fecha se han descrito once TLR en mamíferos (TLR-1 a TLR-11), sin embargo, no se han documentado proteínas funcionales de TLR-11 en humanos. Cada TLR es diferente en su especificidad, así que mientras individualmente cada receptor Tipo-Toll responde a ligandos limitados, colectivamente la familia de TLRs puede responder a una amplia gama de PAMPs asociados a bacterias, virus, hongos y parásitos. Basados en la localización de estos receptores se han



clasificado en dos grandes grupos; el primero son expresados en la superficie de la célula (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 Y TLR-10), el segundo grupo se encuentra expresado sobre las membranas de organelos intracelulares como en los endosomas (TLR-3, TLR-7, TLR-8 Y TLR-9) (Koga *et al.* 2009).

#### **1.11.1 TLR-4**

El receptor tipo-Toll 4 fue el primero en ser identificado en humanos y subsecuentemente se encontró ser el receptor específico del complejo lipopolisacárido-proteína de unión a lipopolisacárido (LPS-LBP) asociado con el CD14 y su activación conduce principalmente a la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas. Además del reconocimiento de LPS, el principal componente de la membrana de las bacterias Gram negativas, TLR-4 reconoce algunos otros componentes de patógenos como polímeros de ácido manurónico de bacterias Gram negativas, ácido teicurónico de bacterias Gram positivas y componentes virales como la proteína F del virus sincitial respiratorio, TLR-4 también se une a moléculas endógenas como HSP, fibronectina tipo III y ácidos grasos saturados (Abrahams y Mor, 2004 y Vaure y Liu, 2014).

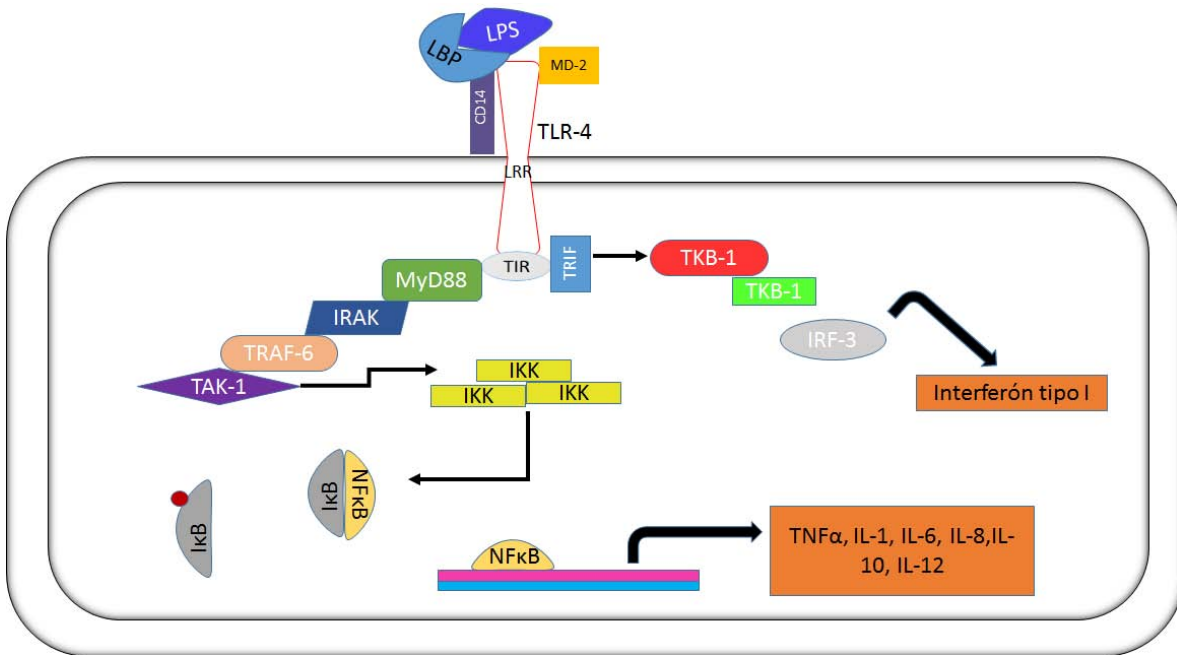
A diferencia de otros, TLR-4 requiere de la formación de un complejo de proteínas accesorias; el primer evento en la respuesta inmune ante LPS ocurre fuera de la célula, el LPS entra en contacto con LBP en el plasma. El complejo LPS-LBP puede ser reconocido por el TLR-4 participando en conjunto con MD-2 que se asocia con el dominio extracelular de TLR-4 y CD14, aunque estudios recientes sugieren que CD14 y LBP solo mejoran la unión entre el LPS y TLR-4 por lo que no son indispensables para la unión y señalización (da Silva *et al.* 2001).

TLR-4 inicia una cascada de señalización intracelular a través de dos principales vías originadas por la diferente localización celular, en la superficie de la célula y el endosoma, esto resulta en una respuesta inflamatoria mediada por el adaptador MyD88 (El factor de diferenciación mieloide 88) y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B que induce la producción de citocinas, productos antimicrobianos (defensinas) y

moléculas co-estimuladoras o una respuesta anti viral transducida por TRAM/TRIF que activa el factor regulador de interferón (IRF3); que media subsecuentemente la sobre regulación de genes que codifican para interferón tipo I y moléculas co-estimuladoras. Ambas vías activan el sistema inmune innato y culminan con la iniciación de la respuesta inmune adaptativa (Morris *et al.* 2015, Liaunardy-Jopeace y Gay, 2014, Vaure y Liu, 2014, Plociennikowska *et al.* 2014, Abrahams *et al.* 2005, Kannaki *et al.* 2011) (Figura 6) hasta la fecha los TLR-1 a -9 han sido identificados en la placenta humana, en específico caso de TLR-4 este se expresa de forma constitutiva en la placenta durante la gestación (Patni *et al.* 2009).

### **1.12 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE TLR-4 DEPENDIENTE DE MyD88**

MyD88 contiene un dominio TIR dentro de su C-terminal y un dominio de muerte (DD) en su N-terminal. Después de la unión de TLR-4 con su ligando, MyD88 se asocia con el dominio intracelular de TLR-4 mediante una interacción TIR-TIR a su vez MyD88 a través de sus DD y activa los DD de IRAK (Cinasa asociada al receptor de IL-1  $\beta$ ). IRAK a continuación, se disocia del complejo y se asocia con TRAF-6 (Factor asociado al receptor de TNF $\alpha$ ). La activación de NF-kB se produce a través de la activación de una cascada de cinasas que incluyen TAK-1 e IKK (Cinasa I kappa B). La disociación de NF-kB con su inhibidor (I $\kappa$ B) debido a la fosforilación de este último permite la traslocación de NF-kB al núcleo y el reconocimiento de sus genes blanco. MyD88 fue el primer componente caracterizado esencial para la activación de la respuesta inmune innata por todos los TLR's (Abrahams y Mor, 2005 y Takeda y Akira, 2004).



**Figura 6:** Cascada de señalización de TLR-4 tras la unión con su ligando. Se muestra la vía dependiente de MyD88 que culmina con la producción de citocinas pro-inflamatorias, así como la vía independiente que induce la producción de interferones tipo I.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 INFLAMACIÓN DURANTE EL EMBARAZO

La inflamación es parte de la respuesta inmune innata, que actúa inmediatamente, no es específica y carece de memoria. La inflamación mantiene el tejido en homeostasis. Sin embargo la inflamación exagerada o la falta de una respuesta puede conducir a la enfermedad (Romero *et al.* 2006), la placenta es fuente de un gran número de citocinas, quimiocinas y factores relacionados (Keelan *et al.* 2003).

De principio a fin de la gestación, la modulación y control de la inflamación en la unidad materno-fetal es clave para la continuidad de la misma. En contraste durante los últimos 20 años, un conjunto de evidencias en crecimiento sugiere que la infección intrauterina y/o inflamación conduce a la activación de vías locales de inflamación y juegan un papel crítico en el 25 % a 40 % de los partos pretérminos; la infección es el único proceso patológico para el que se ha establecido una

relación causal firme con el parto prematuro (Bastek *et al.* 2011 y Romero *et al.* 2006).

El trofoblasto placentario es el principal productor de citocinas proinflamatorias, sin embargo, las células de Hofbauer (macrófagos) y células estromales de la placenta participan en esta producción, en este mismo sentido se ha demostrado que receptores de citocinas son expresados en el tejido placental, indicando que este tejido es tanto productor como blanco de estos importantes mediadores biológicos (Mitchell y Keelan, 2006).

En la placenta/trofoblasto a término se han identificado a nivel de RNAm TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, algunos otros genes de citocinas se han encontrado aumentados en casos de partos pretérmino tanto a nivel de proteína como de RNAm entre las que se encuentra además de las ya mencionadas; el factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF por sus siglas en inglés), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF por sus siglas en inglés).

Los procesos infecciosos sistémicos maternos han sido ligados a resultados adversos del embarazo, tales como muerte fetal, ruptura prematura de membranas, aborto y parto pretérmino, en casos de infecciones por bacterias Gram negativas la pérdida fetal puede resultar en parte por la respuesta del hospedero a los componentes de la pared celular de la bacteria, el LPS se ha conocido que causa muerte fetal y abortos en animales desde 1940 y ha sido implicado en parto pretérmino en humanos (Silver *et al.* 1994).

Así pues, la hipótesis que se planteó de que la infección intrauterina puede ser causa de parto pretérmino resultó más llamativa como el fenómeno biomolecular de las respuestas inflamatorias las cuales se definieron a gran detalle por Romero *et al.* 1988 estudiando que la secuencia de eventos fisiopatológicos en el trabajo de parto prematuro, inducido por infección podría ser el resultado tras la ascensión de microorganismos residentes en la vagina o el endocérvix uterino a través del canal de parto, y colonizar los tejidos de la interfase materno-fetal, el líquido amniótico o ambos.

De forma similar el LPS u otras toxinas de estos microorganismos pueden actuar y promover la formación de IL-1 $\beta$  esta citocina primaria a su vez estimula la síntesis de factores uterotónicos como PG así como de otras citocinas proinflamatorias tales como IL-8, IL-6 y TNF $\alpha$  entre otras en una variedad de tejidos y a continuación se prevé que las PG producidas en respuesta a esta inflamación induzcan las contracciones del miometrio y el inicio del parto pretérmino (Cox *et al.* 1997), en este sentido la infección durante el embarazo puede activar diversas células como los macrófagos que secretan altos niveles de citocinas tipo Th1 que alteran el delicado balance de la interfase materno-fetal (Hunt *et al.* 2005).

El aumento de los niveles de esteroides sexuales como la P4, durante la gestación favorece que no exista rechazo materno-fetal al inhibir la acción de células citotóxicas y aumentar la producción de citocinas antiinflamatorias, inclinando la balanza hacia una respuesta tolerogénica ha sido observado que en mujeres con abortos recurrentes, a nivel endometrial hay aumento de IL-12 lo cual actuaría como estímulo para la diferenciación de linfocitos Th0 hacia Th1 (Barañao, 2011).

En el humano y en primates superiores, los niveles de P4 maternos, fetales y en líquido amniótico se mantienen sin cambios significativos antes, durante y después del encendido de trabajo de parto. En estas especies, el papel de la P4 como modulador en el inicio de trabajo de parto está relacionado no con los niveles circulantes de P4 sino con el perfil de expresión del RP en diferentes tejidos de la unidad materno-placentaria (Brown *et al.* 2004).

Durante todo el embarazo y justo antes del inicio del trabajo de parto los distintos tejidos gestacionales expresan mayoritariamente el RP-B asociado con efectos progestacionales y anti-inflamatorios; sin embargo, existen evidencias que demuestran que el inicio del trabajo de parto coincide con un cambio en el perfil de expresión del los RP, en el que es favorecida la expresión del RP-A, este mecanismo ha sido denominado “retiro funcional de la progesterona“(Mendelson y Codon, 2005).

En particular la P4 contribuye de forma sobresaliente e integral en funciones de tolerancia inmunológica que permiten la supervivencia del feto al evitar el rechazo de la placenta, la administración de RU486 en ratones propicia la reabsorción de las crías, por otra parte el proceso de polarización celular de los linfocitos T hacia un fenotipo Th1/Th2 es un evento regulado por la activación y/o inhibición del factor nuclear NF- $\kappa$ B, se ha demostrado la capacidad de P4 para inducir la producción de I $\kappa$ Ba (inhibidor de NF- $\kappa$ B), de igual manera se propone que la P4 unida a su receptor puede competir con NF- $\kappa$ B por un sitio de unión adyacente al DNA impidiendo la expresión de genes inducidos por parte de NF- $\kappa$ B, así mismo por la competición de cofactores esenciales para su transcripción (Barrera *et al.* 2007).

## **2.2 PRESENCIA DE RECEPTORES TIPO TOLL EN LA INTERFASE MATERNO FETAL.**

Hasta la fecha es poco lo que se conoce sobre el papel de los receptores tipo-Toll durante el embarazo, sin embargo, se ha demostrado que la placenta normal expresa TLR-1 -10 a nivel de RNA y a nivel de proteína TLR-2 y TLR-4 son expresados en placentas tanto en el primer trimestre como a término, sugiriendo que la placenta puede reconocer patógenos a través de estos receptores e inducir una respuesta inflamatoria (Koga *et al.* 2009).

Klaffenbach *et al.* 2005 Demostró que líneas celulares de coriocarcinoma JAR y BeWo expresan TLR1-10, así como proteínas co-receptoras y accesorias como: CD14, MyD88, MD-2, TIRP, TRAP y TRIF a nivel de RNAm, Holmlund *et al.* 2002 Demostraron que células del sincitiotrofoblasto y del trofoblasto intermedio expresa TLR-2 y TLR-4, Kumazaki *et al.* 2004 encontró que las células placentarias TLR-4 positivas pueden ser trofoblasto extraveloso e intermedio. (Abrahams y Mor, 2005, Abrahams *et al.* 2005b, Koga y Mor, 2008).

## 2.3 PARTICIPACIÓN DE LAS CITOCINAS EN EL INICIO DEL TRABAJO DE PARTO

El embarazo se ha definido como un estadio Th2 es decir, se postula que predomina un estadio antiinflamatorio y un cambio hacia un perfil Th1 conduciría al trabajo de parto (Wilczyński, 2005). Se ha comprobado que tanto IL-1 y TNF $\alpha$  pueden ser encontradas en concentraciones elevadas en el líquido amniótico de mujeres que experimentan parto pretérmino, Romero *et al.* 1989 encontró que IL-1 es un componente clave en la correlación con las concentraciones de PG, IL-6 ha sido encontrada elevada en el líquido amniótico de mujeres con parto pretérmino y mujeres con parto pretérmino asociado a infección en diversos estudios (Dudley, 1997). Romero *et al.* 1990 fueron los primeros en reportar que elevadas concentraciones de IL-6 en el líquido amniótico es característica de mujeres con parto pretérmino asociada a infecciones.

Se ha descrito que el estímulo *in vivo* de ratas Sprague-Dawley con LPS genera el aumento importante en la expresión de TLR-4 y el factor NF-kB en la placenta (Boles *et al.* 2012), del mismo modo en el humano se ha descrito que el estímulo *in vitro* de explantes de placenta humana con LPS induce un incremento significativo del TLR-4 (Deng, 2009) así como la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (Holmlund *et al.* 2002).

Considerable evidencia obtenida de animales de experimentación indican que la administración de microorganismos o productos microbianos como endotoxinas a animales embarazados puede inducir parto pretérmino, en 1943 Zahl y Bjerknes demostraron que la inyección de la endotoxina de *Shigella* y *Salmonella* dentro de ratones y conejos puede ser capaz de inducir abortos, Takeda y Tsuchiya confirmaron esta observación por la administración de la endotoxina de *E. coli*. En nuestro laboratorio se ha estudiado la respuesta de las membranas corioamnióticas simulando infecciones *in vitro* con el empleo de microorganismos vivos tales como *Candida albicans* (Zaga-Clavellina *et al.* 2006a), *Streptococcus grupo B* (Zaga-Clavellina *et al.* 2006b), *E. coli* (Zaga-Clavellina *et al.* 2007), y *Gardnerella vaginalis* (Zaga-Clavellina *et al.* 2012) con lo cual se ha demostrado

que estos tejidos tienen la capacidad de reconocer y responder de manera específica secretando diversos mediadores pro-inflamatorios como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-8 así como factores pro-degradativos como MMP-2 y -9, PGE2.

De igual manera se ha descrito como la P4 tiene la capacidad de modular estas respuestas pro-inflamatorias disminuyendo la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y reduciendo la expresión de TLR-4 en estos tejidos efecto revertido con el empleo del inhibidor de la P4 (Flores-Espinosa *et al.* 2014), por este motivo resulta relevante describir la participación de la placenta bajo estas mismas condiciones.



### **3 JUSTIFICACIÓN**

En el humano, el parto pretérmino es una condición patológica cuyo origen etiopatológico es de naturaleza multifactorial, sin embargo, existe evidencia clínica y experimental que sustenta una estrecha relación causal entre la presencia de un proceso infeccioso a nivel intra-uterino y el desarrollo de parto pretérmino (Robbins y Bakardjev, 2012 y McParland *et al.* 2004).

Una tercera parte de los partos pretérmino pueden ser asociados a infección, esta condición induce en los tejidos maternos-fetales una respuesta inmune encabezada por la secreción de moduladores pro-inflamatorios tales como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , cuya acción favorece la síntesis y secreción de otros mediadores efectores que degradan la matriz extracelular de los tejidos y alteran la estructura y función, modificando el ambiente y creando condiciones incompatibles con la continuidad de la gestación (Cobo *et al.* 2012 y Goldenberg *et al.* 2008).

En condiciones perjudiciales, el binomio madre-hijo comienza una serie de mecanismos encaminados a mantener la gestación el mayor tiempo posible, entre los candidatos para regular estos procesos está la progesterona, hormona esteroide cuyas propiedades inmuno-moduladoras la hacen indispensable para el mantenimiento de la estrecha relación entre tejidos maternos y fetales.

### **4 HIPÓTESIS**

Si la P4 favorece el establecimiento de un ambiente anti-inflamatorio, entonces el pre-tratamiento de explantes de vellosidades placentarias humanas a término inhibirá la síntesis de diferentes marcadores inmunológicos pro-inflamatorios y pro-degradativos inducidos por la estimulación con lipopolisacárido.

## **5 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la capacidad anti-inflamatoria de la P4 en explantes de placenta humana estimulados con endotoxina bacteriana.

## **6 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Cuantificar mediante ELISA los niveles de las citocinas pro-inflamatorias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 secretadas al medio de cultivo por los explantes placentarios en condiciones basales y después del co-tratamiento con 1000 ng/mL de LPS y diferentes concentraciones de P4 (0.01, 0.1 y 1  $\mu$ M).
- Cuantificar mediante ELISA los niveles de las quimiocinas IL-8 y MIP-1 $\alpha$  secretadas al medio de cultivo por los explantes placentarios en condiciones basales y después del co-tratamiento con 1000 ng/mL de LPS y diferentes concentraciones de P4 (0.01, 0.1 y 1  $\mu$ M).
- Cuantificar mediante ELISA los niveles de la citocina anti-inflamatoria IL-10 secretada al medio de cultivo por los explantes placentarios en condiciones basales y después del co-tratamiento con 1000 ng/mL de LPS y diferentes concentraciones de P4 (0.01, 0.1 y 1  $\mu$ M).
- Cuantificar mediante ELISA los niveles del factor pro-degradativo MMP-9 secretada al medio de cultivo por los explantes placentarios en condiciones basales y después del co-tratamiento con 1000 ng/mL de LPS y diferentes concentraciones de P4 (0.01, 0.1 y 1  $\mu$ M).

## 7 METODOLOGÍA

- **Muestras biológicas**

Las placentas utilizadas en el presente trabajo fueron voluntariamente donadas por pacientes atendidas en el servicio de consulta externa en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer IER). Todas las mujeres fueron previamente informadas del objetivo de la investigación y accedieron a donar sus placentas una vez que fueran intervenidas por cesárea electivas (Cesárea previa, incompatibilidad céfalo-pélvica, ETC.).

Se utilizaron los tejidos de mujeres sanas de entre 20-38 años de edad, con gestaciones a término (37-39 SDG) y con gesta única.

Todas las mujeres cursaron un embarazo normal, sin ninguna patología subyacente, mujeres con diabetes, preeclampsia, lupus eritematoso sistémico, hipotiroidismo y obesidad no fueron incluidas en el estudio. No fue incluida ninguna mujer con gestas gemelares o placenta previa.

**Tabla 1:** Características generales de las mujeres que fueron incluidas en el estudio

Numero	Edad	SDG	Gesta	Peso durante el embarazo		Producto
				Inicio	Final	
1	22	38	1	--	--	----
2	38	37.4	3	74	85	mujer
3	37	38.5	1	48	57.4	varón
4	21	38.4	4	52	61	varón
5	38	39.4	5	64	73.4	varón
6	23	38.3	2	50	58	----
7	33	38	2	70	80.4	varón
8	24	37.3	3	46	60	----
9	23	37.5	3	73.5	69.7	mujer
10	23	38.5	3	53	60	mujer
11	32	38	4	65	71	mujer
12	36	38	1	57	65	----
13	23	38.5	4	----	----	----
14	29	38.2	3	----	----	---
15	39	39	4	----	---	----
16	28	38.5	2	65	82	----
17	33	38	4	--	67.2	mujer
18	25	38.2	3	54	59.6	mujer
<b>Promedio</b>	<b>30.1</b>	<b>38.2</b>	<b>2.85</b>	<b>61.3</b>	<b>69.7</b>	<b>50/50</b>

**SDG:** semanas de gestación

- **Reactivos**

La progesterona, el inhibidor de progesterona RU486 (Mifepristone) y el lipopolisacárido de *E. coli* (055:B5) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A).

- **Obtención de muestras y control microbiológico**

Tras el nacimiento y posterior retiro de la placenta, esta fue depositada en un contenedor estéril-hermético y transportada al laboratorio. A partir de este momento el tejido fue trabajado en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar).

Para garantizar que las placentas estuvieran libres de patógenos, se realizaron cultivos bacterianos de diversos fragmentos del tejido, tanto de placenta como de membranas fetales, estos fragmentos fueron cultivados 24 h a 37°C en medio infusión cerebro-corazón (BHI) para la búsqueda de microorganismos convencionales, tras este tiempo el medio se inoculó en placa de Agar MacConkey, Agar sangre, Agar sales manitol, Agar papa dextrosa y Agar GC, estas placas fueron incubadas a 37°C de 24-48 h, en caso de existir crecimiento bacteriano se realizan las pruebas bioquímicas primarias y secundarias para la identificación del microorganismos, para microorganismo no convencionales como *Ureaplasma spp.* y *Mycoplasma spp.* Se emplearon caldo urea y caldo arginina respectivamente los cuales se incubaron a 37°C durante 8 días en un ambiente microfilico, revisando cada 24 h la presencia de vire en el medio, en caso de no existir se reportaba como negativo, en caso de vire, el medio se filtraba en membranas de poro de 0.22 µm, y se inoculaba el filtrado en medio nuevo por 5 días bajo las mismas condiciones, de nueva cuenta en caso de existir vire se reportaba positivo. Solo fueron utilizadas placentas cuya esterilidad fue confirmada.

- **Obtención y cultivo de explantes de placenta**

Con la finalidad de retirar los excesos de sangre, las placentas fueron lavadas con abundante solución salina fisiológica (0.9 % NaCl), posteriormente las membranas fueron retiradas del disco placentario y fueron cortados los cotiledones centrales a los que les fue diseccionada la región decidual (materna). Explantes de cotiledones de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> fueron obtenidos y depositados en solución salina para otro proceso de lavado para asegurar la remoción total de sangre.

Una vez que los explantes fueron lavados, estos fueron transferidos a cajas de cultivo de 12 pozos (Costar® NY, EUA.) en una proporción de tres explantes por pozo. A cada pozo se le agregaron 2 mL de medio DMEM sin rojo de fenol suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) libre de hormonas, 1 % de piruvato 1mM y 1 % de antibiótico-antimicótico (100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina y 0.25 µg/mL anfotericina) (DMEM-SFB) (todos ellos de Gibco BRL, Bethesda, E.U.A). Todos los explantes fueron cultivados durante 12 h a 37°C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>.

- **Determinación de la viabilidad funcional y estructural de explantes de placenta humana en cultivo**

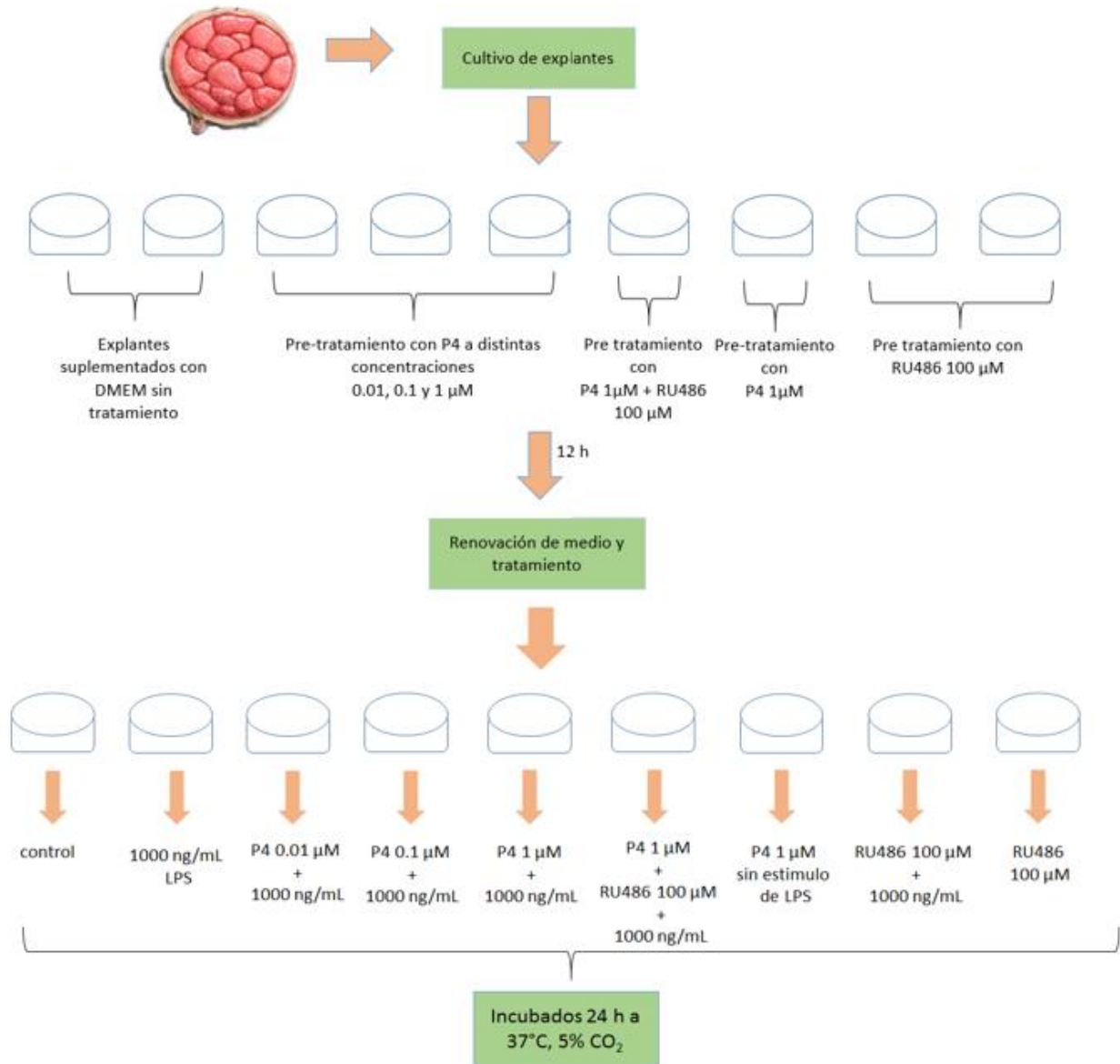
Con la finalidad de determinar la viabilidad funcional del tejido durante el experimento se efectuó una prueba colorimétrica para determinar la viabilidad metabólica del tejido empleando el kit XTT (2,3-bis- (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) - 2H-tetrazolio-5-carboxanilida) (Roche Applied Science, Mannheim, DE). Este kit permite determinar la función metabólica de las células al reducir la sal de tetrazolio (XTT) de color amarillo a la sal de formazan de color naranja, por acción de la enzima deshidrogenasa mitocondrial. La reacción colorimétrica se considera como un buen indicador de células metabólicamente activas, es decir, células viables.

Para este ensayo se cultivaron 3 explantes de placenta por pozo durante 96 h con 1 mL de DMEM-SFB, adicionando 250  $\mu$ L de la mezcla XTT-acoplador en una relación 50:1 (según el inserto del kit) a cada pozo según la hora de cultivo; 0, 24, 48, 72 y 96 h. El reactivo se dejó reaccionar durante 2 h, periodo en que se observó un cambio significativo de color. Transcurrido este tiempo los medios se recuperaron para la lectura de la absorbancia a 450nm (según las especificaciones del proveedor). En el caso de los tiempos 72 y 96 h se renovó el medio a las 48 h de incubación, esto no afecta el resultado puesto que se evalúa la actividad metabólica del tejido independientemente del tiempo del medio.

Para la viabilidad estructural los explantes fueron cultivados en DMEM-SFB y libre de hormonas durante 72 h bajo las mismas condiciones, dos explantes fueron tomados y colocados directamente en paraformaldehido 4 % y refrigerados a 4°C (Tejidos a tiempo 0 h) el resto de los explantes fueron recuperados a las 4, 24, 48 y 72 h posterior al cultivo y depositados de igual manera en paraformaldehido 4 %, de cada tejido se realizaron dos cortes histológicos que fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina y examinados bajo microscopio óptico.

- **Programa de estimulación de explantes cultivados de placenta humana**

Durante las primeras 24 h de cultivo los explantes fueron pre-tratados con progesterona con concentraciones de 0.01, 0.1 y 1  $\mu$ M/mL, con RU486 y la combinación de P4 1  $\mu$ M/mL y RU486 100  $\mu$ M/mL, transcurrido este tiempo a todos los explantes se les renovó medio DMEM-SFB ya sea con tratamiento de P4, RU486 o su combinación y se co-estimularon con 1000 ng/mL de LPS durante 24 h. (Figura 7)



**Figura 7:** Esquema que ilustra la metodología para los distintos tratamientos de explantes de placenta el cultivo. Cada tratamiento se realizó por triplicado.



- **Procesamiento de las muestras después de los tratamientos**

Una vez concluidos los diferentes tratamientos el medio de cultivo fue recuperado en 4 alicuotas de 500  $\mu$ L cada una, mismas que fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estos medios fueron utilizados para la cuantificación por ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) de los siguientes analitos;

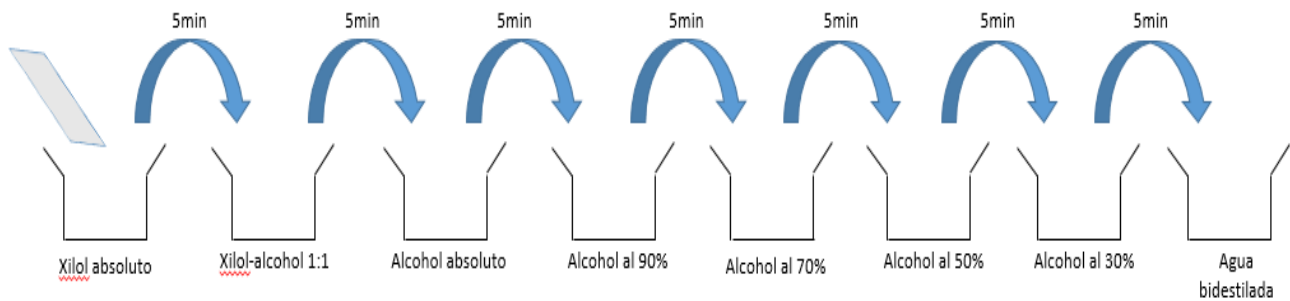
- Citocinas pro-inflamatorias; IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6
- Quimiocinas; IL-8, MIP-1 $\alpha$
- Citocina anti-inflamatoria: IL-10
- Metaloproteasa de matriz extracelular; MMP-9

Con la finalidad de obtener la fracción proteica de los tejidos, al terminar los experimentos el tejido fue pesado y depositado en buffer de lisis (EGTA 100 mM, MgCL 1000 mM, Tris HCl 20 mM, 150 mM respectivamente, inhibidor de proteasas) (Roche Applied Science, Manheim, DE) y congelados rápidamente en hielo seco, posteriormente se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche, para la extracción de la fracción citosolica los tejidos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y el sobrenadante fue recuperado para su empleo en las técnicas de Zimogramas y Western blot.

- **Técnica de inmunohistoquímica**

Para evaluar la integridad del tejido durante todo el experimento se realizaron cortes histológicos a diferentes tiempos de cultivo; 0, 24, 48, 72 h de igual modo esto nos permitiría observar las características del tejido y garantizar que se trataba de trofoblasto vellosos. Para esto los tejidos fueron cortados por micrótopo y resguardados en parafina hasta su uso.

Para efectuar la tinción inmunohistoquímica las laminillas fueron desparafinadas a  $60^{\circ}\text{C}$  por 30min. e hidratadas en un gradiente de alcohol:



**Figura 8:** Gradiente de hidratación para cortes de explantes de placenta tras ser desparafinados.

Las laminillas se dejaron secar y se delimitó el área del tejido con Pap Pen que se dejó secar durante 10 min. Todas las laminillas fueron sumergidas en PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) una a una las laminillas fueron sumergidas en una solución de peróxido de hidrógeno 0.5 % en metanol por 15min. para eliminar la actividad peroxidasa endógena, tras este tiempo se realizaron 3 lavados con PBS 1X de dos minutos cada uno, en el último lavado las laminillas se dejaron sumergidas en PBS.

Una a una cada laminilla se secó el área alrededor del Spot delimitado y se adicionó 100 µL de solución de bloqueo (10 % suero de caballo y 30 % suero humano inactivados por calor), tras esto todas las laminillas fueron incubadas durante 1 h a TA en cámara húmeda. Las muestras se lavaron y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario monoclonal anti-Citoqueratina-7 humana obtenida de ratón OV-TL 12/30 (CK-7) (DAKO, são paulo Brasil) para el control negativo se utilizó un isotipo IgG de conejo (Santa Cruz Biothecnology). Al día siguiente se retiró el anticuerpo con un golpe firme sobre un papel absorbente y se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X, tras secar el área alrededor de la muestra se adicionaron 100 µL del anticuerpo secundario conjugado con Biotina anti-IgG de ratón (Vector, burlingame, CA) a una concentración de 10 µg/mL este se dejó incubar durante 30 min a TA en cámara húmeda.

Transcurrido el tiempo el anticuerpo secundario se retiró y se procedió a realizar tres lavados con PBS 1X de 5 min cada uno, durante el último lavado se preparó

el conjugado estreptavidina-peroxidasa (una gota del concentrado 20X en 1ml de PBS 1X) a cada laminilla se le adicionó 100  $\mu$ L del conjugado dejándose actuar por 10 min. a TA. Finalmente para revelar se adiciono 100  $\mu$ L el cromógeno EAC Kit (Invitrogen) monitoreando el desarrollo de color rojo sobre el tejido en ese momento la reacción se detuvo removiendo la solución sobre una toalla absorbente y sumergiendo la laminilla en PBS 1X. Las laminillas se lavaron 3 veces con agua bidestilada y se contratiñeron con Hematoxilina de Harris por 1 min. Tras esto se lavaron con abundante agua corriente y finalmente para montar las muestras se adiciono una gota de Crystal mount durante toda la noche, posterior a esto las laminillas se sumergieron brevemente en Histoclear y se montaron en medio acuoso Permount (Fischer Scientific, E.U.A) dejándose secar a TA para su posterior observación en microscopio óptico.

- **Técnica de ELISA**

La cuantificación mediante ELISA tipo sándwich de los diferentes analitos se realizó en cada uno de los medios de cultivo obtenidos después de los diferentes tratamientos, se utilizó la metodología general que a continuación se describe:

Las placas de 96 pozos son recubiertas con 100  $\mu$ L del anticuerpo de captura específico (Tabla 2) durante 18 h a TA, posteriormente las placas fueron lavadas tres ocasiones seguidas con PBS-Tween. Inmediatamente después las placas fueron bloqueadas con buffer de bloqueo (1 % de albúmina en PBS filtrado en membrana de 0.22  $\mu$ m) durante 2 h a TA seguidas.

Después de 3 lavados con PBS-Tween fueron cargados en cada pozo la curva estándar y las muestras, mismas que se incubaron durante 2-3 h a TA; una vez transcurrido este tiempo las placas se lavaron nuevamente y se incorporó a la reacción 100  $\mu$ L de anticuerpo de detección (Tabla 2). Finalmente la reacción fue revelada con la adición del substrato específico y leído a 450 nm o 405 nm, según

la casa comercial empleada, en el espectrofotómetro xMark (Bio-Rad, Hercules CA). Cada valor obtenido se normalizó en función del peso húmedo de tejido.

**Tabla 2:** Condiciones en que se realizaron las ELISAS para las diferentes citocinas y péptidos antimicrobianos.

CITOCINA	MARCA	CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPOS		CONJUGADO	SUSTRATO	CURVA ESTÁNDAR
		Ab DE CAPTURA	Ab DE DETECCIÓN			
IL-1 $\beta$	R&D system	4 $\mu$ g/ml	200 ng/mL	Streptavidina-HRP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /tetrametil benzidina	0.5 – 10 ng/mL
TNF	R&D system	4 $\mu$ g/ml	250 ng/mL	Streptavidina-HRP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /tetrametil benzidina	3.0 – 250 pg/mL
IL-6	R&D system	2 $\mu$ g/ml	50 ng/ml	Streptavidina-HRP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /tetrametil benzidina	15.6-2000 pg/mL
IL-10	R&D system	2 $\mu$ g/ml	200 ng/ml	Streptavidina-HRP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /tetrametil benzidina	31.2-2000
MIP-1	R&D system	0.4 $\mu$ g/ml	200 ng/ml	Streptavidina-HRP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /tetrametil benzidina	7.84-1000 pg/mL
MMP-9	R&D system	1.0 $\mu$ g/ml	100 ng/ml	Streptavidina-HRP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /tetrametil benzidina	31.2-2500 pg/mL
IL-8	Peprotech	0.5 $\mu$ g/ml	0.5 $\mu$ g/ml	Avidina-HRP	ABTS	31.2-4000 pg/mL

**ABTS:** 2,2'Azino-bis(3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfúrico); **Ab:** anticuerpo

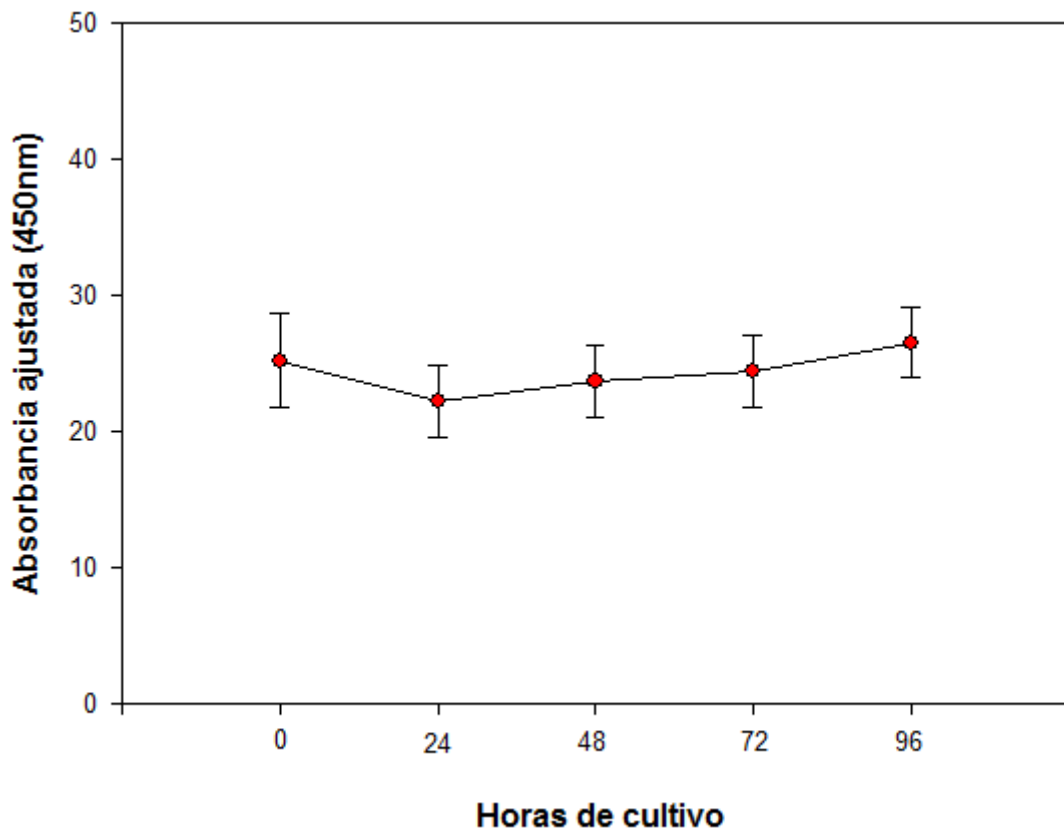
- **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó en el programa Sigma Stat 11.0 (Systat Software, California, EUA). La prueba de normalidad de Kruskal-wallis fue aplicada, las comparaciones se realizaron con las pruebas Dunn's y Holm-sidak. Posteriormente se realizó una prueba t-Student para hacer la comparación entre los grupos deseados, en todos los casos se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La prueba de viabilidad funcional realizada con el sistema colorimétrico XTT demostró que los explantes de vellosidades placentarias humanas en cultivo, mantienen su capacidad metabólica, sin cambio significativo durante 96 h de cultivo.



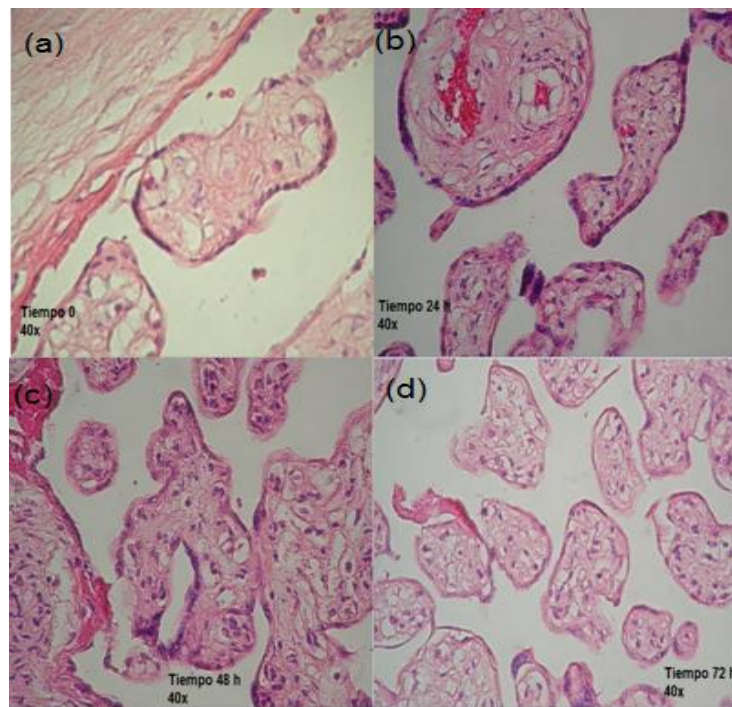
**Figura 9:** Prueba de viabilidad funcional de los explantes de vellosidades placentarias. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar,  $n=3$ .

Al comprobar que el tejido se mantenía viable durante 96 h, se decidió realizar los tratamientos a los explantes, estos se comenzaron al tiempo 0 realizando únicamente el pre-tratamiento con P4 en las diferentes concentraciones, así como el pre-tratamiento con RU486, tras 24 h de cultivo el medio se renovó y se efectuó

el tratamiento de nueva cuenta con P4 y RU486 así como el co-tratamiento con LPS que se dejó durante 24 h en cultivo.

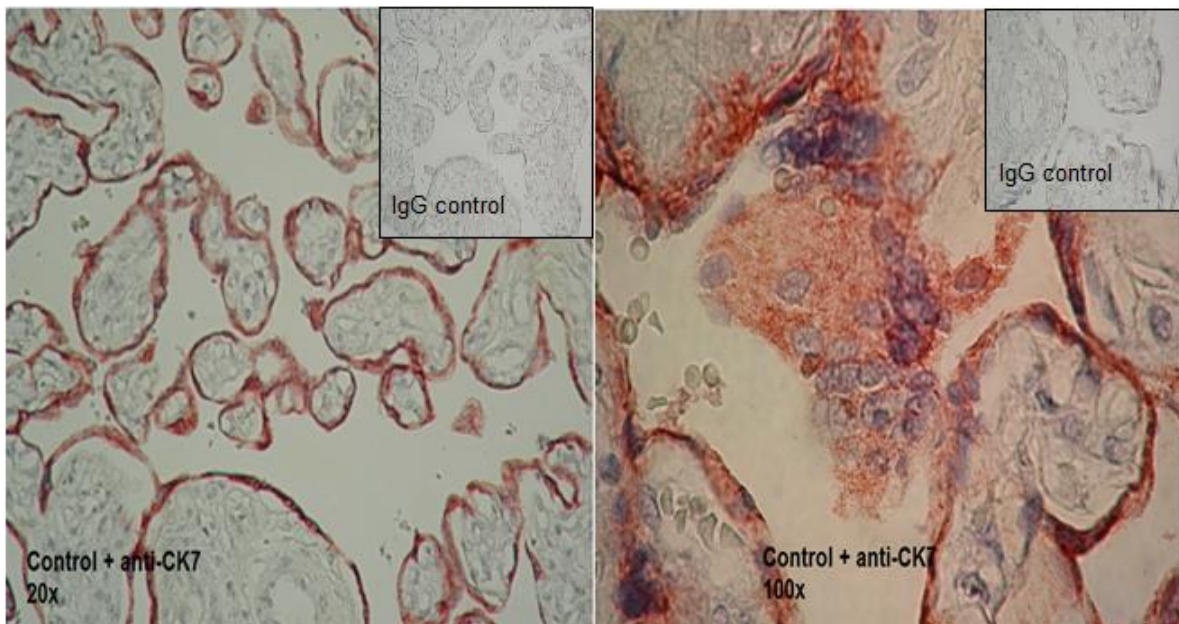
### 8.1.2 VIABILIDAD ESTRUCTURAL

Para poder confirmar que la integridad estructural del tejido se mantenía durante el periodo de experimentación, los explantes de vellosidades se cultivaron durante un periodo de 0-72 horas, con intervalos de 24 h se realizaron cortes histológicos a los explantes los cuales fueron teñidos con Hematoxilina-eosina.



**Figura 10:** Integridad estructural de las vellosidades placentarias en cultivo; **a)** Tejido a 0 horas de cultivo imagen a 40x, **b)** Tejido a 24 h de cultivo, imagen a 40x, **c)** Tejido a 48 h de cultivo, imagen a 40x y **d)** Tejido a 72 h de cultivo, imagen a 40x.

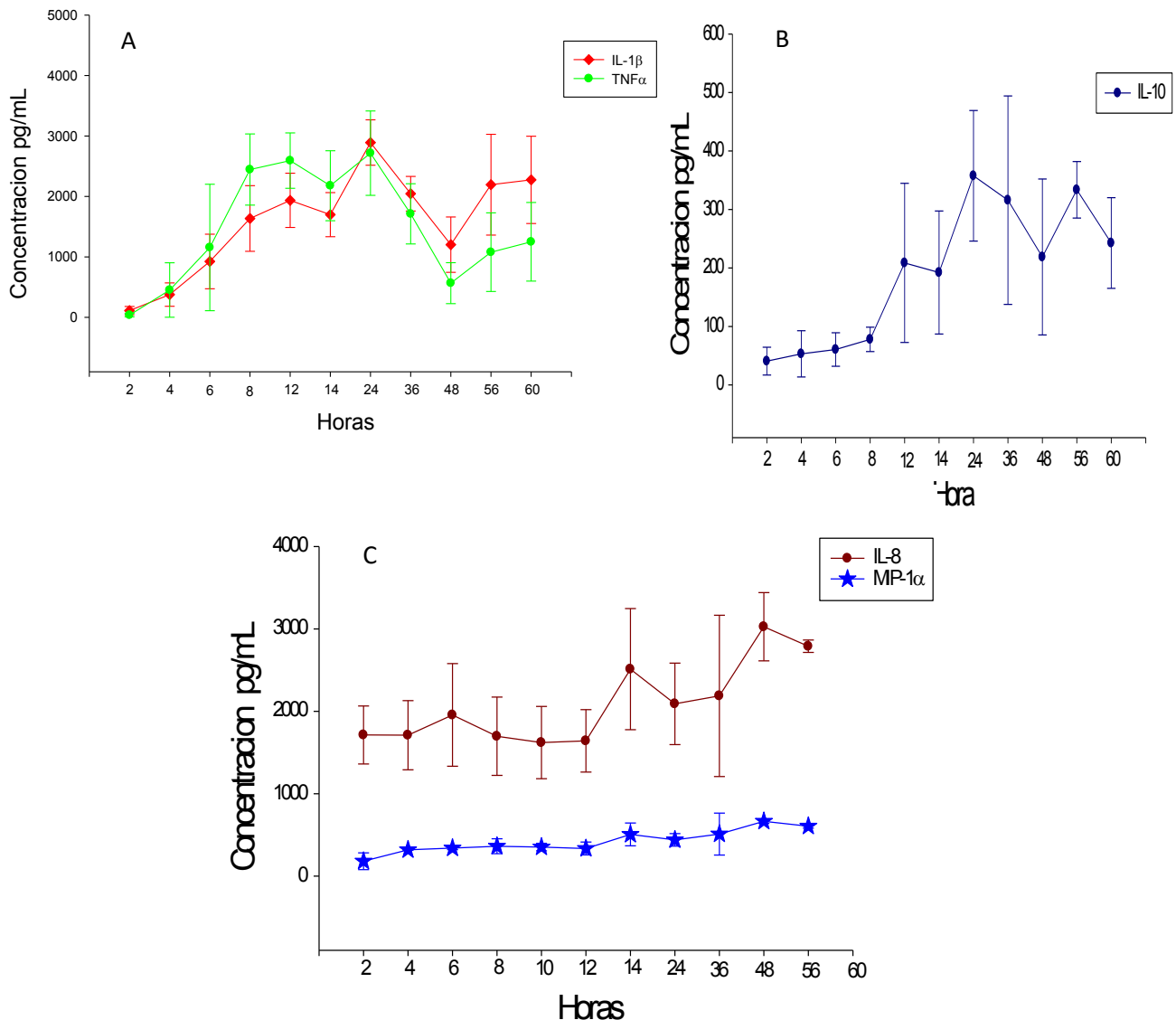
Con estas pruebas se pudo demostrar que los tejidos eran viables tanto funcional como estructuralmente durante un periodo de tiempo mayor al intervalo de estimulación efectuado, sin embargo, era importante caracterizar estructuralmente además de asegurar que se trabajaba con células del trofoblasto para ello se realizó una tinción inmunohistológica con anti-citoqueratina-7 (CK7) una proteína específica del trofoblasto.



**Figura 11:** Tinción inmunohistoquímica anti-CK7 en explantes de vellosidades placentarias. En la imagen se aprecia abundante presencia de trofoblasto y el sincitio que se forma en estas células.

## 8.2 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE CITOCINAS

Con la finalidad de conocer el perfil de secreción de las diferentes citocinas y determinar el periodo de estimulación máxima con 1000 ng/mL de LPS por explantes de vellosidades placentarias humanas se realizó una cinética de producción de diversas citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias determinadas mediante ELISA.



**Figura 12:** Cinética de producción de citocinas por explantes de vellosidades placentarias humanas en cultivo tras un estímulo con 1000 ng/mL de LPS. Las gráficas representan los promedios  $\pm$  error estándar, n=2. (A) citocinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ . (B) citocina anti-inflamatoria IL-10. (C) quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e IL-8.



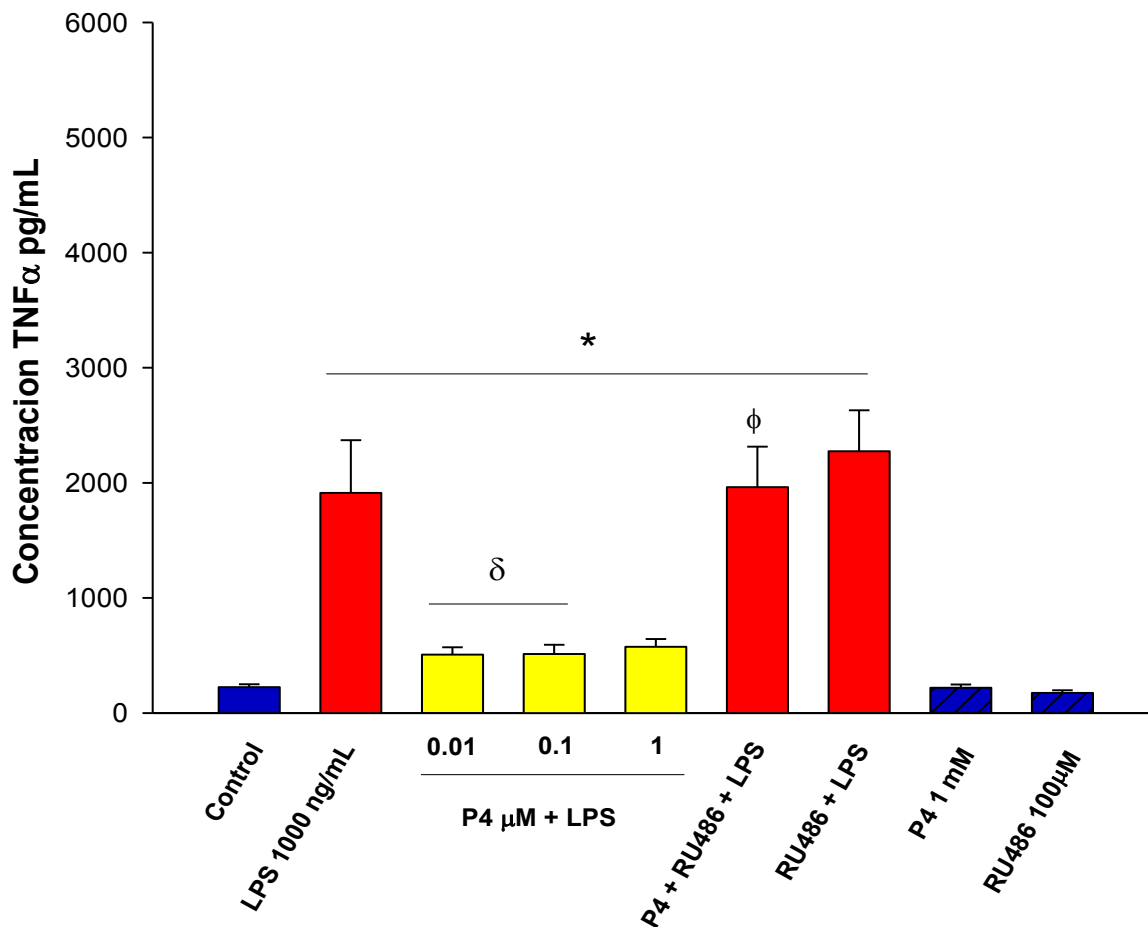
El patrón de expresión de las citocinas con respecto al tiempo en que fueron estimulados los explantes demostró que el pico máximo de producción se presentó a las 24 horas, este patrón se evidencia más en las citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , cuyas concentraciones apreciables se comienzan a ver a partir de las 4 h post-estímulo. Por su parte IL-10 y MIP-1 $\alpha$  no muestran una producción tan elevada y notoria como el resto de las citocinas, sin embargo su aumento es mayor tras 24 h de estímulo. En el caso particular de IL-8, esta citocina quimiotáctica presenta una producción elevada tras un periodo de tiempo corto con el estímulo de LPS, al parecer esta citocina se produce de forma basal por las vellosidades placentarias, y bajo un estímulo con LPS incrementan su producción de igual manera alcanzando niveles máximos a las 24 h. Esto sugiere que el momento ideal para realizar las mediciones de las diversas citocinas es a las 23 h posteriores al estímulo con 1000 ng/mL de LPS.

### **8.3 SECRECIÓN DE TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E IL-6**

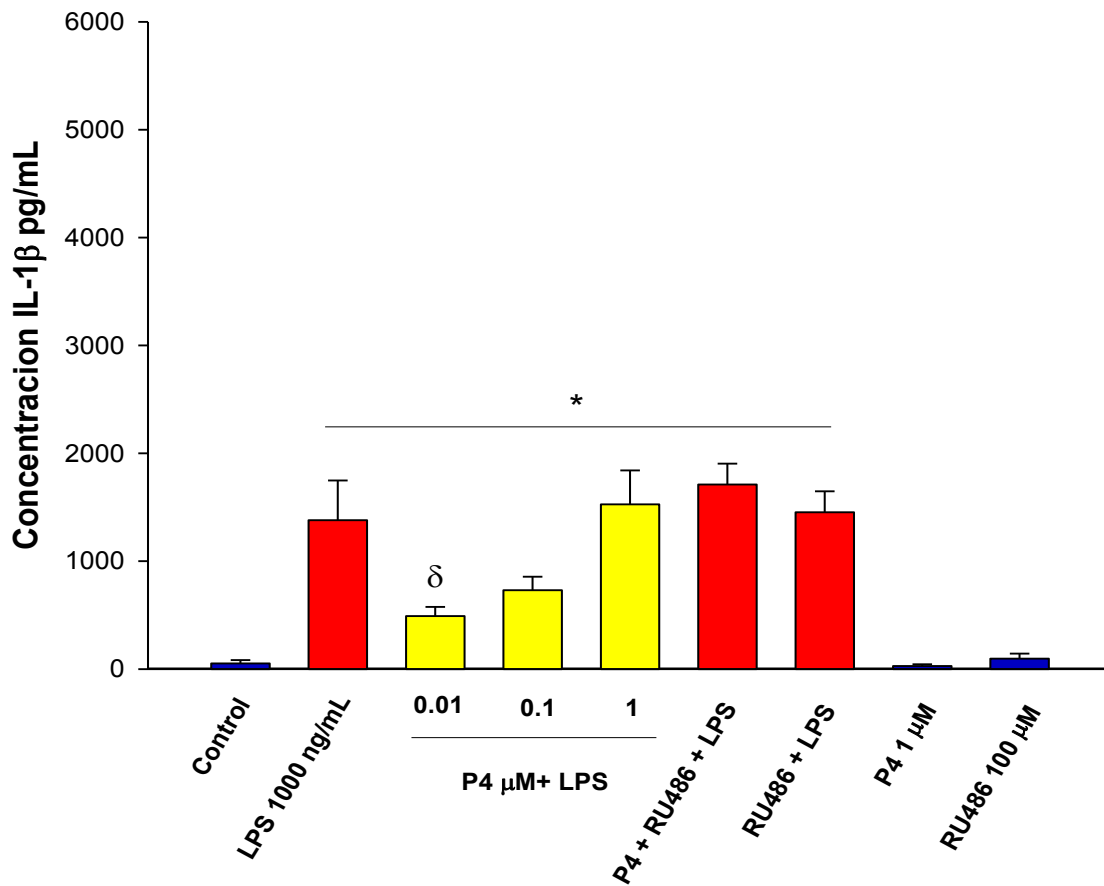
Los niveles de TNF $\alpha$  en el control fueron  $224.15 \pm 26.29$  pg/g de tejido, los de IL-1 $\beta$  fueron de  $53.03 \pm 29.66$  pg/g, y los de IL-6 fueron  $15353.33 \pm 4118.70$  pg/g de tejido. Tras la estimulación con 1000 ng/mL de LPS se produjo un aumento de 8.53 veces la secreción de TNF $\alpha$  ( $1912.73 \pm 457.25$  ng/g de tejido), 26.04 veces la producción de IL-1 $\beta$  ( $1381.00 \pm 367.59$  pg/g de tejido), mientras que para IL-6 el aumento fue de 4.82 veces ( $74110.42 \pm 10154.96$ ).

El tratamiento con las concentraciones de P4 0.01  $\mu$ g/mL y 0.1  $\mu$ g/mL fueron efectivas para disminuir en un 73.48 % y 73.2 % respectivamente la secreción de TNF $\alpha$  citocina por los explantes tras el estímulo con LPS ( $507.25 \pm 63.83$  pg/g de tejido y  $512.42 \pm 80.20$  pg/g de tejido), mientras que la concentración de 1  $\mu$ g/mL de P4 no mostró una reducción estadísticamente significativa, sin embargo, se pudo observar una tendencia de disminución del efecto causado por el LPS. Del mismo modo la concentración de P4 0.01  $\mu$ g/mL mostró ser eficaz para revertir el efecto del LPS en la producción de IL-1 $\beta$  en un 56.1 % ( $606.26 \pm 110.94$  pg/g de tejido) y un 56 % para IL-6 ( $32638.40 \pm 16336.23$  pg/g de tejido).

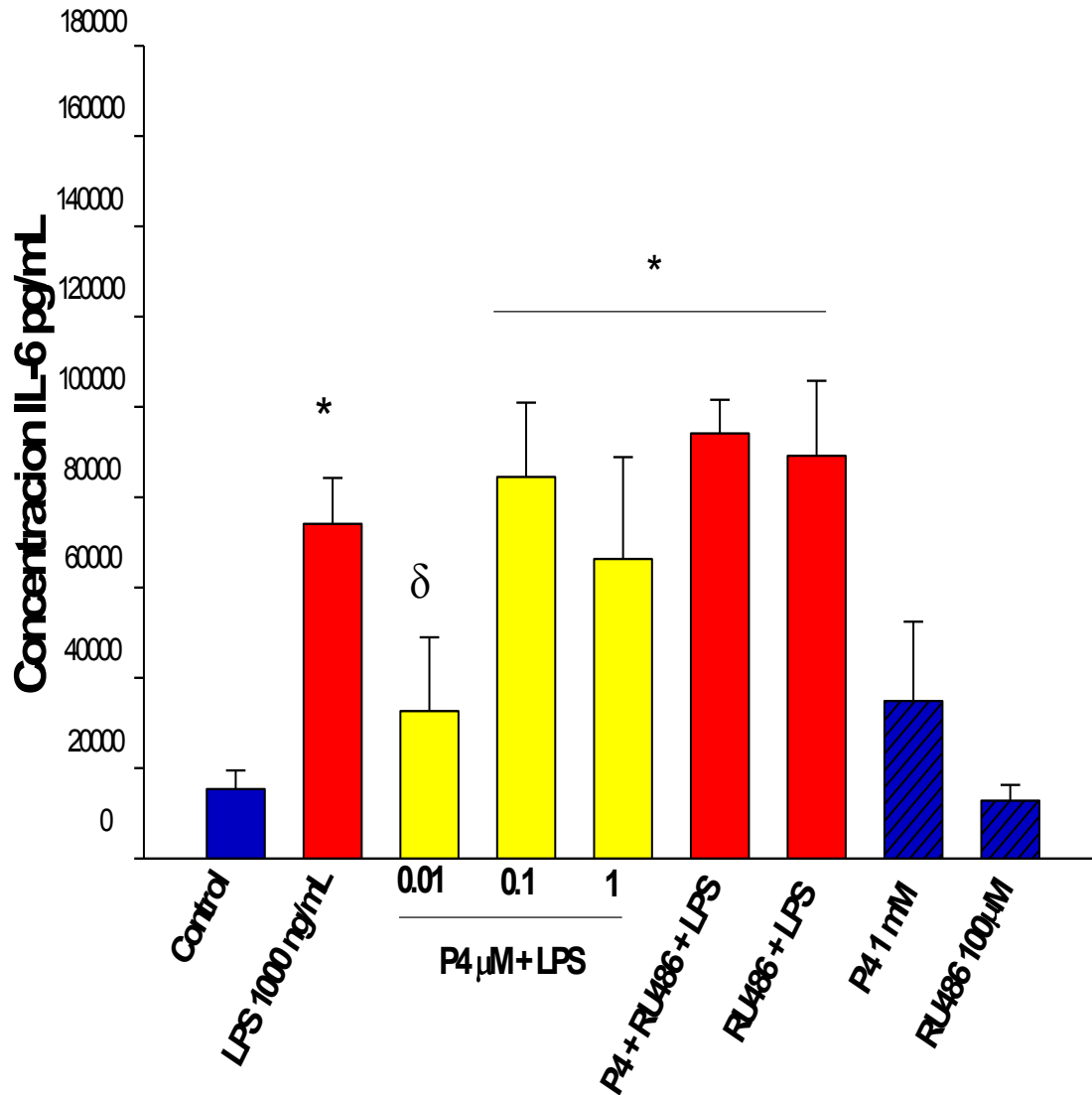
El efecto anti-progestacional de RU486 no se logró apreciar ya que tanto para IL-1 $\beta$  como para IL-6 la concentración de 1  $\mu$ M/mL no pareció tener efecto de inhibir la producción de estas citocinas tras la exposición del tejido al LPS y las concentraciones de ambos estímulos no muestran una diferencia significativa. En el caso particular de TNF $\alpha$  la concentración de 1  $\mu$ M/mL de P4 mostró una reducción en la producción de esta citocina, si no de forma significativa, si de manera marcada. Este efecto se vio revertido de forma significativa tras bloquear la acción de P4 con RU486 100 $\mu$ M (1961.75  $\pm$  351.92) un efecto muy similar al que ejerció LPS por sí solo (Figuras 13, 14 y 15).



**Figura 13:** Concentración de TNF $\alpha$  determinada por ELISA en medio de cultivo de los explantes de vellosidades placentarias en los diferentes tratamientos. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar, n= 10. \*P<0.05 vs Control.  $\delta$  p<0.05 vs LPS,  $\phi$  p<0.05 vs P4 1 $\mu$ M.



**Figura 14:** Concentración de IL-1β determinada por ELISA en medio de cultivo de los explantes de vellosidades placentarias en los diferentes tratamientos. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar, n= 10. \*p<0.05 vs Control,  $\delta$  p<0.05 vs LPS.

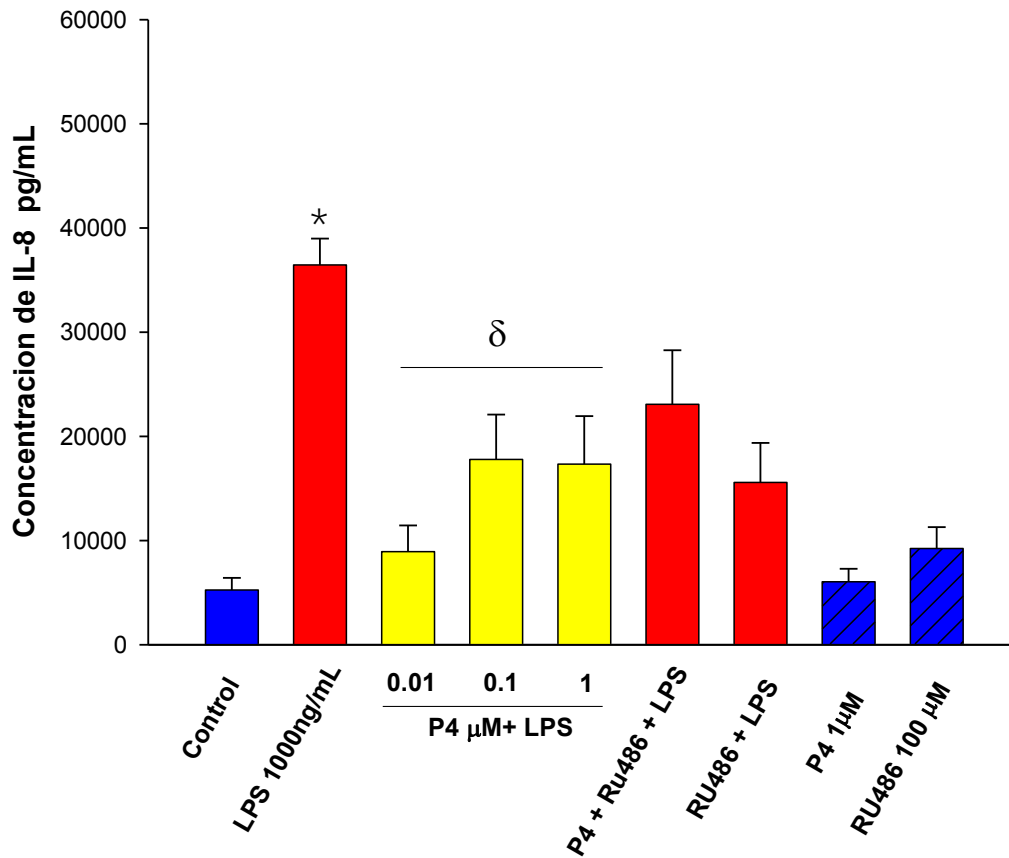


**Figura 15:** Secreción de IL-6 medida por ELISA como respuesta a los diversos tratamientos de explantes de vellosidades placentarias en cultivo. La gráfica representa los promedios  $\pm$  error estándar,  $n = 10$ . \*  $p < 0.05$  vs Control,  $\delta$   $p < 0.05$  vs LPS.

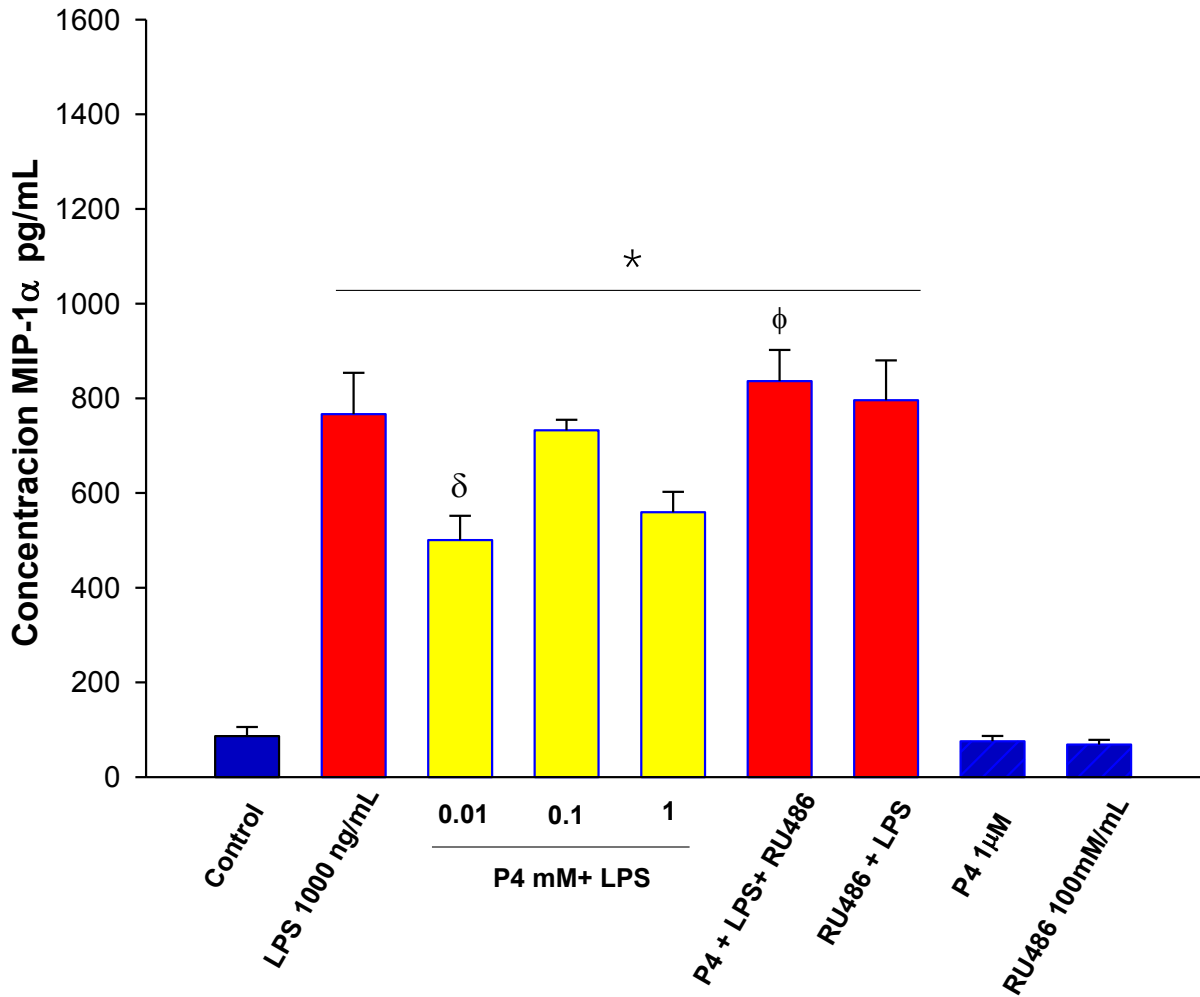
#### **8.4 SECRECIÓN DE IL-8 Y MIP-1 $\alpha$**

El estímulo de los explantes con LPS indujo el aumento de 6.93 (36451.44  $\pm$  2538.62 pg/g de tejido) y de 5.06 (766.65  $\pm$  87.34 pg/g de tejido) veces para IL-8 y MIP-1 $\alpha$ , en comparación con los niveles basales del control (5257.90  $\pm$  1164.22 pg/g de tejido) y (151.41  $\pm$  48.45 pg/g de tejido) respectivamente. Las tres concentraciones empleadas de P4 (0.01, 0.1 y 1  $\mu$ M/mL) lograron disminuir los niveles de IL-8 de forma significativa la producción de esta citocina alcanzando hasta un 75.49 % en la reducción de ella (8934.00  $\pm$  2522.10 pg/g de tejido, 17785.85  $\pm$  4300.64 pg/g de tejido y 17331.84  $\pm$  4612.53 pg/g de tejido respectivamente), en el caso específico de 1  $\mu$ M/mL de P4 aunque no de forma significativa el efecto se vio revertido por el antagonista RU486.

Por su parte solo la concentración de 0.01  $\mu$ M/mL de P4 logró reducir la concentración de MIP-1 $\alpha$  en 24.69 %, el resto de las concentraciones no tuvo un efecto supresor significativo, sin embargo, mostraron una tendencia de disminuir el efecto del LPS al emplear 1  $\mu$ M/mL de P4, efecto que se vio revertido al bloquear la acción de la hormona con RU486 (Figuras 16 y 17).



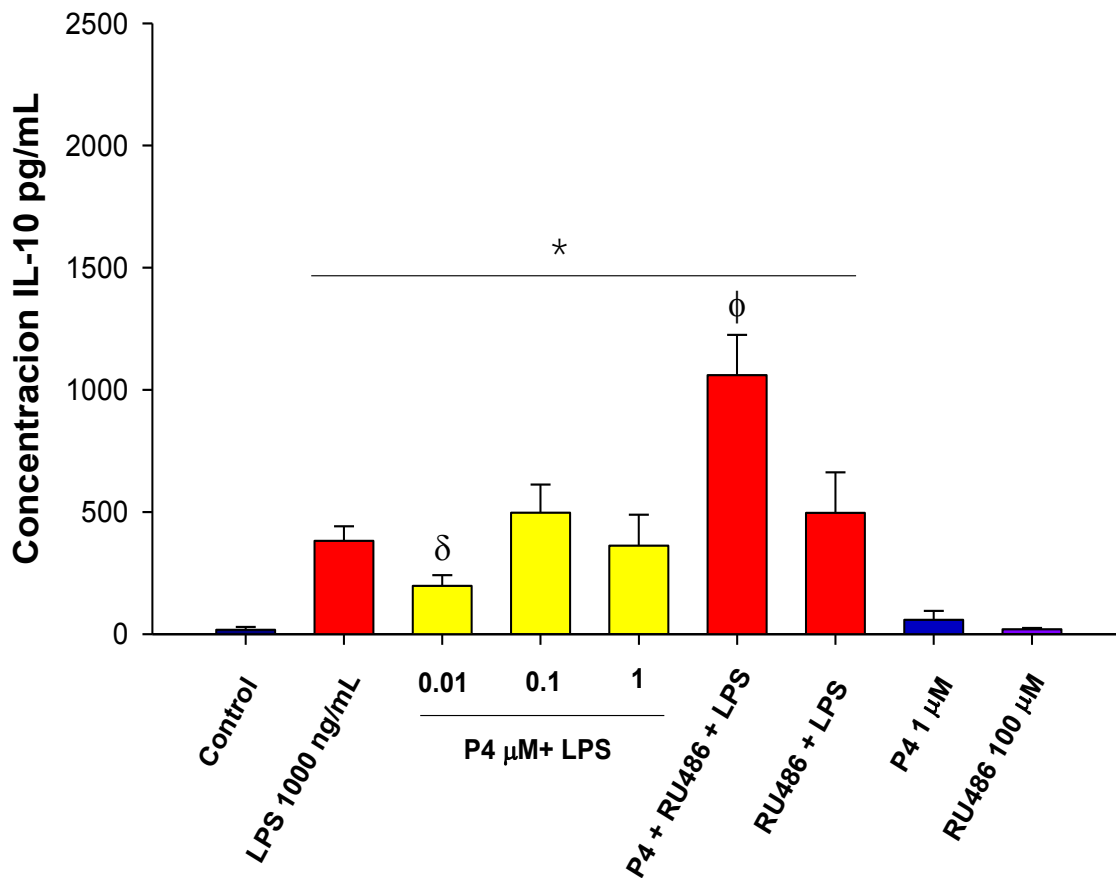
**Figura 16:** Concentración de IL-8 determinada por ELISA en medio de cultivo de los explantes de vellosidades placentarias en los diferentes tratamientos. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar,  $n=10$  \*  $p<0.05$  vs control,  $\delta$   $p<0.05$  vs LPS.



**Figura 17:** Concentración de MIP-1 $\alpha$  determinada por ELISA en medio de cultivo de los explantes de vellosidades placentarias en los diferentes tratamientos. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar, n= 10. \* P<0.05 vs Control,  $\delta$  p<0.05 vs LPS,  $\Phi$  p< 0.05 vs P4 1 $\mu$ M.

## 8.5 SECRECIÓN DE IL-10

A diferencia del control cuyos niveles de IL-10 son prácticamente 0 pg/mL por g de tejido, el estímulo con 1000 ng/mL de LPS generó un aumento de 21.3 veces la producción de IL-10 ( $381.57 \pm 60.21$  pg/g de tejido), efecto que se vio revertido significativamente por la administración P4 0.01  $\mu$ M disminuyendo en un 48.28 % ( $197.33 \pm 44.49$  pg/g de tejido). El resto de las concentraciones de P4 no parece tener efecto en la disminución de la producción de IL-10 por efecto del estímulo con LPS.

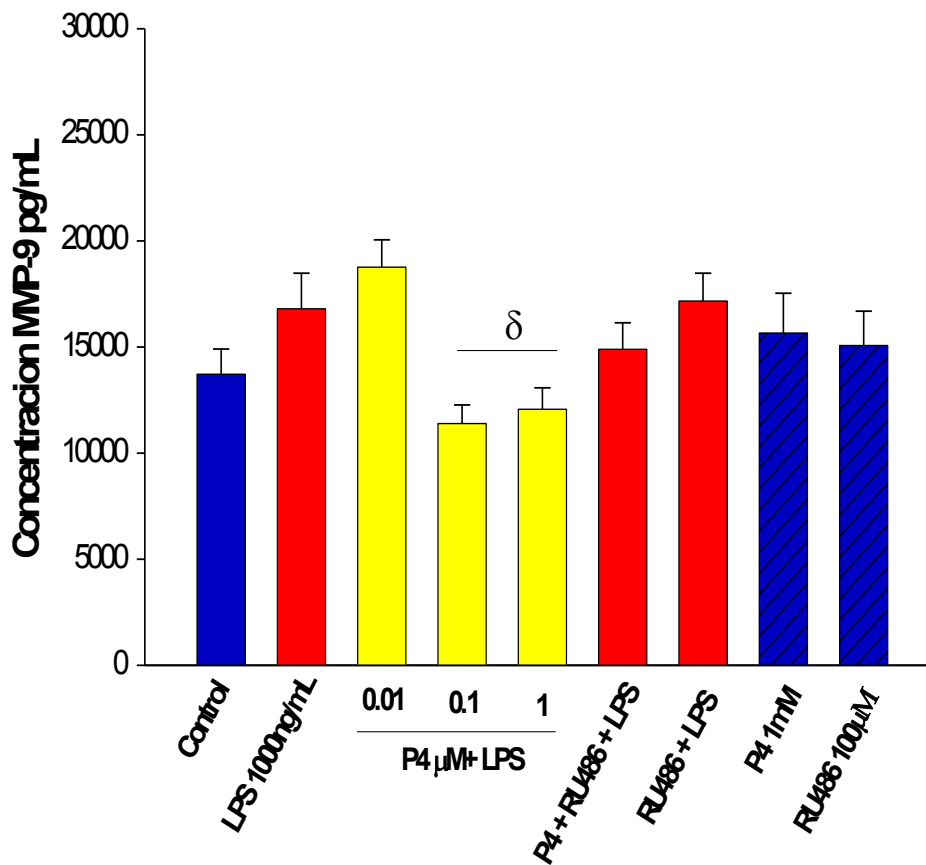


**Figura 18:** Concentración de IL-10 determinada por ELISA en medio de cultivo de los explantes de vellosidades placentarias en los diferentes tratamientos. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar,  $n=10$ . \*  $p<0.05$  vs Control,  $\delta$   $p<0.05$  vs LPS,  $\Phi$   $p<0.05$  vs P4 1  $\mu$ M.



## 8.6 SECRECIÓN DE MMP-9

La producción de la metaloproteasa no mostró cambios significativos en un estado basal y tras el estímulo con LPS ( $13712.16 \pm 1191.54$  pg/g de tejido y  $16802.62 \pm 1672.71$  pg/g de tejido respectivamente), a pesar de existir un ligero aumento de esta tras el tratamiento con LPS. Sin embargo, la producción de MMP-9 se vio disminuida cuando el tejido fue tratado con P4 0.1 y 1  $\mu$ M en un 32 y 28.19 % respectivamente ( $11392.00 \pm 876.43$  pg/g de tejido y  $12065.66 \pm 1010.39$  pg/g de tejido).



**Figura 19:** Concentración de MMP-9 determinada por ELISA en medio de cultivo de los explantes de vellosidades placentarias en los diferentes tratamientos. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar, n= 10.  $\delta$  P<0.05 vs LPS.

## 9. DISCUSIÓN

Sin duda el parto prematuro sigue siendo una prioridad obstétrica y neonatal del siglo XXI, su entendimiento y prevención continúa siendo sujeto de estudio así como los mecanismos fisiopatológicos que conllevan el inicio del trabajo de parto antes de las 37 semanas de gestación.

El parto pretérmino sigue siendo la causa de mortalidad y morbilidad perinatal y aunque se han intentado múltiples estrategias para prevenir el parto pretérmino estas no han tenido éxito y la tasa ha incrementado de 9 % a 12 % en las últimas dos décadas. La patogénesis del parto pretérmino en el marco de la infección no ha sido completamente elucidado (Subramaniam *et al.* 2012) sin embargo, la invasión bacteriana en la cavidad amniótica es documentada en aproximadamente 10 % de pacientes con parto pretérmino con membranas intactas y en aproximadamente 30 % de mujeres con ruptura prematura de membranas (Gotkin *et al.* 2006 y Elovitz *et al.* 2005), así pues las infecciones maternas se han propuesto que se presentan en 25-40 % de los partos pretérmino (Schwartz *et al.* 2009).

Con el aumento de la comprensión en que la infección en relación con la inflamación están asociadas con muchos casos de parto pretérmino, se han realizado ensayos clínicos con diferentes regímenes de antibióticos en un esfuerzo por disminuir la tasa de nacimientos prematuros, estos tratamientos no han demostrado ser benéficos e incluso han sido asociadas con el incremento en la tasa de partos pretérmino (Elovitz *et al.* 2005).

La respuesta inflamatoria materna a lo largo del tracto genital ha sido identificada como un importante enlace entre la infección materna y el parto pretérmino. Evidencia substancial parece indicar que las citocinas proinflamatorias juegan un papel importante en la secuencia de eventos que culminan con el inicio del parto pretérmino asociado con la infección intrauterina (Raghupathy y Kalinka, 2008). Aunque la respuesta inflamatoria no está limitada al sistema inmune materno, un síndrome de respuesta inflamatoria fetal ha sido descrita en partos pretérmino y ha sido asociada con el resultado adverso perinatal (Schwartz *et al.* 2009).

Es de suma importancia que los tejidos fetales posean competencias inmunológicas capaces de montar una respuesta inmunológica efectiva contra algún patógeno, en este sentido la presencia y actividad de TLR-4 es indispensable ya que es el receptor necesario para el reconocimiento de bacterias Gram negativas cuya presencia ha sido fuertemente asociada a las infecciones relacionadas al parto prematuro (Patni et al. 2009 y Holmlund et al. 2002).

Las citocinas relevantes en el embarazo pueden ser generalmente divididas dentro de dos categorías, algunas de estas son potencialmente perjudiciales para el embarazo por incrementar la inmunidad mediada por células (citocinas tipo Th1) y otras modulando un potencial efecto benéfico por inhibición de la respuesta celular (citocinas Th2), tanto estudios clínicos como experimentales sustentan el concepto de que el embarazo es caracterizado por un fenómeno tipo Th2 (Szekeres-Bartho y Wegmann, 1996).

Una manifestación prematura o la aparición repentina de eventos inflamatorios anormales necesarios para el parto natural, podrían iniciar e intensificar la cascada de producción de citocinas inflamatorias involucradas en resultados adversos como el parto pretérmino (Kwak-Kim *et al.* 2010).

El inicio del trabajo de parto ha sido asociado con la elevación de la concentración de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ , estas citocinas entre otras han sido correlacionadas con la infección intra-amniótica y en la patogénesis del parto pretérmino; una examinación del líquido amniótico y a nivel sérico proveyó información acerca de la concentración de estas citocinas. Se han reportado que las concentraciones de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, Factor estimulante de colonias (CSF), MIP-1 $\alpha$  y el factor activador de plaquetas (PAF) se encuentran elevadas en pacientes con infección, en comparación con mujeres sin infección (Saji et al. 2000 Raghupathy *et al.* 2009, Makhseed *et al.* 2003, y Gotkin *et al.* 2006) de igual manera esta elevación se ha descrito en el fluido amniótico, miometrio, decidua y membranas fetales. (Christiaens et al. 2008).

La P4 juega un papel esencial en el establecimiento y mantenimiento del embarazo (Astle *et al.* 2003), recientemente evidencia acumulada sugiere que la

P4 participa de forma significativa en el establecimiento de una adecuada respuesta inmune durante el embarazo exitoso. (Druckmann y Druckmann, 2005).

A esta hormona se le han atribuido propiedades inmunosupresoras porque la concentración alcanzada en la interfase materno-fetal es capaz de inhibir una variedad de funciones celulares inmunes e inflamatorias en ensayos in-vitro. Existe evidencia que indica que la P4 también regula la migración y proliferación de células inmunes y poblaciones de células proinflamatorias en el endometrio de animales y puede jugar un papel similar en mujeres (Choi *et al.* 2000).

La acción de la P4 durante procesos infecciosos en la gestación han sido poco estudiados y la gran mayoría solo se ha efectuado en modelos animales. En un modelo murino la administración de P4 fue capaz de disminuir la secreción de factores pro-inflamatorios y quimiotácticos tras la infusión de LPS vía intrauterina por la regulación de TLR-4 y TLR-2 (Elovitz y Mrinalini, 2005).

Pocos han sido los estudios en humanos que se han realizado para determinar el papel de la P4 en el trabajo de parto pretérmino, la mayoría de la información proviene de estudios en los que la administración de P4 en mujeres con riesgo de trabajo de parto prematuro ha sido exitosa ya que esta prevalencia se ha visto reducida, con ello se ha atribuido la capacidad de la P4 para disminuir la secreción de factores pro-inflamatorios (Tita y Rouse, 2009 y da Fonseca *et al.* 2003), aunque el mecanismo exacto por el cual la P4 ejerce esta función no ha sido dilucidado completamente.

Con el objetivo de evaluar si la P4 puede modular la respuesta inflamatoria que genera la placenta ante un estímulo con LPS de *E. coli*, simulando un infección aguda en el tejido. Propusimos y validamos un modelo experimental que nos permitió determinar como la P4 puede reducir la respuesta pro-inflamatoria tras el reto inmunológico con la endotoxina bacteriana en la placenta.

Las pruebas colorimétricas de XTT así como el análisis histológico permitieron comprobar que en nuestro modelo de explantes se mantenían metabólicamente viables durante 96 h sin cambio en la integridad celular, lo cual permitió realizar los

protocolos de estimulación con LPS y P4 sin que la funcionalidad del tejido se viese disminuida, de igual manera la tinción inmunohistoquímica con anti-CK7 permitió constatar que la población celular mayoritaria en los explantes era trofoblasto y no existía presencia de células deciduales o corioamnióticas.

En el presente trabajo se evaluaron marcadores pro-inflamatorios, anti-inflamatorios y pro-degradativos, todos estos marcadores que fueron determinados han sido previamente reportados y se ha identificado que tejidos extra embrionarios los producen en respuesta a una infección. Estos estudios se han enfocado principalmente en membranas fetales (Zaga-Clavellina *et al.* 2007, Flores-Herrera *et al.* 2012 y Zaga *et al.* 2004), en células del trofoblasto (Shimoya *et al.* 1999, Bowen *et al.* 2002; Hauguel-de Mouzon y Guerre-Millo, 2006). Sin embargo pocos son los estudios que se han enfocado en la respuesta funcional de la placenta, la mayoría de ellos se han realizado en células aisladas o en líneas celulares, por este motivo nosotros decidimos realizar nuestro estudio en explantes de placenta humana para determinar la respuesta funcional en conjunto de las diferentes poblaciones celulares presentes en la placenta.

Para evaluar como estos marcadores pro-inflamatorios eran producidos por los explantes de vellosidades placentarias optamos por realizar una curva tiempo-respuesta, con ella logramos observar como TNF $\alpha$  es la primera citocina en alcanzar niveles significativamente altos desde las 6 h post estímulo y llegando a un punto mayor a las 8 h, seguido por IL-1 $\beta$  cuyo primer pico se observa a las 14 h tras el estímulo con la endotoxina, sin embargo, el pico máximo alcanzado por todas las citocinas; IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-8, MIP-1 e IL-10 resultó tras 24 h de estímulo con LPS, todas las citocinas pro-inflamatorias alcanzaron en este tiempo niveles superiores a 2500 pg/mL, por su parte tanto IL-10 como MIP-1 $\alpha$  también alcanzaron su punto máximo de producción a las 24 h, sin embargo, su concentración máxima no superó los 500 pg/mL.

Esta prueba nos permitió definir el tiempo óptimo para el estímulo de los explantes de placenta humana en cultivo y el momento indicado para recuperar el medio y realizar las determinaciones por ELISA de cada citocina siendo este de 24 h post-estimulo.

Escasos son los estudios que han efectuado una curva de producción de citocinas como la que nosotros efectuamos, sin embargo ninguno de ellos fue realizado en explantes de placenta humana, Gravett *et al.* 1994 realizo un estudio en monos *Rhesus* demostrando que la producción de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6 comienzan a elevarse de forma significativa a las 6 h posteriores al estímulo con LPS, todas ellas alcanzando un punto máximo a las 24 h sus resultados a pesar de no ser el mismo modelo concuerdan con nuestros datos en la cinética de producción de citocinas. Boles *et al.* 2012 en placentas de ratas Sprague-Dawley muestra que tras 6 h de exposición a LPS en diferentes concentraciones (1-10  $\mu$ g/mL) la producción de IL-6 y TNF $\alpha$  se ve aumentada considerablemente, Shimoya *et al.* 1999 en células de trofoblasto aisladas y purificadas de placentas humanas muestra que a las 24 h de estímulo con LPS la producción de IL-8 alcanza niveles máximos de producción.

En conjunto estos resultados y los que obtuvimos demuestran que la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias por la placenta tras el reto con LPS comienza a partir de las 4 h post-tratamiento, a las 6 h comienzan a tomar niveles considerablemente altos pero su máxima producción se encuentra a las 24 h después del estímulo con LPS.

TNF $\alpha$  es una citocina pro-inflamatoria que es capaz de inducir efectos pleiotrópicos en el sistema inmune, en la hemostasis de los tejidos, y en el desarrollo del embrión. Recientemente varios estudios han confirmado que la expresión de TNF $\alpha$  juega papeles en el cuerpo lúteo de mujeres embarazadas como un mediador autocrino y/o paracrino, sin embargo, altas concentraciones de esta citocina se han encontrado en el suero de mujeres con abortos espontáneos recurrentes (Yu *et al.* 2004).

Una variedad de estudios han mostrado que, en el embarazo humano, los tejidos de la interfase materno fetal expresan RNAm de TNF $\alpha$  y del receptor para TNF $\alpha$ , la forma biológicamente activa de esta citocina se han detectado en el líquido amniótico, en el suero materno, en secreciones vaginales y en el sobrenadante de cultivos celulares de placenta y tejido decidual. Un amplio espectro de funciones adversas de esta citocina han sido propuestas para TNF $\alpha$  tanto en tejido materno como fetal; se ha demostrado que TNF $\alpha$  es capaz de inhibir la proliferación celular del trofoblasto tanto en rata como en ratón, en humanos promueve la apoptosis del trofoblasto (Daher *et al.* 1999), la administración de TNF $\alpha$  en ratonas preñadas resulta en la interrupción del embarazo (Makhseed *et al.* 2003).

En respuesta a una infección con una variedad de patógenos o sus productos asociadas al inicio del trabajo de parto prematuro, los tejidos de la interfase materno-fetal son capaces de producir esta citocina (Zaga *et al.* 2004). En nuestro estudio demostramos que en respuesta a la estimulación con LPS de explantes de vellosidades placentarias humanas se genera un aumento en la producción de esta citocina, efecto que se ve revertido por el pre-tratamiento con P4 0.01  $\mu$ M, resultados similares se han observado en macrófagos de ratones, donde la acción de la P4 es capaz de reducir la síntesis de TNF $\alpha$ , este efecto pudo deberse a la inhibición de NF- $\kappa$ B mediante la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  (Miller y Hunt, 1998),

Un efecto análogo fue observado en epitelio amniótico humano en el cual el pre-tratamiento con P4 (0.01, 0.1 y 1  $\mu$ M) inhibe de manera significativa la producción de TNF $\alpha$  mediante un mecanismo que involucra la inhibición significativa de la expresión de TLR-4/MyD88 (Flores-Espinosa *et al.* 2013).

IL-1 $\beta$  fue la primer citocina implicada en la patogénesis del inicio del trabajo de parto pretérmino asociado a infección. Evidencia clínica y experimental sustenta que la participación de IL-1 $\beta$  incluye la estimulación en la producción de prostaglandinas y la activación de las contracciones miométriales. De igual manera se ha comprobado que la administración de IL-1 $\beta$  en animales embarazados induce el comienzo del trabajo de parto (Romero *et al.* 2007). Por su parte IL-6 es una citocina clave para la identificación de inflamación intra-

amniotica, pacientes con elevados niveles de IL-6 en líquido amniótico presentan riesgo inminente de parto pretérmino (Chaemsaihong *et al.* 2015).

La estimulación de los explantes de placenta humana con LPS demostró inducir la producción tanto de IL-1 $\beta$  como de IL-6 de forma significativa. Estas citocinas son producidas por la placenta, y diversos tejidos de la unidad materno-fetal, numerosas investigaciones han demostrado la presencia de RNAm y la forma proteica de estas citocinas (Bowen *et al.* 2002), del mismo modo se ha determinado la producción tanto de IL-1 $\beta$  como de IL-6 en respuesta al estímulo con LPS en diversos tejidos de la unidad materno-fetal como; membranas fetales (Fortunato *et al.* 1996, Menon *et al.* 2009), y trofoblasto humano (Dudley *et al.* 1993).

Con el presente estudio evidenciamos que el pre-tratamiento de P4 0.01  $\mu$ M/mL demostró reducir la producción de estas citocinas por los explantes de placenta humana de forma significativa, algunos trabajos han demostrado que el uso de esta hormona tiene el mismo efecto que nosotros observamos. Un estudio realizado en células mononucleares de sangre de cordón humano demostró que el pre-tratamiento con P4 ( $10^6$  y  $10^5$  M) fue capaz de reducir significativamente la síntesis de IL-6 (Giannoni *et al.* 2011). Efecto similar fue observado en un trabajo realizado por Su *et al.* 2009 en la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 en la cual la P4 es capaz de inhibir la respuesta al estímulo a LPS, un estudio realizado en explantes de arterias de la placa coriónica inducen una sobreexpresión de IL-6, la misma que es bloqueada por el pre-tratamiento con P4 (Gotkin *et al.* 2006). Por otra parte muy pocas investigaciones han correlacionado el efecto de la P4 con la producción de IL-1 $\beta$ , el trabajo realizado por Butts *et al.* 2006 en células dendríticas derivadas de médula de rata mostró que la P4 disminuye la producción de IL-1 $\beta$  después de la estimulación con LPS, mismo efecto se observó en células mononucleares por Morishita *et al.* 1999.

Dos marcadores de suma importancia que se han correlacionado en el comienzo del trabajo de parto, y en especial con el trabajo de parto prematuro han sido la quimiocina IL-8 y la metaloproteinasa de matriz (MMP)-9. IL-8 es una quimiocina



capaz de estimular la quimiotaxis y activación de neutrófilos y linfocitos T, esta citocina es detectada en el líquido amniótico en mujeres a partir del segundo trimestre en adelante (Saji *et al.* 2000) su importancia como marcador de parto prematuro resulta del hecho que la infección microbiana ha sido relacionada con concentraciones elevadas de esta. Por su parte las MMPs son una familia de enzimas capaces de degradar matriz extracelular, distinguidas por su estructura y sustratos específicos (Vadillo-Ortega *et al.* 1995).

Durante el embarazo las MMPs contribuyen en el re-modelamiento/degradación de la matriz extracelular que conduce a la maduración cervical, la ruptura de las membranas fetales y finalmente la separación de la placenta del útero materno. Numerosos estudios han reportado cambios en los niveles séricos, de líquido amniótico y en las membranas fetales de MMP-9 durante el parto pretérmino (Sundrani *et al.* 2012).

IL-8 puede contribuir de igual forma a la maduración cervical y la ruptura de las membranas fetales porque es activador de colagenasas, elastasas y otras enzimas capaces de degradar las membranas, estas enzimas derivan de neutrófilos, trofoblasto y decidua (Laham *et al.* 1999 y Kayisli *et al.* 2002) este mecanismo ha sido fuertemente asociado como una causa del parto prematuro. El útero, el cérvix, la placenta y las membranas fetales contienen colágena tipo I y III, que representan los principales componentes de matriz extracelular, los estudios sugieren que el remodelamiento de estas colágenas están implicadas en el comienzo del trabajo de parto (Koscica *et al.* 2007) en la cual las MMPs juegan un papel primordial.

En este sentido la IL-8 es liberada por explantes de placenta humana y cervicales, así como cultivos primarios de células coriodeciduales, células de estroma decidua y citotrofoblasto, esta citocina ha sido localizada en citotrofoblasto y células de Hofbauer de la placenta (Laham *et al.* 1999) y se ha observado que la estimulación con LPS induce el aumento en la producción de IL-8 (Menon *et al.* 2009). Nuestro trabajo demostró como la estimulación de explantes de placenta humana genera un incremento en la producción tanto de IL-8 como de MMP-9

aunque estas dos proteínas en nuestro modelo actúan de forma distinta a todos los demás marcadores ya que a pesar de no tener el estímulo con LPS la concentración de ellas se encuentra elevada a diferencia de otras citocinas.

Estudios *in vitro* han documentado que IL-8 se comporta de manera distinta a cualquier otra citocina evaluada, de tal manera que la expresión de IL-8 parece ser constitutiva, como si existiera la pérdida de una sustancia inhibitoria mientras que otras citocinas pro-inflamatorias requieren un estímulo para su producción (Fortunato *et al.* 1996). El aumento de IL-8 se correlaciona con la expresión de MMPs especialmente MMP-9 (Kayisli *et al.* 2002). Con base en nuestros resultados y los datos obtenidos por otros grupos de investigación proponemos que IL-8 se produce de forma constitutiva por la placenta humana, esta producción genera el estímulo necesario para que MMP-9 sea producida también por estas células por esta razón los niveles que encontramos en los tejidos que no recibieron el estímulo con LPS se encuentran elevados, en comparación con otros marcadores.

Nuestros datos resultan interesantes ya que el pre-tratamiento con P4 en las distintas concentraciones logró disminuir de manera significativa la producción de IL-8, cabe señalar que la concentración menor (0.01  $\mu$ M/mL) fue la más efectiva para generar este efecto, un resultado que se observó en otros marcadores pro-inflamatorios, de igual manera las concentraciones mayores de P4 disminuyeron la producción de forma significativa de MMP-9, estas dos proteínas que están correlacionadas en su producción parecen ser inhibidas de igual manera por la acción de P4 en las mismas concentraciones.

Nuestros resultados se asemejan a los obtenidos en células de epitelio amniótico donde el co-tratamiento con P4 bloqueó la capacidad que tiene IL-1 $\beta$  para inducir la producción de IL-8 (Loudon *et al.* 2003), los estudios realizados en placenta sobre la producción de MMP-9 y la influencia de P4 en esta son nulos, sin embargo, existen datos que demuestran el efecto de P4 sobre esta enzima; como el observado en fibroblastos de cuello uterino de conejo en estas células la P4 logra suprimir la producción de proMMP-9 cuando estas células fueron tratadas

con 1  $\mu$ M de progesterona (Imada *et al.* 1997). Un estudio de doble compartimento demostró que P4 tiene la capacidad de reducir la producción de IL-8 y MMP-9 tanto en la región amniótica y coriodecidual de las membranas fetales (Pineda-Torres *et al.* 2014).

Otra quimiocina de interés es MIP-1 $\alpha$ , esta citocina es responsable de la migración de casi la mitad de todos los monocitos y dos terceras partes de células NK, este descubrimiento demostró que el compartimento fetal posee la habilidad de regular la migración y activación de células inmunes maternas, teniendo la placenta el mayor control del medio ambiente inmunológico que previamente fue previsto (Drake *et al.* 2002), esta citocina es prácticamente indetectable en líquido amniótico de mujeres en el segundo trimestre del embarazo y a término pero sin labor, en contra parte, la invasión microbiana de la cavidad amniótica se asocia con un aumento en la concentración de MIP-1 $\alpha$  tanto en parto a término como en pretérmino (Romero *et al.* 1994)

Nuestro trabajo reveló que los explantes de placenta humana son capaces de producir MIP-1 $\alpha$  en respuesta a LPS, efecto que fue antagonizado por el pretratamiento con P4 0.01  $\mu$ M. Ningún estudio ha correlacionado el efecto de esta hormona con la producción de la quimiocina, como tampoco se ha efectuado en placenta humana.

La primer citocina que fue considerada como un importante inmunosupresor fue IL-10 la cual poseía la capacidad de inhibir las actividades de tipos de células inflamatorias Th1 (Thaxton y Sharma, 2010), esta es una citocina clave que participa en el comienzo del embarazo ya que esta involucrada en varios eventos importantes como la formación de la placenta, de igual manera IL-10 ejerce un efecto protector en la unidad feto-placentaria ya que inhibe la secreción de citocinas pro-inflamatorias (Moreli *et al.* 2012). En diversos estudios el nivel de IL-10 son significativamente altos en mujeres con embarazos exitosos, mientras que en pacientes con recurrentes pérdidas gestacionales se ha observado que la producción de IL-10 es baja (Bakir *et al.* 2010).

Se ha demostrado en diversos trabajos que la estimulación con LPS genera un aumento en la producción de esta citocina, en tejidos coriodeciduals (Simpson *et al.* 1998), macrófagos alveolares (Chanteux *et al.* 2007), tejido amniótico (Flores-Espinosa *et al.* 2014), estos resultados avalan los datos obtenidos, los cuales muestran como el estímulo con LPS en explantes de placenta humana incrementa la secreción de IL-10, este efecto lo asociamos a un acto de compensación o equilibrio entre las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. De igual manera nuestro estudio reveló como la P4 tiene la capacidad de reducir la secreción de esta citocina al pre-tratar los tejidos con concentraciones bajas de P4, comparando nuestros resultados con un modelo experimental de explantes de arteria feto-placentaria, discrepan en el efecto de P4 sobre la síntesis de IL-10, ya que en este modelo P4 parece no tener ningún efecto en la síntesis de IL-10 inducidos por la estimulación con LPS. Estos resultados nos permitirían vislumbrar que el efecto anti-inflamatorio de P4 no está mediado a través de la acción de esta citocina (Shields *et al.* 2005).

Evidencia que sustenta que el comienzo del trabajo de parto es un evento inflamatorio, continúa acumulándose. Eventos inflamatorios pueden ser observados y han sido reportados en una diversidad de tejidos como el miometrio, cérvix, membranas fetales y sangre periférica. Este fenómeno inflamatorio ha sido asociado fuertemente a infecciones que desencadenan una reacción inmunológica pro-inflamatoria. Estas citocinas regulan la expresión de prostaglandinas que inicia las contracciones uterinas, la dilatación cervical y la exposición de las membranas, igualmente la producción de MMPs se ve incrementada estimulando la maduración cervical y la ruptura de membranas fetales (Bastek *et al.* 2011) eventos implicados en el comienzo y progresión trabajo de parto.

Utilizando nuestro modelo de explantes de vellosidades de placenta humana demostramos como la P4 posee la capacidad de modular el ambiente inflamatorio que este tejido genera en condiciones que simulan una infección aguda al ser estimulados con LPS. Es importante señalar que al igual que otros modelos experimentales, el nuestro presenta limitaciones, ya que este nos permitió

observar la respuesta generada por las vellosidades placentarias exclusivamente como una unidad funcional, más no permite dilucidar qué población celular específica se encarga en mayor o menor medida de generar esta respuesta. De igual manera nuestro modelo solo puede ser aplicado a vellosidades placentarias provenientes de mujeres sanas en edad gestacional a término.

El mecanismo por el cual P4 ejerce funciones inmunomoduladoras es actualmente desconocido, algunos trabajos han mostrado la capacidad que tiene P4 para inducir la producción de I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibidor de NF- $\kappa$ B), así como se ha propuesto que P4 unida a su receptor puede competir con NF- $\kappa$ B por un sitio de unión adyacente al DNA impidiendo la expresión de genes inducidos por parte del NF- $\kappa$ B, de igual manera por la competición de co-factores esenciales para su transcripción modificando la producción de citocinas (Barrera *et al.* 2007). Trabajos de Raghupathy *et al.* 2009 Han descrito una proteína denominada Factor bloqueador inducido por progesterona (PIBF) una proteína capaz de alterar el perfil de secreción de diversas citocinas por linfocitos activados, esta proteína ha tomado relevancia como un posible modulador para proteger al feto de la respuesta inmunológica generada en la unidad materno-fetal.

Tomando en cuenta nuestros resultados y los reportados por otros grupos de trabajo queda claro que las vellosidades placentarias humanas son capaces de responder a un estímulo infeccioso secretando diversos moduladores pro-inflamatorios como un mecanismo de defensa inmune innata de este tejido, sin embargo, el aumento desproporcionado de citocinas pro-inflamatorias como los marcadores que nosotros elegimos son incompatibles con la continuidad del embarazo al alterar el fino equilibrio inmunológico de la unidad materno-fetal. Por otro lado P4 ha sido ampliamente usada en la prevención de parto prematuro y pérdidas gestacionales, aunque el mecanismo por el cual genera este efecto no ha sido esclarecido completamente, se le ha atribuido a su capacidad para generar una modulación en la respuesta inmune, específicamente una acción anti-inflamatoria.

En este sentido el estudio de las acciones inmunoreguladoras de la P4 merecen ser ampliamente estudiadas, y para ello nuestro modelo permite reproducir *in vitro* un escenario patológico posible *in vivo*.

## 10. Conclusiones

- 1.- En el presente trabajo se logró estandarizar un modelo experimental de vellosidades placentarias humanas en cultivo, las cuales son funcional y estructuralmente viables, así como metabólicamente activas.
- 2.- Las vellosidades placentarias son capaces de generar una respuesta pro-inflamatoria ante un estímulo con LPS, situación semejante a la que ocurriría *in vivo* en un escenario de infección intrauterina durante el embarazo.
- 3.- La P4 posee la capacidad de generar un efecto inhibitorio en la producción de citocinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y factores pro-degradativos generados ante una respuesta de los explantes de placenta humana a LPS.
- 4.- Las vellosidades placentarias humanas pueden producir y secretar citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6, quimiocinas como MIP-1 $\alpha$  e IL-8 y factores pro-degradativos como MMP-9, esto como una respuesta inmunológica a LPS.
- 5.- En una cinética en relación al tiempo de estímulo con LPS, las vellosidades placentarias producen en primera instancia TNF- $\alpha$ , seguida de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-8, sin embargo, la respuesta máxima generada por este tejido se genera tras 24 h de estímulo.
- 6.- IL-8 es una citocina que se produce de forma constitutiva por las vellosidades de placentas humanas a término.

## **11. PERSPECTIVAS**

Los resultados presentados en este trabajo demuestran un importante efecto de la P4 sobre la respuesta inmunológica de las vellosidades placentarias humanas, ejerciendo un efecto inmunomodulador sobre la síntesis y secreción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a un proceso infeccioso, sin embargo, es importante realizar más estudios para comprender completamente esta función de la progesterona.

En este sentido nuestras perspectivas incluyen caracterizar el mecanismo por el cual la progesterona ejerce este efecto inmunoregulador, mediante la determinación de las isoformas del RP que participan en el mecanismo efector, además evaluar la participación de diferentes elementos de la respuesta innata como la regulación de receptores tipo-Toll.



## 12. BIBLIOGRAFÍA

- **Abrahams VM, Mor G.** (2005). Toll-like Receptors and their Role in the Trophoblast. *Placenta*; 26(7):540-547.
- **Abrahams VM, Visintin I, Aldo PB, Guller S, Romero R, Mor M.** (2005b). Role for TLRs in the Regulation of Immune Cell Migration by First Trimester Trophoblast Cells. *The Journal of Immunology*; 175(12):8096-80104.
- **Al-Asmakh M.** (2007). Reproductive functions of progesterone. *Middle East Fertility Society Journal*; 12(3): 147-152.
- **Amado JA, Flórez J.** (2003). Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. En: *Farmacología Humana*, 4<sup>o</sup> edición. Barcelona: Masson; pp. 887-911.
- **Arancibia SA, Beltran CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA.** (2007). Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses. *Biol Res*; 40(2): 97-112.
- **Arck P, Hansen PJ, Jericevic BM, Piccinni MP, Szekeres-Bartho J.** (2007). Progesterone During Pregnancy: Endocrine–Immune Cross Talk in Mammalian Species and the Role of Stress. *Am J Reprod Immunol.* 58(3):268-279.
- **Astle S, Slater DM, Thornton S.** (2003). The involvement of progesterone in the onset of human labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*; 108(2):177-181.
- **Astle S, Slater DM, Thornton S.** (2003). The involvement of progesterone in the onset of human labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*; 108(2):177-181.
- **Bakir WA, Abdul-gany ZS, Faeg A.** (2010). The Role of IL-6, IL-10 and IFN- $\gamma$  mRNA in Women with Recurrent Abortion. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics*; 3(1):46-52.
- **Barañao RI.** (2011). Inmunología del embarazo. *Invest Clin*; 52(2): 175-194.
- **Barrera D, Avila E, Diaz L.** (2007). Papel inmunológico de la progesterona en el mantenimiento del embarazo. *Revista de Investigación Clínica*; 59(2):139-145.
- **Bastek JA, Gomez LM, Elovitz MA.** (2011). The Role of Inflammation and Infection in Preterm Birth. *Clin Perinatol*; 38(3): 385-406.
- **Bernal AL.** (2007). Overview. Preterm labour: mechanisms and management. *BioMed central*; 7(suppl. 1): S2.
- **Boles JL, Ross MG, Beloosesky R, Desai M, Belkacemi L.** (2012). Placental-mediated increased cytokine response to lipopolysaccharides: a potential mechanism for enhanced inflammation susceptibility of the preterm fetus. *J Inflamm Res.*; 5:67-75.
- **Bottino MC, Lanari C.** (2010). Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómico. *Medicina*; 70(2): 173-184.
- **Bowen JM, Chamley L, Mitchell MD, Keelan JA.** (2002). Cytokines of the Placenta and Extra-placental Membranes: Biosynthesis, Secretion and Roles in Establishment of Pregnancy in Women. *Placenta*; 23(4):239-256.
- **Brown AG, Leite RS, Strauss JF 3rd.** (2004). Mechanisms underlying "functional" progesterone withdrawal at parturition. *Ann N Y Acad Sci.* Dec;1034:36-49.

- **Bryant-Greenwood GD.** (1998). The Extracellular Matrix of the Human Fetal Membranes: Structure and Function. *Placenta*; 19(1); 1-11.
- **Butts CL, Shukair SA, Duncan KM, Bowers E, Horn C, Belyavskaya E, Tonelli L, Sternberg EM.** (2006). Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int Immunol.*; 19(3):287-296.
- **Castellucci M, Kaufmann P.** (2006). Basic Structure of the Villous Trees. *Pathology of human placenta*. 5ed. Autores: Benirschke K. Kaufmann P y Beargen R.
- **Castellucci M, Kosanke G, Verdenelli F, Huppertz B, Kaufmann P.** (2000). Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Human Reproduction Update*; 6(5): 485-494.
- **Chaemsaihong P, Romero R, Korzeniewski SJ, Martinez-Varea A, Dong Z, Yoon BH, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Yeo L.** (2015). A rapid interleukin-6 bedside test for the identification of intra-amniotic inflammation in preterm labor with intact membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.*; 23:1-11.
- **Challis J, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ.** (2000). Endocrine and Paracrine Regulation of Birth at Term and Preterm. *Endocrine Reviews*; 21(5): 514-550.
- **Choi BC, Polgar K, Xiao L, A.Hill J.** (2000). Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.*; 15 Suppl 1:46-59.
- **Chanteux H, Guisset AC, Pilette C, Sibille Y.** (2007). LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKinases- and Sp1-dependent mechanisms. *Respir Res.* 2007 Oct 4;8:71.
- **Christiaensn I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM.** (2008). Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol.*; 79(1):50-57.
- **Cobo T, Kacerovsky M, Palacio M, Hornychova H, Hougaard DM.** (2012). Intra-Amniotic Inflammatory Response in Subgroups of Women with Preterm Prelabor Rupture of the Membranes. *PLOS ONE*; 7(8):e43677
- **Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP.** (2003). Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids*; 68(10-13):771-778.
- **Cox SM, Casey ML, MacDonald C.** (1997). Accumulation of interleukin-1b and interleukin-6 in amniotic fluid: a sequela of labour at term and preterm. *Human Reproduction Update*; 5(7):517-527.
- **Da Fonseca EB, Bittar RE, Carvalho MHB, Zugaib M.** (2003). Prophylactic administration of progesterone by vaginal suppository to reduce the incidence of spontaneous preterm birth in women at increased risk: A randomized placebo-controlled double-blind study. *Am J Obstet Gynecol.*; 188(2):419-424.
- **da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ.** Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 2001;276:21129e35.
- **Daher S, Fonseca F, Ribeiro G, Musatti CC, Gerbase-DeLima M.** (1999). Tumor necrosis factor during pregnancy and at the onset of labor and spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*; 83(1):77-79.

- **Deng F, Han F, Wu C.** (2009). Expression and immune effect of toll-like receptor 4 in human trophoblast cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.*; 29(3):359-352.
- **Donnelly L, Campling G.** (2014). Functions of the placenta. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*; 15:3
- **Drake PM, Red-Horse K, Fisher SJ.** (2002). Chemokine expression and function at the human maternal-fetal interphase. *Endocrine & Metabolic Disorders*; 3:159-165.
- **Druckmann R, Druckmann MA.** (2005). Progesterone and the immunology of pregnancy. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; 97(5):389-396.
- **Dudley DJ, Trautman MS, Mitchell MD.** (1993). Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the corio-decidual interphase. *J Clin Endocrinol Metab.*; 76(2):404-410.
- **Dudley DJ.** (1997). Pre-term labor: an intra-uterine inflammatory response syndrome?. *J Reprod Immunol.*; 36(1-2):93-109.
- **Edwards DP, Altmann M, DeMarzo A, Zhang Y, Weigel NL, Beck CA.** (1995). Progesterone Receptor and the Mechanism of Action of Progesterone Antagonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*; 53(1-6): 449-458.
- **Elliott CL, Slater DM, Dennes W, Poston L, Bennett PR.** (2000). Interleukin 8 expression in human myometrium: changes in relation to labor onset and with gestational age. *Am J Reprod Immunol.*; 43(5):272-277.
- **Elovitz MA, Mrinalini C.** (2005). Can medroxyprogesterone acetate alter Toll-like receptor expression in a mouse model of intrauterine inflammation?. *Am J Obstet Gynecol.*; 193(3 Pt 2):1149-1155.
- **Enders A, Blankenship T.** (1998). Comparative placental structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 38(1999):3-15.
- **Evain-Brion D, Malassiné A.** (2005). The human placenta: an atypical endocrine organ. *Growth Horm IGF Res.*; 13 Suppl A:S34-7.
- **Flores-Espinosa P, Pineda-Torres M, Vega-Sánchez R, Estrada-Gutiérrez G, Espejel-Nuñez A, Flores-Pliego A, Maida-Claros R, Paredes-Vivas Y, Morales-Méndez I, Sosa-González I, Chávez-Mendoza A, Zaga-Clavellina V.** (2014). Progesterone elicits an inhibitory effect upon LPS-induced innate immune response in pre-labor human amniotic epithelium. *Am J Reprod Immunol*; 71(1):61-72.
- **Flores-Herrera H, García-López G, Díaz NF, Molina-Hernandez A, Osorio-Caballero M, Soriano-Becerril D, Zaga-Clavellina V.** (2012). An experimental mixed bacterial infection induced differential secretion of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) and proMMP-9 in human fetal membranes. *Placenta*; 33(4):271-7.
- **Forbes K, Westwood M.** (2010). Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth. *J Endocrinol.*; 207(1):1-16.
- **Fortunato SJ, Menon RP, Swan KF, Menon R.** (1996). Inflammatory cytokine (interleukins 1, 6, and 8 and tumor necrosis factor- $\alpha$ ) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations. *Am J Obstet Gynecol*; 174(6):1855-1861.

- **Fumitaka S, Samejuma Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T.** (2000). Cytokine production in chorioamnionitis. *Journal of Reproductive Immunology*; 47:185-196.
- **Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A.** (2014). A Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals. *J Toxicol Pathol*; 27: 11-18.
- **Gallegos S, Espino S, Gallardo JM, Velasquez B, Camargo L, Guzman ME.** (2008). La placenta humana: revisión. *Perinatol Reprod Hum*; 22(3):230-245.
- **Giannoni E, Guignard L, Reymond MK, Perreau M, Roth-Kleiner M, Calandra T, Roger T.** (2011). Estradiol and Progesterone Strongly Inhibit the Innate Immune Response of Mononuclear Cells in Newborns. *Infect Immun.*; 79(7):2690-2698.
- **Goldenberg RL, Culhane JF, Lams J, Romero R.** (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*; 371(9606): 75-84.
- **Gotkin JL, Celver J, McNutt P, Shields AD, Howard BC, Paonessa DJ, Napolitano PG.** (2006). Progesterone reduces lipopolysaccharide induced interleukin-6 secretion in fetoplacental chorionic arteries, fractionated cord blood, and maternal mononuclear cells. *Am J Obstet Gynecol.*; 195(4):1015-1019.
- **Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, Edwards JL, Cook MJ, Novy MJ.** (1994). An experimental model for intraamniotic infection and preterm labor in Rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol.*; 171(6):1660-1667.
- **Gude N, Roberts C, Kalionis B, King R.** (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res.*; 114(5-6): 397-407.
- **Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M.** (2006). The Placenta Cytokine Network and Inflammatory Signals. *Placenta*; 27(8):794-198.
- **Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, Sandstedt B, Bremme K, Ekstöm AS, Scheynius A.** (2002). Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology*; 107(1):145-151.
- **Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C.** (2005). HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *The FASEB Journal*; 19(7):681-93.
- **Huppertz B, Ghosh D, Sengupta J.** (2014). An integrative view on the physiology of human early placental villi. *Prog Biophys Mol Biol.*; 114(1):33-48.
- **Iglesias M, Guzmán R, Martínez O, Restrepo JF, Iglesias A.** (2002). Inmunología de la reproducción. *Acta Medica Colombiana* 23(3):170-180.
- **Imada K, Ito A, Sato T, Namiki M, Nagase H, Mori Y.** (1997). Hormonal Regulation of Matrix Metalloproteinase 9/Gelatinase B Gene Expression in Rabbit Uterine Cervical Fibroblasts. *Biol Reprod.*; 56(3):575-580.
- **Jansson T, Powell TL.** (2007). Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond).*; 113(1):1-13.
- **Kannaki TR, Shanmugam M, Verma PC.** (2011). Toll-like receptors and their role in animal reproduction. *Anim Reprod Sci*; 125(1-4):1-12.
- **Karolicki H.** (1979). Endocrinología de la placenta. *Act. Méd. Cost*; 22(3): 305-309.

- **Kayisly UA, Mahutte NG, Arici A.** (2002). Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am J Reprod Immunol.*; 47(4):213-221.
- **Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJA, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD.** (2003). Cytokines, Prostaglandins and Parturition—A Review. *Placenta*; 24(17): s33-s46.
- **Kelly RW.** (2002). Inflammatory mediators and cervical ripening. *J Reprod Immunol.*; 57:217-224.
- **Klauffenbach D, Rascher W, Rollinghoff M, Dotsch J, Meissner U, Schnare M.** (2005). Regulation and signal transduction of toll-like receptors in human chorioncarcinoma cell line. *Am J Reprod Immunol.* 53:77-84.
- **Koch MO, Romano MF, Jara ML, Sciangula MD.** (2008). CORIOAMNIONITIS. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina*; 180:21-23.
- **Koga K, Aldo PB, Mor G.** (2009). Toll-like receptors and pregnancy: Trophoblast as modulators of the immune response. *J. Obstet. Gynaecol. Res*; 35(2):191-202.
- **Koga K, Mor G.** (2008). Expression and function of Toll-Like receptor at the Maternal-Fetal interfase. *Reproductive Sciences*; 15(3): 231-242.
- **Koscica KL, Ananth CV, Placido J, Reznik SE.** (2007). The effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on inflammation-mediated preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.*; 196(6):551.e1-3.
- **Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y.** (2004). Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human pacentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol.*; 35:47-54.
- **Kumpel BM, Manoussaka MS.** (2011). Placental immunology and maternal alloimmune responses. *The International Journal of Transfusion Medicine*; 102(1): 2-12.
- **Kwak-Kim J, Park JC, Ahn HK, Kim JW, Gilman-Sachs A.** (2010). Immunological Modes of Pregnancy Loss. *Am J Reprod Immunol.*; 63(6):611-23.
- **Laham N, Brennecke SP, Rice GE.** (1999). Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: effects of gestational labor, and chorioamnionitis. *Biol Reprod.*; 61(3):823-827.
- **Leonhardt SA, Boonyaratanakornkit V, Edwards DP.** (2003). Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids*; 68(10-13): 761-770.
- **Liaunardy-Jopeace A, Gay NJ.** (2014). Molecular and cellular regulation of Toll-like receptor-activity induced by lipopolysaccharide ligands. *Front Immunol.*; 5:473.
- **Levy O.** (2007). Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 7(5):379-90.
- **Loudon JAZ, Elliott CL, Hill F, Bennett PR.** (2003). Progesterone Represses Interleukin-8 and Cyclo-Oxygenase-2 in Human Lower Segment Fibroblast Cells and Amnion Epithelial Cells. *Biol Reprod.*; 69(1):331-337.

- **Lundin-Schiller S, Mitchell MD.** (1991). Prostaglandin production by human chorion leave cells in response to inflammatory mediators. *Placenta*; 12:353-363.
- **Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MMK.** (2003). Pro-inflammatory Maternal Cytokine Profile in Preterm Delivery. *Am J Reprod Immunol.*; 49(5):308-318.
- **McParland P, Jones G, Taylor D.** (2004). Preterm labour and prematurity. *Current Obstetrics & Gynaecology*; 14:309-319.
- **Mendelson CR, Condon JC.** (2005). New insights into the molecular endocrinology of parturition. *J Steroid Biochem Mol Biol.*; 93(2-5):113-119.
- **Menon R, Peltier MR, Eckardt J, Fortunato SJ.** (2009). Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*; 201:306.e1-6.
- **Mesiano S, Chan EC, Fitter J, Kwek K, Yeo G, Smith R.** (2002). Progesterone Withdrawal and Estrogen Activation in Human Parturition Are Coordinated by Progesterone Receptor A Expression in the Myometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 87(6): 2924-2930.
- **Miller L, Hunt JS.** (1998). Regulation of TNF- $\alpha$  Production in Activated Mouse Macrophages by Progesterone. *J Immunol.*; 160(10):5098-5104.
- **Mitchell MD, Keelan JA.** (2006). Inflammation and normal labor, inflammation and pregnancy, Peebles y Myatt, informa. United Kingdom. Pp. 79-93.
- **Moreli JB, Ruocco MC, Vernini JM, Rudge MVC, Calderon IMP.** (2012). Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor- Alpha in Pregnancy: Aspects of Interest in Clinical Obstetrics. *ISRN Obstet Gynecol.* 2012: 230742.
- **Morishita M, Miyagi M, Iwamoto Y.** (1999). Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes. *Journal of Periodontology*; 70(7):757-769.
- **Morris MC, Gilliam EA, Li L.** (2015). Innate immune programming by endotoxin and its pathological consequences. *Front Immunol.*; 5:680.
- **Mulac-Jericevic B, Conneely OM.** (2004). Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction*; 128(2):139-46.
- **Norman JE, Bollapragada S, Yuan M, Nelson SM.** (2007). Inflammatory pathways in the mechanism of parturition. *BMC Pregnancy and Childbirth*; 7(Suppl 1):S7
- **Orizaba-Chávez B, Alba-Jasso GA, Ocharán-Hernández ME.** (2013). Farmacocinética de la progesterona. *Rev Hosp Jua Mex*: 80(1): 59-6622.
- **Parry S, Strauss JF.** (1998). Premature rupture of the fetal membranes. *Mechanisms of disease*; 338(10): 663-670.
- **Patni S, Flynn P, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, Thorthon CA.** (2007). An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour. *BJOG*; 114(11): 1326-1334.
- **Patni S, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, Thornton CA.** (2009). Expression and Activity of Toll-Like Receptors 1–9 in the Human Term Placenta and Changes Associated with Labor at Term. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*; 80(2):243-248.

- **Pineda-Torres M, Flores-Espinosa P, Espejel-Nuñez A, Estrada-Gutierrez G, Flores-Pliego A, Maida-Claros R, Zaga-Clavellina V.** (2014). Evidence of an immunosuppressive effect of progesterone upon in vitro secretion of proinflammatory and prodegradative factors in a model of choriodecidual infection. *BJOG*; [Epub ahead of print].
- **Plociennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska KK.** (2014). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci*; 72:557-581.
- **Purizaca-Benites M.** (2008). La placenta y la barrera placentaria. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*; 54(2): 270-278.
- **Raghupathy R, Al-Mutawa E, AlAzemi M, Makhseed M, Azizieh F, Szekeres-Bartho J.** (2009). Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *J Reprod Immunol.*; 80(1-2):91-99.
- **Raetz CR, Whitfield C.** (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700. Epub 2001 Nov 9.
- **Raghupathy R, Kalinka J.** (2008). Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation. *Frontiers in Bioscience*; 13:985-994.
- **Rico-Rosillo MG, Vega-Robledo GB.** (2012). Mecanismos inmunológicos involucrados en el embarazo. *Ginecol Obstet Mex*: 80(5): 332-340.
- **Robbins JR, Bakardjiev AI.** (2012). Pathogens and the placental fortress. *Current Opinion in Microbiology*; 15(1): 36-43.
- **Rodríguez-Cortés YM, Mendieta-Zerón H.** (2014). La placenta como órgano endocrino compartido y su acción en el embarazo normoevolutivo. *Revista de Medicina e Investigacion*; 2(1): 28-34.
- **Romero E, Avila C, Santhanam U, Shgal PB.** (1990). Amniotic Fluid Interleukin 6 in Preterm Labor. Association with Infection. *J Clin Invest.*; 85(5):1392-400.
- **Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK.** (2006b). Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med.*; 11(5):317-326.
- **Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, Chaiwoeapongsa T, Mazor M.** (2006a). The preterm parturition síndrome. *BJOG*; 113(suppl. 3):17-42.
- **Romero R, Gómez R, Chaiworapongsa T, Conoscenti G, Kim JC, Kim YM.** (2001). The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*; 15(Suppl. 2): 41-56.
- **Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP.** (2007). Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications and fetal injury. *Nutr Rev.*; 65(12 Pt 2):S194-202.
- **Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, Cerami A.** (1989). Infection an labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J obstet Gynecol*; 161(2):336-341.
- **Romero R, Mazor M.** (1988). Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol.*; 31:553-584.

- **Romero R, Gomez R, Galasso M, Munoz H, Acosta L, Yoon BH, Svinarich D, Cotton DB.** (1994). Macrophage inflammatory protein-1 alpha in term and preterm parturition: effect of microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Reprod Immunol.*; 32(2):108-113.
- **Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T.** (2000). Cytokine production in chorioamnionitis. *Journal of Reproductive Immunology*; 47(2):185-196.
- **Schwartz N, Xue X, Elovitz MA, Dowling O, Metz CN.** (2009). Progesterone suppresses the fetal inflammatory response ex vivo. *Am J Obstet Gynecol*; 201:211.e1-9.
- **Shields AD, Weight J, Paonessa DJ, Gotkin J, Howard BC, Hoeldtke NJ, Napolitano PG.** (2005). Progesterone modulation of inflammatory cytokine production in a fetoplacental artery explant model. *Am J Obstet Gynecol.*; 193(3 Pt 2):1144-1148.
- **Shimoya K, Moriyama A, Matsuzaki N, Ogata I, Koyama M, Azuma C, Saji F, Murata Y.** (1999). Human placental cells show enhanced production of interleukin (IL)-8 in response to lipopolysaccharide (LPS), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , but not to IL-6. *Molecular Human Reproduction*; 5(9): 885-891.
- **Silver RM, Lohner WS, Daynes RA, Mitchell MD, Branch W.** (1994). Lipopolysaccharide-Induced Fetal Death: The Role of Tumor-Necrosis Factor Alpha *Biol Reprod.*; 50(5): 1108-1112.
- **Simpson KL, Keelan JA, Mitchell MD.** (1998). Labor-associated changes in interleukin-10 production and its regulation by immunomodulators in human choriondecidua. *J Clin Endocrinol Metab.*; 83(12):4332-4337.
- **Slattery MM, Morrison JJ.** (2002). Preterm delivery. *THE LANCET*; 360:1489-1497.
- **Spitz IM.** (2003). Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators: an overview. *Steroids*; 68(10-13): 981-993.
- **Stjernholm YV.** (2012). *Progesterone in Human Pregnancy and Parturition.* INTECH Open Access Publisher.
- **Su L, Sun Y, Ma F, Lü P, Huang H, Zhou J.** (2009). Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF- $\kappa$ B activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunol Lett*; 125(2):151-155.
- **Subramaniam A, Abramovici A, Andrews W, Tita AT.** (2012). Antimicrobials for Preterm Birth Prevention: An Overview. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*; 2012:1-12.
- **Sundrani DP, Chavan-Gautam PM, Pisal HR, Mehendale SS, Joshi SR.** (2012). Matrix Metalloproteinase-1 and -9 in Human Placenta during Spontaneous Vaginal Delivery and Caesarean Sectioning in Preterm Pregnancy. *Plosone*; 7(1): e29855.
- **Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L.** (2001). Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol.*; 1(6): 1037-1048.



- **Szekeres-Bartho J, Halasz M, Palkovics T.** (2009). Progesterone in pregnancy; receptor–ligand interaction and signaling pathways. *J Reprod Immunol.*; 83(1-2): 60-64.
- **Szekeres-Bartho J, Wegmann TG.** (1996). A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th 1 /Th2 balance. *J Reprod Immunol.*; 31(1-2):81-95.
- **Takeda K, Akira S.** (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunol.*; 16(1): 3-9.
- **Takeda Y, Tsuchiya I.** (1953). Studies on the pathological changes caused by the injection of the Shwartzman filtrate and the endotoxin into pregnant rabbits. *Japanese Journal of experimental medicine*; 21:9-16.
- **Tarrade A, Kuen RL, Malassiné A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, Evain-Brion D.** (2001). Characterization of Human Villous and Extravillous Trophoblasts Isolated from First Trimester Placenta. *Laboratory Investigation*; 81(9): 1199- 1211.
- **Thaxton JE, Sharma S.** (2010). Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy. *Am J Reprod Immunol.*; 63(6): 482–491.
- **Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E.** (2000). Tolerance to the foeto-placental “graft”: ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol*; 12(6):731-737.
- **Thellin O, Heinen E.** (2003). Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicology*; 185(3):179-184.
- **Tita AT, Rouse DJ.** (2009). Progesterone for preterm birth prevention: an evolving intervention. *Am J Obstet Gynecol*; 200(3):219-224.
- **Trundley A, Gardner L, Northfield J, Chang C, Moffett A.** (2006). Methods for isolation of cells from the human fetal-maternal interface. *Methods Mol Med.*; 122:109-122.
- **Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, Strauss JF.** (1995). 92-kd Type IV Collagenase (Matrix Metalloproteinase-9) Activity in Human Amniochorion Increases with Labor. *American journal of Pathology*; 146(1):148-156.
- **Vaure C, Liu Y.** (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol.*; 5:316
- **Vazquez-Rodriguez S, Boucham-Valencia P, Gonzalez-Jimenez M, Paredes-Vivas L, Calixto-Gonzalez R, Cerbulo-Vazquez A.** (2011). Mecanismos de tolerancia inmunológica en el embarazo. *Perinatología y reproducción humana*; 25(1): 39-45.
- **Waldorf KM, McAdams RM.** (2013). Influence of Infection During Pregnancy on Fetal Development. *Reproduction*; 146(5): R151-R162.
- **Wilczyński JR.** (2005). Th1/Th2 cytokines balance—yin and yang of reproductive immunology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*; 122(2): 136-143.
- **Yu XW, Yan CF, Jin H, Li X.** (2004). Tumor necrosis factor receptor 1 expression and early spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*; 132(1):58-63.

- **Zaga V, Estrada-Gutierrez G, Beltran-Montoya J, Maida-Carlos R, Lopez-Vancell R, Vadillo-Ortega F.** (2004). Secretion of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or chorion with lipopolysaccharides or group B Streptococci. *Biol Reprod.*; 71(4):1296-1302.
- **Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, Espejel-Nuñez A, Flores-Pliego A, Soriano-Becerril D, Maida-Claros R, Merchant-Larios H, Vadillo-Ortega F.** (2007). In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF  $\alpha$  after selective infection with *Escherichia coli* in human fetal membranes. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 13;5:46.
- **Zaga-Clavellina V, López GG, Estrada-Gutierrez G, Martínez-Flores A, Maida-Claros R, Beltran-Montoya J, Vadillo-Ortega F.** (2006b). Incubation of human chorioamniotic membranes with *Candida albicans* induces differential synthesis and secretion of interleukin-1beta, interleukin-6, prostaglandin E, and 92 kDa type IV collagenase. *Mycoses*; 49(1):6-13.
- **Zaga-Clavellina V, Merchant-Larios H, García-López G, Maida-Claros R, Vadillo-Ortega F.** (2006a). Differential secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after selective infection with group B streptococci in human fetal membranes. *J Soc Gynecol Investig*; 13(4):271-279.
- **Zaga-Clavellina V, Ruiz M, Flores-Espinosa P, Vega-Sanchez R, Flores-Pliego A, Estrada-Gutierrez G, Sosa-Gonzalez I, Morales-Mendez I, Osorio-Caballero M.** (2012). Tissue-specific human beta-defensins (HBD)-1, HBD-2 and HBD-3 secretion profile from human amniochorionic membranes stimulated with *Candida albicans* in a two-compartment tissue culture system. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 10:70.
- **Zahl PA, Bjerknes C.** (1943). Induction of decidua-placental hemorrhage in mice by the endotoxins of certain gram-negative bacteria. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*; 54:329-332.

Publicación derivada del proyecto de investigación

RESEARCH

Open Access



# In vitro progesterone modulation on bacterial endotoxin-induced production of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1 $\alpha$ , and MMP-9 in pre-labor human term placenta

G. García-Ruiz<sup>1,3</sup>, P. Flores-Espinosa<sup>1</sup>, E. Preciado-Martínez<sup>1,3</sup>, L. Bermejo-Martínez<sup>1</sup>, A. Espejel-Nuñez<sup>1</sup>, G. Estrada-Gutiérrez<sup>1</sup>, R. Maida-Claros<sup>2</sup>, A. Flores-Pliego<sup>1</sup> and Veronica Zaga-Clavellina<sup>1,3\*</sup>

## Abstract

**Background:** During human pregnancy, infection/inflammation represents an important factor that increases the risk of developing preterm labor. The purpose of this study was to determine if pre-treatment with progesterone has an immunomodulatory effect on human placenta production of endotoxin-induced inflammation and degradation of extracellular matrix markers.

**Methods:** Placentas were obtained under sterile conditions from pregnancies delivered at term before the onset of labor by cesarean section. Explants from central cotyledons of 10 human placentas were pre-treated with different concentrations of progesterone (0.01, 0.1, 1.0  $\mu$ M) and then stimulated with 1000 ng/mL of LPS of *Escherichia coli*. Cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , IL-10 concentrations in the culture medium were then measured by specific ELISA. Secretion profile of MMP-9 was evaluated by ELISA and zymogram. Statistical differences were determined by one-way ANOVA followed by the appropriate ad hoc test;  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**Results:** In comparison to the explants incubated with vehicle, the LPS treatment led to a significant increase in the level of all cytokines. In comparison to the explants treated only with LPS, pre-treatment with 0.01–1.0  $\mu$ M progesterone significantly blunted (73, 56, 56, 75, 25, 48 %) the secretion of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , IL-10, respectively. The MMP-9 induced by LPS treatment was inhibited only with the highest concentration of progesterone. Mifepristone (RU486) blocked the immunosuppressive effect of progesterone.

**Conclusions:** The present results support the concept that progesterone could be part of the compensatory mechanism that limits the inflammation-induced cytotoxic effects associated with an infection process during gestation.

**Keywords:** Progesterone, Cytokines, Metalloproteinase, Bacterial endotoxin, Inflammation, Human placenta, Intrauterine infection, Preterm labor

\* Correspondence: v.zagaclavellina@gmail.com

<sup>1</sup>Inmunobiochemistry Branch, Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes", Montes Urales 800, Lomas Virreyes, Ciudad de México 11000, Mexico

<sup>3</sup>Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, Ciudad de México 54700, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 García-Ruiz et al. Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

The cervicovaginal/intrauterine infection process during pregnancy represents a condition of extreme vulnerability for the mother and fetus. The immunologic defense process induces a pro-inflammatory environment that jeopardizes/disrupts the immune privilege of the intrauterine cavity.

There is evidence that almost 30 % of women with preterm labor have microbial invasion or inflammation of the amniotic cavity [1, 2]; this condition induces uncontrolled production and increase of Th1 cytokines such as interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$ , and IL-6 that alter the intra-amniotic milieu, leading to disruption of fetal tolerance [3].

Evidence supports the existence of a strong relation between the microorganisms that reach the amniotic cavity from the vagina and bacteria identified in the fetal circulation of premature neonates [4]. In this adverse scenario, the placenta represents a physical barrier that protects the product.

The placenta allows for the diffusion of nutrients and oxygen from the maternal blood to the fetal blood; therefore, this tissue is key in the immune-endocrine relationship between mother and fetus, creating an immune tolerance that permits their co-existence along 40 weeks.

From the 7th week of gestation, the placenta takes over steroid production and becomes the main source of steroid hormone until the end of pregnancy [5]. Progesterone (P4) is a steroid hormone that modulates/regulates different biological processes in a broad range of tissues, its action is essential in different reproductive events, such as ovulation, uterine and mammary gland development. Its function is essential during the establishment and maintenance of pregnancy and the onset of labor.

Both clinical and experimental data support the concept that normal pregnancy is a Th-2-like phenomenon. It is now evident that the protection of the fetus against a harmful maternal immune response is based on a complicated mechanism, and the communication between the various steps in the cascade of events is accomplished via cytokines.

Cytokines have been shown to affect the outcome of pregnancy, several pro-inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, have been implicated in the onset of spontaneous preterm labor [6–9]. The biological significance of this immunologic response includes deep alterations in the maternal immune system, as well as the establishment of a fetal inflammatory response syndrome that has been described in preterm birth and is strongly associated with an adverse perinatal outcome [10–12].

The toxic effects of inflammation lie in the well-known fact that a strong cellular anti-fetal response is

deleterious for pregnancy. Under these pathological conditions, the maternal-fetal unit displays compensatory mechanisms that limit partially the effects of pro-inflammation and privilege the continuity of gestation.

Among its multiple functions, P4 elicits immunomodulatory effects creating a suitable immune environment. Although the mechanism of action has not been completely characterized, experimental and clinical evidence indicates that P4 elicits anti-inflammatory properties. Likewise, there is evidence to support that prevention of the pro-inflammatory process by this hormone may be exerted through modulation of the host immune response [13–15].

The present work was conducted to determine whether P4 could modulate the secretion of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, and matrix metalloproteinase (MMP)-9 in explants of human placentas.

## Methods

### Reagents

Progesterone (4-pregnene-3, 20-dione), LPS (from *Escherichia coli* 055:B5), and RU486 (mifepristone) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA).

### Biological samples

The present project was approved by both the Human Ethical and Research Committees of the Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer IER-212250-06161) in Mexico City.

Ten placentas were collected from healthy women, 21–35 years, with normal, uncomplicated, singleton pregnancies, who underwent elective cesarean section at term (37–39 weeks of pregnancy) with no evidence of active labor, cervical dilatation or loss of mucus plug.

Written informed consents were obtained from all participants, their care was provided at the obstetrics outpatient service of the INPer IER. Patients with antecedents of cervicovaginal infection, chronic hypertension, diabetes mellitus, cardiac or renal insufficiency, or other systemic illnesses were not included in this study.

Immediately after delivery, microbial analyses were conducted to preclude the presence of chorioamniotic infection. Sterile swabs were randomly rolled across selected areas of the placenta. The swabs were then rolled onto Columbia agar with 5 % sheep blood, used as a primary isolation medium for fastidious and non-fastidious aerobic microorganisms. Appropriate selective media were used to detect specific pathogens and only infection-free membranes were used for this study.

Explants of the placenta were transported to the laboratory in sterile Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Life Technologies, CA, USA) supplemented with 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (Gibco). Tissues were manipulated under

sterile conditions. Two central cotyledons were dissected, once the decidua of the chorion laeve had been removed, 3 explants of 1 cm<sup>3</sup> were cultured in each well of a 12-well tissue culture plate with 2 mL of DMEM (GIBCO) without phenol red and supplemented with heat-inactivated and hormone-free 10 % fetal calf serum. Then, 1 mM sodium pyruvate and 1X antibiotic-antimycotic solution (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2.5 µg/mL amphotericin) were added to each well. The explants were incubated under 5 % CO<sub>2</sub>/ 95 % air at 37 °C.

#### Validation of placenta explants culture

To warrant that the explants were metabolically active, their viability was determined by a colorimetric assay using tetrazolium salts added to the culture medium (Boehringer Mannheim, Germany). The assay was performed every 24 h of culture over 4 days (data not shown). To explore the secretion profile of different analytes, a time-response curve was also performed (data not shown)

#### Treatment of placenta explants

The first 24 h of culture, the explants were incubated in absence (basal control plus vehicle [0.01 % ethanol]) and presence of three different concentrations (1.0 µM, 0.1 µM, and 0.01 µM) of P4 for 24 h; after this time, fresh medium was added including co-stimulations with 1000 ng/ml of LPS plus 0.01, 0.1, and 1 µM of P4. Another set of experiments was included, co-incubating the explants with LPS plus the highest concentration of P4 and RU-486 (100 µM), controls with LPS, P4, or RU-486 were also included.

#### Cytokines quantitation by ELISA

The concentrations of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MIP1 $\alpha$ , IL-10, and MMP-9 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) present in cell culture supernatants were determined by sandwich ELISA, using human specific duo-set kits according to manufacturer's instructions.

To coat the plates, the following capture anti-human antibodies (hAbs) were used: anti-human hAb TNF $\alpha$  (4 µg/mL), anti-human hAb IL-1 $\beta$  (4 µg/mL), anti-human hAb IL-6 (2 µg/mL), anti-human hAb IL-8 (0.5 µg/mL), anti-human hAb MIP-1 $\alpha$  (0.4 µg/mL), anti-human hAb IL-10 (2 µg/mL), anti MMP-9 (1 µg/mL).

For the TNF- $\alpha$  assay, a standard curve was developed from 0.5 to 10 ng/mL with a sensitivity of 0.2 ng/mL; for the IL-1 $\beta$  assay, from 3.00 to 250 pg/mL; for the IL-6 assay, the curve was linear from 0.5 to 10 ng/mL with a sensitivity of 0.2 ng/mL; for IL-8, the curve was developed from 15.6 to 1000 pg/mL with sensitivity of 10 pg/mL; for MIP-1 $\alpha$ , the curve was developed from 7.4 to 1000 pg/mL; and for IL-10, from 31.25 to 2000 pg/mL with a sensitivity of 10 pg/mL. The MMP-9 curve was performed from 31.2 to 2500 pg/mL.

#### Zymography

SDS-polyacrylamide gels (9 %) co-polymerized with porcine gelatin (1 mg/mL) were prepared according to the standard methods previously described by [16]. Briefly, 5 µg of each supernatant and tissue lysate sample were loaded into each well under non-denaturing conditions and run under a constant current (10 mA) for 1.6 h; then, gels were washed in 2.5 % Triton X-100 for 0.5 h and incubated overnight at 37 °C in an activation buffer (50 mM Tris pH 7.4, 0.15 M NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.02 % NaN<sub>3</sub>). Gels were stained with 0.1 % R-250 brilliant blue (Boehringer Mannheim, IN, USA); 1 µg of conditioned medium from U-937 promyelocyte cells was used in each gel as an indicator of activity.

#### Statistical analyses

Descriptive statistics (mean, standard deviation, standard error, median, and range) were obtained for each variable. Data distribution was tested for normality using Kolmogorov-Smirnoff and Shapiro-Wilks tests. When distribution was normal, Student's t-test was used to analyze for differences among groups. Man-Whitney's U test was used when data were not normally distributed; a P < 0.05 was considered statistically significant.

#### Results

With the aim of standardizing our experimental model, we decided to perform a viability assay to demonstrate that the metabolic viability of the placenta explants remained without significant changes along the four days. Taking into account the results obtained from the time-course curve, the LPS-induced cytokines secretion was maximal at 24 h after stimulation (data not shown).

Once concluded the co-stimulations with LPS and P4, we evaluated the secretion patterns of all analytes in the culture medium. Data are presented as mean  $\pm$  SEM from 10 separate experiments performed in triplicate.

Stimulation with LPS enhanced IL-1 $\beta$  secretion 26-times in comparison to basal level (53.0  $\pm$  29.6 pg/g of tissue) and the co-stimulation with 0.1 µmol/L P4 blunted by 56 % this level (606.2  $\pm$  110.9 pg/g of tissue). This effect was reverted by adding the anti-progestin RU486 (1710.85  $\pm$  193.35 pg/g of tissue) (Fig. 1).

In comparison to the basal level of TNF $\alpha$  (224.15  $\pm$  26.2 pg/g of tissue), the culture of placenta explants with 1000 ng/ml LPS induced a significant increase (1912.73  $\pm$  457.25 pg/g of tissue) equivalent to 8-times. The co-addition of P4 (0.01 µM) decreased TNF $\alpha$  by 73 %, an effect that was blocked with 100 µM RU486 (1961.7  $\pm$  351.92 pg/g of tissue) (Fig. 2).

Basal IL-6 level of the explants was 15,357  $\pm$  4118 pg/g of tissue, stimulation with LPS increased it 4.8-times (74,110  $\pm$  10,154 pg/g of tissue), treatment with P4

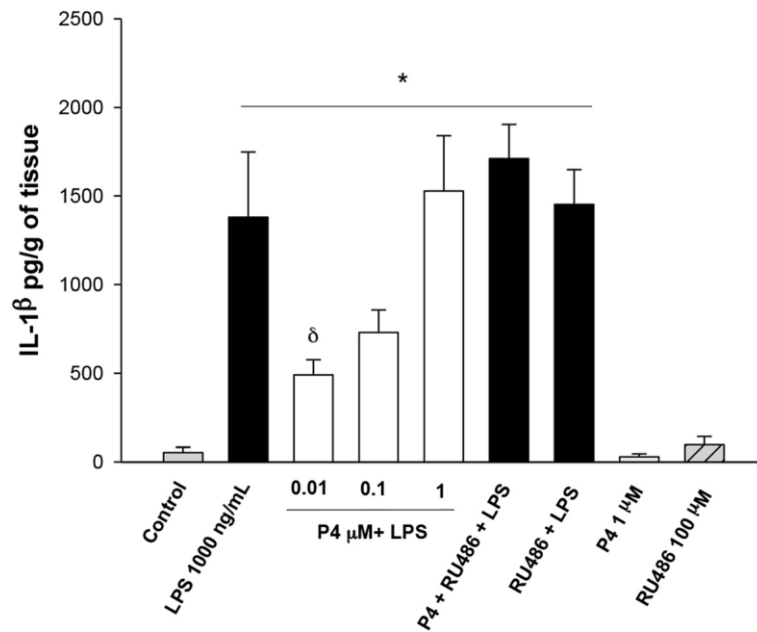


Fig. 1 In vitro secretion profile of IL-1 $\beta$  in human placental explants. IL-1 $\beta$  was measured by ELISA in the cultured medium in the basal condition and with different treatments. Data represent 10 independent experiments  $\pm$  S.E.M., performed in triplicate  $P \leq 0.05$  \* versus control;  $\delta$  versus LPS treatment

inhibited the LPS-induced increase in 55.9 % ( $32,638 \pm 16,336$  pg/g of tissue) (Fig. 3).

After stimulation with the bacterial endotoxin, the chemokines IL-8 and MIP1- $\alpha$  increased 7-fold ( $36,451 \pm 2538.6$  pg/g of tissue) and 5-fold ( $766.65 \pm 87.34$  pg/g of tissue), respectively. Co-stimulation with the three

concentrations of P4 inhibited IL-8 (Fig. 4), however MIP-1 $\alpha$  was only inhibited by 0.01  $\mu$ M of P4 (Fig. 5).

The secretion pattern of IL-10 was also modified after stimulation with LPS ( $381.5 \pm 60.21$  pg/g of tissue), which represents 21-times the basal level ( $17.87 \pm 11.57$  pg/g of tissue). The effect of the endotoxin was

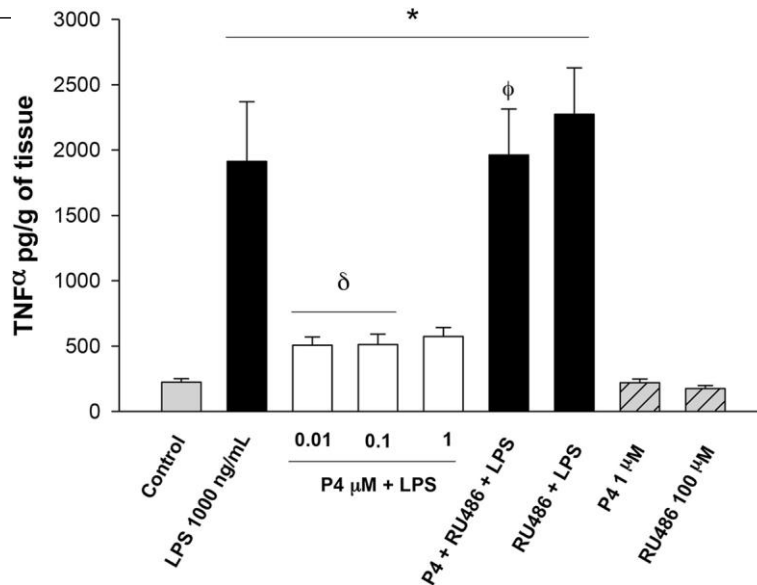


Fig. 2 In vitro secretion profile of TNF $\alpha$  in human placental explants. TNF $\alpha$  was measured by ELISA in the cultured medium in the basal condition and with different treatments. Data represent 10 independent experiments  $\pm$  S.E.M., performed in triplicate  $P \leq 0.05$  \* versus control;  $\delta$  versus LPS treatment;  $\Phi$  versus 1  $\mu$ M P4 treatment

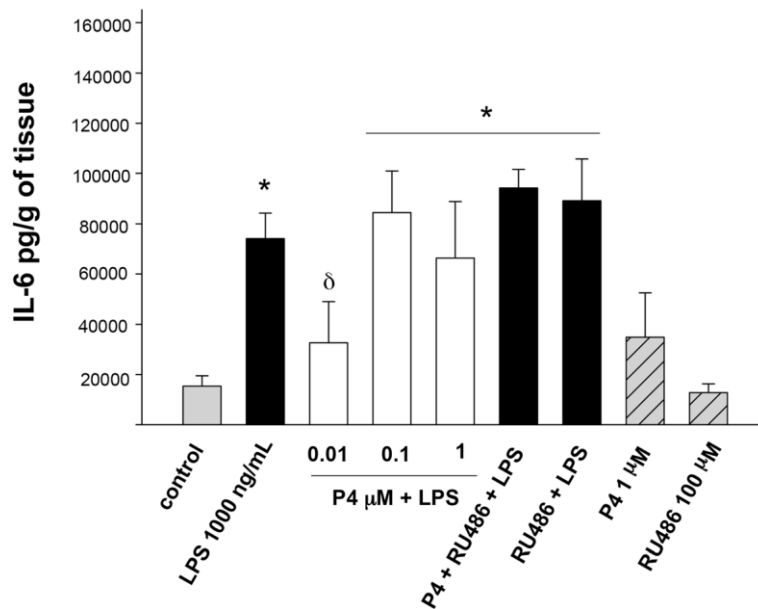


Fig. 3 In vitro secretion profile of IL-6 in human placental explants. IL-6 was measured by ELISA in the cultured medium in the basal condition and with different treatments. Data represent 10 independent experiments  $\pm$  S.E.M., performed in triplicate  $P \leq 0.05$  \* versus control;  $\delta$  versus LPS treatment

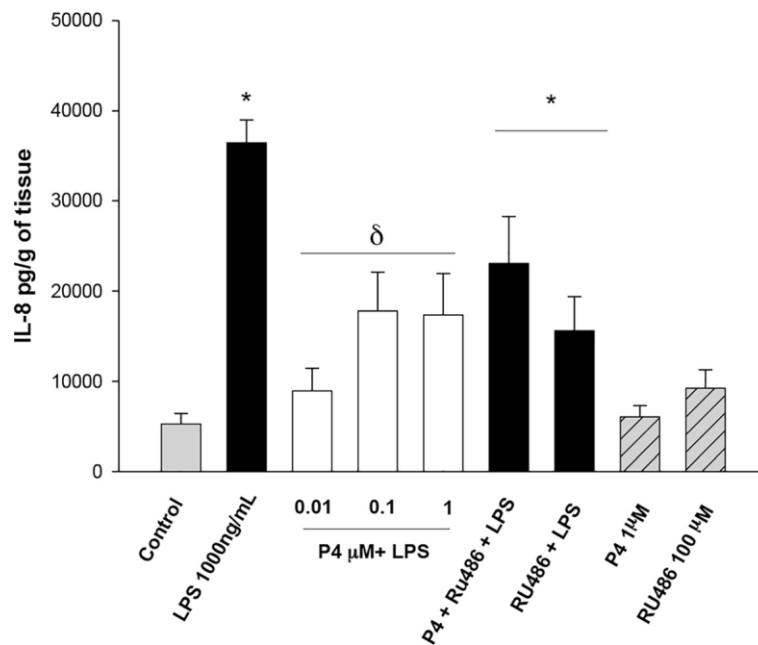


Fig. 4 In vitro secretion profile of IL-8 in human placental explants. IL-8 was measured by ELISA in the cultured medium in the basal condition and with different treatments. Data represent 10 independent experiments  $\pm$  S.E.M., performed in triplicate.  $P \leq 0.05$  \* versus control;  $\delta$  versus LPS treatment



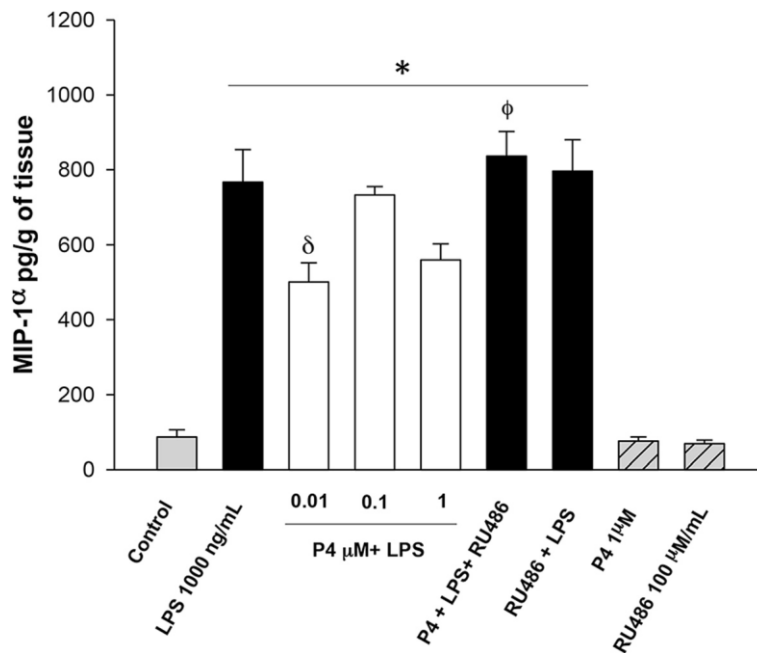


Fig. 5 In vitro secretion profile of MIP-1 $\alpha$  in human placental explants. MIP-1 $\alpha$  was measured by ELISA in the cultured medium in the basal condition and with different treatments. Data represent 10 independent experiments  $\pm$  S.E.M, performed in triplicate.  $P \leq 0.05$  \* versus control;  $\delta$  versus LPS treatment;  $\Phi$  versus 1  $\mu$ M P4 treatment

inhibited in a significant way when the explants were co-stimulated with 0.01  $\mu$ M of P4 ( $197.33 \pm 44.49$  pg/g of tissue) (Fig. 6).

In comparison to the level of MMP-9 when the same explants were only stimulated with the endotoxin ( $16,802.6 \pm 1672.0$  pg/g of tissue), the co-stimulation of explants with 1000 ng/mL of LPS and 0.1  $\mu$ M of P4 blunted the level of MMP-9 ( $11,392 \pm 976$  pg/g of tissue), the equivalent to 1.3 times (Fig. 7a); the gelatinase activity profile shown in the zymogram supports this finding (Fig. 7b).

## Discussion

Successful pregnancy is the result of different immune-endocrine strategies that permit the co-existence of mother and fetus. Based on clinical, experimental and epidemiological evidence, the inflammation associated with an infection process can be considered as one of the most important causes of preterm labor. The mother-fetus co-existence can be compromised if the maternal-fetal milieu is modified by pro-inflammatory modulators that can exert strong effects on the conceptus.

Under exceptional conditions, such as infection, the maternal-fetal unit displays a set of compensatory mechanisms that could eventually limit –partially– damage, and thereby privilege the continuity of pregnancy. One of these mechanisms includes the immunomodulatory effects of P4, considered a key factor in the regulation of

the Th1/Th2 balance required to maintain the immune privilege.

On the other hand, an important body of evidence indicates that the placenta is a source of proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, which are secreted under basal conditions and in response to different kind of immunologic stimulus [17].

The present results indicate that the stimulation of explants of human villous placenta with LPS increased significantly the level of IL-1 $\beta$ , this cytokine by itself can induce deep changes in the fetal-maternal unit creating conditions incompatible with gestation continuity [18]. Our results are also supported by previous evidence indicating that the chorion of fetal membranes, a region rich in trophoblasts, is the principal source of IL-1 $\beta$  when stimulated selectively with different pathogens associated with preterm labor, including *E. coli* [19], Group B *Streptococcus* [20], and *Gardnerella vaginalis* [21].

In the human term and preterm placenta, IL-1 $\beta$  is secreted basally and after perfusion with LPS of epithelial cells of the amnion, chorion, syncytiotrophoblasts, and stromal cells of villous tissue and the decidua [22]. Furthermore, evidence from animal models support that elevation of IL-1 $\beta$  in the fetal-maternal environment may be an important factor in the pathogenesis of preterm labor associated with intra-amniotic infection [23, 24].

Herein, we demonstrated that pre-stimulation with P4 reduces the secretion of IL-1 $\beta$  induced by the LPS; these results are concurrent with evidence generated in related

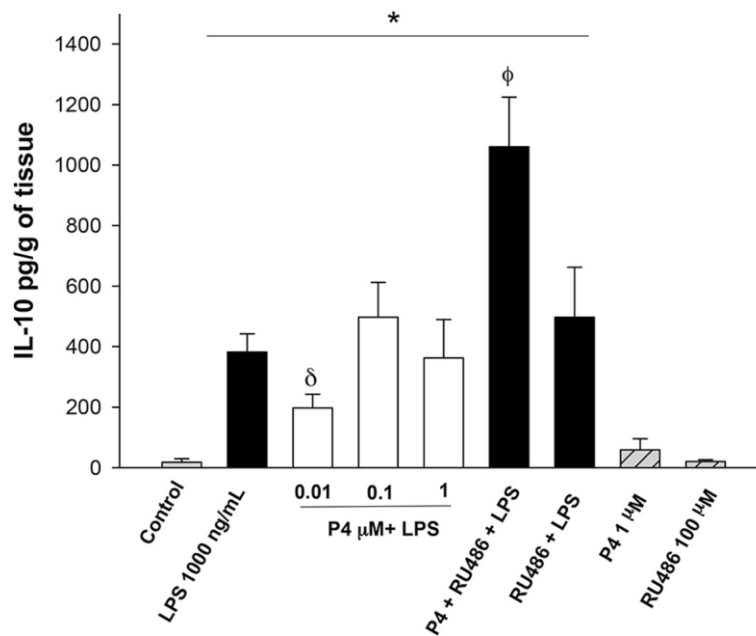


Fig. 6 In vitro secretion profile of IL-10 in human placental explants. IL-10 was measured by ELISA in the cultured medium in the basal condition and with different treatments. Data represent 10 independent experiments  $\pm$  S.E.M., performed in triplicate  $P \leq 0.05$  \* versus control;  $\delta$  versus LPS treatment;  $\Phi$  versus 1  $\mu$ M P4 treatment

tissues, such as the amnion epithelium [25], and in a model of choriodecidual infection [26].

Studies done with lymphocytes isolated from women with recurrent miscarriage indicate that dydrogesterone inhibits the production of  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-4, and IL-6 modifying the Th1/Th2 ratio [27]. Furthermore, at a concentration similar to that found in umbilical cord blood, P4 inhibits cytokine production by cord blood mononuclear cells [28].

$\text{TNF}\alpha$  is a key cytokine in the proinflammatory response of the fetal-placental unit under normal and pathological conditions, its concentration has been found elevated in the amniotic fluid of patients with intra-amniotic infection and preterm labor [29].

There is evidence that  $\text{TNF}\alpha$  is powerful enough to potentiate other inflammatory modulators and to induce preterm labor, fetal injury, and histological chorioamnionitis in a nonhuman primate model [30]. As expected, in our model,  $\text{TNF}\alpha$  was secreted by explants after stimulation with LPS, which has been previously reported in different experimental models [23, 31].

On the other hand, P4 is able to inhibit the secretion and toxic effects of infection-induced  $\text{TNF-}\alpha$  in both fetal mononuclear cells isolated from umbilical cord blood and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from women with unexplained recurrent miscarriage [27], as well as in human monocytes stimulated with heat-killed *Escherichia coli* or *Ureaplasma urealyticum*

[32], and in human fetal membranes that are also sensitive to the immunomodulatory effects of P4 [25, 26].

In this work, we also demonstrate that the inhibition of  $\text{TNF-}\alpha$  by P4 is blocked by RU-486, which suggests that P4 could be acting through both the progesterone receptor (PR) [33–35] and the glucocorticoid receptor (GR) [36, 37], which are present in the human placenta.

Clinical and experimental evidence supports that elevated early second-trimester amniotic fluid IL-6 levels are associated with preterm delivery and can be used as an intrauterine inflammation predictor [38, 39].

Stimulation of explants of placenta with LPS increased IL-6 secretion, and pre-stimulation with P4 impacted the placenta explants inhibiting this effect. The capacity of P4 to limit the secretion of IL-6 has been reported in reproductive tissues such as whole human fetal membranes [26], amnion epithelium [25], myometrium [40], and human uterine cervical fibroblasts [41].

To create a more competitive/effective immune response in the fetal-placental unit undergoing an infectious process, the secretion of chemokines, such as IL-8 and MIP-1 $\alpha$ , can attract immune cells that support and enhance the response.

During chorioamnionitis, IL-8 is indispensable in the process of neutrophil infiltration of the decidua [42]. Additional evidence supports that stimulation of human placental multipotent mesenchymal stromal cells with LPS induces the secretion of IL-8, which has been

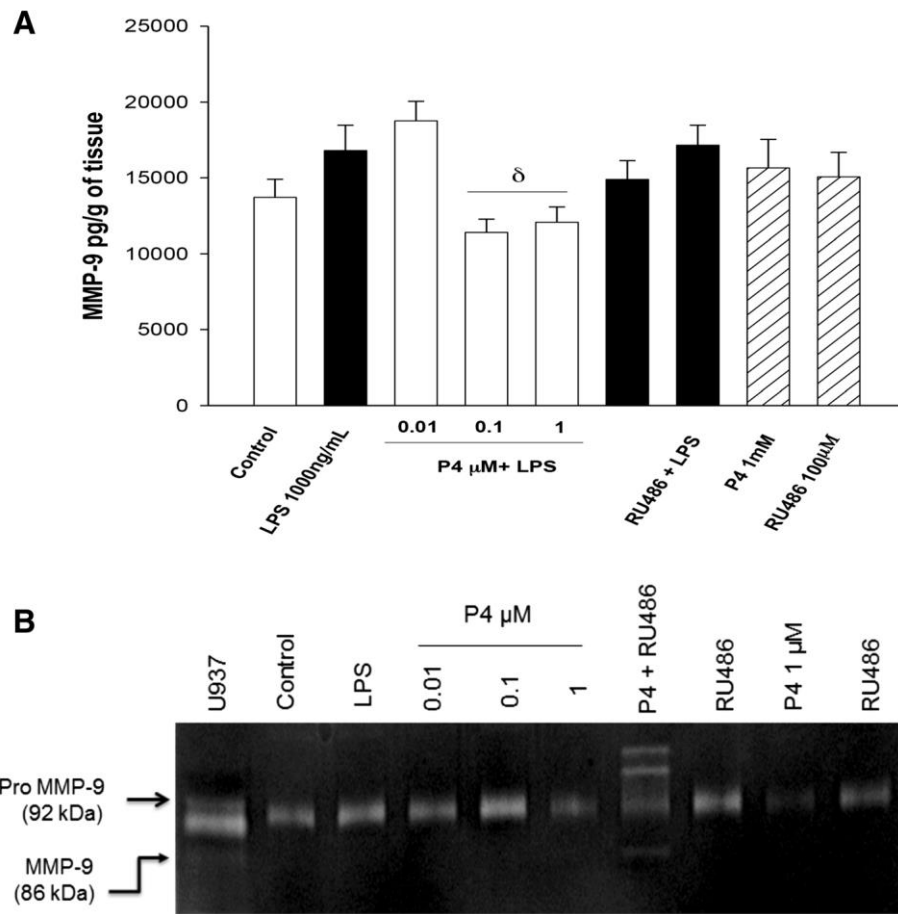


Fig. 7 a In vitro secretion profile of MMP-9 in human placental explants. MMP-9 was measured by ELISA in the cultured medium in the basal condition and with different treatments. Data represent 10 independent experiments  $\pm$  S.E.M., performed in triplicate.  $P \leq 0.05$   $\delta$  versus LPS treatment. b Representative zymogram showing the gelatinase activity present in the cultured medium obtained after each treatment

ascribed a potent role in both neutrophil chemotaxis and reduction of neutrophil apoptosis [43].

Using an in vitro culture system in which human umbilical vein endothelial cells constitutively express human PR, Goddard et al. demonstrated that P4 can inhibit the secretion of IL-6, IL-8, CXCL2/3, and CXCL1 induced by LPS [44].

Regarding MIP-1 $\alpha$ , there is evidence indicating that this chemokine is produced by trophoblast cells in human placenta [45]; however, it is undetectable in most amniotic fluids from patients in the mid-trimester of pregnancy and at term not in labor [46]. The concentration of MIP-1 $\alpha$  correlates with IL-8 and both chemokines increase in the amniotic fluid during microbial invasion of the amniotic cavity [46] and in human fetal membranes during labor [47].

Herein we report the induction of MIP-1 $\alpha$  after stimulation with LPS, which has been previously reported in human PBMCs [48, 49]. On the other hand, although there is no information about the effect of P4 on MIP-

1 $\alpha$  regulation; evidence from other experimental models supports that MIP-1 $\alpha$  secreted by CD8+ T lymphocytes is blunted by this steroid hormone [50]. Additionally, it has been reported that the expression of this chemokine can be inhibited also by the treatment of human monocytes and alveolar macrophages with corticosteroids [51].

A key mechanism that modulates the immune equilibrium during pregnancy is IL-10, a cytokine with anti-inflammatory properties that plays pivotal roles in immune recognition and maintenance of gestation, limiting the harmful effects of proinflammatory modulators. IL-10 is produced by immune cells such as T cells, B cells, and macrophages [52–54], as well as by maternal and fetal tissues including the human chorion, the decidua, and the placenta [55–61].

The placenta is an essential tissue for IL-10's contribution to the maternal-fetal unit, additionally to its role as an immunomodulatory factor, IL-10 is also an important mediator in placental growth and remodeling; changes in its production profile have been associated with labor

[62]. The capacity of IL-10 to limit the cytotoxic effects of inflammation is evidenced by the diminution of its concentration associated with labor [63].

The production of IL-10 can be modulated by different stimuli, including proinflammatory cytokines and bacterial products, as well as different pathogens associated with intrauterine infections [64]. Experimental evidence suggests that the choriodecidual region of the fetal membranes is the principal source of this cytokine and stimulation with *E. coli* increases IL-10 [19].

As expected, the present study demonstrates that LPS stimulation induced a significant increase of IL-10, which was dampened by the co-stimulation with P4. The explanation for these results could be controversial. A previous study demonstrated that P4 inhibits the LPS-induced pro-inflammation in a model of choriodecidual infection [26]; however, there is another study in which co-stimulation of fetoplacental artery explants with P4 did not inhibit the LPS-induced IL-10 secretion [65]. These latter results agree with results published by Olmos-Ortiz et al. [66], who demonstrated that IL-10 inhibits placental antimicrobial peptides that, eventually, could modify the entire innate response of the placenta [66].

Stimulation of PBMC from women with recurrent miscarriage with P4 did not modify the secretion profile of IL-10 [27]. These results are not concurrent with clinical studies that demonstrate that dydrogesterone treatment of patients with threatened preterm delivery induces the increase of IL-10 in serum, which is associated with increased length of gestation [67]; in turn, supporting the association between high levels of IL-10 and successful pregnancy.

Once the inflammation modulators are secreted in response to an immunological/infectious stimulus, cytokines such as IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , and IL-6 induce the synthesis and secretion of effector modulators, such as MMP-9, which can degrade type IV collagen and gelatin, which are essential in the structure of different tissues of the fetal-placental unit [16, 68].

Many observations suggest that alteration of the equilibrium between the synthesis and degradation of extracellular matrix is a mechanism through which the structural continuity and function are deeply modified during labor under normal and pathological conditions.

In the present study, we demonstrated that the stimulation of placenta explants with LPS induces the increase of MMP-9, this finding is concurrent with evidence obtained from human fetal membranes stimulated with different pathogens [69, 70], supporting that this enzyme is part of the response against different pathogens including *Candida albicans*. Additionally, clinical evidence supports that MMP-9 is an enzyme that increases in the amniotic fluid of women with preterm labor and suspected intra-amniotic infection [71].

Our results show that the pre-stimulation of explants with the highest concentration of P4 inhibits the LPS-induced MMP-9. This could be partially explained by the evidence supporting that different proinflammatory cytokines can induce expression of MMP-9, this cumulative effect impacts the expression of this enzyme by the tissue and a more potent stimulus with P4 than used for inhibition of cytokines is required to induce its inhibition [72].

In this context, previous experimental evidence demonstrated that P4 inhibits other MMPs in term decidua cells, such as MMP-1 and MMP-3 [73] that are key elements during labor, and suppresses the production of pro-MMP-9 induced by IL-1 $\alpha$  in rabbit uterine cervical fibroblasts [74].

Experimental and clinical evidence indicates that microbial-induced preterm labor is mediated by an inflammatory process; microorganisms and their products are sensed by pattern recognition receptors, such as Toll-like receptors (TLRs), which induce the production of chemokines (e.g., IL-8 and C-C motif ligand 2 [CCL2]), cytokines (e.g., IL-1 $\beta$  and TNF), prostaglandins, and proteases leading to activation of the common paritition pathway [75–77].

The anti-inflammatory effect of P4 might be exerted through the modulation of immune innate factors, specifically the (TLR)-4, which is constitutively expressed by the human placenta during gestation [78] and is critical for a host inflammatory response to Gram-negative organisms.

Reports from a murine experimental model support that pre-treatment with MPA decreases the LPS-induced up-regulation of TLR-4 mRNA in the cervix and placenta [79]; additionally, stimulation of the human amnion with P4 blunts the inflammation induced by LPS through the inhibition of expression and activation of TLR-4/MyD88 [25]. A similar mechanism could be exerted in the human placenta, however, more studies are required to understand the complexity of signals turned on by this tissue during a scenario complicated by an infectious process.

The effect of P4 described herein supports the concept that the immune-endocrine regulation is key in the maintenance of the immune privilege of the fetal-placental unit. We propose that, under *in vivo* conditions, P4 can be a mechanism that could limit –partially– the deleterious effects of inflammation. However, its therapeutic use can only be attempted after finding equilibrium between the “protective” anti-inflammatory action and a possible deleterious effect when a strong response against infection is required.

## Conclusion

In summary, results show that P4 reduces the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6,

chemokines MIP1 $\alpha$  and IL-8, the anti-inflammatory IL-10 as well as the MMP-9. These data suggest that P4 in the placental-fetal unit can be part of an immunomodulatory mechanism that can limit –partially– the deleterious effects of these modulators.

#### Abbreviations

LPS: Lipopolysaccharide; P4: Progesterone; IL: Interleukin; MMP: Matrix Metalloprotease; TNF: Tumor necrosis factor; hAbs: Anti-human antibodies; MPA: Medroxyprogesterone acetate; S.E.M: Standard error of the mean.

#### Competing interests

We declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

#### Authors' contributions

GRG, PE, BML collected samples and performed microbiological control. GRG, PE and FEP cultured placenta explants and performed stimulations. GRG, ENA carried out the ELISA tests. FPA coordinated data collection and provided statistical analysis. MCR coordinated all activities in the hospital, including procurement of the informed consent from each patient and the collection of placenta in the operating room. GEG, MIE and ZCV participated in the design of the study, data analysis, and manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

#### Detail of ethics approval

This study was approved by the Ethical and Research Committees of the Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" (INPer IER 212250-06161), in Mexico City, Mexico.

#### Acknowledgements

We would like to thank the patients for their cooperation in donating placentas for research. We thank Ingrid Mascher and Karla MacDonald for editorial assistance. We acknowledge and thank Maria Guadalupe Martínez Salazar and Maribel Sánchez Martínez for their technical support.

#### Funding

The studies were supported by the Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" Project No. 212250-06161 to VZC.

#### Author details

<sup>1</sup>Immunobiochemistry Branch, Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes", Montes Urales 800, Lomas Virreyes, Ciudad de Mexico 11000, Mexico. <sup>2</sup>Neonatology Branch, Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes", Montes Urales 800, Lomas Virreyes, Ciudad de Mexico 11000, México. <sup>3</sup>Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de Mexico, Ciudad de Mexico 54700, Mexico.

Received: 18 August 2015 Accepted: 2 October 2015

Published online: 07 October 2015

#### References

1. Yoon BH, Romero R, Moon JB, Shim SS, Kim M, Kim G, et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185:1130–6.
2. Kara M, Ozden S, Arioglu P, Cetin A. The significance of amniotic fluid interleukin-6 levels in preterm labour. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1998;38:403–6.
3. Raghupathy R, Kalinka J. Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation. *Front Biosci.* 2008;13:985–94.
4. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science.* 2014;345:760–5.
5. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol.* 2001;1:1037–48.
6. Romero R, Erez O, Espinoza J. Intrauterine infection, preterm labor, and cytokines. *J Soc Gynecol Investig.* 2005;12:463–5.
7. Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, et al. Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;160:1117–23.
8. Coultrip LL, Lien JM, Gomez R, Kapernick P, Khoury A, Grossman JH. The value of amniotic fluid interleukin-6 determination in patients with preterm labor and intact membranes in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;171:901–11.
9. Baggia S, Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, Novy MJ. Interleukin-1 beta intra-amniotic infusion induces tumor necrosis factor-alpha, prostaglandin production, and preterm contractions in pregnant rhesus monkeys. *J Soc Gynecol Investig.* 1996;3:121–6.
10. Elovitz MA, Mrinalini C, Sammel MD. Elucidating the early signal transduction pathways leading to fetal brain injury in preterm birth. *Pediatr Res.* 2006;59:50–5.
11. Urakubo A, Jarskog LF, Lieberman JA, Gilmore JH. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophr Res.* 2001;47:27–36.
12. Romero R, Gomez R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Edwin SS, et al. A fetal systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:186–93.
13. Miyaura H, Iwata M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol.* 2002;168:1087–94.
14. Butts CL, Shukair SA, Duncan KM, Bowers E, Horn C, Belyavskaya E, et al. Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int Immunol.* 2007;19:287–96.
15. Butts CL, Bowers E, Horn JC, Shukair SA, Belyavskaya E, Tonelli L, et al. Inhibitory effects of progesterone differ in dendritic cells from female and male rodents. *Gend Med.* 2008;5:434–47.
16. Garcia-Lopez G, Vadillo-Ortega F, Merchant-Larios H, Maida-Claros R, Osorio M, Soriano-Becerril D, et al. Evidence of in vitro differential secretion of 72 and 92 kDa type IV collagenases after selective exposure to lipopolysaccharide in human fetal membranes. *Mol Hum Reprod.* 2007;13:409–18.
17. Kameda T, Matsuzaki N, Sawai K, Okada T, Saji F, Matsuda T, et al. Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta.* 1990;11:205–13.
18. Kallapur SG, Presicce P, Sentharamaikannan P, Alvarez M, Tarantal AF, Miller LM, et al. Intra-amniotic IL-1beta induces fetal inflammation in rhesus monkeys and alters the regulatory T cell/IL-17 balance. *J Immunol.* 2013;191:1102–9.
19. Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, Espejel-Nunez A, Flores-Pliego A, Soriano-Becerril D, et al. In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with *Escherichia coli* in human fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007;5:46.
20. Zaga V, Estrada-Gutierrez G, Beltran-Montoya J, Maida-Claros R, Lopez-Vancell R, Vadillo-Ortega F. Secretions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or choriondecidua with lipopolysaccharides or group B streptococci. *Biol Reprod.* 2004;71:1296–302.
21. Menon R, Peltier MR, Eckardt J, Fortunato SJ. Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;201:306 e301–306.
22. Holcberg G, Amash A, Sapir O, Sheiner E, Levy S, Myatt L, et al. Perfusion with lipopolysaccharide differently affects the secretion of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist by term and preterm human placentae. *Placenta.* 2008;29:593–601.
23. Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, Edwards JL, Cook MJ, Novy MJ. An experimental model for intraamniotic infection and preterm labor in rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;171:1660–7.
24. Reznikov LL, Fantuzzi G, Selzman CH, Shames BD, Barton HA, Bell H, et al. Utilization of endoscopic inoculation in a mouse model of intrauterine infection-induced preterm birth: role of interleukin 1beta. *Biol Reprod.* 1999;60:1231–8.
25. Flores-Espinosa P, Pineda-Torres M, Vega-Sanchez R, Estrada-Gutierrez G, Espejel-Nunez A, Flores-Pliego A, et al. Progesterone elicits an inhibitory effect upon LPS-induced innate immune response in pre-labor human amniotic epithelium. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71:61–72.
26. Pineda-Torres M, Flores-Espinosa P, Espejel-Nunez A, Estrada-Gutierrez G, Flores-Pliego A, Maida-Claros R, et al. Evidence of an immunosuppressive

- effect of progesterone upon in vitro secretion of proinflammatory and prodegradative factors in a model of choriodecidual infection. *BJOG* 2014, doi:10.1111/1471-0528.13113.
27. Raghupathy R, Al Mutawa E, Makhseed M, Azizieh F, Szekeres-Bartho J. Modulation of cytokine production by dydrogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage. *BJOG*. 2005;112:1096–101.
  28. Giannoni E, Guignard L, Knaup Raymond M, Perreau M, Roth-Kleiner M, Calandra T, et al. Estradiol and progesterone strongly inhibit the innate immune response of mononuclear cells in newborns. *Infect Immun*. 2011;79:2690–8.
  29. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, et al. Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161:336–41.
  30. Sadowsky DW, Adams KM, Gravett MG, Witkin SS, Novy MJ. Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195:1578–89.
  31. Peltier MR, Faux DS, Hamblin SD, Silver RM, Esplin MS. Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells of women with a history of preterm birth. *J Reprod Immunol*. 2010;84:111–6.
  32. Peltier MR, Tee SC, Smulian JC. Effect of progesterone on proinflammatory cytokine production by monocytes stimulated with pathogens associated with preterm birth. *Am J Reprod Immunol*. 2008;60:346–53.
  33. Zhuang Y, Cui H, Liu S, Zheng D, Liu C. Progesterone receptor B promoter hypermethylation in human placenta after labor onset. *Reprod Sci*. 2015;22:335–42.
  34. Goldman S, Shalev E. Progesterone receptor profile in the decidua and fetal membrane. *Front Biosci*. 2007;12:634–48.
  35. Oh SY, Kim CJ, Park I, Romero R, Sohn YK, Moon KC, et al. Progesterone receptor isoform (A/B) ratio of human fetal membranes increases during term parturition. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193:1156–60.
  36. Saif Z, Hodyl NA, Stark MJ, Fuller PJ, Cole T, Lu N, et al. Expression of eight glucocorticoid receptor isoforms in the human preterm placenta vary with fetal sex and birthweight. *Placenta*. 2015;36:723–30.
  37. Saif Z, Hodyl NA, Hobbs E, Tuck AR, Butler MS, Osei-Kumah A, et al. The human placenta expresses multiple glucocorticoid receptor isoforms that are altered by fetal sex, growth restriction and maternal asthma. *Placenta*. 2014;35:260–8.
  38. Wenstrom KD, Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL, DuBard MB, Cliver SP. Elevated second-trimester amniotic fluid interleukin-6 levels predict preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178:546–50.
  39. Chaemsaitong P, Romero R, Korzeniewski SJ, Martinez-Varea A, Dong Z, Yoon BH, et al. A rapid interleukin-6 bedside test for the identification of intra-amniotic inflammation in preterm labor with intact membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015; 25:1-11.
  40. Anbe H, Okawa T, Sugawara N, Takahashi H, Sato A, Vedernikov YP, et al. Influence of progesterone on myometrial contractility in pregnant mice treated with lipopolysaccharide. *J Obstet Gynaecol Res*. 2007;33:765–71.
  41. Fukuyama A, Tanaka K, Kakizaki I, Kasai K, Chiba M, Nakamura T, et al. Anti-inflammatory effect of proteoglycan and progesterone on human uterine cervical fibroblasts. *Life Sci*. 2012;90:484–8.
  42. Lockwood CJ, Arcuri F, Toti P, Felice CD, Krikun G, Guller S, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulate interleukin-8 expression in third trimester decidual cells: implications for the genesis of chorioamnionitis. *Am J Pathol*. 2006;169:1294–302.
  43. Chen CP, Chen YY, Huang JP, Wu YH. The effect of conditioned medium derived from human placental multipotent mesenchymal stromal cells on neutrophils: possible implications for placental infection. *Mol Hum Reprod*. 2014;20:1117–25.
  44. Goddard LM, Ton AN, Org T, Mikkola HK, Iruela-Arispe ML. Selective suppression of endothelial cytokine production by progesterone receptor. *Vascul Pharmacol*. 2013;59:36–43.
  45. Moussa M, Mognetti B, Dubanchet S, Menu E, Roques P, Dormont D, et al. Expression of beta chemokines in explants and trophoblasts from early and term human placentae. *Am J Reprod Immunol*. 2001;46:309–17.
  46. Romero R, Gomez R, Galasso M, Munoz H, Acosta L, Yoon BH, et al. Macrophage inflammatory protein-1 alpha in term and preterm parturition: effect of microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Reprod Immunol*. 1994;32:108–13.
  47. Gomez-Lopez N, Estrada-Gutierrez G, Jimenez-Zamudio L, Vega-Sanchez R, Vadillo-Ortega F. Fetal membranes exhibit selective leukocyte chemotactic activity during human labor. *J Reprod Immunol*. 2009;80:122–31.
  48. Sherry B, Espinoza M, Manogue KR, Cerami A. Induction of the chemokine beta peptides, MIP-1 alpha and MIP-1 beta, by lipopolysaccharide is differentially regulated by immunomodulatory cytokines gamma-IFN, IL-10, IL-4, and TGF-beta. *Mol Med*. 1998;4:648–57.
  49. Kimata M, Shichijo M, Daikoku M, Inagaki N, Mori H, Nagai H. Pharmacological modulation of LPS-induced MIP-1 alpha production by peripheral blood mononuclear cells. *Pharmacology*. 1998;56:230–6.
  50. Vassiliadou N, Tucker L, Anderson DJ. Progesterone-induced inhibition of chemokine receptor expression on peripheral blood mononuclear cells correlates with reduced HIV-1 infectability in vitro. *J Immunol*. 1999;162:7510–8.
  51. Berkman N, Jose PJ, Williams TJ, Schall TJ, Barnes PJ, Chung KF. Corticosteroid inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes and alveolar macrophages. *Am J Physiol*. 1995;269:L443–452.
  52. Mosmann TR. Properties and functions of Interleukin-10. *Adv Immunol* 1994; 56:1-26.
  53. Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today*. 1992;13:198–200.
  54. Moore KW, O'Garra A, de Waal MR, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165–90.
  55. Trautman MS, Collmer D, Edwin SS, White W, Mitchell MD, Dudley DJ. Expression of interleukin-10 in human gestational tissues. *J Soc Gynecol Investig*. 1997;4:247–53.
  56. Dudley DJ, Edwin SS, Dangerfield A, Jackson K, Trautman MS. Regulation of decidual cell and chorion cell production of interleukin-10 by purified bacterial products. *Am J Reprod Immunol*. 1997;38:246–51.
  57. Paradowska E, Blach-Olszewska Z, Gejdel E. Constitutive and induced cytokine production by human placenta and amniotic membrane at term. *Placenta*. 1997;18:441–6.
  58. Jones CA, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Type-1 and type-2 cytokines in human late-gestation decidual tissue. *Biol Reprod*. 1997;57:303–11.
  59. Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Litton MJ, Fisher SJ. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med*. 1996;184:539–48.
  60. Cadet P, Rady PL, Tying SK, Yandell RB, Hughes TK. Interleukin-10 messenger ribonucleic acid in human placenta: implications of a role for interleukin-10 in fetal allograft protection. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173:25–9.
  61. Bennett WA, Lagoo-Deenadayalan S, Brackin MN, Hale E, Cowan BD. Cytokine expression by models of human trophoblast as assessed by a semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction technique. *Am J Reprod Immunol*. 1996;36:285–94.
  62. Roth I, Fisher SJ. IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Dev Biol*. 1999;205:194–204.
  63. Simpson KL, Keelan JA, Mitchell MD. Labor-associated changes in interleukin-10 production and its regulation by immunomodulators in human choriodecidual. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:4332–7.
  64. Zaga-Clavellina V, Flores-Espinosa P, Pineda-Torres M, Sosa-Gonzalez I, Vega-Sanchez R, Estrada-Gutierrez G, et al. Tissue-specific IL-10 secretion profile from term human fetal membranes stimulated with pathogenic microorganisms associated with preterm labor in a two-compartment tissue culture system. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014;27:1320–7.
  65. Shields AD, Wright J, Paonessa DJ, Gotkin J, Howard BC, Hoeldtke NJ, et al. Progesterone modulation of inflammatory cytokine production in a fetoplacental artery explant model. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193:1144–8.
  66. Olmos-Ortiz A, Noyola-Martinez N, Barrera D, Zaga-Clavellina V, Avila E, Halhali A, et al. IL-10 inhibits while calcitriol reestablishes placental antimicrobial peptides gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;148:187–93.
  67. Hudic I, Szekeres-Bartho J, Fatusic Z, Stray-Pedersen B, Dizdarevic-Hudic L, Latifagic A, et al. Dydrogesterone supplementation in women with threatened preterm delivery—the impact on cytokine profile, hormone profile, and progesterone-induced blocking factor. *J Reprod Immunol*. 2011;92:103–7.
  68. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol*. 1995;146:148–56.

69. Zaga-Clavellina V, Lopez GG, Estrada-Gutierrez G, Martinez-Flores A, Maida-Claros R, Beltran-Montoya J, et al. Incubation of human chorioamniotic membranes with *Candida albicans* induces differential synthesis and secretion of interleukin-1beta, interleukin-6, prostaglandin E, and 92 kDa type IV collagenase. *Mycoses*. 2006;49:6–13.
70. Zaga-Clavellina V, Merchant-Larios H, Garcia-Lopez G, Maida-Claros R, Vadillo-Ortega F. Differential secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after selective infection with group B streptococci in human fetal membranes. *J Soc Gynecol Investig*. 2006;13:271–9.
71. Locksmith GJ, Clark P, Duff P, Schultz GS. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 levels in women with preterm labor and suspected intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol*. 1999;94:1–6.
72. Roh CR, Oh WJ, Yoon BK, Lee JH. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in human myometrium during labour: a cytokine-mediated process in uterine smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod*. 2000;6:96–102.
73. Oner C, Schatz F, Kizilay G, Murk W, Buchwalder LF, Kayisli UA, et al. Progesterone-inflammatory cytokine interactions affect matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in term decidua: implications for treatment of chorioamnionitis-induced preterm delivery. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:252–9.
74. Imada K, Ito A, Sato T, Namiki M, Nagase H, Mori Y. Hormonal regulation of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B gene expression in rabbit uterine cervical fibroblasts. *Biol Reprod*. 1997;56:575–80.
75. Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Conoscenti G, Kim JC, Kim YM. The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2001;15 Suppl 2:41–56.
76. Elovitz MA, Wang Z, Chien EK, Rychlik DF, Phillippe M. A new model for inflammation-induced preterm birth: the role of platelet-activating factor and Toll-like receptor-4. *Am J Pathol*. 2003;163:2103–11.
77. Agrawal V, Hirsch E. Intrauterine infection and preterm labor. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2012;17:12–9.
78. Patni S, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, Thornton CA. Expression and activity of Toll-like receptors 1-9 in the human term placenta and changes associated with labor at term. *Biol Reprod*. 2009;80:243–8.
79. Elovitz MA, Mrinalini C. Can medroxyprogesterone acetate alter Toll-like receptor expression in a mouse model of intrauterine inflammation? *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193:1149–55.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)