



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA**

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

**LA PROGESTERONA MODULA LA SECRECIÓN DE LA  
PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO DE 70-KDa Y DE LA IL-1 $\beta$   
EN EL TEJIDO DE LA CORIODECIDUA DESPUÉS DE LA  
INFECCIÓN CON *ESCHERICHIA COLI***

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA  
Y OBSTETRICIA**

**P R E S E N T A**

**DRA. MARIANA VICTORIA LÓPEZ MARRUFO**

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

**DIRECTOR DE TESIS**

**M en C. HÉCTOR FLORES HERRERA  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA**



Ciudad de México Junio, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AUTORIZACIÓN DE TESIS**

Título de la Tesis

**“La progesterona modula la secreción de la proteína de choque térmico de 70-KDa y de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidua después de la infección con *Escherichia coli*”**

**Dra. VIRIDIANA GORBEA CHÁVEZ**

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

**Dr. NORBERTO REYES PAREDES**

Profesor titular del Curso de Especialización en Ginecología y Obstetricia.  
Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

**M. en C. HÉCTOR FLORES HERRERA**

Director de Tesis y Asesor Metodológico  
Departamento de Inmunobioquímica  
Instituto Nacional de Perinatología  
“Isidro Espinosa de los Reyes”

## **DEDICATORIAS**

**A mis padres Juan y Estela, que han estado conmigo a cada paso que he dado en esta trayectoria que apenas empieza, que me han apoyado ante cualquier situación, pero sobre todo por darme la oportunidad de poder cumplir mis sueños y aspiraciones, por alentarme a seguir adelante siempre y por ser mis mayores ejemplos de vida a seguir.**

**A mi hermano Juan Roberto porque de quien he aprendido a nunca rendirme y seguir adelante ante cualquier adversidad, de siempre dar lo mejor en todo momento Por escuchar y siempre aconsejarme cuando más lo necesitaba.**

**A mi hermano Dany que me ha demostrado que uno puede ser feliz y disfrutar siempre de todos los momentos, que la vida son instantes y que la felicidad depende de uno mismo.**

**A mi sobrino Roberto porque eres y serás mi gran consentido siempre.**

**A mi mejor amiga Faride, quien me ha visto en todas las facetas de esta carrera y me ha animado a seguir adelante y nunca darme por vencida.**

**Gracias a las personas que han hecho de esta travesía que le llama Residencia un camino más agradable, y en especial a mi asesor de tesis Dr. Héctor Flores por que, sin usted nada de esto hubiera sido posible.**

## **AGRADECIMIENTO**

**Este trabajo se desarrolló con fondos federales al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) mediante el proyecto con número de registro 2017-2-82 (otorgado a HFH).**

## INFORMACIÓN DE LOS AUTORES

### Mariana Victoria López Marrufo

Médico Residente

Especialidad de Ginecología y Obstetricia,

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

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, 11000.

Ciudad de México, México

Correo electrónico: mariavic3@hotmail.com

Contribución y aportaciones del autor en el desarrollo del presente trabajo

1) obtención de las membranas fetales humanas a término; 2) procesamiento y montaje de las membranas fetales en el modelo de Transwell; 3) cuantifico la Hsp-70, e -IL-1 $\beta$  en el medio de cultivo en las diferentes condiciones experimentales; 3) escritura de la tesis.

### M. en C. Héctor Flores Herrera

Investigador en Ciencias Médicas C

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel 1

Departamento de Inmunobioquímica,

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

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, 11000. Ciudad de México, México

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

Contribución y aportaciones del autor en el desarrollo del presente trabajo

1) diseño y ejecución experimental; 2) asesoramiento para la cuantificación de la Hsp-70 e IL1 $\beta$  mediante el ensayo de ELISA; 3) revisión de la tesis; 4) obtención del financiamiento para el desarrollo del presente trabajo.

## INDICE

	<i>Página</i>
AUTORIZACIÓN DE TESIS .....	2
DEDICATORIAS .....	3
AGRADECIMIENTO .....	3
INFORMACIÓN DE LOS AUTORES .....	4
RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. ANTECEDENTES	
2.1 <i>Epidemiología y etiología de los nacimientos prematuros</i> .....	10
2.2 <i>Las infecciones durante el embarazo</i> .....	12
2.3 <i>Las proteínas de choque térmico</i> .....	13
2.4 <i>Relación de las Hsp y la respuesta inflamatoria</i> .....	16
2.5 <i>Efecto de la progesterona sobre la expresión de las Hsp</i> .....	17
3. JUSTIFICACION .....	18
4. HIPÓTESIS .....	18
5. OBJETIVOS GENERAL .....	19
5.1 <i>Objetivos específicos</i> .....	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1 <i>Aspectos éticos</i> .....	20
6.2 <i>Características de las pacientes</i> .....	20
6.3 <i>Diseño del estudio</i> .....	21
6.3.1 <i>Características del estudio</i> .....	21
6.3.2 <i>Unidades de observación</i> .....	21
6.3.3 <i>Tamaño de la muestra</i> .....	21
6.3.4 <i>Criterios de selección</i> .....	21
6.3.5 <i>Criterios de inclusión</i> .....	21
6.3.6 <i>Criterios de exclusión</i> .....	22
6.3.7 <i>Criterios de eliminación</i> .....	22
6.3.8 <i>Variables de estudio</i> .....	22
6.4 <i>Obtención de las membranas fetales</i> .....	22
6.4.1 <i>Procesamiento y montaje de las membranas fetales en el sistema de Transwell</i> .....	22
6.4.2 <i>Procedimiento de estimulación</i> .....	22
6.4.3 <i>Determinación de la Hsp-70</i> .....	23
6.4.4 <i>Determinación de la IL-1<math>\beta</math></i> .....	24
6.4.5 <i>Análisis estadístico</i> .....	25
7. RESULTADOS	
7.1 <i>Características de la población de estudio</i> .....	26
7.2 <i>Secreción de la Hsp-70</i> .....	26
7.3 <i>Secreción de la IL-1<math>\beta</math></i> .....	31
8. DISCUSIÓN .....	36
9. CONCLUSIONES .....	37

10. BIBLIOGRAFÍA .....38

**TABLA**

1 Características maternas y neonatales de la población de estudio.....26

**FIGURAS**

1. Estructura de las Hsp pequeñas .....14

2. Estructura de las Hsp grandes .....15

3. Secreción de la Hsp-70 en el tejido de la coriodecidua después de 3 horas  
estimulación .....27

4. Secreción de la Hsp-70 en el tejido de la coriodecidua después de 6 horas  
estimulación .....29

5. Secreción de la Hsp-70 en el tejido de la coriodecidua después de 24 horas  
estimulación .....30

6. Secreción de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidua después de 3 horas  
estimulación .....32

7. Secreción de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidua después de 6 horas  
estimulación .....33

8. Secreción de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidua después de 24 horas  
estimulación .....34

**ANEXOS**

1. Registro del proyecto institucional .....43

2. Consentimiento informado .....44

## RESUMEN

**Introducción:** *Escherichia coli* es una bacteria gram negativa la cual ha sido asociada con el desarrollo de corioamnionitis y la ruptura prematura de las membranas fetales. Las proteínas de choque térmico (Hsp) son un componente importante de activación y regulación de la respuesta inmunológica. Recientemente, en nuestro grupo de investigación hemos demostrado que las membranas fetales humanas (MFH) responden de manera espacio-temporal a la estimulación con *E. coli* mediante la secreción de la Hsp-60, -70 promoviendo en la siguiente fase la secreción de la IL-1 $\beta$ . Se ha demostrado que la progesterona (P4) regula la respuesta inmunológica; sin embargo, no se ha determinado si la P4 inhibe la secreción de la Hsp por lo que nos propusimos como objetivo principal determinar el papel de la progesterona sobre la secreción de la Hsp-70 y de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidua humana después de la estimulación con *Escherichia coli*.

**Material y Métodos:** Nueve MFH fueron montadas en el sistema de Transwell y se estimuló el tejido de la coriodecidua considerando los siguientes grupos: 1) CDH sin estimular; 2) CDH estimulada con progesterona (P4; 4.80x10<sup>-7</sup> M); 3) CDH estimulada con mifepristona (RU486; 10  $\mu$ M); 4) CDH estimulada con *E. coli* (10<sup>2</sup> UFC/mL); 5) CDH estimulada con *E. coli* (10<sup>2</sup> UFC/mL) + P4 (4.80x10<sup>-7</sup> M); 6) CDH estimulada con *E. coli* (10<sup>2</sup> UFC/mL) + P4 (4.80x10<sup>-7</sup> M) + RU486 (10  $\mu$ M); 7) CDH estimulada con *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL); 8) CDH estimulada con *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL) + P4 (4.80x10<sup>-7</sup> M); 9) CDH estimulada con *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL) + P4 (4.80x10<sup>-7</sup> M) + RU486 (10  $\mu$ M). El medio de cultivo se recuperó a las 3, 6, y 24 horas y se determinó la secreción de la Hsp-70 e IL-1 $\beta$  mediante el ensayo inmunoenzimático de ELISA.

**Resultados:** Al estimular al tejido de la CDH con ciclodextrina, P4, y con RU486 no observamos un aumento en la concentración de la Hsp-70 a las por 3 (fig. 3), 6 (fig. 4), y 24 horas (fig. 5). Al estimular al tejido de la CHD con *E. coli* observamos un incremento significativo en la concentración de la Hsp-70 con respecto al grupo control ( $p \leq 0.05$ ). Este efecto se reduce al incubar simultáneamente al tejido de la CHD con P4. En estos mismos ensayos encontramos que la secreción de IL-1 $\beta$  aumento significativamente a las 24 horas (fig. 6;  $p \leq 0.05$ ) con respecto al grupo control.

**Discusión:** Estos resultados demuestran que las membranas fetales humanas responden de manera espacio-temporal a la estimulación con *E. coli* mediante la secreción de Hsp-60, -70 e IL-1 $\beta$ . En las primeras seis horas de estimulación la respuesta es principalmente de tipo Hsp en tanto que a las 24 horas cambia su perfil de secreción siendo de tipo IL-1 $\beta$ . Estos resultados indican que la región de la coriodecidua secreta tanto la Hsp-60 y -70 en tanto que la secreción en el epitelio amniótico es de tipo Hsp-70. La secreción diferencial entre las Hsp/IL-1 $\beta$  sugiere un mecanismo de regulación común promovido por las HSP lo cual deberá de ser demostrado en futuros experimentos.

**Palabras clave:** Corioamnioítis, *Escherichia coli*, interleucina-1 $\beta$ , membranas fetales humanas, proteínas de choque térmico.



## ABSTRACT

**Introduction:** *Escherichia coli* is a gram negative, bacterium which has been associated with the development of chorioamnionitis and premature rupture of fetal membranes. Heat shock proteins (Hsp) are an important component of the activation and regulation of the immune response. Recently, in our research group we have shown that human fetal membranes (HFM) respond spatiotemporally to stimulation with *E. coli* by secreting Hsp-60, -70 promoting in the next phase the secretion of IL-1 $\beta$ . It has been shown that progesterone (P4) regulates the immune response; however, it has not been determined if P4 inhibits the secretion of Hsp, so we set ourselves the main objective of determining the role of progesterone on the secretion of Hsp-70 and IL-1 $\beta$  in choriodecidual tissue. human after stimulation with *Escherichia coli*.

**Material and Methods:** Nine MFH were mounted in the Transwell system and choriodecidual tissue was stimulated considering the following groups: 1) unstimulated CDH; 2) CDH stimulated with progesterone (P4;  $4.80 \times 10^{-7}$  M); 3) CDH stimulated with mifepristone (RU486, 10  $\mu$ M); 4) CDH stimulated with *E. coli* (102 CFU / mL); 5) CDH stimulated with *E. coli* (102 CFU / mL) + P4 ( $4.80 \times 10^{-7}$  M); 6) CDH stimulated with *E. coli* (102 CFU / mL) + P4 ( $4.80 \times 10^{-7}$  M) + RU486 (10  $\mu$ M); 7) CDH stimulated with *E. coli* (106 CFU / mL); 8) CDH stimulated with *E. coli* (106 CFU / mL) + P4 ( $4.80 \times 10^{-7}$  M); 9) CDH stimulated with *E. coli* (106 CFU / mL) + P4 ( $4.80 \times 10^{-7}$  M) + RU486 (10  $\mu$ M). The culture medium was recovered at 3, 6, and 24 hours and the secretion of Hsp-70 and IL-1 was determined by the ELISA immunoenzymatic assay.

**Results:** When stimulating the CDH tissue with cyclodextrin, P4, and with RU486, we did not observe an increase in the concentration of Hsp-70 at 3 times (Fig. 3), 6 (Fig. 4), and 24 hours (Fig. 5). When stimulating the tissue of the CHD with *E. coli* we observed a significant increase in the concentration of the Hsp-70 with respect to the control group ( $p < 0.05$ ). This effect is reduced by simultaneously incubating the tissue of the CHD with P4. In these same trials we found that the secretion of IL-1 increased significantly at 24 hours (Fig. 6,  $p < 0.05$ ) with respect to the control group.

**Key words:** Chorioamnionitis, *Escherichia coli*, interleukin-1, human fetal membranes, heat shock proteins.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Las infecciones intrauterinas son un factor de riesgo comúnmente asociada con la ruptura prematura de las membranas fetales humanas (MFH) (1-3). Los microorganismos patógenos aislados frecuentemente en esta patología son *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Ureaplasma urealyticum* los cuales al contactar con las MFH inducen la secreción de diferentes citocinas inflamatorias, quimiocinas, factores uterotónicos y metaloproteasas de matriz extracelular (4). Estos marcadores bioquímicos han sido asociados tanto con la activación prematura del trabajo de parto y/o con la ruptura de las MFH. A pesar de que se tienen evidencias de las moléculas implicadas en el desarrollo infeccioso no se cuenta aún con un perfil de secreción en sus fases iniciales.

Recientemente se ha demostrado que en las fases iniciales del proceso infeccioso se activan diversas vías de señalización en las que están involucrados genes de respuesta rápida como son péptidos antimicrobianos (5, 6), especies reactivas de oxígeno (7), y las proteínas de choque térmico (8-10).

Las proteínas de choque térmico (Hsp), juegan un importante papel como moléculas de protección, plegamiento y evitando la formación de complejos agregados entre proteínas (11). Recientemente se ha demostrado su participación en la regulación y activación del sistema inmunológico (10, 12). Las Hsp han sido detectadas en las células de la decidua, placenta, y en líquido amniótico y su expresión permanece constante a lo largo de la gestación (8, 13, 14).

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que *Escherichia coli* induce en el tejido de la coriodecidua humana (CDH) la secreción de la Hsp-70 en las primeras 6 horas de estimulación y este perfil disminuye a las 24 horas. En ese mismo, estudio se demostró que la Hsp-70 está asociada con el incremento de la IL-1 $\beta$  de manera dosis dependiente (15). Se ha demostrado que la progesterona (P4) reduce la respuesta inflamatoria (16), y degradativa (17); sin embargo, no se ha demostrado si la P4 modula la secreción de la Hsp. En el presente estudio nos propusimos determinar el papel de la P4 sobre la secreción de la Hsp-70 y de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidua humana después de la estimulación con *Escherichia coli*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Epidemiología y etiología de los nacimientos prematuros

El nacimiento pretérmino se define como el nacimiento antes de las 37 semanas de gestación, actualmente es un problema que afecta a todas las naciones a nivel mundial y se ha estimado que tiene una incidencia global de aproximadamente 15 millones de nacimientos al año. En Estados Unidos el parto pretérmino ha tenido una disminución en la última década; aproximadamente 1 de cada 10 nacimientos en los Estados Unidos es un parto Pretérmino (18).

Los 10 países con mayor número de nacimientos prematuros son los siguientes: India: 3 519 100, China: 1 172 300, Nigeria: 773 600, Pakistán: 748 100, Indonesia: 675 700, Estados Unidos de América: 517 400, Bangladesh: 424 100, Filipinas: 348 900, República Democrática del Congo: 341 400, Brasil: 279 300 (19)

En México se registran más de 200 mil nacimientos prematuros de manera anual, según indican las cifras de la secretaria de salud. En el Instituto Nacional de Perinatología "*Isidro Espinosa de los Reyes*" se ha reportado en los últimos cinco años un total de 5,731 recién nacidos vivos pretérmino de 26 a 36.6 semanas de gestación (Departamento de Estadística INPer 2014-2018).

También el nacimiento prematuro se puede ver relacionado con la raza; en la última encuesta realizada en el Centro Nacional de Estadística para la Salud (2, 12) se hace mención que la raza Africana (con un 13.3%) es en la que mayormente se presenta el nacimiento pretérmino, seguido de raza India Americana (10.4%), Hispanos (9.1%), Blancos (9.0%) y asiáticos (8.6%).

La importancia del nacimiento pretérmino radica no solo en la morbilidad o mortalidad que viene asociada con la prematuridad sino también con el costo que genera a la sociedad. Se ha estimado que el costo total del nacimiento pretérmino genera aproximadamente gastos de hasta 26.6 millones de dólares en los Estados Unidos cada año, la duración de la estadía en el hospital para los bebés prematuros es de 13 días aproximadamente en comparación con los 1,5 días para los recién nacidos a término y los costos médicos para los bebés prematuros en el primer año de vida son diez veces mayores que los de los recién nacidos a término (\$ 650,000 pesos en comparación con \$ 60,000 pesos) (19).

La morbilidad con la que más frecuentemente se asocia el parto pretérmino es el síndrome de distrés respiratorio agudo, sepsis, hemorragia intraventricular, enterocolitis necrotizante, hipotermia, hipoglucemia, hiperbilirrubinemia y dificultades para alimentarse. La morbilidad a largo plazo incluye la retinopatía del prematuro, el deterioro del desarrollo neurológico y la parálisis cerebral (18, 20).

Los factores de riesgo para el nacimiento prematuro espontáneo incluyen infecciones, el parto prematuro espontáneo previo, insuficiencia cervical, la raza negra no hispana, el intervalo entre embarazos cortos, las gestaciones múltiples y las malformaciones uterinas. El parto prematuro espontáneo previo es el factor de riesgo más fuerte, con tasas de recurrencia que van del 15% al 50%, dependiendo de la cantidad y la edad gestacional de los partos prematuros anteriores (21).

Algo que debemos tomar en cuenta es que la principal diferencia entre el parto prematuro y el de término es cuando comienza el parto. Esto es quizás comprensible dado que ambos involucran eventos clínicos similares: aumento de la contractilidad uterina, dilatación cervical y rotura de las membranas corioamnióticas (22). Estos eventos representan el “camino común” del trabajo de parto. La comprensión actual de este proceso es que el cambio del miometrio de un estado quiescente a un estado contráctil se acompaña de un cambio en la señalización de las vías antiinflamatorias a proinflamatorias, que incluyen quimiocinas [interleucina-8 (IL-8)], citocinas (IL-1 y -6) y proteínas asociadas a la contracción (receptor de oxitocina, conexina 43, receptores de prostaglandina). La progesterona mantiene la inactividad uterina al reprimir la expresión de estos genes. El aumento de la expresión de la familia microRNA-200 (miR-200) a corto plazo puede eliminar los genes contráctiles y promover el metabolismo de la progesterona (23). La activación decidua o de membrana se refiere a los eventos anatómicos y bioquímicos involucrados en la retirada del apoyo individual para el embarazo, la separación de las membranas corioamnióticas de la decidua y, eventualmente, la ruptura de la membrana. Puede observarse un aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias [factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-1] y quimiocinas, con aumento de la actividad de proteasas [matriz metaloproteínasa 8 (MMP-8) y MMP-9], así como disolución de componentes de la matriz extracelular como la fibronectina y la posterior apoptosis.

## 2.2 Las infecciones durante el embarazo

Dentro de las principales causas ya mencionadas atribuibles al parto pretérmino las infecciones siempre se han visto relacionadas con dicha patología, uno de cada cuatro bebés prematuros nace de madres con una infección intraamniótica que es en gran parte subclínica, los microorganismos aislados del líquido amniótico son similares a los que se encuentran en el tracto genital inferior y, por lo tanto, una vía ascendente se considera la vía de infección más frecuente. También se han encontrado bacterias involucradas en la enfermedad periodontal en el líquido amniótico, lo que sugiere que también puede ocurrir diseminación hematogena con pasaje transplacentario (24, 25). El parto pretérmino inducido por microbios está mediado por un proceso inflamatorio. Los microorganismos y sus productos son detectados por receptores de reconocimiento de patrones, como los receptores tipo peaje (TLR), que inducen la producción de quimiocinas [por ejemplo, IL-8 y ligando de motivo CC 2 (CCL2)], citoquinas (por ejemplo, IL-1b y TNF-a), prostaglandinas y proteasas que conducen a la activación de la vía común de parto (26).

Se estima que la prevalencia porcentual de colonización vaginal anormal en mujeres embarazadas en cada trimestre es del 21.7, 21.0 y 14.5 en el primer, segundo y tercer trimestre respectivamente. Durante el embarazo debido a las modificaciones en los niveles de estrógenos, progesterona, puede existir el estado de "flora intermedia" que significa una etapa de transición entre la flora vaginal normal y la vaginosis bacteriana (27). Así mismo Doders et. al., (2015) acuñaron el término de vaginosis aeróbica, esta condición consta de otro tipo de microorganismos vaginales alterados, en los cuales los lactobacilos de la flora original vaginal son reemplazados por patógenos aerobios facultativos como *Klebsiella*, *E. coli*, *Staphylococcus* spp., y estreptococos del grupo B caracterizándose por leucocitosis vaginal y células parabasales con un aumento de la reacción inflamatoria (28).

Los microorganismos observados con mayor frecuencia en el tracto genital femenino son el estreptococo del grupo B, *E. coli* y *Ureaplasma urealyticum*. *Escherichia coli* es uno de los microorganismos más frecuentes cultivados en vaginitis aeróbica (18).

### 2.3 Las proteínas de choque térmico

Las proteínas del choque térmico (Hsp) fueron inicialmente descritas en la larva de *Drosophila melanogaster* la cual fue expuesta a incrementos de temperatura y se observó el aumento en la expresión de un grupo particular de proteínas las cuales fueron denominadas de tolerancia al calor (29). Las Hsp son moléculas pequeñas de 20 a 100 Kilo Daltones (KDa) se encuentran ampliamente conservadas y se expresan en plantas, animales, y bacterias (30). Las principales funciones biológicas se encuentra la homeostasis celular (31), regulan tanto la conformación estructural y estabilidad del material genético (DNA, y RNA) como de las proteínas por lo que se les dio originalmente el término de “*chaperonas moleculares*”, reducen el estrés celular ocasionado por temperaturas extremas, emisiones de luz ultravioleta, y por metabolismo oxidativo (32), y recientemente han sido asociadas con la respuesta inmunológica (33, 34).

Por su tamaño las Hsp, han sido agrupadas en proteínas de bajo (20-, 22- y 27-KDa) y alto (40-, 60-, 70-, 90- y 100-KDa) peso molecular (35) con propiedades anti y pro inflamatorias respectivamente (36, 37).

Las Hsp pequeñas tienen un peso molecular de entre 15 a 30 KDa (150 a 250 aminoácidos). El dominio amino-terminal presenta tres estructuras alfa ( $\alpha$ 1-3) que están poco conservadas y contiene regiones ricas en metionina. Este dominio funciona como molécula acompañante “*chaperona*”, no depende de la hidrólisis de ATP y su capacidad de unión a proteínas es reversible y previene la agregación parcial de las proteínas (Fig. 1) (38).

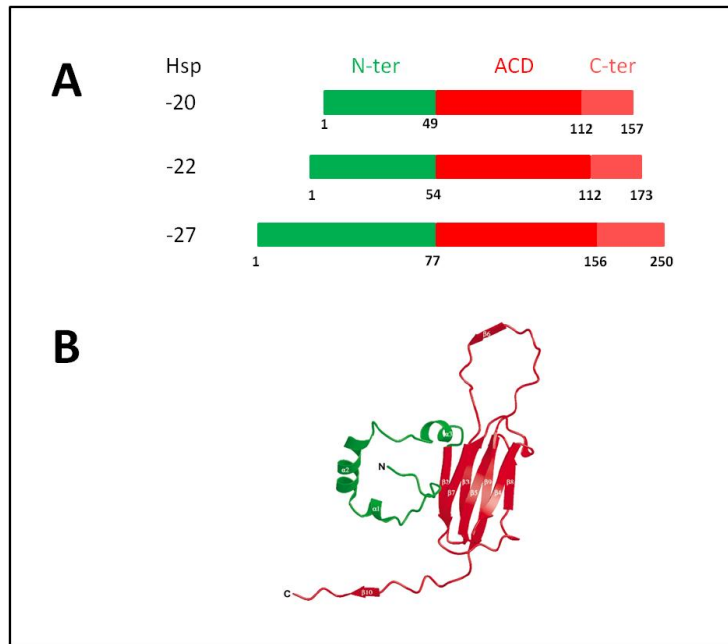


Figura 1 Estructura de las Hsp pequeñas. (A) Dominios N-terminal (N-ter; verde),  $\alpha$ -cristalino (ACD; rojo), C-terminal (C-ter; rosa). (B) Estructura secundaria se observa los diferentes dominios de las hojas alfa y beta. Imagen tomada de van Montfort y cols., (39).

El siguiente dominio contiene aproximadamente 90 residuos de aminoácidos que forman estructuras de tipo  $\alpha$ -cristalinas (ACD; *alpha-crystallin domain*) similar a la proteína del cristalino. Este dominio consiste de estructuras de tipo  $\beta$  compuesta por dos láminas antiparalelas con cuatro ( $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_9$ ,  $\beta_8$ ) y tres ( $\beta_7$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_5$ ) hojas (fig. 1B) (40). El dominio carboxilo-terminal presenta una hoja de tipo  $\beta$ . Este dominio es una región conservada que está implicada con la interacción entre monómeros y cambios en su secuencia reduce la capacidad de unión con el DNA y con otras proteínas (fig. 1) (39).

Las Hsp grandes contiene 646 aminoácidos, en la porción del amino-terminal está compuesta por 386 aa (44 KDa) y constituyen el dominio de tipo ATPasa el cual hidroliza ATP. Este dominio, tiene la función de distinguir diferentes conformaciones de las proteínas. El segundo dominio está ubicado entre la posición 387-543 aa (18 KDa) y constituye el sitio de unión el cual está involucrado con la capacidad de interactuar con otras proteínas y con receptores específicos (TLRs, por sus siglas en inglés Toll Like Receptos; CD36, CD40). El tercer dominio, está comprendido entre la

posición 543-646 aa (10 KDa) representa la porción del dominio carboxilo terminal (fig. 2) (39, 41, 42).

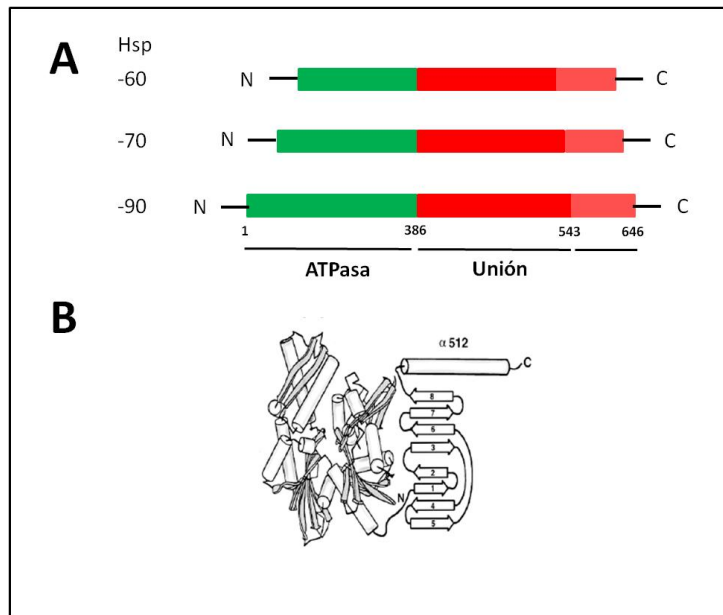


Figura 2 Estructura de las Hsp grandes. (A) Dominios amino-terminal de hidrólisis de ATP (*N*-; verde), dominio de unión (rojo), dominio carboxilo-terminal (-C; rosa). (B) Estructura secundaria se observa los diferentes dominios de las hojas alfa y beta. Imagen tomada de Kiang y Tsokos (41).

Las Hsp son proteínas altamente conservadas y se encuentran localizadas en el núcleo, citoplasma, membrana plasmática y en diferentes fluidos biológicos (43, 44). Diferentes evidencias han demostrado que las Hsp se encuentran en células de la decidua (14), placenta (43, 44), cordón umbilical (45), miometrio (46) líquido amniótico (8), en células del amnios (47), la decidua (14, 48), en tejido placentario (49), y en suero materno (13).



#### 2.4 Relación de las Hsp y la respuesta inflamatoria

Dentro del sistema de alarma celular temprana se encuentran las Hsp (50) y las proteínas de tipo  $\beta$ -defensinas (51, 52) que de manera conjunta y coordinada activan tanto de las células profesionales (macrófagos, monocitos y células dendríticas) como en los tejidos inmunológicos (membranas fetales y placenta) para la secreción de diferentes citocinas involucradas con la respuesta inflamatoria (53).

Se ha demostrado que los monocitos humanos al ser estimulados con la Hsp-27 incrementa de manera dosis dependiente la secreción de interleucina (IL) de tipo 10 la cual se encuentra mediada por la proteína de tipo cinasa p38 (36, 54), en tanto que la Hsp-60 y -70 incrementan la secreción de IL-1 $\beta$  y del factor de necrosis tumoral (TNF) de tipo alfa (53).

Las propiedades antiinflamatorias de Hsp-27 pueden ser utilizadas para diversos tratamientos asociados a procesos de enfermedades inflamatorias (55). Asimismo, se ha demostrado que la administración de la Hsp-27 da como resultado la protección contra el shock de endotoxinas letal y es altamente inducida en monocitos de pacientes con síndrome de shock inflamatorio sistémico (36). Durante los períodos de homeostasis celular, los niveles de la Hsp-70 están alrededor del 2% del contenido intracelular; sin embargo, este perfil de expresión cambia durante un estrés celular incrementando los niveles hasta 10-veces con respecto al estado basal (36). Se ha propuesto que el mecanismo por el cual la Hsp-70 activa la respuesta inflamatoria esta mediada por el factor nuclear-kappa-beta (NF- $\kappa$  $\beta$ ) y la fosforilación de la proteína cinasa mitogénica (MAPK), mediando una respuesta pro o antiinflamatoria al estrés (56, 57).

En muestras obstétricas de pacientes con infección en el líquido amniótico y con ruptura prematura de las membranas fetales se ha observado el aumento significativo en la secreción de la Hsp-70 con respecto a pacientes sanas a la misma edad gestacional (8, 56, 58). Recientemente nuestro grupo de investigación ha demostrado mediante un modelo experimental de infección (59) que al estimular en condiciones *in vitro* el tejido de la CDH con *Escherichia coli* se incrementa significativamente a las 3 y 6-horas la secreción de la Hsp-60 y -70 con respecto al grupo sin estimulación (15). En este mismo estudio se observó que a las 24-horas de estimulación la concentración

de la Hsp-60 y -70 disminuye significativamente incrementándose la secreción de la IL-1 $\beta$  (15).

Se ha demostrado que la proteína de choque térmico extracelular 60 (Hsp-60) actúa como potente estimulador de las respuestas inmunitarias. Cuando se libera en el medio extracelular, la Hsp-60 aumenta los niveles de células CD4 + CD25 y suprime los linfocitos T citotóxicos (60).

### *2.5 Efecto de la progesterona sobre la expresión de las Hsp*

En condiciones experimentales se ha demostrado que la progesterona (P4) inhibe la expresión y secreción de la proteína de tipo  $\beta$ -defensinas (61), IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (62, 63), uterotónico (64), y de las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP) -2, y -9 (65, 66). Recientemente, Chu y colaboradores (2017) determinaron en muestras de pacientes con cáncer mamario el aumento en la expresión de la Hsp-60 está asociada con la disminución de los receptores de progesterona (RP4) (67, 68); sin embargo, no se ha determinado si la P4 puede modular la secreción de la Hsp-70 y en el tejido de la coriodescuidua por lo que el principal objetivo de este estudio será determinar el papel de la progesterona sobre la secreción de la Hsp-70 y de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodescuidua humana después de la estimulación con *Escherichia coli*.

### 3.0 JUSTIFICACIÓN

*E. coli* ha sido asociada con la ruptura prematura de las membranas fetales humanas, al contactar las diferentes regiones que conforman a las membranas fetales humanas (amnios, corión y decidua) (2), activan la secreción masiva de citocinas inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , y TNF $\beta$ ) (69) y metaloproteasas de matriz extracelular (MMP-9 y MMP-2) (70). Se ha demostrado en otros modelos que en la fase inicial del proceso infeccioso/inflamatorio se produce la síntesis y secreción de las proteínas de fase aguda tisular denominadas de choque térmico (Hsp), las cuales favorecen la respuesta inmunológica y mantienen la homeostasis celular (71).

Existen diversas evidencias que demuestran, que la concentración de Hsp-70 se incrementa hasta 7-veces en las pacientes con trabajo de parto prematuro (8, 48). El incremento de la Hsp-70 ha sido asociado con el aumento en la concentración de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (14, 58). Recientemente Osorio-Caballero y colaboradores (2015) demostraron mediante un sistema de infección *in vitro*, que el tejido de la coriodecidual humana responde activamente ante la estimulación con *Escherichia coli* incrementado 3.7-veces de manera dosis respuesta a las 3 y 6-horas la secreción de la Hsp-70, y a las 24-horas de estimulación, observamos un decremento en la secreción de la Hsp-70 a cualquier concentración de las UFC/mL de *E. coli* utilizadas. Finalmente, observamos que el mayor aumento en la secreción de IL-1 $\beta$  fue a las 24-horas (15). En el presente trabajo, nos hemos propuesto contestar la siguiente pregunta de investigación. ¿La progesterona reducirá la secreción de la Hsp-70 y de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidual después de la estimulación con *Escherichia coli*?

Para responder a esta pregunta de investigación, nos propusimos desarrollar la siguiente hipótesis y objetivos experimentales.

### 4.0 HIPÓTESIS

La progesterona reducirá la concentración de la proteína de choque térmico de 70-KDa y de la IL-1 $\beta$  con respecto al grupo experimental sin tratamiento.

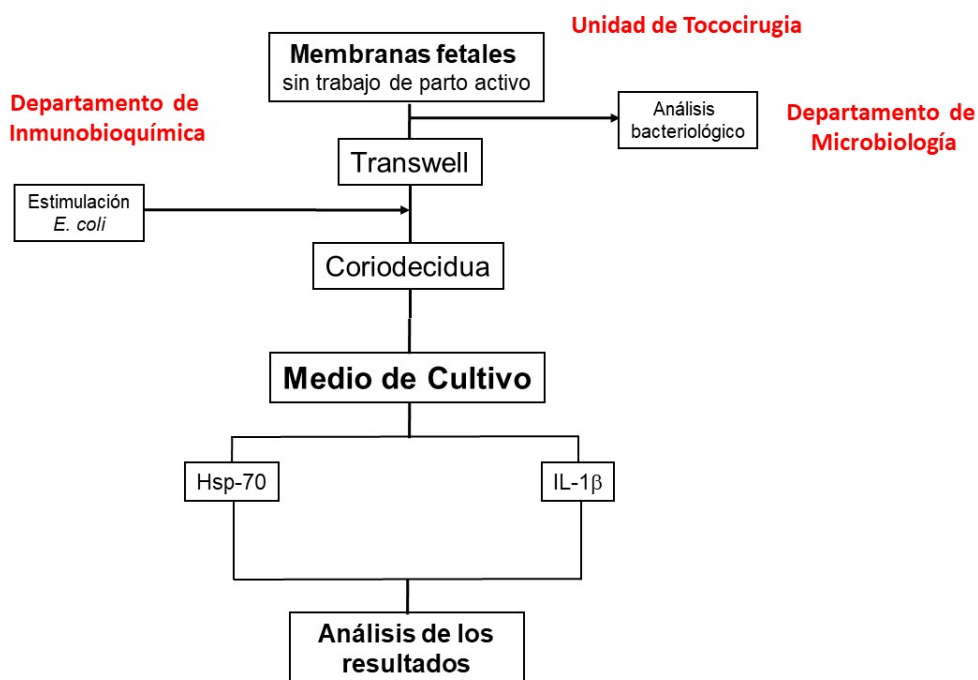
## 5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de la progesterona sobre la secreción de la Hsp-70 y de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidua humana después de la estimulación con *Escherichia coli*

### 5.1 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la progesterona sobre la secreción de la Hsp-70 en el tejido de la coriodecidua después de la estimulación con *Escherichia coli* a las 3, 6 y 24 horas.
2. Determinar el efecto de la progesterona sobre la secreción de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidua después de la estimulación con *Escherichia coli* a las 3, 6 y 24 horas.

## 6.0 MATERIAL Y MÉTODOS



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

### 6.1 Aspectos éticos

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

### 6.2 Características de las pacientes

Las membranas fetales humanas (MFH) que serán seleccionadas de pacientes con embarazo único a término mayor o igual a 37 semanas de gestación, que sean

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

### *6.3 Diseño del estudio*

Tipo de investigación: Experimental

Tipo de diseño: Experimental biomédico.

#### *6.3.1 Características del estudio*

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

#### *6.3.2 Unidades de observación:*

#### *6.3.3 Tamaño de la muestra*

Para cubrir con los objetivos planteados en el desarrollo del presente trabajo hemos considerado obtener 9 membranas fetales humanas. Este número, es como resultado de la experiencia de nuestro grupo de investigación, demostrado por las publicaciones con respecto al uso del modelo de infección (59, 72) y en la cuantificación de las Hsp (15).

#### *6.3.4 Criterios de selección*

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

#### *6.3.5 Criterios de inclusión*

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

#### 6.3.6 Criterios de exclusión

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

#### 6.3.7 Criterios de eliminación

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

#### 6.3.8 Variables de estudio

##### *Variable independiente*

Tejido de la coriodecidua estimulada con diferentes unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* ( $10^2$  y  $10^6$  UFC/mL) solas y en combinación con progesterona ( $4.80 \times 10^{-7}$  M) y con RU486 (10  $\mu$ M).

##### *Variable dependiente*

Secreción de la Hsp-70 KDa, e IL-1 $\beta$ .

#### 6.4 Obtención y procesamiento de las membranas fetales

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

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

La sangre adherida a las MFH fue quitada mediante una gasa estéril. Las MFH serán cortadas en piezas de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> y montadas en el sistema de Transwell las cuales serán cultivadas en cajas de 12 pozos como ha sido previamente reportado (15).

##### 6.4.2 Procedimiento de estimulación

La región del tejido de la coriodecidua humana (CDH) fue estimulada con diferentes cantidades de unidades formadoras de colonias de *E. coli* ( $10^2$ ,  $10^6$  UFC/ml)

necesarias para observar la secreción de la Hsp-70 e IL-1 $\beta$  y realizamos una cinética de estimulación a diferentes intervalos de tiempo (3, 6 y 24-horas). Las UFC/mL de *E. coli* utilizamos como referencia de turbidez el tubo número 0.5 de MacFarland que representa aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL. Se realizaron diferentes diluciones hasta obtener la concentración de bacterias requeridas.

La estimulación de la CDH se realizará considerando los siguientes grupos: 1) CDH sin estimular; 2) CDH estimulada con progesterona (P4; 4.80x10<sup>-7</sup> M); 3) CDH estimulada con mifepristona (RU486; 10  $\mu$ M); 4) CDH estimulada con *E. coli* (10<sup>2</sup> UFC/mL); 5) CDH estimulada con *E. coli* (10<sup>2</sup> UFC/mL) + P4 (4.80x10<sup>-7</sup> M); 6) CDH estimulada con *E. coli* (10<sup>2</sup> UFC/mL) + P4 (4.80x10<sup>-7</sup> M) + RU486 (10  $\mu$ M); 7) CDH estimulada con *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL); 8) CDH estimulada con *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL) + P4 (4.80x10<sup>-7</sup> M); 9) CDH estimulada con *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL) + P4 (4.80x10<sup>-7</sup> M) + RU486 (10  $\mu$ M).

Para determinar la cantidad de *E. coli* (10<sup>2</sup> y 10<sup>6</sup> UFC/mL) se realizó con respecto al tubo de 0.5 del nefelómetro de MacFarlan. La concentración de *E. coli* ha sido determinada en base al aumento significativo de las Hsp observado previamente [Osorio-Caballero 2015]. Las concentraciones de P4 y del RU486 fueron tomadas en base a lo previamente reportado por Romero (73) y Marbaix (74).

El medio de cultivo fue recuperado a las 3, 6 y 24 horas después de la estimulación y en cada caso las muestras fueron centrifugadas a 5 000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado en tubo Eppendorf y almacenado a -70 °C hasta la cuantificación de la Hsp-70 e IL-1 $\beta$ .

#### 6.4.3 Determinación de la Hsp-70

La determinación de la Hsp-70 (DYC-1663-2, R&D System) en el medio de cultivo de los diferentes procedimientos experimentales se realizó mediante el ensayo inmuno enzimático tipo sándwich (ELISA) con las recomendaciones de la casa comercial y como ha sido publicado por nuestro grupo de investigación (15).

La preparación de las microplacas (Nunc-Immuno Brand products, Denmark) consistió en la adición del anticuerpo de captura para la Hsp-70 (2.0 $\mu$ g/mL) y fue sellada con membrana adhesiva (SealPleat; EXCEL Scientific) y fue incubada a temperatura



ambiente toda la noche a 4°C. Al finalizar la incubación la placa fue lavada tres veces con solución de lavado que contiene Tween-20 al 0.05% en PBS (TPBS, pH 7.2).

A cada pozo de la placa se le añadieron 300 µL de solución bloqueadora (0.1% BSA, 0.05 % NaN<sub>3</sub>, PBS pH 7.2) y fue incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Al terminar la incubación, la placa fue lavada nuevamente con la solución de PBS.

La curva estándar para cada placa fue de 7 puntos con diluciones seriadas (2-veces) teniendo la concentración más alta de 10,000 pg/mL para la Hsp-70. En el resto de los pozos de la placa se colocaron 100 µL de cada una de las muestras de los diferentes procedimientos experimentales. La placa fue incubada por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionaron 100 µL por pozo del anticuerpo de detección Hsp-70 (100 ng/mL), se incubó nuevamente por dos horas a temperatura ambiente. La placa fue lavada dos veces, y posteriormente se adicionaron 100 µL por pozo de estreptavidina-HRP e incubadas nuevamente a temperatura ambiente por 20 minutos y en oscuridad. La placa fue lavada con TPBSA, se le adicionaron 100 µL por pozo de la mezcla 1:1 del sustrato colorimétrico (R&D; DY999) que consiste en el reactivo A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y B (tetrametilbenzidina), la placa fue incubada por 20 minutos. La reacción fue detenida mediante la adición de 50 µL por pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. La placa fue leída a 450 nm (Dynatech MR5000). Los resultados fueron expresados en unidades de pg/mL.

#### *6.4.5 Determinación de la IL-1β*

Para determinar la concentración de IL-1β (DY201; R&D Systems) en el medio de cultivo de los diferentes grupos experimentales se utilizó el ensayo de ELISA con las recomendaciones de la casa comercial y como ha sido reportado previamente por nuestro grupo de investigación (59). A la microplaca se le añadió 4.0µg/ml del anticuerpo de captura y se incubó toda la noche a 4°C. La curva estándar para la IL-1β fue de 4.0 a 260 pg/mL. El procedimiento de lavado de la microplaca (0.05% Tween-20), adición del cromógenos (estrapavidina-HRP), sustrato, inactivación de reacción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2N) y la determinación de la densidad óptica (450 nm) han sido detalladas previamente (*ver sección 6.4.4*). Los resultados fueron expresados en unidades de pg/mL

#### *6.4.5 Análisis estadístico*

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

## 7.0 RESULTADOS

### 7.1 Características de la población de estudio.

La tabla 1 muestra las características maternas y neonatales procedentes de las 9 MFH incluidas en el presente estudio. Los datos fueron obtenidos del archivo clínico del INPerIER.

**Tabla 1 Características maternas y neonatales de la población de estudio.**

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

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

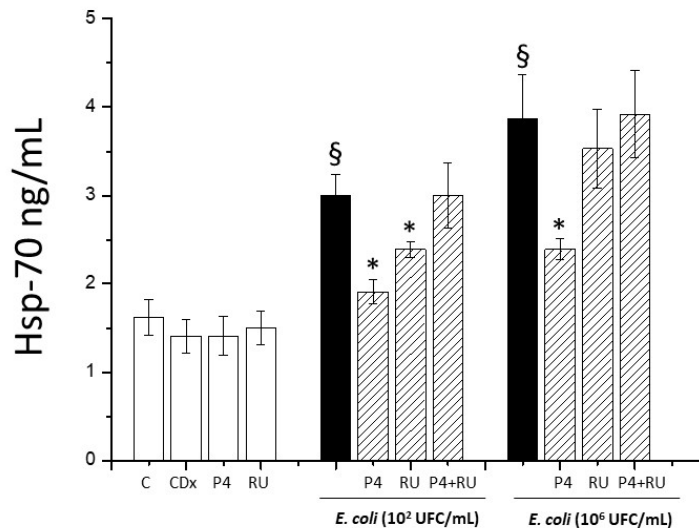
No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al sexo, edad gestacional, peso, y talla de los recién nacidos (tabla 1).

### 7.2 Secreción de la Hsp-70.

Se determino el efecto de la progesterona sobre la secreción de la Hsp-70 en el tejido de la coriodecidua (CHD) a las 3 (figura 3), 6 (figura 4) y 24 horas (figura 5) después de la estimulación con *Escherichia coli*.

### Estimulación a las 3 horas

Se cuantificó la concentración de la Hsp-70 en el tejido de la CHD sin estimulación y fue de  $1.62 \pm 0.41$  ng/mL (grupo control). En estos mismos ensayos se incluyeron el efecto de la preincubación con ciclodextrina ( $1.41 \pm 0.39$  ng/mL), P4 ( $1.41 \pm 0.45$  ng/mL), y RU486 ( $1.50 \pm 0.37$  ng/mL) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ( $p = 0.05$ ; fig. 3).



**Figura 3.** Secreción de la Hsp-70 en el tejido de la coriodecidua después de 3 horas de estimulación. Grupo sin estimulación (control; C), ciclodextrina (CDx), progesterona (P; 10mM), y mifepristona (RU486; 10mM). Estimulación de la CDH con *E. coli* 10<sup>2</sup> y 10<sup>6</sup> (barras negras) y se muestra el efecto con progesterona, RU486 y en combinación (barras ashuradas). La concentración de Hsp-70 se expresó como ng/ml para cada muestra. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 9 membranas fetales humanas independientes. Las diferencias estadísticas se muestran con respecto al grupo control (§,  $p \leq 0.05$ ), y con respecto a la estimulación con *E. coli* (\*,  $p \leq 0.05$ ).

Al estimular al tejido de la CHD con *E. coli* (10<sup>2</sup> UFC/mL) observamos el incremento significativo de 1.8-veces en la concentración de la Hsp-70 con respecto al grupo control ( $p \leq 0.05$ ), el cual fue reducido significativamente 1.5 ( $1.91 \pm 0.29$  ng/mL) y 1.2-

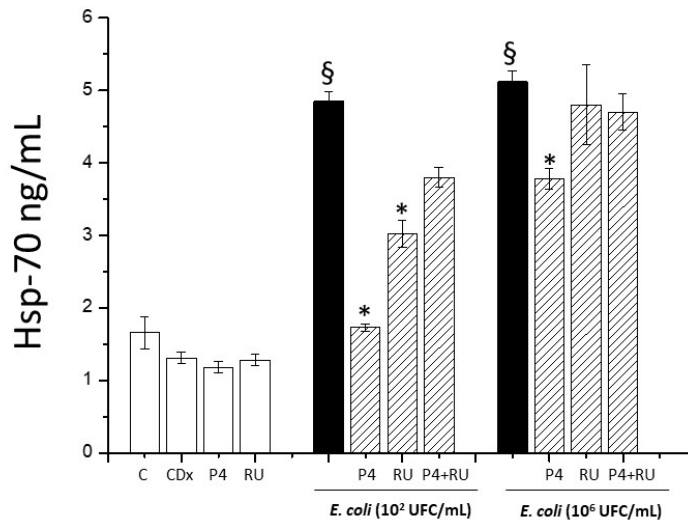
veces ( $2.39 \pm 0.18$  ng/mL) con la estimulación simultánea de *E. coli*  $10^2$  UFC/mL+P4 y con *E. coli*  $10^2$  UFC/mL+P4+RU486 respectivamente (fig. 3;  $p \leq 0.05$ ). Finalmente, la concentración de la Hsp-70 no fue reducida por la incubación simultánea con *E. coli*  $10^2$  UFC/mL+RU486 ( $3.0 \pm 0.75$  ng/mL; fig. 3).

Al estimular al tejido de la CHD con *E. coli* ( $10^6$  UFC/mL) observamos el incremento significativo de 2.3-veces en la concentración de la Hsp-70 ( $3.8 \pm 1.0$  ng/mL) con respecto al grupo control ( $p \leq 0.05$ ; fig. 3), el cual fue reducido significativamente 1.6-veces con la estimulación simultánea de *E. coli*  $10^6$  UFC/mL+P4 ( $2.39 \pm 0.25$  ng/mL; fig. 3).

Finalmente, la concentración de la Hsp-70 no fue reducida por la incubación simultánea con *E. coli*  $10^2$  UFC/mL+P4+RU486 ( $3.5 \pm 0.90$  ng/mL) y con *E. coli*  $10^6$  UFC/mL+RU486 ( $3.92 \pm 0.99$  ng/mL; fig. 3).

#### *Estimulación a las 6 horas*

La concentración de la Hsp-70 en el tejido de la CHD sin estimulación y fue de  $1.66 \pm 0.22$  ng/mL (grupo control). En estos mismos ensayos se incluyeron el efecto de la preincubación con ciclodextrina ( $1.31 \pm 0.08$  ng/mL), P4 ( $1.18 \pm 0.08$  ng/mL), y RU486 ( $1.28 \pm 0.086$  ng/mL) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (fig. 4;  $p = 0.05$ ).



**Figura 4.** Secreción de la Hsp-70 en el tejido de la coriodecidua después de 6 horas de estimulación. Grupo sin estimulación (control; C), ciclodextrina (CDx), progesterona (P; 10mM), y mifepristona (RU486; 10mM). Estimulación de la CDH con *E. coli* 10<sup>2</sup> y 10<sup>6</sup> (barras negras) y se muestra el efecto con progesterona, RU486 y en combinación (barras ashuradas). La concentración de Hsp-70 se expresó como ng/ml para cada muestra. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 9 membranas fetales humanas independientes. Las diferencias estadísticas se muestran con respecto al grupo control (§,  $p \leq 0.05$ ), y con respecto a la estimulación con *E. coli* (\*,  $p \leq 0.05$ ).

Al estimular al tejido de la CHD con *E. coli* (10<sup>2</sup> UFC/mL) observamos el incremento significativo de 2.4-veces en la concentración de la Hsp-70 con respecto al grupo control ( $p \leq 0.05$ ; fig. 4), el cual fue reducido significativamente 2.3-veces con la estimulación simultánea de *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL+P4 (1.73  $\pm$  0.05 ng/mL).

Finalmente, la estimulación simultánea con *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL+P4+RU486 no redujo significativamente la secreción de la Hsp-70 (3.02  $\pm$  0.19 ng/mL) con respecto a *E. coli* (10<sup>2</sup> UFC/mL;  $p = 0.05$ ; fig. 4).

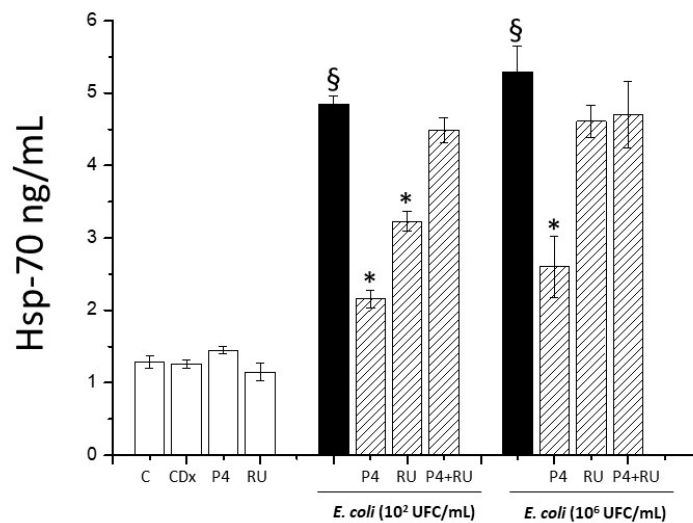
Al estimular al tejido de la CHD con *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL) observamos el incremento significativo de 3-veces en la concentración de la Hsp-70 (5.12  $\pm$  0.15 ng/mL) con respecto al grupo control ( $p \leq 0.05$ ; fig. 4), el cual fue reducido significativamente 1.3-veces con la estimulación simultánea de *E. coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL+P4 (3.78  $\pm$  0.14 ng/mL;

fig. 4).

Finalmente, la concentración de la Hsp-70 no fue reducida significativamente por la incubación simultánea con *E. coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL+P4+RU486 (4.73 ± 0.06 ng/mL) y con *E. coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL+RU486 (4.85 ± 0.55 ng/mL; fig. 4).

#### Estimulación a las 24 horas

La concentración de la Hsp-70 en el tejido de la CHD sin estimulación fue de 1.29 ± 0.09 ng/mL (grupo control). En este mismo ensayo se incluyeron el efecto de la preincubación con ciclodextrina (1.26 ± 0.06 ng/mL), P4 (1.45 ± 0.05 ng/mL), y RU486 (1.15 ± 0.12 ng/mL) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (fig. 5;  $p = 0.05$ ).



**Figura 5.** Secreción de la Hsp-70 en el tejido de la coriodecidua después de 24 horas de estimulación. Grupo sin estimulación (control; C), ciclodextrina (CDx), progesterona (P; 10mM), y mifepristona (RU486; 10mM). Estimulación de la CDH con *E. coli* 10<sup>2</sup> y 10<sup>6</sup> (barras negras) y se muestra el efecto con progesterona, RU486 y en combinación (barras ashuradas). La concentración de Hsp-70 se expresó como ng/ml para cada muestra. Los datos representan la media ± error estándar de 9 membranas fetales humanas independientes. Las diferencias estadísticas se muestran con respecto al grupo control (§,  $p \leq 0.05$ ), y con respecto a la estimulación con *E. coli* (\*,  $p \leq 0.05$ ).

A las veinticuatro horas de estimulación, observamos que la incubación simultánea con *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL incremento significativamente 3.7-veces secreción de la Hsp-70 (4.85 ± 0.11 ng/mL) con respecto al grupo control ( $p \leq 0.05$ ; fig.5;), y este efecto fue revertido 1.3-veces por la incubación simultánea con *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL+P4 (3.6 ± 0.46 ng/mL; fig. 5).

Finalmente, la concentración de la Hsp-70 no fue reducido significativamente por la incubación simultánea con *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL+P4+RU486 (4.49 ± 0.14 ng/mL) y por *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL+RU486 (5.30 ± 0.41 ng/mL; fig. 5).

Al estimular a la CHD con *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL) observamos el incremento significativo de 4.1-veces en la concentración de la Hsp-70 con respecto al grupo control (fig. 5;  $p < 0.05$ ).

La estimulación con *E. coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL+P4 (4.77 ± 0.46 ng/mL), y *E. coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL+P4+RU486 (4.61 ± 0.22 ng/mL) no mostraron una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la estimulación con *E. coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL ( $p = 0.05$ ; fig. 5;).

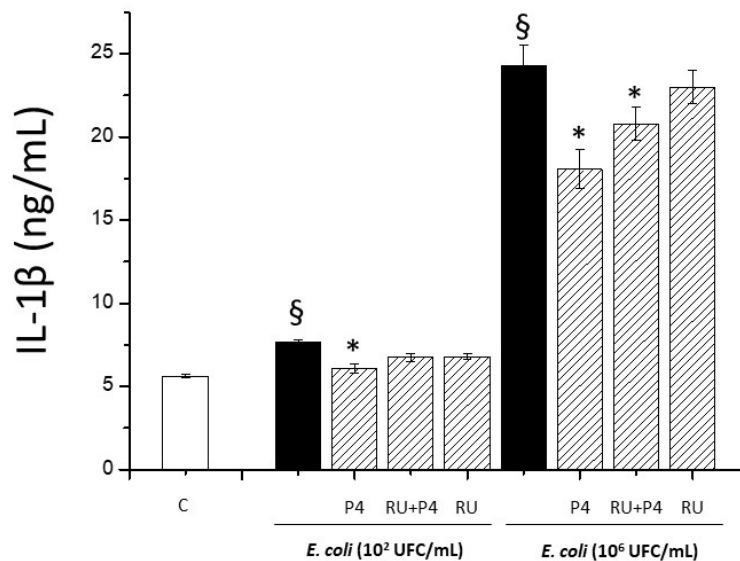
### 7.3 Secreción de la IL-1 $\beta$

Se determino el efecto de la progesterona sobre la secreción de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidual (CHD) a las 3 (figura 6), 6 (figura 7) y 24 horas (figura 8) después de la estimulación con *Escherichia coli*.

#### *Estimulación a las 3 horas*

La concentración de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la CHD sin estimulación fue de 5.6 ± 0.09 ng/mL (grupo control; fig. 6). Después de la estimulación con *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL se incrementó 1.3-veces la secreción de la IL-1 $\beta$  con respecto al grupo control ( $p \leq 0.05$ ) y este efecto fue revertido 1.2-veces por la incubación simultánea de *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL+P4 ( $p \leq 0.05$ ). La concentración de la IL-1 $\beta$  no fue reducida significativamente por la incubación simultánea con *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL+P4+RU486 (6.75 ± 0.23 ng/mL) y por *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL+RU486 (6.77 ± 0.17 ng/mL; fig. 5).





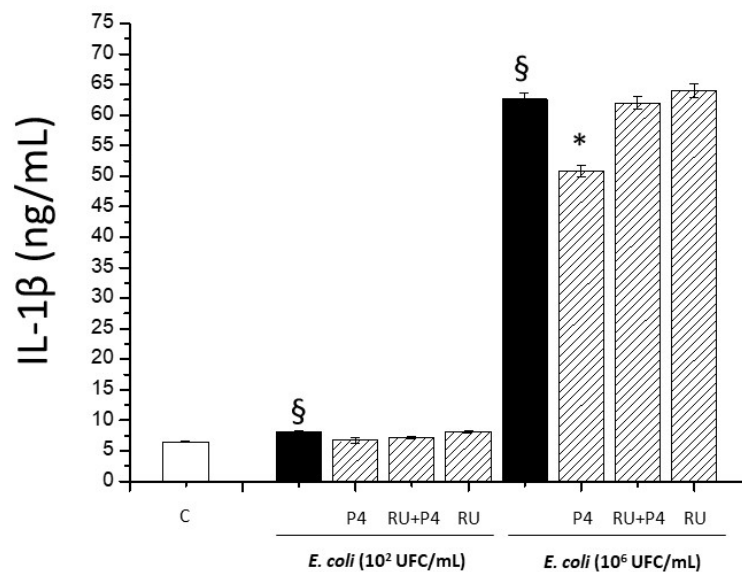
**Figura 6.** Secreción de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidua después de 3 horas de estimulación. Grupo sin estimulación (control; C), estimulación de la CDH con *E. coli* 10<sup>2</sup> y 10<sup>6</sup> (barras negras) y se muestra el efecto con progesterona, RU486 y en combinación. La concentración de IL-1 $\beta$  se expresó como ng/ml para cada muestra. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 9 membranas fetales humanas independientes. Las diferencias estadísticas se muestran con respecto al grupo control (§,  $p < 0.05$ ), y con respecto a la estimulación con *E. coli* (\*,  $p < 0.05$ ).

Al estimular a la CHD con *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL) observamos el incremento significativo de 4.3-veces en la concentración de la IL-1 $\beta$  con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ; fig. 6) la cual fue revertida significativamente 1.3- y 1.1-veces por la estimulación con *E. coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL+P4 ( $p < 0.05$ ) y *E. coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL+P4+RU486 ( $p < 0.05$ ) respectivamente, con respecto a la estimulación con *E. coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL ( $p < 0.05$ ; fig. 6). Este efecto no fue observado con la estimulación simultánea de *E. coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL+RU486 (23.0  $\pm$  0.81).

#### Estimulación a las 6 horas

La concentración de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la CHD sin estimulación fue de 6.46  $\pm$  0.12 ng/mL (grupo control; fig. 7). Después de la estimulación con *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL se incrementó 1.2-veces la secreción de la IL-1 $\beta$  con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

La incubación simultánea de *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL+P4 redujo 1.1-veces la secreción de IL-1 $\beta$ ; sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo tratado con *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL ( $p = 0.05$ ; fig. 7). La concentración de la IL-1 $\beta$  no fue reducido significativamente por la incubación simultánea con *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL+P4+RU486 ( $8.15 \pm 0.12$  ng/mL) y por *E. coli* 10<sup>2</sup> UFC/mL+RU486 ( $7.15 \pm 0.20$  ng/mL; fig. 7).



**Figura 7.** Secreción de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidua después de 6 horas de estimulación. Grupo sin estimulación (control; C), estimulación de la CDH con *E. coli* 10<sup>2</sup> y 10<sup>6</sup> (barras negras) y se muestra el efecto con progesterona, RU486 y en combinación. La concentración de IL-1 $\beta$  se expresó como ng/ml para cada muestra. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 9 membranas fetales humanas independientes. Las diferencias estadísticas se muestran con respecto al grupo control (§,  $p < 0.05$ ), y con respecto a la estimulación con *E. coli* (\*,  $p < 0.05$ ).

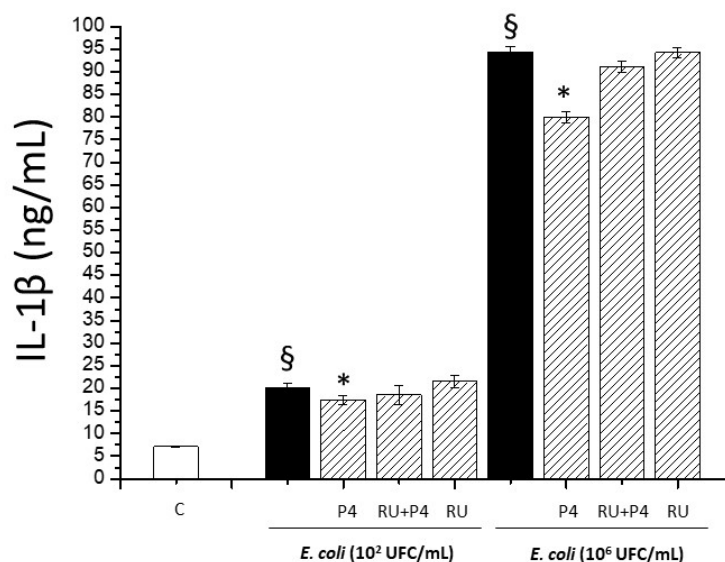
Al estimular a la CHD con *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL) observamos el incremento significativo de 9.6-veces en la concentración de la IL-1 $\beta$  con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ; fig. 7) la cual fue revertida significativamente 1.2-veces por la estimulación con *E. coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL+P4 con respecto al grupo de *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL) ( $p < 0.05$ ; fig. 7).

En este mismo intervalo de tiempo, no observamos diferencias estadísticamente significativas en la incubación con *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL)+P4+RU ( $63.8 \pm 0.90$ ) y *E. coli*

( $10^6$  UFC/mL)+RU ( $63.2 \pm 0.95$ ) con respecto a la estimulación con *E. coli* ( $10^6$  UFC/mL; fig. 7).

#### Estimulación a las 24 horas

La concentración de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la CHD sin estimulación fue de  $7,12 \pm 0.171$  ng/mL (grupo control; fig. 8). Después de la estimulación con *E. coli*  $10^2$  UFC/mL se incrementó 2.8-veces la secreción de la IL-1 $\beta$  con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). La incubación simultánea de *E. coli*  $10^2$  UFC/mL+P4 redujo significativamente 1.1-veces la secreción de IL-1 $\beta$  ( $p = 0.05$ ; fig. 8).



**Figura 8.** Secreción de la IL-1 $\beta$  en el tejido de la coriodecidua después de 6 horas de estimulación. Grupo sin estimulación (control; C), estimulación de la CDH con *E. coli*  $10^2$  y  $10^6$  (barras negras) y se muestra el efecto con progesterona, RU486 y en combinación. La concentración de IL-1 $\beta$  se expresó como ng/ml para cada muestra. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 9 membranas fetales humanas independientes. Las diferencias estadísticas se muestran con respecto al grupo control (§,  $p < 0.05$ ), y con respecto a la estimulación con *E. coli* (\*,  $p < 0.05$ ).

Al estimular a la CHD con *E. coli* ( $10^6$  UFC/mL) observamos el incremento significativo de 13.2-veces en la concentración de la IL-1 $\beta$  con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ;

fig. 8) la cual fue revertida significativamente 1.0- y de 1.0-veces veces por la estimulación con *E. coli*  $10^6$  UFC/mL+P4 y *E. coli*  $10^6$  UFC/mL+P4+RU respectivamente con respecto al grupo de *E. coli* ( $10^6$  UFC/mL) ( $p < 0.05$ ; fig. 8). Finalmente, no observamos diferencia estadísticamente significativas en la incubación con *E. coli* ( $10^6$  UFC/mL)+RU ( $63.2 \pm 0.95$ ) con respecto a la estimulación con *E. coli* ( $10^6$  UFC/mL; fig. 8).

## 8.0 DISCUSIÓN

Las proteínas de choque térmico son un componente importante de la respuesta de inmunidad innata y se encuentran regulando tanto los procesos fisiológicos como en diferentes condiciones patológicas y han sido localizadas en las diferentes regiones celulares que conforman a las membranas fetales humanas (14, 47).

Se ha demostrado que, al estimular a macrófagos, y células dendríticas con un componente estructural como es el lipopolisacárido de *Escherichia coli* se incrementa la secreción de las Hsp (60- y 70-KDa) incrementándose la respuesta inflamatoria de tipo IL-6, -12 y del TNF $\alpha$  (75, 76).

Recientemente Osorio-Caballero y colaboradores (2015) demostró mediante un modelo experimental de infección que al estimular con *E. coli* al tejido de la coriodecidua se incrementa la secreción de la Hsp-60 y -70 de manera dosis dependiente la cual fue dependiente del tiempo de estimulación. El incremento de las Hsp estuvo asociado en la fase tardía de la estimulación con el aumento en la secreción de la IL-1 $\beta$  (15).

Se ha demostrado que la P4 modula la secreción de diferentes moléculas asociadas a la respuesta degradativa de las metaloproteasas de matriz extracelular (17), citocinas inflamatorias (16, 62), de estrés celular (61) y en la modulación de la proteína de choque térmico de 10-KDa (67). A la fecha, no existen reportes de la modulación de la progesterona sobre la Hsp-70 en las membranas fetales humanas.

Utilizando el mismo modelo de infección, nos propusimos en el presente estudio determinar si la progesterona reduciría en el tejido de la coriodecidua la concentración de la proteína de choque térmico de 70-KDa y de la IL-1 $\beta$  inducidas por la estimulación de *Escherichia coli* con respecto al grupo experimental sin tratamiento. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que 1) la P4 reduce en el tejido de la coriodecidua el perfil de secreción de la Hsp-70 (figuras 3-5) y de la IL1 $\beta$  (figuras 6-8) a las 3, 6, y 24 horas después de la estimulación con *E. coli*; y 2) la estimulación simultánea de P4+RU restablece la concentración de la Hsp-70 con respecto a la obtenida con la estimulación de *Escherichia coli*.

El papel funcional de la P4 sobre la actividad de diversos genes ha quedado demostrado mediante la utilización de un análogo sintético llamado mifepristona

(RU486) el cual tiene afinidad por los receptores de progesterona el cual activa la uterina y la inducción del trabajo de parto, por lo que estaría provocando un efecto inhibitor sobre la P4 (77, 78).

Se ha demostrado que en las membranas fetales humanas se encuentran cinco isoformas del receptor de progesterona RP-A (82 KD), RP-B (116-KDa), RP-C (60-KDa), y dos isoformas pequeñas de 45 y 36-KDa (79). Previo al trabajo de parto se ha demostrado que el receptor que se encuentra con mayor expresión en el tejido de la coriodecidua es el RP-B y la activación del trabajo de parto asociado el cual esta asociado a la respuesta inflamatoria disminuye la expresión del RP-B y se aumenta el RP-A (79).

Estudios posteriores serán dirigidos para determinar el efecto de la estimulación con *E. coli* en el tejido de la coriodecidua sobre los receptores de progesterona.

## **9.0 CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos sugieren que la progesterona modula la secreción de la Hsp-70 en el tejido de la coriodecidua y que este efecto es a través de los receptores de progesterona ya que en el grupo tratado con su antagonista (RU486) aumenta la concentración en el medio de cultivo de la Hsp-60

## 10.0 BIBLIOGRAFIA

1. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One*. 2008;3(8):e3056.
2. Hecht JL, Onderdonk A, Delaney M, Allred EN, Kliman HJ, Zambrano E, et al. Characterization of chorioamnionitis in 2nd-trimester C-section placentas and correlation with microorganism recovery from subamniotic tissues. *Pediatr Dev Pathol*. 2008;11(1):15-22.
3. Hillier SL, Krohn MA, Kiviat NB, Watts DH, Eschenbach DA. Microbiologic causes and neonatal outcomes associated with chorioamnion infection. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165(4 Pt 1):955-61.
4. Kelly RW. Inflammatory mediators and parturition. *Rev Reprod*. 1996;1(2):89-96.
5. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res*. 2000;1(3):141-50.
6. Patgaonkar M, Aranha C, Bhonde G, Reddy KV. Identification and characterization of anti-microbial peptides from rabbit vaginal fluid. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011;139(2-4):176-86.
7. Chakraborty SP, Roy S. In vitro *Staphylococcus aureus*-induced oxidative stress in mice murine peritoneal macrophages: a duration-dependent approach. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014;4(Suppl 1):S298-304.
8. Chaiworapongsa T, Erez O, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Gotsch F, et al. Amniotic fluid heat shock protein 70 concentration in histologic chorioamnionitis, term and preterm parturition. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2008;21(7):449-61.
9. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*. 1991;66(2):191-7.
10. Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol*. 2002;23(3):130-5.
11. Fink AL. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*. 1999;79(2):425-49.
12. Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):185-94.
13. Molvarec A, Tamasi L, Losonczy G, Madach K, Prohaszka Z, Rigo J, Jr. Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. *Cell Stress Chaperones*. 2010;15(3):237-47.
14. Shah M, Stanek J, Handwerger S. Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. *Histochem J*. 1998;30(7):509-18.
15. Osorio-Caballero M, Perdigon-Palacio C, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera O, Olvera-Sanchez S, Morales-Mendez I, et al. *Escherichia coli*-induced temporal and differential secretion of heat-shock protein 70 and interleukin-1beta by human fetal membranes in a two-compartment culture system. *Placenta*. 2015;36(3):262-9.
16. Feng L, Ransom CE, Nazzal MK, Allen TK, Li YJ, Truong T, et al. The Role of Progesterone and a Novel Progesterone Receptor, Progesterone Receptor Membrane Component 1, in the Inflammatory Response of Fetal Membranes to *Ureaplasma parvum* Infection. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168102.
17. 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(3):575-80.

18. Purisch SE, Gyamfi-Bannerman C. Epidemiology of preterm birth. *Semin Perinatol.* 2017;41(7):387-91.
19. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health.* 2019;7(1):e37-e46.
20. Manuck TA, Rice MM, Bailit JL, Grobman WA, Reddy UM, Wapner RJ, et al. Preterm neonatal morbidity and mortality by gestational age: a contemporary cohort. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215(1):103 e1- e14.
21. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008;371(9606):75-84.
22. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG.* 2006;113 Suppl 3:17-42.
23. Renthal NE, Williams KC, Mendelson CR. MicroRNAs--mediators of myometrial contractility during pregnancy and labour. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(7):391-401.
24. 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(5):2103-11.
25. Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *J Clin Periodontol.* 2013;40 Suppl 14:S170-80.
26. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science.* 2014;345(6198):760-5.
27. Son KA, Kim M, Kim YM, Kim SH, Choi SJ, Oh SY, et al. Prevalence of vaginal microorganisms among pregnant women according to trimester and association with preterm birth. *Obstet Gynecol Sci.* 2018;61(1):38-47.
28. Donders G, Bellen G, Rezeberga D. Aerobic vaginitis in pregnancy. *BJOG.* 2011;118(10):1163-70.
29. Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol (1985).* 2002;92(5):2177-86.
30. Garsia RJ, Hellqvist L, Booth RJ, Radford AJ, Britton WJ, Astbury L, et al. Homology of the 70-kilodalton antigens from *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium bovis* with the *Mycobacterium tuberculosis* 71-kilodalton antigen and with the conserved heat shock protein 70 of eucaryotes. *Infect Immun.* 1989;57(1):204-12.
31. Bausinger H, Lipsker D, Hanau D. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 2002;23(7):342-3.
32. Becker J, Craig EA. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem.* 1994;219(1-2):11-23.
33. Stocki P, Dickinson AM. The immunosuppressive activity of heat shock protein 70. *Autoimmune Dis.* 2012;2012:617213.
34. Tsan MF, Gao B. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol.* 2004;1(4):274-9.
35. Charmpilas N, Kyriakakis E, Tavernarakis N. Small heat shock proteins in ageing and age-related diseases. *Cell Stress Chaperones.* 2017;22(4):481-92.
36. De AK, Kodys KM, Yeh BS, Miller-Graziano C. Exaggerated human monocyte IL-10 concomitant to minimal TNF-alpha induction by heat-shock protein 27 (Hsp27) suggests Hsp27 is primarily an antiinflammatory stimulus. *J Immunol.* 2000;165(7):3951-8.
37. Lechner P, Buck D, Sick L, Hemmer B, Multhoff G. Serum heat shock protein 70 levels as a biomarker for inflammatory processes in multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin.* 2018;4(2):2055217318767192.



38. Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(10):842-6.
39. van Montfort RL, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol.* 2001;8(12):1025-30.
40. Basha E, O'Neill H, Vierling E. Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(3):106-17.
41. Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther.* 1998;80(2):183-201.
42. Velten M, Gomez-Vrielynck N, Chaffotte A, Ladjimi MM. Domain structure of the HSC70 cochaperone, HIP. *J Biol Chem.* 2002;277(1):259-66.
43. Pockley AG, Henderson B, Multhoff G. Extracellular cell stress proteins as biomarkers of human disease. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(6):1744-51.
44. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):15-27.
45. Chang A, Zhang Z, Jia L, Zhang L, Gao Y, Zhang L. Alteration of heat shock protein 70 expression levels in term and preterm delivery. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013;26(16):1581-5.
46. MacIntyre DA, Tyson EK, Read M, Smith R, Yeo G, Kwek K, et al. Contraction in human myometrium is associated with changes in small heat shock proteins. *Endocrinology.* 2008;149(1):245-52.
47. Gelber SE, Bongiovanni AM, Jean-Pierre C, Linhares IM, Skupski DW, Witkin SS. Antibodies to the 70 kDa heat shock protein in midtrimester amniotic fluid and intraamniotic immunity. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(3):278 e1-4.
48. Menon R. Human fetal membranes at term: Dead tissue or signalers of parturition? *Placenta.* 2016;44:1-5.
49. Abdulsid A, Hanretty K, Lyall F. Heat shock protein 70 expression is spatially distributed in human placenta and selectively upregulated during labor and preeclampsia. *PLoS One.* 2013;8(1):e54540.
50. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* 2003;425(6957):516-21.
51. Boldenow E, Hogan KA, Chames MC, Aronoff DM, Xi C, Loch-Carus R. Role of cytokine signaling in group B Streptococcus-stimulated expression of human beta defensin-2 in human extraplacental membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(3):263-72.
52. Varrey A, Romero R, Panaitescu B, Miller D, Chaiworapongsa T, Patwardhan M, et al. Human beta-defensin-1: A natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid that is increased in spontaneous preterm labor with intra-amniotic infection. *Am J Reprod Immunol.* 2018;80(4):e13031.
53. Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol.* 1999;162(6):3212-9.
54. Yang Y, Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, Sonoda KH, Ishibashi T. IL-10 is significantly involved in HSP70-regulation of experimental subretinal fibrosis. *PLoS One.* 2013;8(12):e80288.
55. Wang W, Weng J, Yu L, Huang Q, Jiang Y, Guo X. Role of TLR4-p38 MAPK-Hsp27 signal pathway in LPS-induced pulmonary epithelial hyperpermeability. *BMC Pulm Med.* 2018;18(1):178.

56. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem.* 2002;277(17):15028-34.
57. Wilhide ME, Tranter M, Ren X, Chen J, Sartor MA, Medvedovic M, et al. Identification of a NF-kappaB cardioprotective gene program: NF-kappaB regulation of Hsp70.1 contributes to cardioprotection after permanent coronary occlusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51(1):82-9.
58. Jean-Pierre C, Perni SC, Bongiovanni AM, Kalish RB, Karasahan E, Ravich M, et al. Extracellular 70-kd heat shock protein in mid-trimester amniotic fluid and its effect on cytokine production by ex vivo-cultured amniotic fluid cells. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(3):694-8.
59. Flores-Herrera H, Garcia-Lopez G, Diaz NF, Molina-Hernandez A, Osorio-Caballero M, Soriano-Becerril D, et al. An experimental mixed bacterial infection induced differential secretion of proinflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha) and proMMP-9 in human fetal membranes. *Placenta.* 2012;33(4):271-7.
60. Giuliano JS, Jr., Lahni PM, Wong HR, Wheeler DS. Pediatric Sepsis - Part V: Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. *Open Inflamm J.* 2011;4:49-60.
61. Han JH, Kim MS, Lee MY, Kim TH, Lee MK, Kim HR, et al. Modulation of human beta-defensin-2 expression by 17beta-estradiol and progesterone in vaginal epithelial cells. *Cytokine.* 2010;49(2):209-14.
62. Luo G, Abrahams VM, Tadesse S, Funai EF, Hodgson EJ, Gao J, et al. Progesterone inhibits basal and TNF-alpha-induced apoptosis in fetal membranes: a novel mechanism to explain progesterone-mediated prevention of preterm birth. *Reprod Sci.* 2010;17(6):532-9.
63. 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.* 2015;122(13):1798-807.
64. Thiex NW, Chames MC, Loch-Carusio RK. Tissue-specific induction of COX-2 and prostaglandins in lipopolysaccharide-stimulated extraplacental human gestational membranes in a 2-chamber transwell culture system. *Reprod Sci.* 2010;17(12):1120-9.
65. Garcia-Ruiz G, Flores-Espinosa P, Preciado-Martinez E, Bermejo-Martinez L, Espejel-Nunez A, Estrada-Gutierrez G, et al. In vitro progesterone modulation on bacterial endotoxin-induced production of IL-1beta, TNFalpha, IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1alpha, and MMP-9 in pre-labor human term placenta. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13:115.
66. Goldman S, Weiss A, Shalev E. The effect of progesterone on gelatinase expression in the decidua and fetal membranes before and after contractions. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(5):521 e1-7.
67. Chu S, Wen Q, Qing Z, Luo J, Wang W, Chen L, et al. High expression of heat shock protein 10 correlates negatively with estrogen/progesterone receptor status and predicts poor prognosis in invasive ductal breast carcinoma. *Hum Pathol.* 2017;61:173-80.
68. Pieber D, Allport VC, Hills F, Johnson M, Bennett PR. Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(9):875-9.
69. Splichal I, Trebichavsky I. Cytokines and other important inflammatory mediators in gestation and bacterial intraamniotic infections. *Folia Microbiol (Praha).* 2001;46(4):345-51.

70. Gomez Lopez N, Estrada Gutierrez G, Beltran Montoya J, Espejel Nunez A, Vadillo Ortega F. [Extracellular matrix metalloproteases profile identification in chorioamniotic membranes of term and preterm pregnancies through soluble microarrays]. *Ginecol Obstet Mex.* 2008;76(1):32-7.
71. Bangen JM, Schade FU, Flohe SB. Diverse regulatory activity of human heat shock proteins 60 and 70 on endotoxin-induced inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;359(3):709-15.
72. 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.
73. Romero R, Scoccia B, Mazor M, Wu YK, Benveniste R. Evidence for a local change in the progesterone/estrogen ratio in human parturition at term. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159(3):657-60.
74. Marbaix E, Donnez J, Courtoy PJ, Eeckhout Y. Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(24):11789-93.
75. Flohe SB, Bruggemann J, Lendemans S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohe S, et al. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol.* 2003;170(5):2340-8.
76. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol.* 2000;164(1):13-7.
77. Frydman R, Taylor S, Paoli C, Pourade A. [RU 486 (mifepristone): a new tool for labor induction women at term with live fetus]. *Contracept Fertil Sex (Paris).* 1992;20(12):1133-6.
78. Theron KE, Penny CB, Hosie MJ. The Bax/Bcl-2 apoptotic pathway is not responsible for the increase in apoptosis in the RU486-treated rat uterus during early pregnancy. *Reprod Biol.* 2013;13(4):290-7.
79. Goldman S, Weiss A, Almalah I, Shalev E. Progesterone receptor expression in human decidua and fetal membranes before and after contractions: possible mechanism for functional progesterone withdrawal. *Mol Hum Reprod.* 2005;11(4):269-77.

## ANEXO 1

### Registro del proyecto institucional



INSTITUTO NACIONAL  
DE PERINATOLOGÍA  
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

DIRECCIÓN GENERAL

INPER-DG - 000906 -2017

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

CIUDAD DE MÉXICO, A 29 DE SEPTIEMBRE DE 2017.

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

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

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

**Registro: 2017-2-82**

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

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

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

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

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

ATENTAMENTE

  
DR. JORGE ARTURO CARDONA PÉREZ  
DIRECTOR GENERAL

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

## ANEXO 2

### Consentimiento informado



INSTITUTO  
NACIONAL DE  
PERINATOLOGÍA  
Pedro Espinosa de los Reyes

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

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimada señora:

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

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

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

El estudio básicamente consiste en lo siguiente:

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

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

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

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

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

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

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





**TEXTO DECLARATORIO**

YO \_\_\_\_\_

(Nombre del participante o de su representante legal)

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

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

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

México D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_.

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