



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Papel inmunorregulador de la prolactina  
sobre las señales quimiotácticas de las  
membranas fetales humanas**

**TESIS**

Que para obtener el título de:

**Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

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

Núñez Sánchez Estefanía

**ASESOR:** Dra. María del Pilar Flores Espinosa

**COASESOR:** M.V.Z. Ángel Germán Martínez Sosa

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

**Papel inmunorregulador de la prolactina sobre las señales quimiotácticas de las membranas fetales humanas.**

Que presenta la pasante: **Núñez Sánchez Estefanía**  
Con número de cuenta: **312342621** 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 26 de Noviembre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
<b>VOCAL</b>	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en D. María Verónica Vázquez Cianca	

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

LMCF/javg/cga\*

## Agradecimientos:

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida para poder realizar este trabajo, durante el periodo Julio 2018 – Junio 2019 (número 28033). Este proyecto contó con el apoyo de CONACyT con número de registro 242162, perteneciente a la Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina.

Al Instituto Nacional de Perinatología y a la FES Cuautitlán por ayudar en el proceso de mi formación profesional.

A la Dra. Verónica Zaga Clavellina, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por todas las enseñanzas y el apoyo para llevar a cabo mi trabajo de tesis; pero sobre todo por permitirme ampliar mi formación profesional en el área de la investigación.

A la Dra. Pilar, que durante la realización de este proyecto has sido mi mano derecha y quien me ha guiado durante este complicado proceso. Es cierto que no fue nada fácil, pero gracias a tus conocimientos, experiencia y ayuda incondicional fue posible llegar a este resultado tan satisfactorio. Gracias por ser mi amiga, por ser tan paciente conmigo y por enseñarme tanto.

Al profesor Ángel Germán por brindarme una formación crítica y trasmitirme la pasión por estudiar la inmunología.

A la Dra. Leticia González Ibarra por ser mi amiga y compañera incansable de trabajo, gracias por todas las enseñanzas y momentos compartidos.

Al Dr. Ismael Mancilla Herrera, por el gran aporte a este trabajo, por su gran amabilidad y por estar siempre dispuesto a ayudarnos.

Al M. en C. Eduardo Axel Preciado por el apoyo, todas esas charlas sobre cosas triviales, por la buena música en los días de trabajo y por ser un buen compañero y amigo.

A mis compañeras de laboratorio Alma y Cristina por todas las risas y momentos divertidos que compartimos dentro y fuera del laboratorio.

A Luisa y a la Dra. Andrea por estar siempre dispuestas a resolver dudas.

A Victor, gracias por ser más que un gran apoyo durante la carrera y por permitirme compartir, aprender y salir adelante juntos en estos años, además de brindarme cariño y comprensión en todo momento

A Karen, Andrea, Yara, Flor y Gerardo por alegrarme el corazón cada vez que los veo y por seguir siendo tan divertidos y maravillosos como cuando los conocí.

A mi hermano y mi familia, que siempre ha estado ahí para poder ayudarme en cualquier cosa.

## Dedicatoria

A mi madre

Gracias por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros te los debo a ti, incluyendo este. Gracias por ser mi modelo a seguir y mostrarme que el trabajo duro siempre tiene recompensas, por ser mi sostén, por apoyar cada una de mis decisiones académicas y por alentarme a no estancarme y estar siempre en búsqueda del siguiente desafío, de algo mejor...

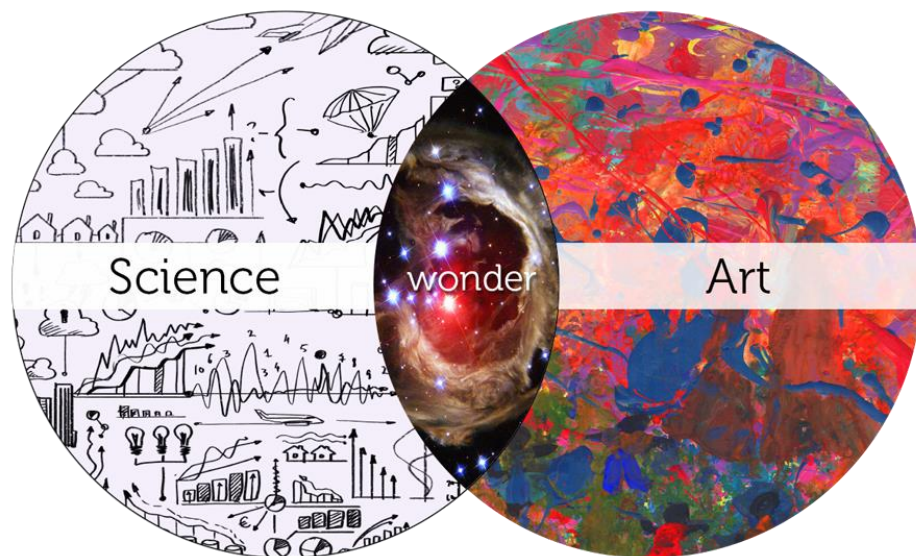
TE AMO

A Julita

Gracias por estar presente en cada día de mi vida.

“How often people speak of art and science as though they were two entirely different things, with no interconnection. An artist is emotional, they think, and uses only his intuition; he sees all at once and has no need of reason. A scientist is cold, they think, and uses only his reason; he argues carefully step by step, and needs no imagination. That is all wrong. The true artist is quite rational as well as imaginative and knows what he is doing; if he does not, his art suffers. The true scientist is quite imaginative as well as rational, and sometimes leaps to solutions where reason can follow only slowly; if he does not, his science suffers”.

Isaac Asimov, The Roving Mind



# ÍNDICE

<b>Índice de figuras</b> .....	<b>I</b>
<b>Índice de gráficas</b> .....	<b>I</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>II</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>IV</b>
<b>I. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Estrategias que favorecen la tolerancia materno-fetal</b> .....	<b>2</b>
1.1. Estrategias anatómicas .....	2
1.1.1. Formación de la interfase materno-fetal .....	2
1.1.1.1. Decidua materna .....	3
1.1.1.2. Placenta .....	3
1.1.1.3. Membranas corioamnióticas .....	4
1.2. Estrategias inmunológicas .....	5
1.2.1. Expresión de moléculas HLA no clásicas .....	5
1.2.2. Células del sistema inmune en la interfase materno-fetal .....	6
1.2.2.1. Células dNK .....	6
1.2.2.2. Macrófagos .....	7
1.2.2.3. Linfocitos T y el paradigma $T_{h1}/T_{h2}/T_{h17}/T_{reg}$ .....	7
1.3. Estrategias endócrinas .....	8
1.3.1. P4 y hCG .....	9
1.3.2. E2 .....	9
<b>2. Trabajo de parto</b> .....	<b>10</b>
2.1. Quimiotaxis en los tejidos extraembrionarios .....	11
<b>3. El parto pre-término y la infección intrauterina</b> .....	<b>12</b>
3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	13
<b>4. Prolactina</b> .....	<b>14</b>
4.1. PRL durante el embarazo.....	15
<b>II. Antecedentes</b> .....	<b>17</b>
<b>III. Justificación</b> .....	<b>19</b>
<b>IV. Objetivos</b> .....	<b>20</b>
General .....	20
particulares .....	20
<b>V. Hipótesis</b> .....	<b>20</b>
<b>VI. Metodología</b> .....	<b>21</b>
1. Diagrama general de la metodología desarrollada .....	21
2. Muestras Biológicas.....	21

3.	Obtención y transporte de muestras .....	23
4.	Reactivos.....	23
5.	Ensayo de bioactividad de la PRL.....	23
6.	Cultivo de membranas fetales.....	24
7.	Cinética de secreción de quimiocinas por las membranas corioamnióticas en respuesta a LPS durante 72 h.....	24
8.	Medición de marcadores quimiotácticos provenientes de la cinética por medio de Cytometric bead Array .....	25
9.	Estimulación y obtención de los medios de cultivos condicionados por las membranas corioamnióticas. ....	25
10.	Cuantificación de quimiocinas mediante ELISA .....	27
11.	Aislamiento de células mononucleares de sangre de cordón umbilical.....	28
12.	Ensayos de migración.....	29
13.	Conteo de células migrantes .....	30
14.	Análisis por citometría de flujo.....	31
15.	Análisis estadístico de los datos.....	33
<b>VII.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>34</b>
1.	Ensayo de Bioactividad de la PRL.....	34
2.	Cinética de secreción de las quimiocinas en respuesta al estímulo con LPS.....	34
3.	Perfil de secreción de las quimiocinas en medios condicionados.....	36
3.1.	Secreción de MCP-1.....	36
3.2.	Secreción de MIP-1 $\alpha$ .....	37
3.3.	Secreción de RANTES.....	39
3.4.	Secreción de IP-10 .....	40
4.	Efecto de los medios condicionados sobre la quimiotaxis de LAS CMCU .....	41
4.1.	Controles de migración.....	41
4.2.	Número de células migrantes en respuesta a medios condicionados. ....	42
5.	Inmunofenotipificación de las CMCU migrantes .....	43
5.1.	Migración de las subpoblaciones de CMCU en respuesta a medios condicionados por la Coriodecidua.....	44
5.2.	Migración de las subpoblaciones de CMCU en respuesta a medios condicionados por el Amnios.....	45
6.	Perfil de secreción de PECAM-1 en los medios condicionados .....	46
<b>VIII.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>48</b>
<b>IX.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>56</b>
<b>X.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>56</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la organización de la placenta.....	2
Figura 2. Componentes de la interfase materno-fetal y composición de las membranas corioamnióticas.....	5
Figura 3. Estructura de la PRL.....	14
Figura 4. Cascada de señalización de la PRL.....	15
Figura 5. Perfil de secreción de PRL durante el embarazo en los compartimentos materno y fetal.....	17
Figura 6. Diseño experimental del cultivo y tratamiento de las membranas corioamnióticas para obtener los medios condicionados.....	26
Figura 7. Diseño experimental del ensayo de migración, el conteo celular y la inmunofenotipificación de las CMCU migrantes.....	30
Figura 8. Dot-plot representativo de la inmunofenotipificación de las CMCU.....	33
Figura 9. Esquema integrativo de la respuesta de las membranas corioamnióticas ante el estímulo de LPS y el co-estímulo de LPS y PRL.....	55

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Proliferación de la línea celular Nb2 en respuesta a PRL.....	34
Gráfica 2. Secreción de quimiocinas en condiciones control y en respuesta al tratamiento con LPS a lo largo de un periodo de cultivo de 72h.....	35
Gráfica 3. Secreción de MCP-1 en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas.....	37
Gráfica 4. Secreción de MIP-1 $\alpha$ en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas.....	38
Gráfica 5. Secreción de RANTES en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas.....	39
Gráfica 6. Secreción de IP-10 en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas.....	40
Gráfica 7. Controles de migración.....	42
Gráfica 8. Migración de células mononucleares inducida por los medios condicionados provenientes de membranas corioamnióticas en respuesta a distintos tratamientos.....	43
Gráfica 9. Migración de las subpoblaciones de leucocitos en respuesta a medios condicionados por la coriodecidua (CHD) con diferentes tratamientos.....	44
Gráfica 10. Migración de las subpoblaciones de leucocitos en respuesta a medios condicionados por el amnios (AMN) con diferentes tratamientos.....	45
Gráfica 11. Secreción de PECAM-1 en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas.....	47

# ABREVIATURAS

**ADN:** ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO

**APC:** ALOFICOCIANINA

**BSA:** ALBÚMINA SÉRICA BOVINA

**CCL:** LIGANDO DE QUIMIOCINA C-C (POR EJEMPLO: CCL3, CCL5, ETC.)

**COX:** CICLOOXIGENASA (POR EJEMPLO: COX-2, ETC.)

**DMEM:** DULBECCO MODIFIED EAGLES MINIMAL ESSENTIAL MEDIUM

**dNK:** ASESINA NATURAL DECIDUAL

**E<sub>2</sub>:** ESTRADIOL

**EDTA:** ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO

**ELISA:** ENSAYO POR INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS

**EVT:** TROFOBLASTO EXTRAVELLOSO

**FITC:** ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA

**G-CSF:** FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS

**GM-CSF:** FACTOR ESTIULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MONOCITOS

**HCG:** GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA

**HLA:** ANTÍGENO LEUCOCITARIO HUMANO (POR EJEMPLO: HLA-A, ETC.)

**ICAM-1:** MOLÉCULA 1 DE ADHESIÓN INTERCELULAR

**IFN- $\gamma$ :** INTERFERÓN GAMA

**IL:** INTERLEUCINA (IL-1, IL-2... ETC.)

**IL-1B:** INTERLEUCINA 1 BETA

**IMSS:** INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**INPER-IER:** INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA "ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES"

**IP-10:** PROTEÍNA 10 INDUCIBLE POR INTERFERÓN GAMA

**JAK 2:** CINASA DE JANUS (POR EJEMPLO: JAK-2, ETC.)

**KIR2DL4:** RECEPTOR CON DOS DOMINIOS IG Y COLA CITOPASMÁTICA LARGA 4 COMO INMUNOGLOBULINA DE CÉLULAS ASESINAS

**LIF:** FACTOR INHIBIDOR DE LEUCEMIA

**LILRB:** RECEPTOR DE LA SUBFAMILIA B COMO INMUNOGLOBULINA DE LEUCOCITOS

**MCH:** COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

**MCP-1:** PROTEÍNA 1 QUIMIOATRAYENTE DE MACRÓFAGOS

**MIP-1 $\alpha$ :** PROTEÍNA 1 ALFA INFLAMATORIA DE MACRÓFAGOS

**MIP-1 $\beta$ :** PROTEÍNA 1 BETA INFLAMATORIA DE MACRÓFAGOS

**MMP:** METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

**NF- $\kappa$ B:** FACTOR NUCLEAR POTENCIADOR DE LAS CADENAS LIGERAS KAPPA DE LAS CÉLULAS B ACTIVADAS

**NK:** ASESINA NATURAL

**NKT:** ASESINAS T NATURALES

**P4:** PROGESTERONA

**PE:** FICOERITRINA

**PECAM-1:** MOLÉCULA 1 DE ADHESIÓN MOLECULAR CELULAR ENDOTELIAL PLAQUETARIA

**PERCP:** PROTEÍNA CLOROFILA PERIDININA

**PLR-R:** RECEPTOR DE PROLACTINA

**pNK:** ASESINAS NATURALES PERIFÉRICAS

**PRL:** PROLACTINA

**RANTES:** REGULACIÓN POR ACTIVACIÓN EXPRESADA Y SECRETADA POR LINFOCITOS T

**RPMI:** ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE

**SFB:** SUERO FETAL BOVINO

**SSF:** SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA

**STAT:** TRANSDUCTOR DE SEÑAL Y ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN

**TIMP:** INHIBIDOR TISULAR DE METALOPROTEINASA (POR EJEMPLO TIMP2, ETC.)

**TNF- $\alpha$ :** FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA

**T<sub>REG</sub>:** LINFOCITOS T REGULADORES

**UMAE- LCA:** UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD “LUIS CASTELAZO AYALA”

**VCAM:** MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR VASCULAR

## RESUMEN

El embarazo es un evento fisiológico único, que se define por una compleja regulación entre los elementos endocrinos e inmunológicos maternos y fetales para generar un estado de tolerancia inmunológica en el útero.

El proceso de trabajo de parto representa el fin del estado de tolerancia inmunológica del embarazo, tiene la característica de ser un proceso inflamatorio, en donde se secretan mediadores bioquímicos que generan una respuesta específica en los tejidos de la interfase materno-fetal; como parte de este proceso se realiza un infiltrado de leucocitos en el miometrio, cérvix y membranas corioamnióticas. Las membranas corioamnióticas tienen la propiedad de actuar como una barrera física e inmunológica que “aísla” al feto dentro de un ambiente privilegiado; durante el trabajo de parto se ha propuesto que poblaciones específicas de leucocitos se infiltran en estos tejidos, creando un microambiente inflamatorio y secretando mediadores que promuevan la ruptura de esos tejidos.

Por otro lado, la PRL es una hormona proteica secretada por la decidua y transportada a través de las membranas corioamnióticas hacia el líquido amniótico donde alcanza una concentración de 4,000-5,000 ng/mL alrededor del segundo trimestre del embarazo, posteriormente la concentración de esta hormona disminuye gradualmente, coincidiendo sus valores más bajos con las primeras señales de trabajo de parto; a nivel experimental se ha descrito que esta hormona ejerce efectos anti-inflamatorios, disminuyendo la secreción de citocinas y quimiocinas en las membranas corioamnióticas y la placenta.

En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar si el efecto regulador de la PRL sobre la secreción de quimiocinas por las membranas fetales en respuesta a LPS de *Escherichia coli* (*E.coli*), se ve reflejado en la cantidad y fenotipo de células mononucleares de cordón umbilical quimioatraídas por los medios condicionados realizando ensayos de migración con la cámara de Boyden.

Para ello se utilizaron muestras de membranas corioamnióticas y sangre venosa de cordón umbilical (n=6) provenientes de mujeres con embarazos normo-evolutivos a término. Para obtener los medios condicionados a utilizar en los ensayos de migración, las membranas fueron cultivadas en el sistema Transwell de dos compartimentos independientes en el cual se realizó un pre-tratamiento de ambos compartimentos (coriodecidual y amniótico) con PRL a una concentración de 4,000 ng/mL durante 24 horas. Posteriormente los tejidos fueron tratados con LPS [500 ng/mL] para mimetizar un proceso inflamatorio y co-tratados con LSP + PRL durante 24 horas.

En los medios condicionados se determinó la concentración de las quimiocinas MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, IP-10 y la molécula de adhesión PECAM-1 mediante ELISA.

Para los ensayos de migración se aislaron las células mononucleares de la sangre venosa del cordón umbilical (CMCU), las cuales se cultivaron a una densidad de

1x10<sup>6</sup> células/350 µl de medio en la cámara superior del sistema Transwell con poro de 8 µm, mientras que en la cámara inferior se colocaron los medios condicionados. Este sistema se incubó por una hora a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>, posterior a este tiempo el número de células migrantes se determinó mediante el ensayo CyQUANT® e inmunofenotipificadas por citometría de flujo para determinar las poblaciones positivas a los marcadores CD3 (linfocitos T), CD56/CD16 (células NK), CD19 (linfocitos B) y CD14 (monocitos).

Los resultados muestran que en comparación con la condición control, el tratamiento con LPS incrementó de manera significativa la secreción de PECAM-1, MCP-1, MIP-1α, RANTES e IP-10 en los medios condicionados, en donde MCP-1 se secreta de forma similar en corion y amnios, y el resto de los factores se secreta predominantemente por la coriodesidua. El co-tratamiento con PRL disminuyó de manera significativa la secreción de MCP-1 y MIP-1α en la coriodesidua y no se observó la disminución significativa de las quimiocinas en la región amniótica; por otro lado, PECAM-1 disminuyó su secreción de forma significativa en las regiones coriodesidual y amniótica.

En los ensayos de migración, los medios condicionados por el amnios en respuesta a LPS incrementaron de manera significativa la migración de CMCU en comparación con la condición control, y el co-tratamiento con PRL fue capaz de disminuir significativamente la migración de células en la región amniótica; en cuanto a la fenotipificación, observamos que los linfocitos T fueron la única población regulada significativamente en respuesta a los medios condicionados, incrementando su migración en los medios condicionados por el amnios en respuesta a LPS y disminuyendo su migración en los medios condicionados por el amnios en respuesta el co-tratamiento con PRL.

Este trabajo demuestra que la PRL es capaz de actuar indirectamente para regular la actividad quimiotáctica selectiva mostrada por las membranas corioamnióticas humanas durante un proceso inflamatorio.

# I. INTRODUCCIÓN

El embarazo representa una condición fisiológica única y compleja, ya que es el resultado de múltiples adaptaciones en el sistema materno (Racicot, Kwon, Aldo, Silasi, & Mor, 2014), para asegurar el adecuado crecimiento y desarrollo del feto dentro del útero materno durante al menos 37 semanas, que es en promedio el tiempo que dura un embarazo en el humano.

En el cuerpo humano el conjunto de moléculas, células y tejidos encargados de reconocer lo propio y lo ajeno, responder y mediar la resistencia a infecciones es llamado sistema inmunológico (Abbas, Lichtman, Pillai, Baker, & Baker, 2015); por lo que este sistema es el encargado de vigilar, proteger y mantener la homeostasis del organismo y permitir su adaptación al medio o a condiciones fisiológicas particulares.

Considerando que el feto es un organismo genéticamente diferente a la madre, una adaptación indispensable durante el embarazo debe ocurrir en el sistema inmune materno para que en el útero se establezca una respuesta de tolerancia al feto.

En 1953 Peter Medawar planteó los posibles mecanismos inmunológicos involucrados en el mantenimiento del embarazo; él propuso que el feto es capaz de sobrevivir en el vientre materno debido a cuatro condiciones:

1. La respuesta inmune materna se encuentra suprimida.
2. La falta de expresión antigénica por parte de los tejidos fetales.
3. El útero es un sitio inmunológicamente privilegiado.
4. La separación anatómica entre la madre y el feto.

Actualmente, se sabe que la respuesta inmune materna no se encuentra suprimida sino regulada, y que tanto el feto como la madre participan de manera activa en la regulación del ambiente inmunológico a nivel local, que hace del útero un sitio de privilegio inmunológico, esto quiere decir que se establece una tolerancia hacia el feto para desarrollarse en un ambiente potencialmente hostil, mientras se preservan los mecanismos inmunológicos maternos para brindar protección contra retos microbianos (Aghaeepour et al., 2017).

# 1. ESTRATEGIAS QUE FAVORECEN LA TOLERANCIA MATERNO-FETAL

Si bien no existe una total comprensión de cómo funcionan los mecanismos que conllevan a la tolerancia inmunológica al feto, se ha avanzado mucho en el conocimiento de las estrategias que favorecen la tolerancia materno-fetal y el establecimiento del privilegio inmunológico durante el embarazo, dentro de los cuales se pueden mencionar estrategias de tipo anatómicas, inmunológicas y endocrinas.

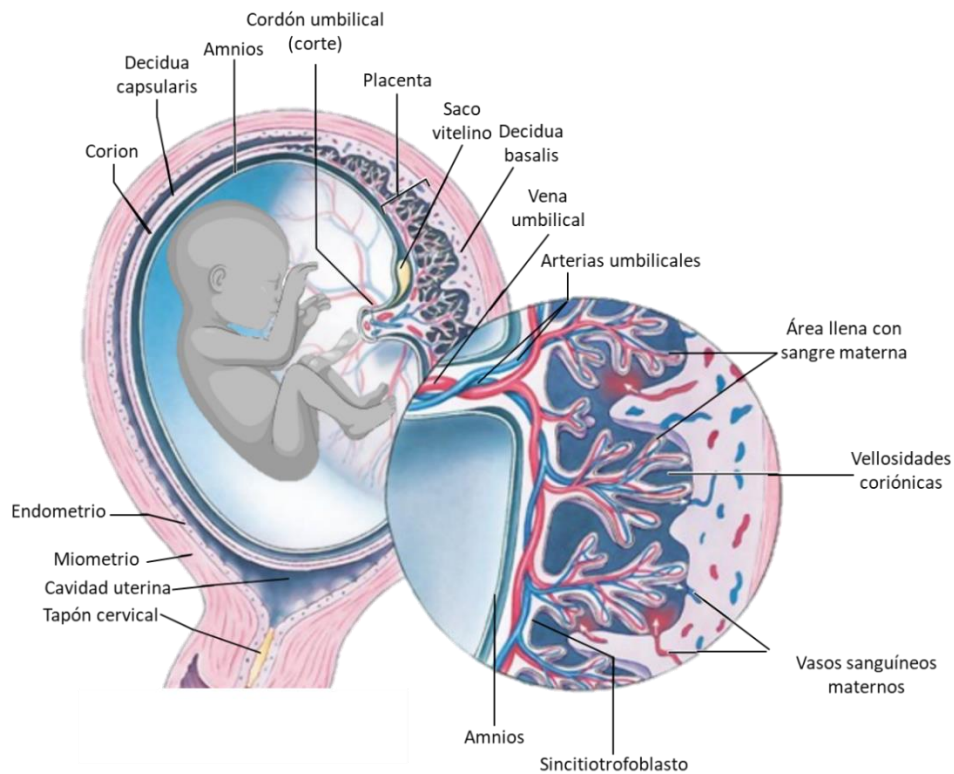


Figura 1. Diagrama de la organización de la placenta (LaPres, J., 2015).

## 1.1. ESTRATEGIAS ANATÓMICAS

### 1.1.1. FORMACIÓN DE LA INTERFASE MATERNO-FETAL

El modelo de la separación anatómica entre la madre y el feto ha sido reemplazado por el modelo de la formación de la interfase materno-fetal. Esto ocurre después de la implantación del blastocisto en el lumen del epitelio endometrial, donde se lleva a cabo el proceso de invasión por parte de las células del trofoblasto, las cuales darán origen a la compleja estructura de la placenta y parte de las membranas corioamnióticas. En este sentido, la interfase materno-fetal hace referencia a la región donde la mucosa uterina (decidua), la placenta y las membranas corioamnióticas se encuentran en estrecho contacto (Shivhare, Bulmer, & Lash, 2015).

#### 1.1.1.1. *DECIDUA MATERNA*

La decidua es un tejido transitorio que se origina a partir de las células estromales del revestimiento endometrial del útero que se transforman por la acción directa de la progesterona y el estradiol. La decidua puede subdividirse en 3 áreas dependiendo de su localización: la decidua *basalis* corresponde al lugar de implantación y desarrollo de la placenta, además de ser el sitio de contacto primario entre tejidos maternos y fetales; la decidua *capsularis* está adherida a las membranas corioamnióticas, mientras que la decidua *parietalis* se encuentra en el resto de la cavidad uterina. A la decidua se le atribuye la función de controlar la invasión del trofoblasto, la función nutricia del blastocisto y mediar la tolerancia inmunológica de la madre (Bryant-Greenwood, 1998; Shivhare et al., 2015).

#### 1.1.1.2. *PLACENTA*

El desarrollo de la placenta presenta una organización progresiva y funcional que da como resultado una circulación de tipo hemocorial, lo que quiere decir que la sangre materna y la sangre fetal quedan aisladas la una de la otra. Esta separación se da porque las vellosidades coriónicas se encuentran suspendidas en la sangre materna, por lo que se conocen como vellosidades flotantes, mientras que aquellas que se fijan a la decidua materna se conocen como vellosidades de anclaje. Las vellosidades flotantes están rodeadas por el sinciotiotrofoblasto, un tipo de trofoblasto multinucleado las cuales son fuente primordial de células citotrofoblásticas que proliferan, se diferencian y migran hacia el endometrio decidualizado y hacia la tercera parte interna del miometrio como células del trofoblasto extravelloso (EVT, por sus siglas en inglés). La invasión por parte del trofoblasto hacia las arterias espirales maternas remodela su estructura,



provocando un incremento en su grosor y un estado de vasodilatación constante, que disminuye la resistencia de los vasos sanguíneos maternos y aumenta el flujo de la sangre materna hacia el espacio intervelloso. Este acomodo estructural hace que la sangre materna esté en contacto directo con las células del trofoblasto fetal y, de esta forma se asegura un suministro suficiente de nutrientes y oxígeno hacia la placenta (Shivhare et al., 2015).

### 1.1.1.3. MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS

Las membranas corioamnióticas se desarrollan a la par del feto y la placenta, representan una barrera física e inmunológica que resguarda al feto dentro de la cavidad amniótica, por su capacidad selectiva mantienen el balance entre los fluidos maternos y fetales (Bryant-Greenwood, 1998).

Las membranas corioamnióticas constituyen una entidad histológicamente compleja conformada por el empalme del amnios y el corion, los cuales tienen una composición única de tejido conectivo y diversos tipos celulares, y no es sino hasta la semana 15 de la gestación que sus capas se encuentran completamente formadas.

El amnios no contiene vasos sanguíneos ni nervios, por lo cual los nutrientes que requiere los obtiene directamente del líquido amniótico. El amnios está formado por cinco capas distintas: 1) el epitelio amniótico, que corresponde a una capa simple de epitelio cúbico retenido entre sí mediante uniones gap, estas células secretan colágeno de tipo III y IV, además de glicoproteínas como laminina, nidógeno y fibronectina que forman la siguiente capa que corresponde a 2) la membrana basal; en esta capa, se forman uniones que permiten la comunicación del epitelio con la matriz extracelular y su composición le confiere una gran resistencia mecánica y fuerza tensil frente al estrés mecánico de los movimientos del feto. 3) La capa compacta formada de tejido conectivo forma el esqueleto fibroso del amnios; 4) la capa fibroblástica secreta los colágenos necesarios para la capa compacta por medio de células mesenquimales; finalmente se encuentra 5) la capa intermedia, la cual está adyacente al corion y es abundante en proteoglicanos hidratados, glicoproteínas y colágeno tipo III que le dan su aspecto esponjoso en preparaciones histológicas; ésta capa absorbe el estrés físico al permitir que el amnios sea capaz de deslizarse sobre el corion subyacente que se encuentra firmemente adherido a la decidua materna.

El corion está en contacto con la decidua por un lado y por el otro con el amnios; por otro lado se compone de cuatro capas: 1) Una capa celular, 2) una capa reticular formada principalmente de fibroblastos y macrófagos, 3) una membrana pseudo-

basal y 5) una capa de células trofoblásticas embebidas en una matriz extracelular más laxa que la del amnios (Figura 1) (Bryant-Greenwood, 1998; Martin, Richardson, & Menon, 2018; Parry & Strauss, 1998).

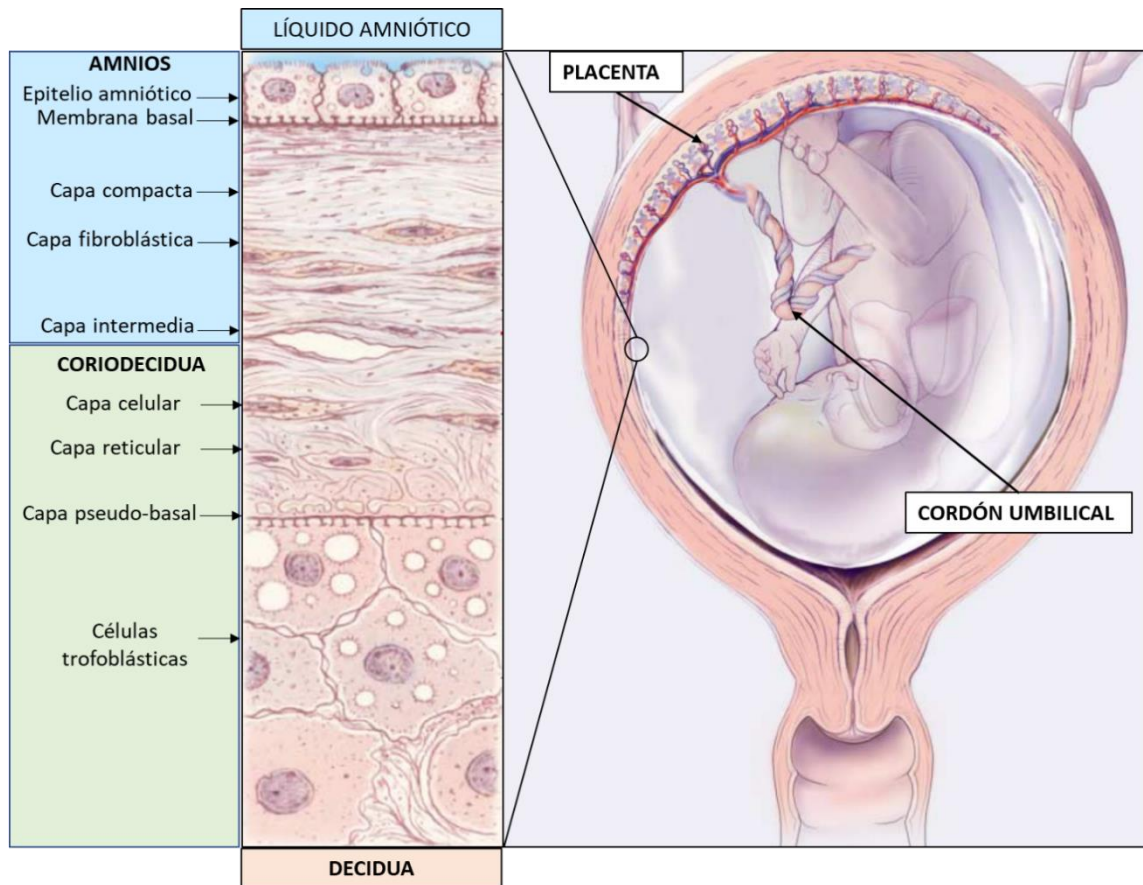


Figura 2. Componentes de la interfase materno-fetal y composición de las membranas corioamnióticas (Goldenberg, & Andrews, 2000).

## 1.2. ESTRATEGIAS INMUNOLÓGICAS

### 1.2.1. EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA NO CLÁSICAS

Las células del trofoblasto fetal juegan un papel importante en la tolerancia inmunológica durante el embarazo, ya que no expresan las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de clase I (HLA-A y HLA-B) y clase II; la ausencia de estas moléculas de superficie celular asegura que las células T maternas no sean capaces de

reconocer a través de su receptor TCR los antígenos del feto heredados del padre, ni montar una respuesta citotóxica clásica hacia las células fetales (Weetman, 1999).

Adicionalmente, el EVT expresa la molécula clásica de clase Ia (HLA-C) y las moléculas no clásicas de clase Ib (HLA-E y HLA-G), mientras que el corion sólo expresa HLA-E y HLA-G, pero no HLA-C. Esta selectividad de expresión permite la comunicación con los leucocitos uterinos los cuales son altamente receptivos a estas moléculas. HLA-G es reconocido a través de los receptores de inhibición KIR2DL4 y LILRB de las células NK deciduales (dNK's), evitando la activación del proceso de citólisis mediada por estas células y por lo tanto el daño al trofoblasto (Hunt, 2006; Weetman, 1999).

## 1.2.2. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL

Además de células estromales, la decidua está compuesta aproximadamente por un 40% de leucocitos. Durante el primer trimestre del embarazo, en la decidua *basalis*, las células dNK representan el 70% de la población, seguido de un 20-25% de macrófagos, después se encuentra un 3-10% de linfocitos T, mientras que las células dendríticas, linfocitos B y células NKT se mantienen escasas. Estos leucocitos son atraídos por gradientes de quimiocinas producidas por las células estromales y los trofoblastos; además tienen la característica de ser distintas de las encontradas en sangre periférica en cuanto a fenotipo y función (Ander, Diamond, & Coyne, 2019).

### 1.2.2.1. CÉLULAS dNK

Las células dNK se caracterizan por su fenotipo CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup>, contienen niveles igualmente altos de las moléculas citolíticas (perforina y granzima B) como las NK circulantes, pero a diferencia de estas, las dNK producen un vasto arreglo de factores de crecimiento, factores angiogénicos, quimiocinas y citocinas como GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 y LIF que contribuyen al remodelamiento de la decidua y las arterias espirales y promueven la invasión del trofoblasto. A pesar de su potencial citotóxico, las dNK se caracterizan por poseer un bajo nivel de respuesta citotóxica, asociado a la interacción entre sus receptores de inhibición y las moléculas HLA-G y E expresadas por el EVT como se mencionó anteriormente; sin embargo, se ha reportado que su capacidad citotóxica

puede ser activada por antígenos virales y factores pro-inflamatorios, de manera que estas células están altamente especializadas para favorecer la tolerancia y en caso de ser necesario proporcionar protección inmune frente a las infecciones intrauterinas (Shivhare et al., 2015).

#### 1.2.2.2. MACRÓFAGOS

Los macrófagos poseen un fenotipo CD14<sup>+</sup>, CD209<sup>+</sup> y residen en el estroma, cerca del EVT y adyacente a las arterias espirales; por lo que se propone que sus funciones principales se encuentren asociadas a la decidualización previa a la implantación del blastocisto y la remodelación de las arterias espirales. Son considerados como los encargados de mantener la homeostasis local del útero, ya que se encargan de regular la respuesta de células T adaptativas y de células NK innatas, así como de la secreción de moléculas clave en la regulación de un ambiente anti-inflamatorio como IL-10, la enzima Oxidasa de Indoleamina (IDO, por sus siglas en inglés), que cataboliza el triptófano y dificulta la activación de las células T y también son productores de la prostanglandina E<sub>2</sub> y la metaloproteasa de matriz extracelular-9 (MMP-9, por sus siglas en inglés), las cuales promueven el remodelado del tejido y facilitan la angiogénesis (Shivhare et al., 2015).

#### 1.2.2.3. LINFOCITOS T Y EL PARADIGMA T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub>/T<sub>H17</sub>/T<sub>REG</sub>

Los linfocitos T cooperadores (T<sub>h</sub>, por sus siglas en inglés) son particularmente importantes en el contexto del embarazo; así como su influencia en otras células del sistema inmune debido a su producción de citocinas, de esta forma pueden ser separados en dos subtipos de acuerdo con el perfil de citocinas que producen: El perfil T<sub>h1</sub> produce Factor de Necrosis Tumoral (TNF-α), Interferón gamma (IFN-γ, por sus siglas en inglés) e Interleucina 2 (IL-2) las cuales se encargan de promover respuesta celular; en contraste, el perfil T<sub>h2</sub> produce IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 las cuales promueven la respuesta humoral (Schejken, Tolosa, Paul, Clifton & Smith, 2012).

El paradigma entre las células T<sub>h1</sub>/T<sub>h2</sub> consiste en el sustento de un balance entre las respuestas de ambos perfiles, los cuales tiene la capacidad de adaptación de acuerdo a los requerimientos de cada fase

del embarazo. El primer trimestre del embarazo se caracteriza por un perfil  $T_h1$ , lo cual se encuentra asociado a los procesos de implantación y placentación que implican procesos de daño tisular y su subsecuente reparación, por lo que el proceso inflamatorio regulado es crucial para que se lleven a cabo de forma adecuada; en contraste, la etapa que sigue a la implantación y placentación corresponde a la del crecimiento y desarrollo fetal; y, debido a que el feto y la madre son simbióticos predomina un perfil de tipo  $T_h2$  que favorece capacidades anti-inflamatorias, de renovación tisular y anti-apoptóticas (Mor, Aldo, & Alvero, 2017).

Debido a que se han propuesto mecanismos adicionales de regulación del paradigma  $T_h1/T_h2$ , se ha expandido hacia el paradigma  $T_h1/T_h2/T_h17/T_{reg}$ . En este paradigma las células  $T_h17$ , las cuales se encuentran en útero, son secretoras de IL-17, que generalmente corresponde a un carácter pro-inflamatorio y tiene la función de proteger la interfase materno-fetal contra infecciones microbianas; análogamente se ha propuesto que las células  $T_{reg}$  funcionan como un mecanismo de control del mecanismo de  $T_h17$ ; sustentando esta idea se ha observado que una alteración en la relación  $T_h17/T_{reg}$  en el útero o la circulación materna se asocia a complicaciones en el embarazo como pérdidas gestacionales recurrentes, pre-eclampsia y parto pre-término. Durante el embarazo las células  $T_{reg}$  se encuentran también en la decidua y tienen un papel primordial en el mantenimiento de un ambiente anti-inflamatorio, evitando una respuesta efectora por parte del sistema inmune de la madre en contra de los antígenos paternos; de forma interesante estas células persisten después del parto y se acumulan rápidamente durante los embarazos siguientes, lo que sugiere una respuesta reguladora de memoria (Schejken et al., 2012; Mor et al., 2017).

### 1.3. ESTRATEGIAS ENDÓCRINAS

Hormonas como la progesterona ( $P4$ , por sus siglas en inglés), el estradiol ( $E_2$ ) y la gonadotropina coriónica humana (hCG, por sus siglas en inglés), están fundamentalmente involucradas en la regulación del ciclo menstrual y en el establecimiento del embarazo a través de sus efectos vía receptores específicos expresados por los tejidos extraembrionarios pero también por las células inmunes; estas hormonas mantienen la tolerancia fetal mediante la inhibición de respuestas

inmunes degradativas, así como por la inducción de vías de tolerancia (Schumacher, Costa, & Zenclussen, 2014).

### 1.3.1. P4 Y HCG

La P4 inicialmente es producida por el cuerpo lúteo y ha sido descrita como “la hormona del embarazo” debido a su papel indispensable para la continuidad del embarazo una vez que ocurre la fecundación del óvulo. El papel de esta hormona consiste en preparar al útero para la implantación, inducir la diferenciación de las células estromales en células deciduales, regular la respuesta inmune mediante la inducción de citocinas Th<sub>2</sub> y la disminución de las Th<sub>1</sub>, además de disminuir la contractilidad de las células del músculo liso uterinas (Nair, Verma, & Singh, 2017; Schumacher et al., 2014).

Por otro lado, la hormona hCG es producida por las células del trofoblasto durante la ventana de implantación del blastocisto, sus niveles más altos y bajos se encuentran entre las semanas 10 y 17 del embarazo, respectivamente; en este tiempo la hCG mantiene los niveles de P4 mediante la inducción de su producción por el cuerpo lúteo, posterior a este tiempo, la placenta será encargada de secretar la P4. Actualmente se sabe que hCG participa activamente en la tolerancia materno-fetal, regulando la actividad deIDO, lo que reduce la actividad de las células T y altera la actividad de las células dendríticas, además es capaz de aumentar la proliferación de las dNK al tiempo que reduce la actividad de las pNK (Nair et al., 2017).

### 1.3.2. E<sub>2</sub>

Durante el embarazo, los niveles de Estradiol incrementan continuamente hasta llegar a término debido a su secreción por parte de la placenta. Después de la ovulación, en la fase lútea E<sub>2</sub> en conjunto con P4 preparan el endometrio para la implantación; es así como durante el embarazo, E<sub>2</sub> promueve el flujo de sangre uterina, el crecimiento del miometrio, la estimulación del crecimiento de las glándulas mamarias. Adicionalmente, se ha sugerido que ejerce efectos sobre el número y la función de las células del sistema inmune, lo que indica que puede contribuir a la tolerancia fetal (Nair et al., 2017; Schumacher et al., 2014).

## 2. TRABAJO DE PARTO

Alrededor de la semana 37 de la gestación, ocurren cambios endocrinos e inmunológicos que conllevan a la pérdida del ambiente inmunológico permisivo. La supresión de las condiciones de tolerancia representa el fin del embarazo y el inicio del trabajo de parto, debido a que inducen la pérdida de la quiescencia uterina, y alteran la integridad tanto estructural como funcional de la decidua, la placenta y las membranas corioamnióticas.

El proceso de trabajo de parto involucra tres procesos fisiológicamente interdependientes y coordinados:

- a) Inicio de contracciones uterinas coordinadas, las cuales incrementan en amplitud y frecuencia conforme avanza el trabajo de parto
- b) Remodelamiento del cérvix (dilatación)
- c) Activación de la decidua y las membranas fetales (Mendelson, 2009).

El cambio del útero de un estado quiescente a un estado activo donde se generen contracciones de forma efectiva y coordinada implica un cambio en las señales de un perfil anti-inflamatorio hacia uno pro-inflamatorio, este cambio está asociado a la activación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B. La activación de NF- $\kappa$ B incrementa la expresión y transcripción de genes de la respuesta inflamatoria como las citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6, la quimiocina IL-8 y marcadores de inflamación como la prostaglandina F $_2\alpha$ , el receptor de oxitocina y ciclooxigenasa-2 (COX-2, por sus siglas en inglés), así como la proteína de unión conexina 43 cuyo incremento en las células uterinas, las hace responder de manera uniforme a las señales bioquímicas, de manera que pueden contraerse y relajarse como una unidad, lo cual incrementa la potencia de las contracciones (Mendelson, 2009).

En el cérvix se generan cambios ocasionados por el aumento de marcadores pro-inflamatorios para permitir la dilatación del canal de vaginal por donde se expulsa el feto. IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  generan un aumento en la producción de MMP-1, MMP-3, MMP-9 y catepsina S; adicionalmente, IL-1 $\beta$  causa una disminución en la regulación de la expresión del inhibidor tisular de metaloproteasa-2 (TIMP-2, por sus siglas en inglés) el cual es un inhibidor de MMP-2. En conjunto, estas proteínas digieren el colágeno y las fibras de elastina presentes en la matriz extracelular del cérvix; aunado a esto el aumento de glucosaminoglicanos y cambios en la barrera epitelial,

disminuyen la fuerza tensil del cérvix y constituyen un proceso clave para que se lleve a cabo la dilatación (Peltier, 2003; Roberto Romero, Dey, & Fisher, 2014).

Por otro lado, la secreción de prostaglandina E<sub>2</sub> y el óxido nítrico por el cérvix, aumentan la permeabilidad de los vasos sanguíneos para la infiltración de leucocitos; simultáneamente la secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés) promueve la proliferación de los neutrófilos, los cuales son reclutados hacia el cérvix por los altos niveles de IL-8 en este tejido, los neutrófilos activados secretan MMP-8 y elastasa, enzimas que degradan la matriz extracelular producida por los fibroblastos cervicales, amplificando el efecto de pro-inflamatorio y degradativo en el cérvix (Peltier, 2003).

En las membranas corioamnióticas, la activación se lleva a cabo de forma similar a como se lleva a cabo en el cérvix. Durante el trabajo de parto, la producción de IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  se incrementa en las membranas corioamnióticas; así como la cantidad de MMP-9, MMP-8; adicionalmente disminuyen los niveles de TIMPs lo cual provoca el incremento en la actividad colagenasa y por ende la disolución de los elementos de la abundante matriz extracelular que compone a estos tejidos. Además, los marcadores de inflamación inducen el proceso de apoptosis en estos tejidos causando que se debilite su fuerza tensil y se pierda la integridad estructural de los mismos ocasionando la ruptura de las membranas en las últimas etapas del trabajo de parto (Peltier, 2003; Romero et al., 2014).

## 2.1. QUIMIOTAXIS EN LOS TEJIDOS EXTRAEMBRIONARIOS

Como parte del proceso de trabajo de parto, se lleva a cabo el reclutamiento e infiltración de leucocitos en el miometrio, cérvix y membranas fetales (Gomez-Lopez, Laresgoiti-Servitje, Olson, Estrada-Gutiérrez, & Vadillo-Ortega, 2010), la importancia de este mecanismo en el trabajo de parto recae en el efecto amplificador de las señales pro-inflamatorias que se dan en la interfase materno-fetal y que resultan irreversibles.

El reclutamiento de leucocitos del espacio intravascular hacia el sitio de infección o inflamación depende de dos condiciones; 1) la secreción de quimiocinas y 2) la expresión de moléculas de adhesión (Gomez-Lopez, Laresgoiti-Servitje, et al., 2010).

Las quimiocinas constituyen una superfamilia de pequeñas citocinas quimiotácticas, las cuales ejercen sus efectos a través de receptores acoplados a proteínas G. Basadas en la estructura de su motivo, incluido el nombre y posición de dos residuos conservados de cisteína, se clasifican en subfamilias: los grupos CXC, CC, CX3C y



C o los  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Las funciones principales de las quimiocinas consisten en la estimulación direccional de células inmunológicas, adhesión y migración dentro del tejido infectado o inflamado para iniciar una respuesta inmunológica. Sin embargo, sus funciones no se limitan a la quimiotaxis, sino también a respuestas inmunológicas como la maduración de células dendríticas, el cambio de isotipo de anticuerpo en linfocitos B, así como la activación y diferenciación de células T (Du, Wang, & Li, 2014).

Si bien las quimiocinas pueden ser secretadas por diversos tipos celulares incluidas las propias células inmunes; en los tejidos gestacionales, secreciones cervicovaginales y líquido amniótico, se ha hecho énfasis en las quimiocinas IL-8, CCL3 también llamada Proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa (MIP-1 $\alpha$ , por sus siglas en inglés); CCL2 o Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1, por sus siglas en inglés) y CCL5 (RANTES, por sus siglas en inglés) como las más relevantes a través del embarazo, ya que se propone que son necesarias para la atracción y activación de distintas células inmunológicas efectoras en el ambiente coriodecidual e intrauterino (Gomez-Lopez, Laresgoiti-Servitje, Olson, Estrada-Gutiérrez, & Vadillo-Ortega, 2010).

Además del incremento de las quimiocinas, las moléculas de adhesión contribuyen al reclutamiento, adhesión y migración transendotelial de los leucocitos dentro de los tejidos (Osman et al., 2004). Se ha reportado un incremento en la expresión de la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1, por sus siglas en inglés), la molécula de adhesión celular vascular (VCAM, por sus siglas en inglés), y la molécula de adhesión celular endotelial de plaquetas (PECAM, por sus siglas en inglés) en ARN mensajero proveniente de cérvix y miometrio con trabajo de parto (Ledingham et al., 2001). En las membranas corioamnióticas con trabajo de parto se ha determinado que la región coriodecidual y amniótica incrementan la expresión de ICAM-1; mientras que la región amniótica solo incrementa la expresión de PECAM en comparación con membranas sin trabajo de parto (Osman et al., 2004).

### 3. EL PARTO PRE-TÉRMINO Y LA INFECCIÓN INTRAUTERINA

El parto pre-término es definido como el nacimiento antes de la semana 37 de gestación, una de las causas asociadas a esta patología es el desarrollo de un proceso infeccioso a nivel intrauterino que explica el 30% de estos casos (Romero et al., 2014).

Evidencias clínicas y experimentales sustentan que la vía a través de la cual los microorganismos patógenos pueden acceder a la cavidad intrauterina, es mediante

la propagación ascendente de la infección desde el tracto genital bajo de la mujer embarazada, alcanzando la región coriodecidual de las membranas corioamnióticas, e incluso eventualmente ganar acceso a la cavidad amniótica, poniendo en riesgo el privilegio inmunológico de la interfase materno-fetal y el desarrollo normal del feto (Romero et al., 1988).

El ascenso de bacterias dentro de la cavidad intrauterina y/o amniótica puede estimular la producción de quimiocinas, citocinas, proteasas y factores inflamatorios, los cuales pueden iniciar de manera descoordinada los eventos que dirigen el trabajo de parto antes de que el feto haya completado su desarrollo óptimo, incrementando la morbilidad y mortalidad tanto del feto como de la madre (Cools, 2017).

### 3.1. *ESCHERICHIA COLI*

*E. coli* es el bacilo entérico gram negativo más frecuentemente encontrado en el tracto genital femenino. Dejando a un lado su papel comensal, *E. coli* extraintestinal es capaz de volverse patogénica y colonizar nuevos ambientes; siendo así el segundo agente etiológico más prevalente en la infección intrauterina y el parto pre-término. Debido a que posee diversos factores de virulencia que le permiten incrementar la colonización vaginal o endocervical de mujeres embarazadas; esta bacteria es capaz de generar distintos tipos de infecciones como lo son las infecciones intra-amnióticas, endometriales o infecciones en el tracto urinario, a veces acompañadas por sepsis. Adicionalmente, puede causar infecciones neonatales, lo que conlleva a la morbilidad y mortalidad materna y fetal (Guiral et al., 2015).

Diversos estudios demuestran el efecto negativo de *E. coli* en el embarazo; a nivel clínico, esta bacteria se ha aislado de muestras vaginales de pacientes que han presentado abortos; por otro lado, estudios han mostrado una asociación significativa entre la velocidad de recuperación de *E. coli* de cultivos cervicovaginales y parto pre-término (antes de las 37 semanas de gestación) (Cools, 2017).

Un componente de la pared celular de *E. coli* es el lipopolisacárido (LPS), esta molécula puede ser secretada por la bacteria y actuar como endotoxina, evidencias experimentales han demostrado la efectividad del LPS para inducir respuestas pro-inflamatorias, tanto en modelos animales de parto pre-término (Dickinson, Harnett, Venditti, & Smith, 2009; Harnett, Dickinson, & Smith, 2007; Takaono, Yogosawa, Okawa-Takatsuji, & Aotsuka, 2002; Xu et al., 2006) como en tejidos y células

humanas (Pilar Flores-Espinosa et al., 2014; Menon, Gerber, Fortunato, & Witkin, 2001) donde induce eficazmente la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  principalmente, generando una potente respuesta inflamatoria que compromete la continuidad del embarazo.

#### 4. PROLACTINA

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica miembro de la familia PRL/Hormona de crecimiento/Lactógeno placentario; en el genoma humano se codifica por un solo gen *PRL* el cual se encuentra en el cromosoma 6 y consiste en cinco exones, cuatro intrones y un exón no codificante. Después de la ruptura de su péptido señal, la proteína madura tiene un peso de 23 kDa y consiste de 199 aminoácidos, ordenados en una cadena simple de aminoácidos con tres enlaces disulfuro entre seis residuos de cisteína, y posee una estructura tridimensional de cuatro alfa hélices antiparalelas (Figura 2) (Bernard, Young, Chanson, & Binart, 2015; Freeman, Kanyicska, Lerant, & Nagy, 2000).

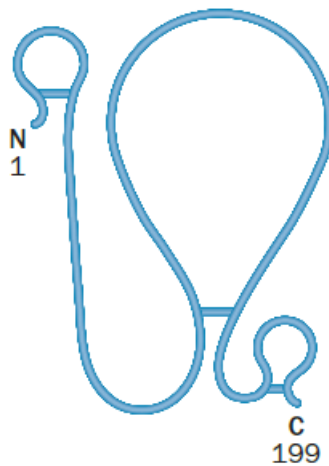


Figura 3. Estructura de la PRL (Bernard et al., 2015).

Las funciones biológicas de la PRL están mediadas por la interacción con su receptor PRL-R, un miembro de la superfamilia de los receptores de citocinas. El PRL-R es una proteína transmembranal con tres dominios: un dominio de unión al ligando extracelular (LBD), un dominio transmembrana hidrofóbico (TMD) y un dominio de señalización intracelular (ICD). La vía de señalización de PRL requiere

la dimerización del PRL-R, lo que conduce a la trans-fosforilación de los residuos de tirosina presentes en la cinasa Janus 2 (JAK 2), que está asociada con el ICD. Este evento promueve el reclutamiento de transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) 1, 3 y 5. Las STATs dimerizan y migran al núcleo para potenciar la expresión de los genes blanco (Figura 3) (Bernard et al., 2015).

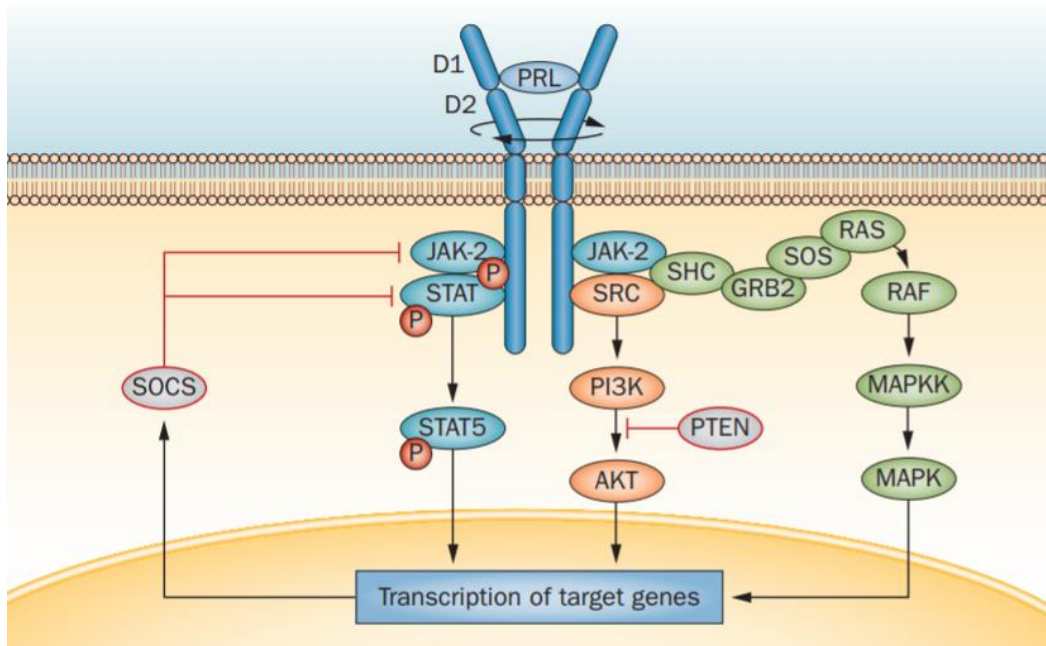


Figura 4. Cascada de señalización de la PRL (Bernard et al., 2015).

#### 4.1. PRL DURANTE EL EMBARAZO

La PRL es principalmente secretada por los lactotrofos de la glándula pituitaria anterior bajo una regulación mediada por la Dopamina; sin embargo, se han descrito sitios extrahipofisarios de secreción de esta hormona como los linfocitos, los testículos, la próstata, las células endoteliales, el cerebro, la glándula mamaria, el ovario y la decidua durante el embarazo; Se conoce muy poco acerca de las funciones que desempeña en los sitios extrahipofisarios, pero se le atribuye más de 300 funciones distintas en el organismo (Bernard et al., 2015).

Diversos estudios realizados en los 80's demostraron que la PRL participaba en la reproducción y el embarazo de manera muy específica en modelos muridos (Bao et al., 2007); de manera paralela en el humano, estudios clínicos determinaron que conforme avanza el embarazo, la concentración de PRL incrementa tanto en suero

materno como en líquido amniótico, por lo que el embarazo es considerado un evento de hiperprolactinemia fisiológica (Kletzky, Rossman, Bertolli, Platt, & Mishell, 1985).

Se sabe que el perfil de secreción de la PRL durante el embarazo involucra tres compartimentos regulados de forma independiente que son el materno, el fetal y el decidual (Figura 4) (Ben-Jonathan, LaPensee, & LaPensee, 2008).

En el suero materno el aumento de PRL comienzan a las 6-8 semanas de gestación y progresivamente alcanza concentraciones de 200 a 300 ng/mL al término del embarazo; en la circulación fetal PRL aumenta a partir de las 20-24 semanas y progresivamente alcanza niveles similares a las del suero materno al término del embarazo (Ben-Jonathan et al., 2008).

Una característica muy importante de la PRL decidual, es su capacidad de atravesar las membranas fetales y concentrarse en la cavidad amniótica, generando una distribución de PRL compartimentada (Fukamatsu, Tomita, & Fukuta, 1984; McCoshen, Tagger, Wodzicki, & Tyson, 1982). Esto genera que la concentración de PRL decidual sea de 10 a 100 veces mayor en el líquido amniótico en comparación con la PRL en la circulación materna y fetal.

De manera exclusiva en los humanos, la decidua produce grandes cantidades de PRL alcanzando niveles máximos tan altos como 4,000 –5,000 ng/ml alrededor de las semanas 16-22 de gestación, posteriormente ocurre una caída en los niveles, llegando a 400 –500 ng/ml a término (Ben-Jonathan et al., 2008).

Por otro lado, sea demostrado que todos los tejidos que componen la interfase materno-fetal expresan el PRL-R, lo que implica que son blancos directo de la PRL producida por la decidua que está presente en líquido amniótico (Maaskant, Bogic, Gilger, Kelly, & Bryant-Greenwood, 1996; Stefanoska, Jovanović Krivokuća, Vasilijić, Čujić, & Vićovac, 2013).

A pesar de que son ampliamente conocidos estos cambios en la secreción de PRL durante el embarazo, no se ha abordado lo suficiente su estudio para entender el significado biológico de los mismos. El descenso en la concentración de PRL hacia el tercer trimestre de la gestación en el líquido amniótico que parece estar relacionado temporalmente con las primeras señales de trabajo de parto, sustenta la hipótesis de que esta hormona tiene un papel clave en el control de las diferentes señales y mecanismos que activan, modifican o preparan a los tejidos de la unidad feto placentaria para el trabajo de parto, por lo que es motivo del desarrollo de este trabajo de tesis abordar el papel de la PRL sobre la capacidad de quimiotaxis de las membranas corioamnióticas humanas.

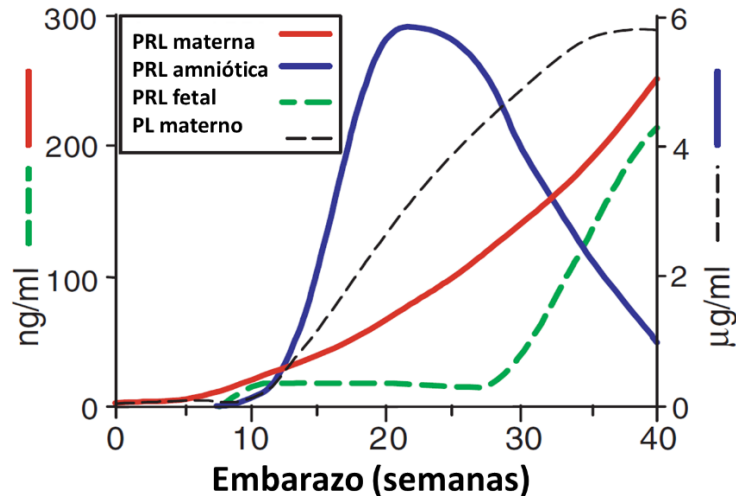


Figura 5. Perfil de secreción de PRL durante el embarazo en los compartimentos materno y fetal (Ben-Jonathan et al., 2008).

## II. ANTECEDENTES

La etiología del trabajo de parto ha sido parcialmente dilucidada a través de diversos estudios *in vivo* en ovinos, mórvidos y primates no humanos, así como estudios *in vitro* de tejidos y células humanas analizados en conjunto con la evidencia clínica. Si bien estos trabajos han demostrado que existen diferencias importantes entre las especies, también han demostrado que el trabajo de parto es un proceso inflamatorio y que, una vez iniciado este proceso, ocurre la extravasación de los leucocitos activados hacia los tejidos de la interfase materno-fetal (Nardhy Gomez-Lopez, Guilbert, & Olson, 2010; Yuan, Jordan, McInnes, Harnett, & Norman, 2009).

Particularmente las membranas corioamnióticas humanas, representan una barrera física e inmunológica, estos tejidos al no estar vascularizados no presentan poblaciones de células inmunes profesionales a diferencia del miometrio y el cérvix; sin embargo, se ha descrito que hacia el final del embarazo y durante el trabajo de parto existe una significativa infiltración de leucocitos en la coriodecuidua y el amnios (Hamilton, Tower, & Jones, 2013).

En este sentido, un aspecto relevante es la capacidad de las membranas fetales de participar activamente en el trabajo de parto, existe evidencia directa de que las membranas fetales ejercen una actividad quimiotáctica, a partir de ensayos de migración utilizando la cámara de Boyden, los extractos de membranas corioamnióticas de pacientes con trabajo de parto generaron una mayor atracción

de granulocitos, linfocitos T, linfocitos B, monocitos y células NK en comparación con extractos de membranas corioamnióticas sin trabajo de parto; esta diferencia de actividad quimiotáctica fue relacionada con una mayor concentración de quimiocinas como IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , Eotaxina, IP-10, MIP-1 $\alpha$  y RANTES en los extractos de membranas de trabajo de parto respecto con las membranas sin trabajo de parto; los autores concluyen que las membranas contribuyen a formar un microambiente compuesto por leucocitos específicos que promueve y amplifica los cambios bioquímicos en las membranas fetales durante el parto (Gomez-Lopez, Estrada-Gutierrez, Jimenez-Zamudio, Vega-Sanchez, & Vadillo-Ortega, 2009).

Considerando que un amplio número de estudios clínicos han demostrado que el trabajo de parto eutócico y el parto pre-término si bien no tienen el mismo origen, sí convergen en el desarrollo del proceso inflamatorio en los tejidos de la interfase materno-fetal, Zaga y cols. (2004) estandarizaron un modelo de cultivo *in vitro* de las membranas corioamnióticas en un sistema que permite recrear la función de barrera selectiva de estos tejidos, generando dos compartimentos independientes y así analizar la respuesta integral de las membranas. Utilizando este modelo los autores describieron que la coriodecidua y el amnios secretan un patrón diferencial de citocinas, péptidos microbianos y MMP's en respuesta al estímulo con diferentes bacterias y endotoxinas que se han asociado al parto pre-término en el humano. *S. agalactiae* (Zaga et al., 2004), *E. coli* (Zaga-Clavellina et al., 2007) y *G. vaginalis* (Zaga-Clavellina, Velasco-Muñoz, Flores-Espinosa, 2012).

Por otro lado, existen evidencias experimentales y clínicas sobre la participación de la PRL como regulador de la respuesta inflamatoria/ inmunológica en los tejidos que componen la interfase materno-fetal tanto en condiciones normales como patológicas. El tratamiento de membranas corioamnióticas humanas a término con PRL ovina (1,000 - 10,000 ng/mL) disminuyó significativamente la producción de prostaglandina E2 (de 628%- 27%) en comparación con la secreción basal (Tyson, McCoshen, & Dubin, 1985).

El tratamiento de las membranas corioamnióticas humanas a término con PRL recombinante humana (500 ng/mL) disminuyó la secreción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y MMP-9; siendo este el antecedente más directo para proponer a la PRL como regulador clave en el control de las señales proinflamatorias asociadas al trabajo de parto (Zaga-Clavellina, Parra-Covarrubias, Ramirez-Peredo, Vega-Sanchez, & Vadillo-Ortega, 2014).

Finalmente, el tratamiento de membranas corioamnióticas humanas con PRL recombinante humana (4,000 ng/mL) fue capaz de inhibir significativamente la secreción de citocinas proinflamatorias (Pilar Flores-Espinosa et al., 2017) y quimiocinas (Flores-Espinosa et al., 2019) inducidas por el estímulo con lipopolisacárido (LPS); en este sentido la PRL podría formar parte de un mecanismo

compensatorio en los tejidos para limitar el daño asociado a un estado de inflamación capaz de comprometer la continuidad del embarazo.

El hecho de que la PRL disminuya la secreción de quimiocinas capaces de exacerbar el proceso pro-inflamatorio que dirige el trabajo de parto, sugiere que esta hormona puede regular la migración de las células profesionales del sistema inmune que son quimio atraídas a la interfase materno-fetal. Es por ello que el objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la PRL sobre la capacidad quimiotáctica de cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas, determinando cuantitativamente la migración y caracterizando el perfil de las células mononucleares en respuesta a medios condicionados por cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas.

### III. JUSTIFICACIÓN

La evidencia científica sustenta que, de manera particular la PRL tiene la capacidad de inducir algunos efectos anti-inflamatorios en tejidos extraembrionarios; sin embargo, el impacto de los mismos, así como los mecanismos mediante los cuales esta hormona es capaz de ejercer sus funciones no se encuentran totalmente descritos.

Conocer los efectos de la PRL sobre la capacidad de quimiotaxis de las membranas fetales, aportará conocimiento sobre el proceso de inmuno-regulación que permite la supervivencia del feto como aloinjerto durante el embarazo además de la participación de estos tejidos en el proceso del trabajo de parto; adicionalmente se proveerá evidencia que sustente el uso de esta hormona como un posible buen candidato para ser utilizado a nivel clínico para el control de expresión de mediadores proinflamatorios asociados al trabajo de parto y también a la etiología de diversas patologías como lo pueden ser el desarrollo de una infección intrauterina, el parto pretérmino y/o la ruptura prematura de las membranas corioamnióticas que son algunas de las complicaciones asociadas al embarazo que comprometen su continuidad y provocan complicaciones fisiológicas de importancia en el recién nacido.



## IV. OBJETIVOS

### GENERAL

Evaluar si el efecto regulador de la PRL sobre las quimiocinas secretadas al medio por las membranas fetales en respuesta al LPS de *E. coli*, se ve reflejado en la cantidad y fenotipo de células mononucleares del cordón umbilical quimioatraídas por los medios condicionados haciendo uso de la cámara de Boyden ®.

### PARTICULARES

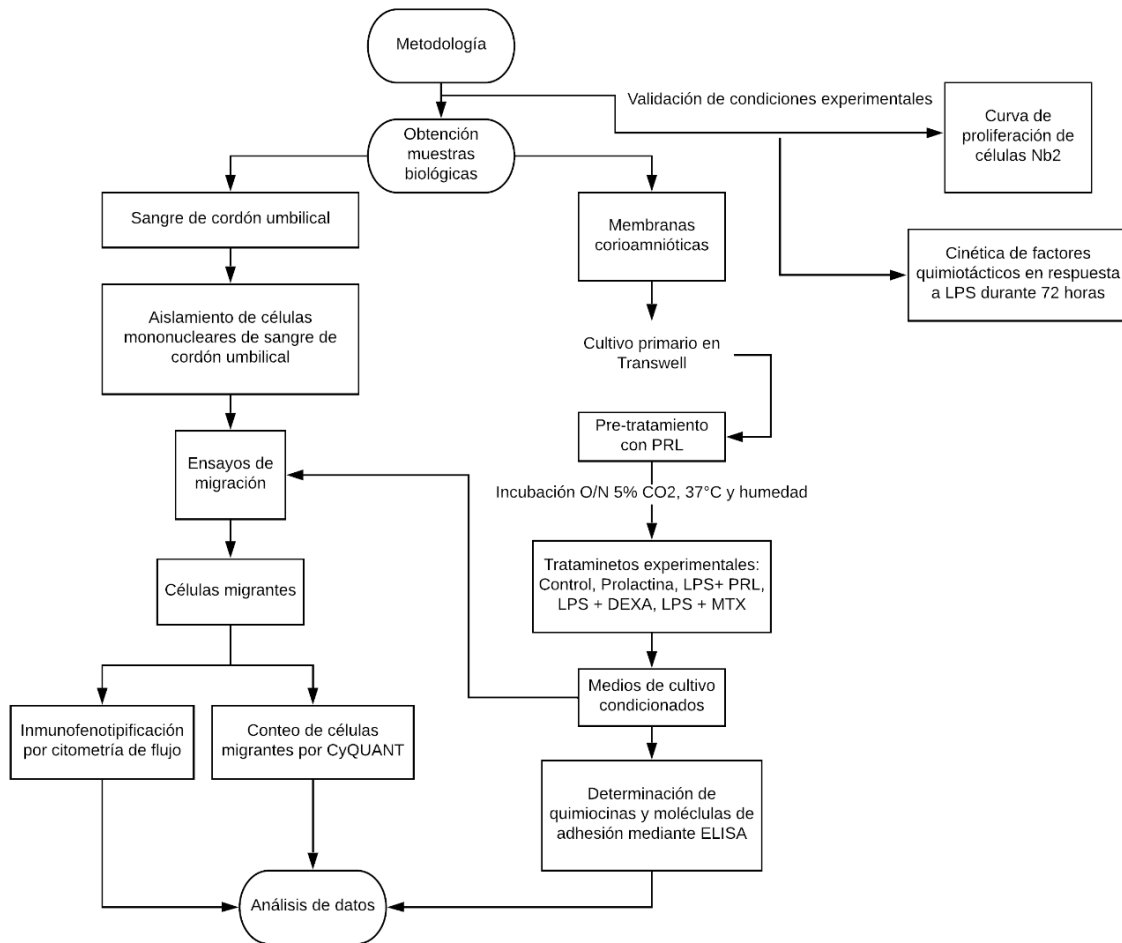
1. Realizar una curva de la secreción de las quimiocinas RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IL-8 e IP-10 por las membranas corioamnióticas en respuesta al tratamiento coriodecidual con LPS en un rango de 2-72 horas de cultivo mediante Cytometric Bead Array.
2. Determinar la concentración de las quimiocinas RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IL-8 e IP-10, así como de las moléculas de adhesión PECAM-1 (CD31) secretadas al medio por las membranas corioamnióticas después del tratamiento con LPS y el co-tratamiento con LPS y PRL mediante ELISA.
3. Estandarizar las condiciones para realizar los ensayos de migración celular con la cámara de Boyden (tiempo de migración y tamaño de poro de la membrana).
4. Cuantificar el número de células quimioatraídas hacia el compartimento inferior de la cámara de Boyden ® por los medios condicionados de las membranas corioamnióticas.
5. Determinar la frecuencia fenotípica de las células quimioatraídas hacia el compartimento inferior de la cámara de Boyden ® mediante citometría de flujo.

## V. HIPÓTESIS

Si la PRL ejerce un efecto regulador sobre las quimiocinas secretadas al medio por las membranas fetales en respuesta al LPS de *E. coli*, el uso de los medios condicionados provenientes del co-tratamiento de las membranas corioamnióticas con LPS + PRL disminuirá la quimioatracción selectiva de las subpoblaciones de células mononucleares de la sangre de cordón umbilical.

# VI. METODOLOGÍA

## 1. DIAGRAMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA



## 2. MUESTRAS BIOLÓGICAS

Este proyecto fue aprobado por el comité de ética, bioseguridad e investigación del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer IER-

212250-3210-21205-01-15); así como por la Unidad Médica de Alta Especialidad Gineco 4 Luis Castelazo Ayala (UMAЕ Gineco 4 LCA-IMSS R-2017-785-013).

Para este trabajo se obtuvieron 6 muestras de membranas corioamnióticas y de sangre venosa de cordón umbilical de mujeres con embarazos normo-evolutivos que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

Los criterios para la inclusión de las pacientes en el estudio fueron: edad materna de 20-35 años, embarazo de producto único a término (37-39 semanas de gestación) y ausencia de signos clínicos de trabajo de parto; además se realizó un análisis histopatológico para evidenciar la morfología normal y ausencia de inflamación en los tejidos.

Se excluyeron del estudio pacientes con infecciones cervico-vaginales en el tercer trimestre de embarazo, aquellas que presentaron antecedentes de alergia a la Penicilina, y patologías como sobrepeso u obesidad, polihidramnios u oligohidramnios.

Los criterios de eliminación de las muestras fueron: un resultado positivo de crecimiento bacteriano en el análisis microbiológico realizado a las membranas posterior a la toma de la muestra y señales de degradación e hinchamiento de los tejidos, y/o separación del amnios y la coriodecidua.

<b>Variable</b>	<b>Promedio ± D.E.</b>	<b>Rango</b>
<b>Edad materna (años)</b>	32.0 ± 5.2	26 - 39
<b>Edad gestacional (semanas)</b>	38.6 ± 1.0	37- 39
<b>Número de gestas</b>	2.1 ± 1.0	1 – 3
<b>Peso pre-gestacional (Kg)</b>	66.1 ± 8.0	57- 81
<b>Peso gestacional (Kg)</b>	72.6 ± 6.2	57-81

Tabla 1. Variables nominales demográficas de la población de estudio. D.E. = desviación estándar.

### 3. OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Todas las muestras se colectaron después de la entrega del producto por cesárea directamente en el quirófano.

Del cordón umbilical sujeto a la placenta se recolectó sangre de la vena umbilical mediante punción con jeringa y, posteriormente se colocó la sangre en tubos heparinizados estériles para evitar su coagulación y se transportó al laboratorio.

Las membranas corioamnióticas se separaron del disco placentario y fueron transportadas al laboratorio en un vaso copro estéril con 30 mL de solución salina fisiológica (NaCl 0.9 %) estéril (SSF estéril); las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente y fueron procesadas en un lapso de tiempo no mayor a 1 hora posterior a su obtención.

### 4. REACTIVOS

PRL recombinante humana (Peprtech; Rocky Hill, NJ, EUA), LPS de *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma; St Louis, MO, EUA), Medio DMEM (Biowest; Nuaillé, FRA), RPMI (Biowest), Hidrolizado de Lactoalbúmina (HLA) (Sigma; St Louis, MO, EUA), Dexametasona (DEXA), formulación comercial Alin (Chinoi Laboratories; Ciudad de México, MEX) y Metotrexato (MTX), formulación comercial Trixilem (Teva Laboratories; Toluca, Estado México, MEX).

### 5. ENSAYO DE BIOACTIVIDAD DE LA PRL

Para asegurarnos que la PRL recombinante humana utilizada (Peprtech®) una vez reconstituida ejercía su actividad biológica, se utilizó la línea celular Nb2 cuyo crecimiento es dependiente de PRL y el ensayo comercial de Cell Viability (Cell Signaling; Danvers, MA, EUA) basada en la determinación de la actividad metabólica mitocondrial como medida indirecta de la proliferación.

Para ello las células Nb2 se colocaron en cultivo con medio Fischer (In vitro, S.A México) en ausencia de suero fetal bovino durante 24 horas para detener su ciclo celular en la fase G<sub>0</sub>. Posteriormente, las células fueron contadas y se colocaron 50,000 células en 50 µL de medio de cultivo por pozo, en una placa de 96 pozos y se adicionaron 100 µL de medio Fischer sin suero fetal bovino con concentraciones crecientes de PRL (0, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 pg/mL). Las células se

incubaron por 72 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, humedad; posterior a este tiempo de incubación se adicionaron 40 µL a cada pozo, de una mezcla de trabajo que contenía reactivo XTT y el acoplador de electrones en una proporción 1:50. Las células se mantuvieron en cultivo por 48 horas, tras las cuales se midió la reacción colorimétrica a 492 nm en el espectrofotómetro (xMark, Bio-Rad).

## 6. CULTIVO DE MEMBRANAS FETALES

Una vez en el laboratorio y en campana de flujo laminar, las membranas corioamnióticas fueron lavadas con SSF estéril para poder eliminar coágulos de sangre adherentes; posteriormente se cortaron explantes de 2 x 2 cm<sup>2</sup>, los cuales se montaron y se sujetaron con ligas de silicón en el sistema Transwell® a los cuales previamente se les retiró la membrana de polietileno; creando así dos compartimentos (superior que corresponde al coriodescidual; e inferior que corresponde al amniótico).

Los Transwell® se colocaron en una placa de cultivo de 12 pozos en la cual se adicionó 1 mL de medio DMEM suplementado con 0.2% de hidrolizado de lactoalbúmina (HLA), piruvato de sodio 1 mM y solución antibiótico-antimicótico 1x (100 U/mL de Penicilina; 100 µg/mL de Estreptomina, 0.25 µg/mL de Anfotericina B) en ambos compartimentos superior e inferior o bien, se colocaron los tratamientos experimentales para la obtención de medios condicionados

## 7. CINÉTICA DE SECRECIÓN DE QUIMIOCINAS POR MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS EN RESPUESTA A LPS

Los explantes previamente incubados por 24 h fueron procesados en esterilidad, para remover el medio de cultivo que contenían ambas cámaras del Transwell. Posteriormente se colocó medio nuevo de la siguiente manera: El grupo control únicamente fue incubado con medio DMEM suplementado con 0.2% de HLA en ambos compartimentos. El grupo experimental fue tratado con medio DMEM suplementado con 0.2% de HLA más 500 ng/ml de LPS en el compartimento coriodescidual, mientras que el compartimento amniótico fue incubado con medio DMEM suplementado con 0.2% de HLA. Los medios de ambos compartimentos, y de las condiciones control y tratamiento se colectaron después de 2, 4, 8, 12, 24 y 48 horas de incubación a las condiciones de 37°C, 5 %CO<sub>2</sub>, humedad y se almacenaron en congelación (-70°C).

## 8. MEDICIÓN DE MARCADORES QUIMIOTÁCTICOS POR MEDIO DE CYTOMETRIC BEAD ARRAY

Para este apartado se utilizó un kit comercial de la marca BD Biosciences que requiere de la preparación de una curva, la cual se prepara partiendo de una alícuota de 250  $\mu\text{L}$  del Estándar (STD) contenido en el kit que cuenta con una concentración de 5000 ng /mL de cada una de los quimiocinas a determinar, se toman 100  $\mu\text{L}$  y se realizaron diluciones seriadas usando buffer diluyente para obtener las concentraciones de 5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5, 156, 80, 40 y 20 pg/mL.

Posteriormente se realizó el mix de reacción en donde se adicionaron 2.5  $\mu\text{L}$  de cada una de las perlas que detectan a las quimiocinas (IL-8, RANTES, MIG, MCP-1, IP-10) que se encuentran en la mezcla con anticuerpos de detección acoplados a PE, además de 12.5  $\mu\text{L}$  de reactivo de detección por cada muestra a leer.

Se realizó la dilución de las muestras en una proporción 1:10 con buffer diluyente y se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  del mix de reacción, contando la curva; se incubaron las muestras 3 horas a temperatura ambiente protegiendo los tubos de la luz.

Al finalizar la incubación se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado a cada tubo, se homogenizaron y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se retiraron 200  $\mu\text{L}$  del volumen de cada tubo cuidando de no tocar el fondo, finalmente las muestras y la curva fueron adquiridas usando el software FACSDiva 6.1.3 en un citómetro de flujo FACSAria I (BD Biosciences); y, posteriormente el análisis final se realizó utilizando el software analítico Infinicyt (Cytognos).

## 9. ESTIMULACIÓN Y OBTENCIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS CONDICIONADOS POR LAS MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS.

A diferencia del procedimiento anterior, para realizar los estímulos a las membranas y obtener los medios condicionados, una vez montados únicamente los explantes correspondientes a tratamientos con prolactina; se pre-estimularon con 4,000 ng/mL de PRL en ambos compartimentos. Todos los explantes montados en el sistema de Transwell® se colocaron en incubadora de CO<sub>2</sub> (5%), a 37°C y 95% de humedad durante 24 horas.

Posterior a la incubación de 24 horas, los medios de todos los compartimentos fueron removidos, y se sustituyeron con 1 mL de medio DMEM + 0.2% HLA fresco más cada uno de los tratamientos a evaluar: 1) control, sólo se adicionó medio suplementado a ambos compartimentos; 2) PRL, se adicionaron 4,000 ng/mL a ambos compartimentos; 3) LPS, se adicionaron 500 ng/mL sólo en el compartimento coriodesidual; 4) LPS + PRL; 5) LPS + PRL+ Metotrexato [50µM]= MTX; 6) LPS + Dexametasona [200nM]= DEXA. Los explantes fueron incubados 24 horas con los tratamientos, terminado este tiempo los medios de cada compartimento fueron colectados y almacenados a -70°C hasta su uso (Figura 5).

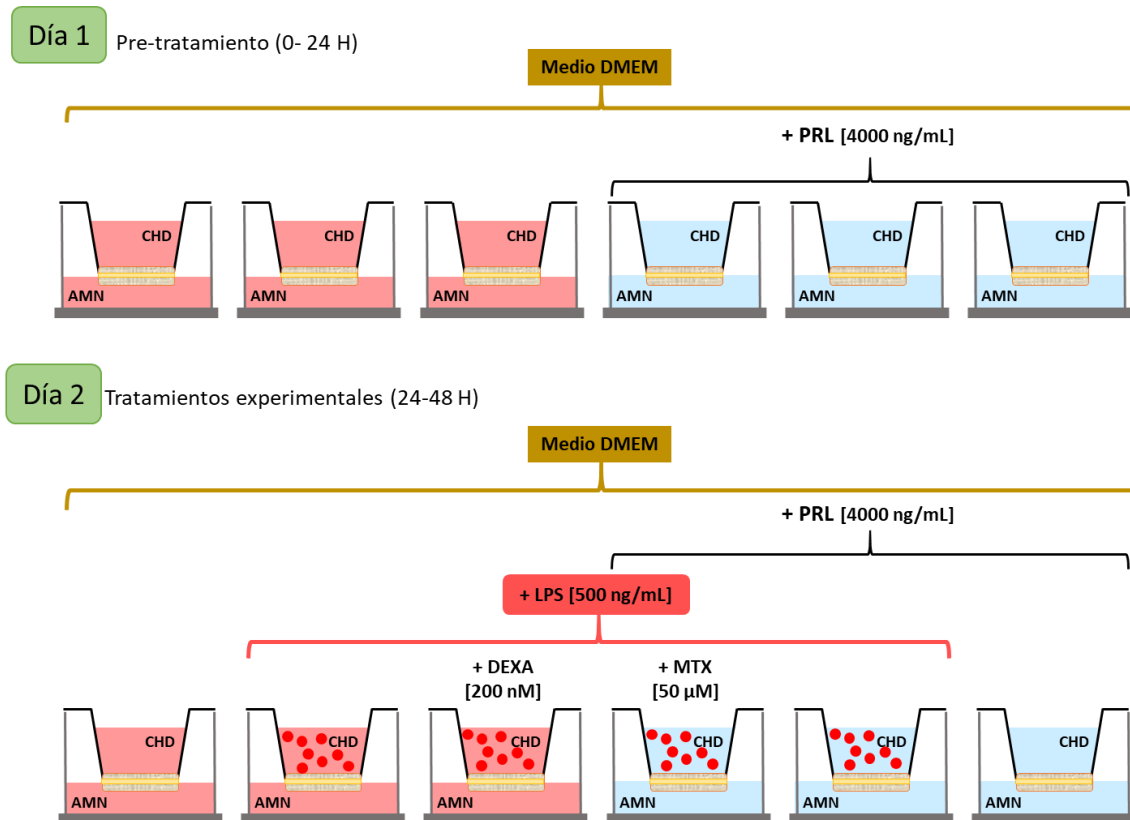


Figura 6. Diseño experimental del cultivo y tratamiento de las membranas corioamnióticas para obtener los medios condicionados.

## 10. CUANTIFICACIÓN DE QUIMIOCINAS MEDIANTE ELISA

Utilizando los medios condicionados por las membranas corioamnióticas en respuesta a los tratamientos experimentales, se determinó la concentración de RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IP-10 y PECAM-1 por medio de ensayos de ELISA comerciales de la marca Peprotech® y R&D® siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para los ensayos de ELISA todos los medios para determinar quimiocinas fueron diluidos 1:4 en el buffer de PBS-BSA (0.1%); para PECAM-1 las muestras no fueron diluidas.

Se colocaron 100  $\mu$ l del anticuerpo de captura en todos los pozos de las placas NUNC (Nalgene Nunc, Dinamarca) a la concentración indicada por el fabricante (Tabla 1) y las placas fueron incubadas toda la noche a temperatura ambiente.

Posteriormente, el exceso de anticuerpo se retiró con 300  $\mu$ l de buffer de lavado preparado con PBS 1x-Tween 20 al 0.05% (v/v); este lavado se realizó 3 veces utilizando el equipo Immunowash 1575 Bio-rad®. Posteriormente se realizó un bloqueo de los pozos para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos colocando 300  $\mu$ l de una solución de albúmina al 1% en PBS 1X en cada pozo, durante 2 horas a temperatura ambiente, al finalizar la incubación las placas se lavaron 3 veces con buffer de lavado.

Se colocaron 100  $\mu$ l de cada punto de la curva o de muestra en el pozo correspondiente y las placas se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, se lavaron las placas 3 veces con buffer de lavado. Para detectar la presencia del analito en la muestra, se agregaron 100  $\mu$ l del anticuerpo de detección a cada pozo (Tabla 1). Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se retiró el anticuerpo no adherido con 3 lavados utilizando el buffer de lavado.

Después de los lavados, se agregaron 100  $\mu$ l del conjugado estreptavidina-HRP/avidina-HRP a cada pozo, incubando por 20 min a temperatura ambiente.

Para el desarrollo de color, las placas se lavaron nuevamente con buffer de lavado y se agregaron 100  $\mu$ l del sustrato SigmaFast OPD®, se vigiló la reacción de 0-30 minutos y posteriormente las placas se leyeron a una densidad óptica de 450 nm utilizando un ajuste de curva logística de 4 parámetros (4PL) en el espectrofotómetro xMark (Bio-Rad).



Quimiocina	[Anticuerpo de captura]	[Anticuerpo de detección]	Curva	Marca
MCP-1	100 µg/mL	100 µg/mL	1,000-0 pg/mL	Peprotech
MIP-1α	100 µg/mL	100 µg/mL	4,000-0 pg/mL	Peprotech
RANTES	100 µg/mL	100 µg/mL	2,000-0 pg/mL	Peprotech
IP-10	100 µg/mL	100 µg/mL	1,000-0 pg/mL	Peprotech
PECAM-1	4 µg/mL	200 µg/mL	5,000-0 pg/mL	R&D

Tabla 2. Características específicas para la determinación de las quimiocinas por ELISA.

## 11. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL (CMCU)

La sangre de cordón umbilical fue procesada en una cabina de seguridad biológica. Las CMCU se aislaron mediante una separación por gradiente de densidad con el reactivo Lymphoprep® (STEMCELL TECHNOLOGIES, Vancouver, Canadá), siguiendo las indicaciones del fabricante, 25 mL de sangre de cordón umbilical heparinizada fue diluida en una proporción 1:1 con SSF estéril ; en un tubo de fondo cónico de 50 mL con 12 mL de Lymphoprep® se colocaron cuidadosamente 25 mL de la sangre diluida, el gradiente se centrifugó a 400g por 40 minutos y a temperatura ambiente; en donde se obtuvo un anillo blanquecino entre la fase del plasma y el Lymphoprep® que corresponde a los leucocitos; este anillo fue cuidadosamente removido y transferido a un nuevo tubo, en donde se agregaron 10 mL de SSF estéril y se centrifugó 400g por 10 minutos para lavar las células (este paso se repitió dos veces).

Posteriormente el botón celular fue resuspendido y tratado con 4 mL de solución de buffer de lisis de eritrocitos (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM y EDTA 10 mM en PBS 1X) por 7 minutos; después se repitieron los lavados con SSF estéril y los ciclos de centrifugación, finalmente se resuspendió el botón en 10 mL de medio RMPI sin suero fetal bovino (SFB) y se determinó la cantidad y viabilidad de la suspensión de células aisladas mediante un ensayo de exclusión con azul de tripán al 0.4% en PBS 1x, utilizando un hemocitómetro; las muestras utilizadas contaron con una viabilidad > 95%.

Una vez determinada la densidad celular, las muestras se centrifugaron 400g por 10 minutos y se resuspendieron en medio RPMI sin SFB para ajustarlas a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/350  $\mu$ L para proceder al ensayo de migración.

## 12. ENSAYOS DE MIGRACIÓN

Para este ensayo se utilizaron Transwell® con membranas de policarbonato con poros de 8 $\mu$ m (Costar, Kennebunk; USA). Los medios condicionados de las membranas fueron descongelados y se adicionaron 350  $\mu$ L de cada tratamiento y compartimento (coriodecidual y amnios) en placas de cultivo de 24 pozos; como controles de migración se utilizó medio DMEM 0.2% HLA (medio base del ensayo) para el control negativo, como control positivo el medio base se suplementó con 10% SFB. El SFB es comúnmente utilizado en estos ensayos, debido a que contiene diversas moléculas como lisofosfolípidos, fibronectina, vitronectina, factores de crecimiento y quimiocinas que estimulan la migración celular de forma no dependiente del tipo celular utilizado. Para evaluar los efectos *per se* de la PRL sobre la migración de las CMCU se adicionó PRL [4,000 ng/mL] en el medio base del ensayo (Figura 6; 1 y 2).

Sobre cada pozo con medio se colocó un Transwell al cual se adicionaron inmediatamente 350  $\mu$ L de suspensión de CMCU con  $1 \times 10^6$  células en las cámaras superiores del sistema Transwell; finalmente se colocó la placa en cultivo durante un periodo de 1 hora a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>, humedad (Figura 6; 3 y 4). Al término de este se procedió a realizar el procesamiento para el marcaje de las células migrantes para el análisis por citometría de flujo y el conteo celular (Figura 6; 5 y 6).

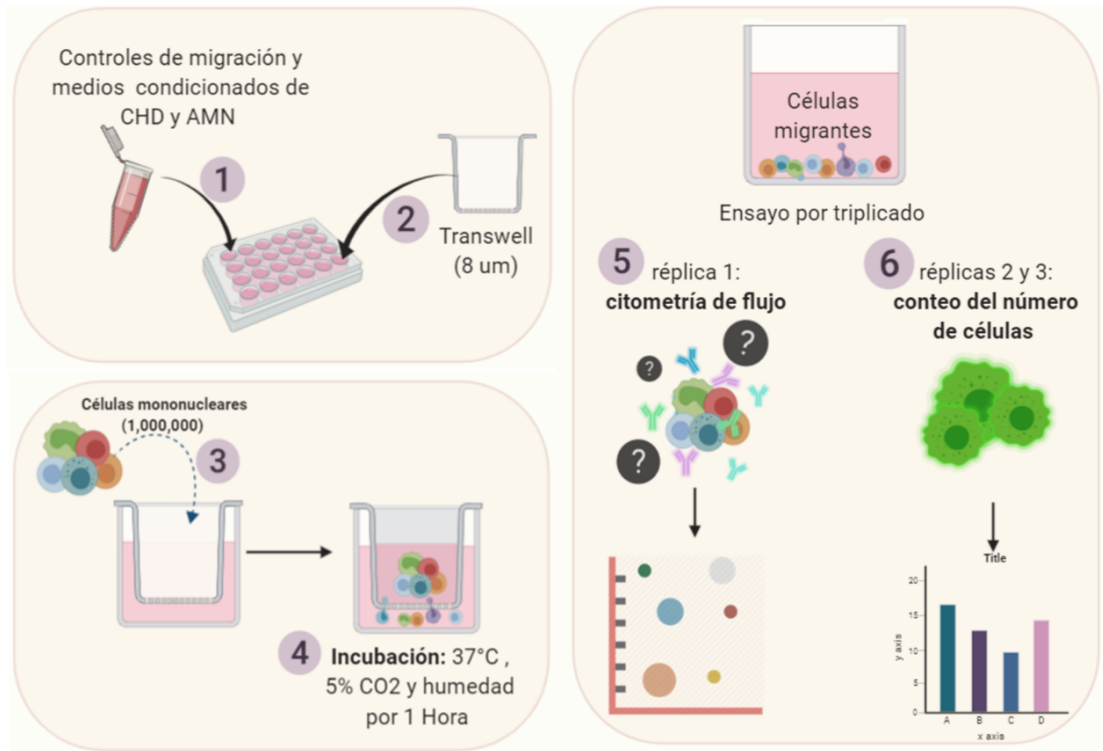


Figura 7. Diseño experimental del ensayo de migración, el conteo celular y la inmunofenotipificación de las CMCU migrantes.

### 13. CONTEO DE CÉLULAS MIGRANTES

Para el conteo celular se utilizó el kit CyQUANT® (Invitrogen, Eugene, Oregon); un ensayo basado en el contenido de ADN marcado con fluorescencia en una muestra en relación a los valores de fluorescencia de una curva conocida.

Después del ensayo de migración se consideraron como células migrantes a aquellas que atravesaron la membrana del Transwell® y se depositaron en el fondo de los pozos de la placa de cultivo (cámara inferior). El volumen total de medio contenido en la cámara inferior se colectó en un microtubo cónico de 1.5 mL; posteriormente se realizó un lavado de los pozos con 250 µL de PBS 1X en donde el volumen también fue colectado; posteriormente se realizó la adición de 250 µL de Tripsina a cada pozo, la placa se incubó por 5 minutos a 37 °C y agitación suave para desprender las células adheridas a la placa, al término de la incubación se recuperó el volumen de tripsina y se adicionó a los microtubos de los tratamientos correspondientes, previamente recuperado.

Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 minutos; cuidadosamente se retiró el medio con micropipeta y se resuspendió el botón celular con 250 µL de PBS 1X para lavarlo. Nuevamente, las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 minutos y se retiró el sobrenadante cuidadosamente, para dejar únicamente los botones celulares; y, finalmente, de acuerdo a las especificaciones del fabricante, se congelaron a -70°C para favorecer la lisis de dichas células.

Posteriormente se preparó el mix de trabajo con el buffer de lisis celular diluido 20 veces en agua destilada y el colorante CyQUANT® GR a una concentración final 5X; a razón de 200 µL por muestra.

Se preparó una curva de cuantificación a partir de un stock de células mononucleares de cordón umbilical de una concentración de  $3 \times 10^6$  células, mediante el cual se prepararon puntos de 0-700,000 células utilizando el mix de trabajo. Cada muestra de botón celular congelado y punto de la curva fueron llevados a un volumen final de 200 µL con el mix de trabajo, todas las muestras se sonicaron para asegurar la lisis efectiva de las células.

En los pozos de una microplaca para ensayos de absorción/ fluorescencia se colocaron los 200µl de cada muestra, la placa se incubó protegida de la luz y con agitación durante 30 minutos. Posteriormente se hizo una lectura de fluorescencia en el multilector de placa BioTek® Synergy HTX, utilizando un espectro de excitación/emisión de 480 nm/520 nm respectivamente; los datos obtenidos fueron analizados con el software Gen 5 de BioTek® (Winooski, VT, USA).

## 14. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La recuperación de las células de la cámara inferior de los pozos, se llevó a cabo de la misma forma que para el conteo de células, con la diferencia de que las células se colectaron en un tubo de fondo redondo de 5 mL.

Los tubos se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y se decantaron los sobrenadantes, los botones se resuspendieron en 100 µL de PBS 1x, únicamente de la muestra control se tomó una alícuota de 10 µL que se colocó en otro tubo como control de autofluorescencia.

Posteriormente se preparó un mix de trabajo adicionando 3 µL de los anticuerpos fluorocromados BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 (BD Biosciences, San Jose, CA USA) y 1 µL del anticuerpo anti-human CD14 Antibody (BioLegend, San Diego, CA), por cada muestra a marcar (Tabla 3).

<b>Estirpe a identificar</b>	<b>Marcador</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clona</b>	<b>Concentración (µg/mL)</b>
<b>Leucocitos totales</b>	CD45	PerCP	2D1 (HLe-1)	7.5
<b>Linfocitos T</b>	CD3	FITC	SK7	2.3
<b>NK</b>	CD16	PE	B73.1	2.75
	CD56	PE	NCAM 16.2	
<b>Linfocitos B</b>	CD19	APC	SJ25C1	2.3
<b>Monocitos</b>	CD14	PE/Cy7	HCD14	150

Tabla 3. Características de los anticuerpos fluorocromados utilizados para realizar el marcaje de células por citometría de flujo.

Se adicionaron 4 µL del mix a cada muestra (exceptuando el tubo de autofluorescencia) y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Después del marcaje las muestras se fijaron con la Solución FLS diluida al momento 1/10 con agua desionizada, agregando 450 µL de la Solución FLS 1X a todos los tubos, incluyendo el de autofluorescencia, las muestras se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Las muestras se lavaron con 500 µL de PBS 1X, se centrifugaron a 400 g por 5 minutos, después se decantaron los sobrenadantes por inversión; finalmente se resuspendieron las células marcadas y fijadas en 100 µL de PBS 1x y se guardaron a 4°C protegidas de la luz por no más de 3 días.

Posteriormente los datos fueron adquiridos en citómetro de flujo FACSAria I (BD Biosciences, San Jose, CA USA) y analizados con el software BD FACSDiva 8.0.2, para obtener las regiones de las subpoblaciones presentes en la muestra (Figura 8).

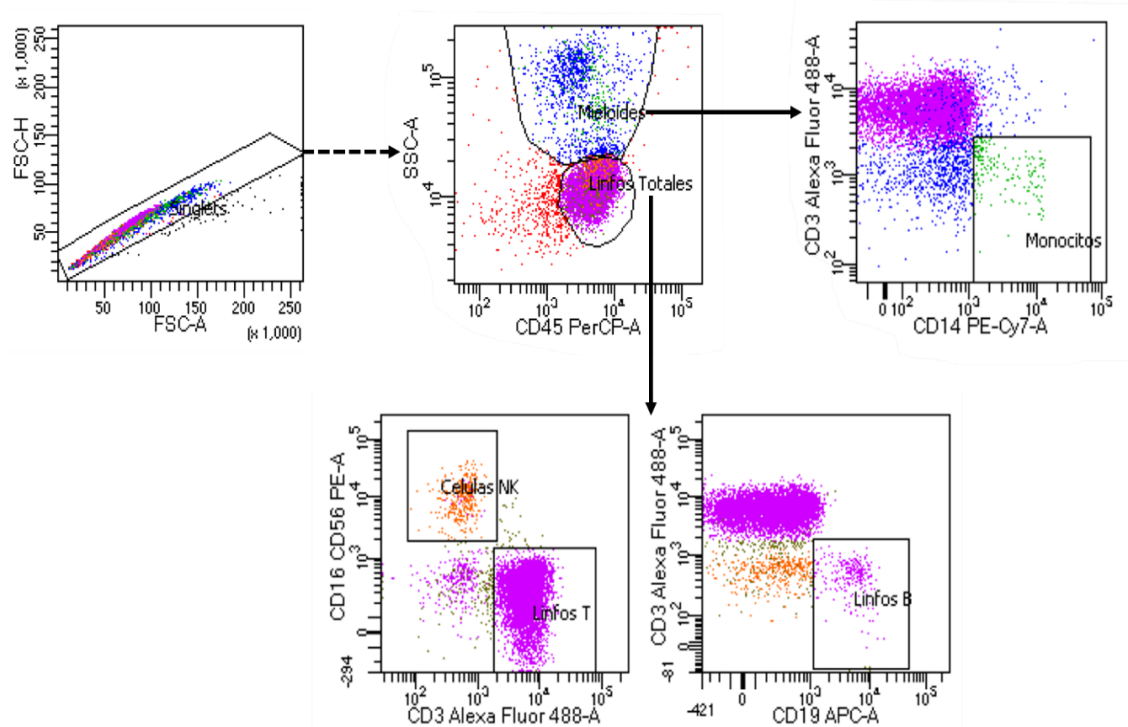


Figura 8. Dot-plot representativo de la inmunofenotipificación de las CMCU. Las regiones fueron seleccionadas a partir de una 1ª separación de células CD45+, seguido de la separación en función a la positividad para CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 y CD14.

## 15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos obtenidos de los diferentes ensayos fueron analizados para determinar su distribución mediante la prueba Kolmogorov-Smirnoff.

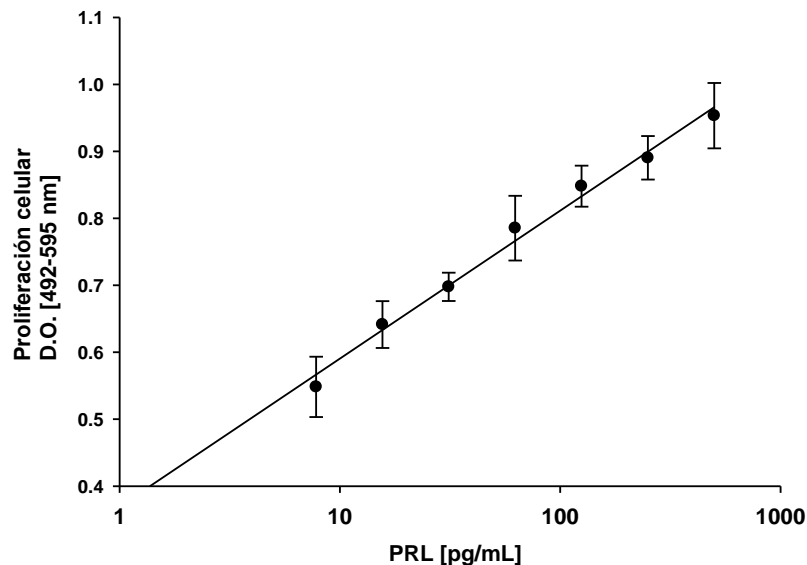
A los datos cuya distribución fue normal se les aplicó una ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples Dunnett's versus el control. Los datos cuya distribución no pasaron la prueba de normalidad, se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis; en todos los casos los valores de  $p \leq 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

Todas las gráficas y el análisis estadístico de los datos se realizaron con el programa SigmaPlot versión 11 (Systat Software Inc; San José, CA; [www.sigmaplot.com](http://www.sigmaplot.com)).

## VII. RESULTADOS

### 1. ENSAYO DE BIOACTIVIDAD DE LA PRL

La actividad biológica de la PRL recombinante utilizada en este trabajo, se probó mediante un ensayo de proliferación de la línea celular Nb2 (linfocitos T inmaduros de rata) que es dependiente de PRL; la proliferación de la línea celular fue medida mediante el ensayo colorimétrico de XTT. Los resultados mostraron un incremento en la actividad metabólica como medida indirecta de la proliferación celular de manera dependiente de la dosis de PRL (Gráfica 1).



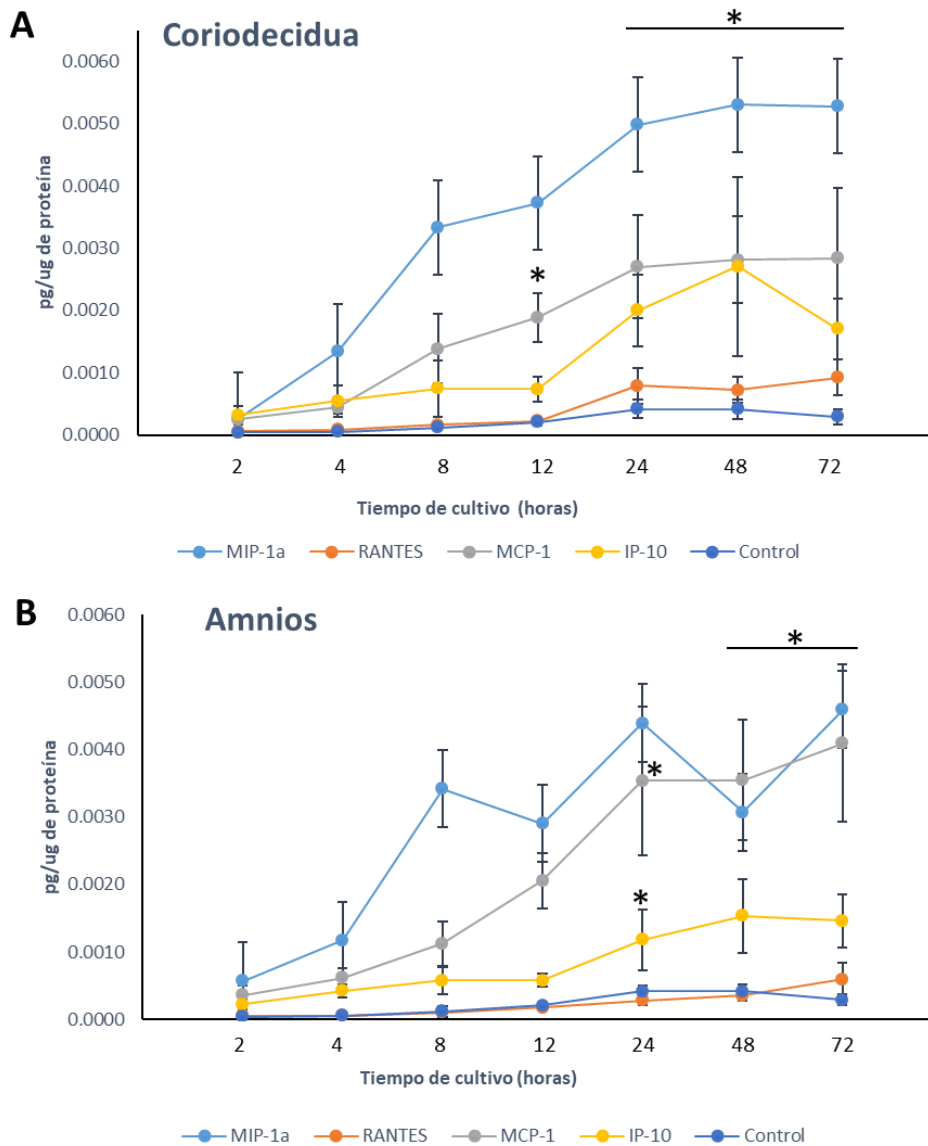
Gráfica 1. Proliferación de la línea celular Nb2 en respuesta a PRL. n=3; ensayos por triplicado. Promedio + desviación estándar.

### 2. CINÉTICA DE SECRECIÓN DE LAS QUIMIOKINAS EN RESPUESTA AL ESTÍMULO CON LPS

La secreción de las quimiocinas inducida con 500ng/ml de LPS en las membranas corioamnióticas, se evaluó a lo largo de un periodo de cultivo de 0 a 72 horas.

IP-10 aumentó a partir de las 12 h post-tratamiento con LPS en la coriodecidua, mientras que RANTES, IP-10 y MIP-1 $\alpha$  aumentaron a partir de las 24 h respecto al

control sin tratamiento (Gráfica 2, A). En el amnios MCP-1 e IP10 aumentaron a partir de las 24 h post-tratamiento con LPS; RANTES y MIP-1 $\alpha$  aumentaron a las 48 h respecto al control sin tratamiento (Gráfica 2, B).



Gráfica 2. Secreción de quimiocinas en condiciones control y en respuesta al tratamiento con LPS a lo largo de un periodo de cultivo de 72h. n=4, con cada intervalo de tiempo por triplicado. Promedio  $\pm$  DE; la diferencia significativa entre el control y el tratamiento con LPS se representa como \* ( $p < 0.05$ ) vs control.



### 3. PERFIL DE SECRECIÓN DE LAS QUIMIOCINAS EN MEDIOS CONDICIONADOS

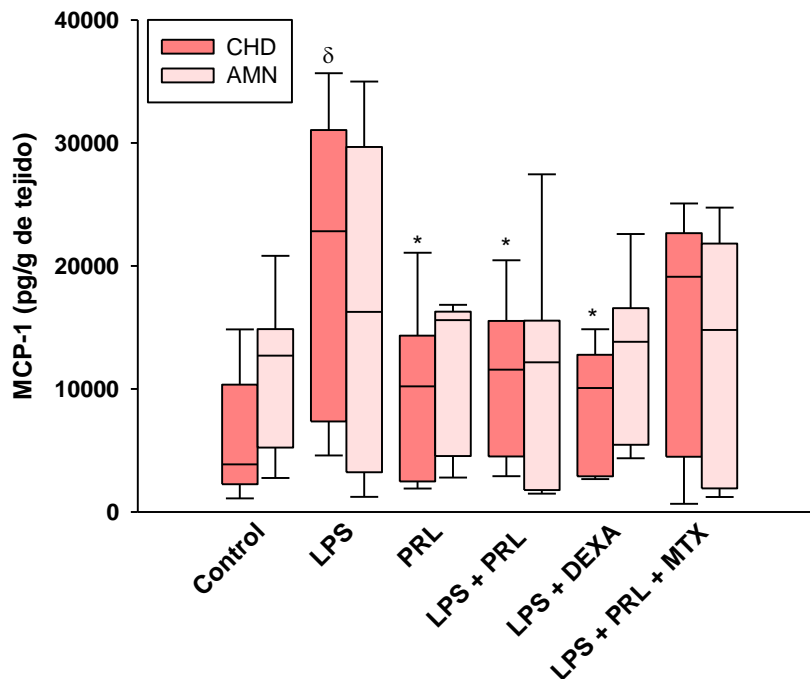
Después de aplicar los diferentes tratamientos a las membranas corioamnióticas, se determinó la concentración de MCP-1, MIP-1 $\alpha$  RANTES e IP-10 en los medios de cultivo, con el objetivo de observar el efecto de la PRL sobre las mismas y determinar si los medios se habían condicionado del modo esperado.

#### 3.1. SECRECIÓN DE MCP-1

El estímulo con LPS en la región coriodecidual fue capaz de inducir significativamente 6 veces ( $22,820.7 \pm 11,729.7$  pg/g de tejido) la secreción con respecto al control ( $3,864.7 \pm 4,893.3$  pg/g de tejido). Mientras que el tratamiento sólo con PRL ( $10,208.8 \pm 6,596.2$  pg/g de tejido) no presentó una diferencia significativa con respecto al control.

Los co-tratamientos de LPS + PRL ( $11,570.3 \pm 5,972.4$  pg/g de tejido) y LPS + DEXA ( $10,080.2 \pm 5,239.9$  pg/g de tejido) disminuyeron significativamente la secreción de esta quimiocina en un 49% y 56% respectivamente. El co-tratamiento de LPS + MTX no fue capaz de revertir de manera significativa el efecto regulador de la PRL.

En la región del amnios, los tratamientos utilizados no generaron cambios significativos en la secreción de MCP-1 (Gráfica 3).



Gráfica 3. Secreción de MCP-1 en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: coriodecidua (CHD) y amnios (AMN) en respuesta al tratamiento con LPS (500ng/ml) y/o el co-tratamiento con PRL [4000 ng/mL], DEXA [200 nM] y MTX [50 µM]. n=6 ensayos por triplicado. Mediana con rango intercuartil. Los datos estadísticos representan δ p<0.003 vs. control, \* p<0.003 vs. LPS.

### 3.2. SECRECIÓN DE MIP-1α

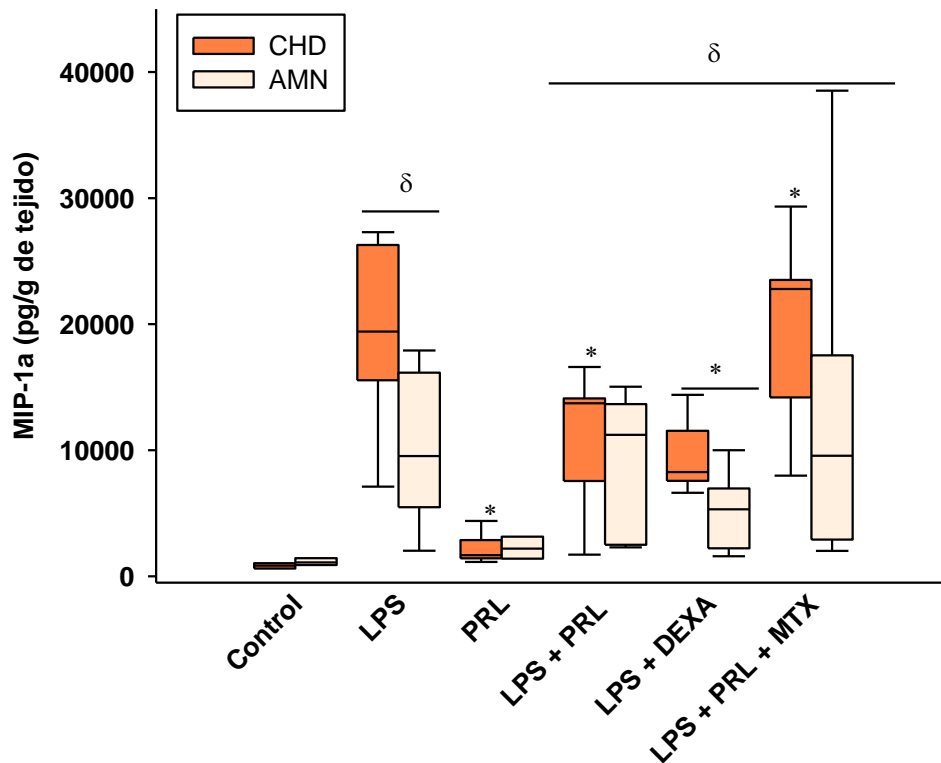
El estímulo con LPS en la región coriodecidua ( $19,415.5 \pm 7,021.3$  pg/g de tejido) incrementó de forma significativa 23 veces la secreción con respecto al control en la región coriodecidua ( $844.8 \pm 746.17$  pg/g de tejido) y 8 veces en la región del amnios ( $9,534.9 \pm 5,457$  pg/g de tejido) con respecto a su control ( $1,096.1 \pm 421.2$  pg/g de tejido).

El tratamiento sólo con PRL no presentó una diferencia significativa con respecto al control en ambos compartimentos.

El co-tratamiento de LPS + PRL ( $13,717.6 \pm 4,900.8$  pg/g de tejido) y LPS + DEXA ( $22,795.7 \pm 5,586.2$  pg/g de tejido) disminuyeron significativamente la secreción de

esta quimiocina en un 70% y 43% respectivamente en coriodecidua, en comparación con el LPS; en la región amniótica el co-tratamiento con PRL no generó una disminución significativa de la secreción de la quimiocina; pero, por otro lado, LPS + DEXA ( $5,305.1 \pm 2,836.3$  pg/g de tejido) si disminuyó la secreción de MIP-1 $\alpha$  en un 43%, respecto al LPS.

El co-tratamiento de LPS con MTX ( $22,795.7 \pm 5,586.2$  pg/g de tejido) sólo fue capaz de revertir de manera significativa el efecto del co-tratamiento de LPS + PRL sobre la secreción de MIP-1 $\alpha$  2 veces en la región coriodecidual pero no en la región amniótica (Gráfica 4).



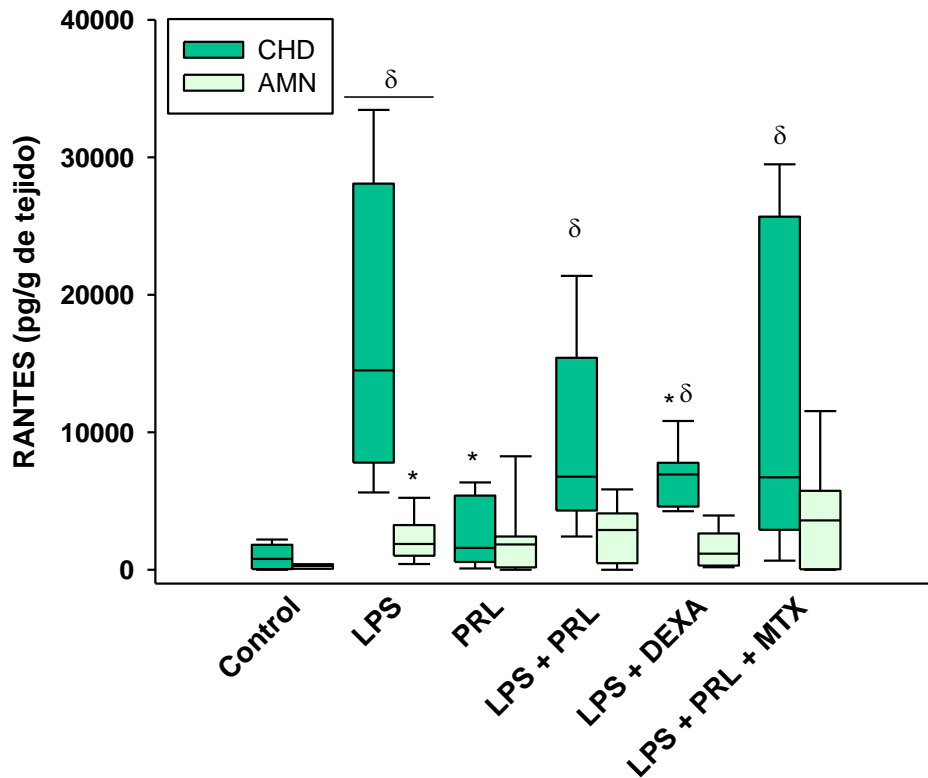
Gráfica 4. Secreción de MIP-1 $\alpha$  en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: coriodecidua (CHD) y amnios (AMN) en respuesta al tratamiento con LPS (500ng/ml) y/o el co-tratamiento con PRL [4000 ng/mL]. DEXA [200 nM] y MTX [50  $\mu$ M]. n=6 ensayos por triplicado. Mediana con rango intercuartil. Los datos estadísticos representan  $\delta$  p<0.001 vs. control, \* p<0.008 vs. LPS.

### 3.3. SECRECIÓN DE RANTES

El estímulo con LPS en la región coriodecidual ( $787.1 \pm 913.6$  pg/g de tejido) fue capaz de inducir significativamente 18 veces la secreción con respecto al control en la región coriodecidual ( $1,4501 \pm 1,0912.9$  pg/g de tejido) y 7 veces en la región del amniótica ( $1,876.7 \pm 1,508.2$  pg/g de tejido) con respecto a su control ( $283.7 \pm 501$  pg/g de tejido).

El co-tratamiento de LPS + PRL no generó una disminución significativa en la secreción de RANTES de ambos compartimentos, respecto al LPS; mientras que el co-tratamiento con LPS + DEXA si disminuyó significativamente la secreción de esta quimiocina en un 48% en la región coriodecidual ( $6,933 \pm 2,124.6$  pg/g de tejido) y en un 43% en el amnios ( $5,305.1 \pm 2,836.3$  pg/g de tejido) respecto al LPS.

El co-tratamiento de LPS con MTX no fue capaz de revertir de manera significativa la secreción de RANTES con respecto al tratamiento de LPS + PRL en la región coriodecidual ni amniótica (Gráfica 5).



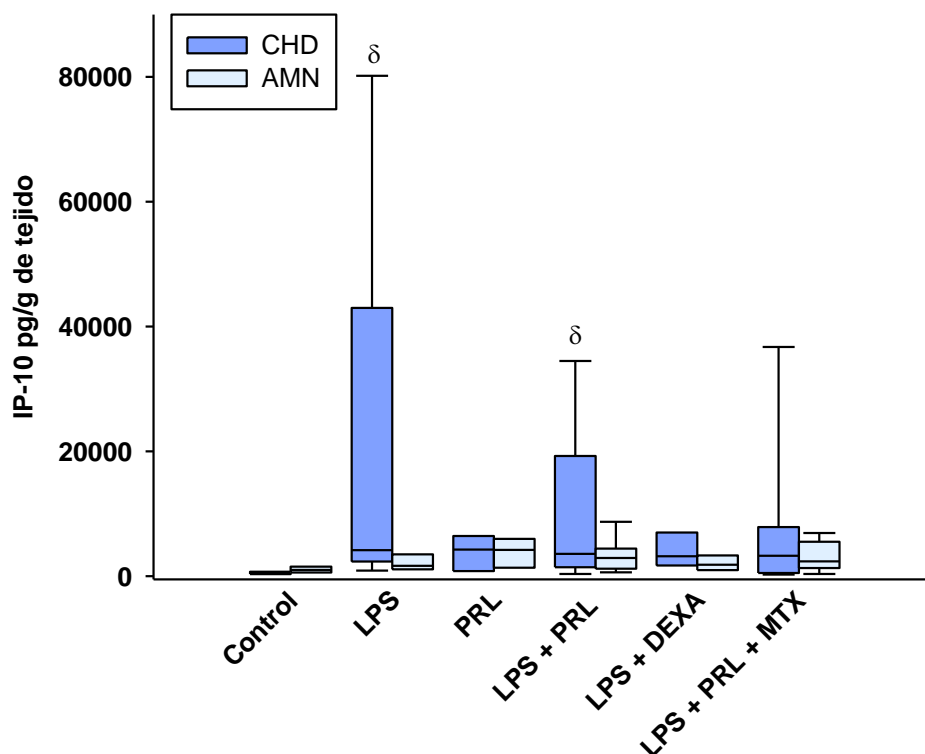
Gráfica 5. Secreción de RANTES en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: coriodecidual (CHD) y amnios (AMN) en

respuesta al tratamiento con LPS (500ng/ml) y/o el co-tratamiento con PRL [4000 ng/mL]. DEXA [200 nM] y MTX [50  $\mu$ M]. n=6 ensayos por triplicado. Mediana con rango intercuartil. Los datos estadísticos representan  $\delta$  p<0.001 vs. control, \* p<0.001 vs. LPS.

### 3.4. SECRECIÓN DE IP-10

El estímulo con LPS en la región coriodecidual incrementó 7.1 veces la secreción de IP-10 ( $4,163 \pm 28,414$  pg/g de tejido) con respecto al control ( $585.5 \pm 203.6$  pg/g de tejido); por otro lado, los co-tratamientos de LPS + PRL ( $4,269.5 \pm 2,978.2$  pg/g de tejido) y LPS + DEXA ( $3,203.2 \pm 8,149.7$  pg/g de tejido) no disminuyeron en forma significativa la secreción de IP-10 con respecto al tratamiento con LPS.

En la región amniótica ninguno de los tratamientos modificó de forma significativa la secreción de IP-10 (Gráfica 6).



Gráfica 6. Secreción de IP-10 en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: coriodecidual (CHD) y amnios (AMN) en respuesta al

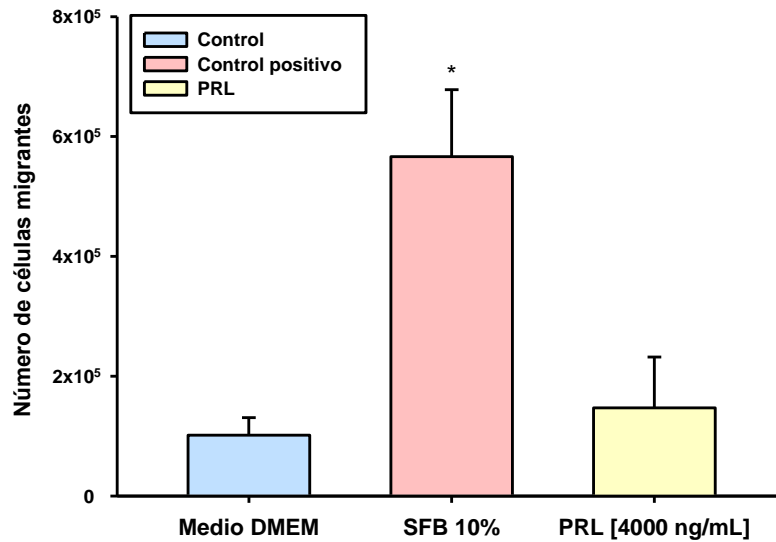
tratamiento con LPS (500ng/ml) y/o el co-tratamiento con PRL [4000 ng/mL]. DEXA [200 nM] y MTX [50  $\mu$ M]. n=6 ensayos por triplicado. Mediana con rango intercuartil. Los datos estadísticos representan  $\delta$  p<0.027 vs. Control.

## 4. EFECTO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS SOBRE LA QUIMIOTAXIS DE LAS CMCU

### 4.1. CONTROLES DE MIGRACIÓN

Con el objetivo de evaluar el funcionamiento adecuado del sistema se consideró un control negativo y un control positivo para la migración. Los resultados demostraron que en el medio base utilizado para condicionar las membranas fetales la migración espontánea fue mínima (101,519.7  $\pm$  29,262.2 células) en comparación con el control positivo (518,074.4  $\pm$  111,855 células), el cual presentó un aumento significativo en el número de células de 5.1 veces.

Por otro lado, la presencia de PRL a las mismas concentraciones utilizadas para el tratamiento de las membranas corioamnióticas [4000 ng/ml] no ejerció *per se* la migración de las CMCU y no presentó diferencias significativas en comparación con el control negativo (Gráfica 7).



Gráfica 7. Controles de migración. Las tres condiciones a evaluar presentaron como medio base DMEM + 0.2% HLA. n=4. Promedio más desviación estándar.

#### 4.2. NÚMERO DE CÉLULAS MIGRANTES EN RESPUESTA A MEDIOS CONDICIONADOS.

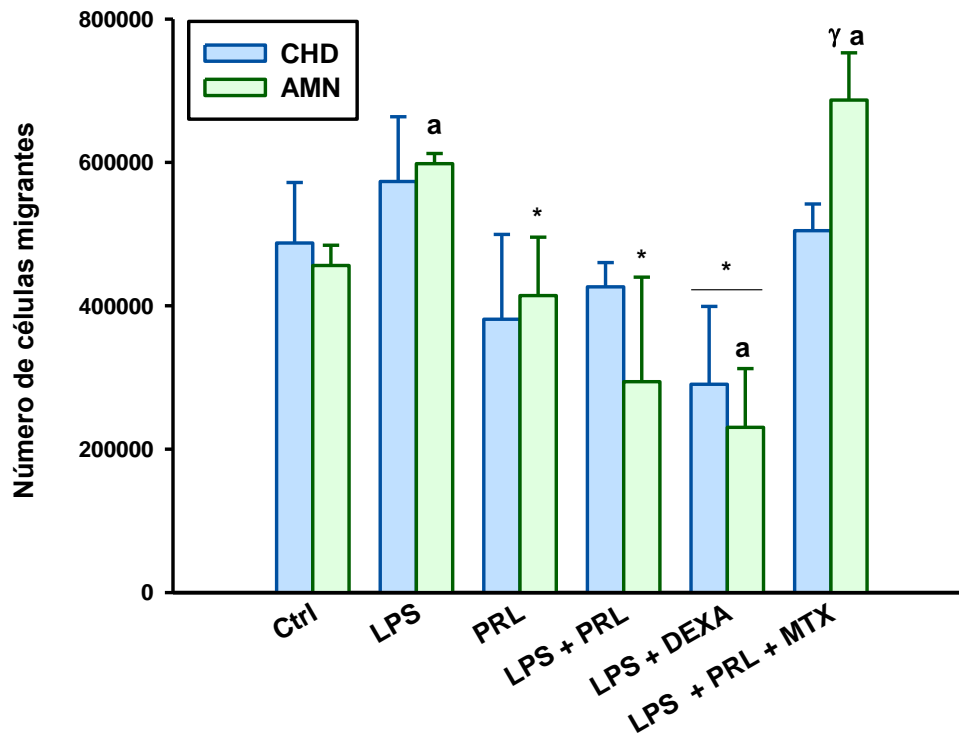
Los medios condicionados por la coriodescuidua no mostraron diferencias significativas en el número de CMCU migrantes en respuesta a los tratamientos con LPS, PRL, el co-tratamiento de LPS + PRL y el co-tratamiento de LPS + PRL + MTX. Sin embargo, el número de CMCU migrantes disminuyó en un 41% en respuesta al medio condicionado por el tratamiento con DEXA ( $391,905.7 \pm 108,641.9$  células) con respecto al número de células migrantes en respuesta al tratamiento de LPS ( $674,995.1 \pm 90,236.2$  células).

Los medios condicionados por el amnios mostraron un aumento significativo de 1.25 veces en el número de células migrantes en respuesta al medio proveniente del tratamiento con LPS ( $699,833 \pm 14,100.8$  células) en comparación con el número de células migrantes en el medio control ( $557,637.4 \pm 28,302.8$  células).

En respuesta a los medios condicionados provenientes de los co-tratamientos de LPS con PRL y DEXA, el número de células migrantes ( $515,848.8 \pm 81,303$  células y  $331,946.3 \pm 81,982.9$  células respectivamente) disminuyeron de forma

significativa en un 26% y 52% respectivamente en comparación la migración inducida por el medio condicionado por el tratamiento con LPS.

Por otro lado, los medios en donde se utilizó MTX como tratamiento mostraron revertir el efecto de la PRL debido a un aumento significativo de 2 veces el número células migrantes ( $788,531.7 \pm 65,862.6$  células) con respecto al tratamiento LPS + PRL ( $395,686.2 \pm 145,732.3$  células) (Gráfica 8).



Gráfica 8. Migración de células mononucleares inducida por los medios condicionados provenientes de membranas corioamnióticas: coriodecidua (CHD) y amnios (AMN) en respuesta a diferentes tratamientos. n=3 ensayos por duplicado. Promedio más desviación estándar. Los datos estadísticos representan a  $p < 0.001$  vs. control, \*  $p < 0.001$  vs. LPS,  $\gamma$   $p < 0.013$  vs. LPS+PRL.

## 5. INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LAS CMCU MIGRANTES

Debido a que las quimiocinas presentan una selectividad para activar y dirigir la migración de diferentes subpoblaciones de leucocitos, realizamos un análisis por



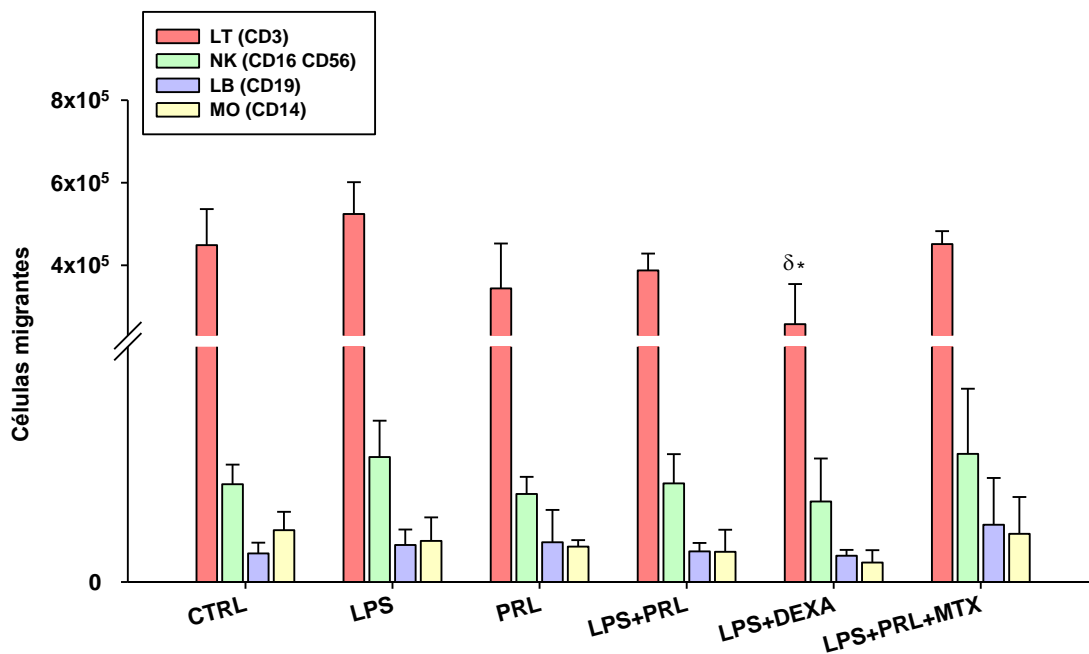
citometría de flujo para determinar diferencias entre las poblaciones de las CMCU migrantes.

La población más abundante en las CMCU fueron los linfocitos T, seguidos de las NK, los monocitos y finalmente los linfocitos B.

Por otro lado, los medios condicionados por la coriodecidua y el amnios en respuesta a los distintos tratamientos experimentales no mostraron una regulación significativa en el número de linfocitos B, NK y monocitos migrantes, pero si en los linfocitos T.

### 5.1. MIGRACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE CMCU EN RESPUESTA A MEDIOS CONDICIONADOS POR LA CORIODECIDUA.

De todas las subpoblaciones de leucocitos, únicamente los linfocitos T mostraron una disminución significativa del 50% en el número de células quimiotraídas por el medio condicionado en respuesta al tratamiento de LPS + DEXA (257,467.8 ± 97,204 células) en comparación con el número de células quimioatraídas por el medio condicionado en respuesta al tratamiento de LPS (524,176.8 ± 76,940.2 células) (Gráfica 9).



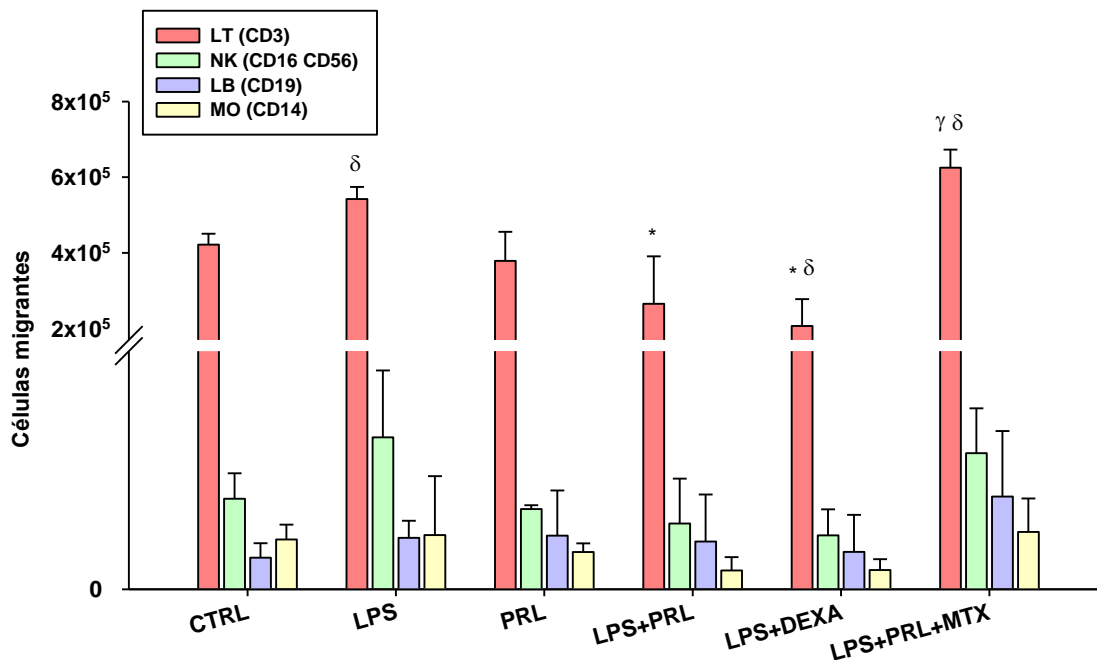
Gráfica 9. Migración de las subpoblaciones de leucocitos en respuesta a medios condicionados por la coriodecidua (CHD) con diferentes tratamientos.

n=3, ensayos por duplicado. Linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), células Natural Killer (CD56<sup>+</sup>), Linfocitos B (CD19<sup>+</sup>), Monocitos (CD14<sup>+</sup>). Promedio más desviación estándar. Los datos estadísticos representan  $\delta$  p<0.019 vs. control, \* p<0.019 vs. LPS.

## 5.2. MIGRACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE CMCU EN RESPUESTA A MEDIOS CONDICIONADOS POR EL AMNIO.

Los linfocitos T quimio traídos en respuesta al medio condicionado por el tratamiento con LPS ( $542,143.9 \pm 31,898.8$  células) incrementaron de forma significativa 1.3 veces con respecto a la respuesta en los medios control ( $421,848.4 \pm 28,614.3$  células). Los medios condicionados por los co-tratamientos de LPS + PRL ( $265,199.9 \pm 125,530.2$  células) y LPS + DEXA ( $206,688.2 \pm 71,002.5$  células) disminuyeron de manera significativa en un 52% y 62% la migración de Linfocitos T con respecto al medio condicionado por el tratamiento de LPS.

En respuesta al medio condicionado por el co-tratamiento de LPS+PRL+MTX ( $625,233.7 \pm 47,732.5$  células) el número de células migrantes fue significativamente 2.3 veces con respecto al número de células migrantes en respuesta al tratamiento de LPS+PRL ( $265,199.9 \pm 125,530.2$  células) (Gráfica 10).



Gráfica 10. Migración de las subpoblaciones de leucocitos en respuesta a medios condicionados por el amnios (AMN) con diferentes tratamientos. n=3,

ensayos por duplicado. Linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), células Natural Killer (CD56<sup>+</sup>), Linfocitos B (CD19<sup>+</sup>), Monocitos (CD14<sup>+</sup>). Promedio más desviación estándar. Los datos estadísticos representan  $\bar{d}$   $p < 0.001$  vs. control, \*  $p < 0.001$  vs. LPS y  $\gamma$   $p < 0.01$  vs. LPS + PRL.

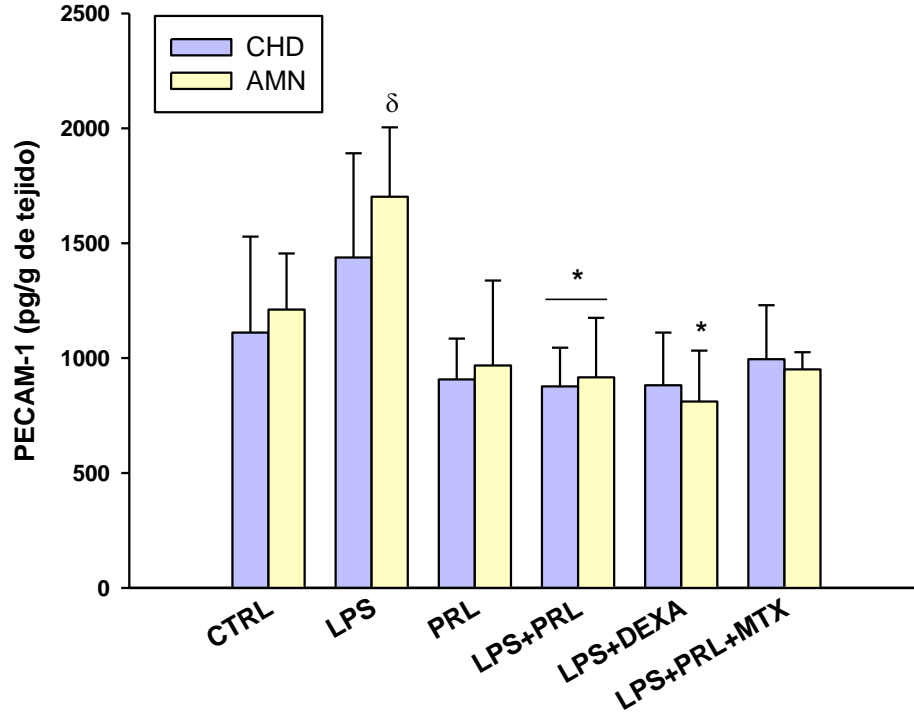
## 6. PERFIL DE SECRECIÓN DE PECAM-1 EN LOS MEDIOS CONDICIONADOS

Considerando que un proceso efectivo de migración implica no solo la secreción de factores quimiotácticos sino también de la expresión de moléculas de adhesión, se cuantificó CD31 para conocer el perfil de secreción por las membranas corioamnióticas en respuesta a los distintos tratamientos y determinar si su secreción se relaciona con el proceso de migración de las CMCU.

En la región coriodecidual la secreción de PECAM-1 no mostró cambios significativos en respuesta al tratamiento con LPS; sin embargo, en la región amniótica, el tratamiento con LPS (1,702.5  $\pm$  302 pg/g de tejido) indujo significativamente un aumento de 1.4 veces en comparación con el control (1,211  $\pm$  244.5 pg/g de tejido).

El co-tratamiento de LPS + PRL (916  $\pm$  259.4 pg/g de tejido) y LPS + DEXA (811  $\pm$  221.5 pg/g de tejido) disminuyeron de manera significativa la secreción de PECAM-1 en un 46% y 52% respectivamente en la región amniótica con respecto al tratamiento con LPS; mientras que en la región coriodecidual sólo en el tratamiento con DEXA (881.5  $\pm$  230 pg/g de tejido) se observó una disminución de un 38 % la secreción de PECAM-1 con respecto al tratamiento con LPS (1,438  $\pm$  453.1 pg/g de tejido).

Por otro lado, el co-tratamiento de LPS+PRL+MTX no revirtió significativamente el efecto observado en los tratamientos de LPS+PRL en las regiones coriodecidual ni amniótica (Gráfica 11).



Gráfica 11. Secreción de PECAM-1 en cada una de las regiones de las membranas corioamnióticas: Coriodecidua=CHD y Amnios=AMN en respuesta al tratamiento con LPS (500 ng/mL) y/o el co-tratamiento con PRL [4000 ng/mL], DEXA [200 nM] y MTX [50  $\mu$ M]. n=3 muestras independientes. Las gráficas representan promedio + desviación estándar. Los datos estadísticos muestran  $\delta$   $p < 0.045$  vs. CTRL, \*  $p < 0.001$  vs. LPS.

## VIII. DISCUSIÓN

Durante el embarazo las membranas corioamnióticas son claves para entablar la tolerancia inmunológica pero también para entablar una respuesta efectiva frente a distintos agentes inmunógenos que pudieran invadir la cavidad amniótica, no solo por su localización sino por las competencias inmunológicas que posee (Shivhare et al., 2015), estas membranas tienen la capacidad de producir citocinas y quimiocinas que pueden vulnerar la inmunotolerancia del embarazo provocando condiciones patológicas como el parto pre-término y la ruptura prematura de membranas

El principal hallazgo de este trabajo fue demostrar la regulación que ejerce PRL sobre la secreción de quimiocinas por las membranas corioamnióticas que se traduce en un efecto indirecto de esta hormona sobre la quimiotaxis de las CMCU en respuesta a los medios condicionados por las membranas corioamnióticas.

Utilizando el modelo de cultivo de las membranas corioamnióticas en compartimentos independientes, se tiene caracterizado que el estímulo con LPS induce un perfil de secreción de factores de inflamación encabezado por TNF- $\alpha$  a las 24 horas, seguido de IL-1 $\beta$  a las 48 horas de cultivo (Pilar Flores-Espinosa et al., 2017; Zaga et al., 2004); sin embargo, se desconocía el patrón de secreción temporal de factores quimiotácticos, por lo cual nuestro primer abordaje fue realizar una cinética de secreción de las quimiocinas RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e IP-10 producidas por las membranas corioamnióticas en respuesta al LPS.

Nosotros encontramos que las cuatro quimiocinas estuvieron presentes en los medios de ambas regiones de las membranas corioamnióticas; sin embargo, en la coriodecidua los niveles de IP-10 y RANTES fueron superiores a los medidos en el amnios, mientras que la concentración de MCP-1 fue mayor en el amnios que en la coriodecidua.

Con respecto a la respuesta inflamatoria inducida por el LPS en relación al tiempo, observamos que en la coriodecidua la respuesta fue más temprana, presentándose a las 12 y 24 horas después del estímulo en comparación con el amnios donde se presentó a las 24 y 48 horas. Por esta razón, decidimos utilizar como punto de corte un tratamiento de 24 horas con LPS para asegurarnos de tener un aumento significativo en la secreción de quimiocinas en los medios de cultivo condicionados que posteriormente se utilizaron en los ensayos de migración.

Mientras que los efectos de la PRL sobre la regulación de la respuesta inmune de las membranas fetales humanas en el contexto de la inflamación ya había sido estudiada y reportada por un par de trabajos previos (Flores-Espinosa et al., 2019;

Zaga-Clavellina et al., 2014), para asegurarnos que en los medios condicionados utilizados en los ensayos de migración se observaba la regulación de PRL previamente reportada, caracterizamos la secreción de quimiocinas por ELISA, de manera general obtuvimos una respuesta similar a la reportada en RANTES y MIP-1 $\alpha$ , pero no en MCP-1.

Nuestros resultados demostraron que MCP-1 es secretado de forma basal por las membranas corioamnióticas y en mayor cantidad por el amnios. En contraste con lo reportado anteriormente en nuestro laboratorio (P Flores-Espinosa et al., 2019) que indica que esta quimiocina se encuentra únicamente en la región amniótica, nuestros resultados demostraron que la región coriodecidual también secreta cantidades considerables de MCP-1 de forma basal e inducida por LPS y que además el co-tratamiento con PRL es capaz de regular su secreción únicamente en esta región de las membranas corioamnióticas.

Con relación a esto, existe evidencia experimental que señala que el cultivo de una fracción enriquecida de células inmunes provenientes de la región coriodecidual de membranas fetales con trabajo de parto producen MCP-1 como parte del microambiente pro-inflamatorio específico necesario para la quimioatracción y “homing” de leucocitos hacia esta región de las membranas (Castillo-Castrejon et al., 2014). El hecho de que nosotros no eliminamos la decidua materna que está adherida a los tejidos, de modo que parte de la secreción de MCP-1 que nosotros observamos en nuestros resultados podría ser la suma de la de las células inmunes que no fueron eliminadas del tejido.

MCP-1 es una quimiocina miembro de la familia CC de las quimiocinas, es capaz de atraer a monocitos/macrófagos, así como eosinófilos, basófilos y células cebadas al área de inflamación; adicionalmente puede estimular el estallido respiratorio requerido para la activación de macrófagos. La expresión de esta quimiocina durante el embarazo no solo se reportó en las membranas corioamnióticas, sino también en la decidua, endometrio y miometrio (Esplin, Peltier, et al., 2005).

Se ha reportado que altos niveles de MCP-1 se encuentran en líquido amniótico en pacientes con trabajo de parto prematuro asociado o no a un proceso infeccioso, sugiriendo un papel importante de esta quimiocina en el trabajo de parto normal (Esplin, Romero, et al., 2005).

Otra quimiocina de interés para nosotros fue MIP-1 $\alpha$ , nuestros resultados mostraron que los valores basales de esta quimiocina son muy bajos en la coriodecidual y el amnios, pero su secreción es considerablemente inducida en ambos al estimular la región coriodecidual con LPS, finalmente el co-tratamiento con PRL disminuyó de forma significativa la secreción de esta quimiocina en la coriodecidual donde se aplicó el estímulo directamente, mientras que en la región del amnios sólo se

observa una tendencia de la PRL a disminuir la secreción de esta quimiocina; estos resultados son congruentes en parte con lo reportado previamente (Flores-Espinosa et al., 2019).

MIP-1 $\alpha$  es una quimiocina capaz de inducir la activación de neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos. Adicionalmente, induce la liberación de histamina por los basófilos y células cebadas e incrementa la producción de otras citocinas como pro-inflamatorias (Romero et al., 1994). A parte de las membranas corioamnióticas, otras fuentes de esta quimiocina incluyen macrófagos residentes en la cavidad amniótica, monocitos/macrófagos y decidua humana (Romero et al., 1994).

Si bien se ha reportado que los niveles más altos de esta quimiocina en muestras de líquido amniótico de embarazos no patológicos a término se asocian con la dilatación cervical (Dudley, Hunter, Mitchell, & Varner, 1996), la expresión génica de MIP-1 $\alpha$  fue mayor en membranas corioamnióticas de embarazos que presentaron una inflamación crónica de estos tejidos a nivel histológico en presencia o ausencia de infección (Kim et al., 2015) lo que demuestra su participación tanto en la inflamación estéril como patológica.

Con lo que respecta a RANTES nuestros resultados mostraron que es secretada en bajas concentraciones de forma basal en el amnios y la coriodecidua, pero únicamente en esta última región fue inducida por el estímulo con LPS, esto apoya los resultados reportados previamente que indican una secreción diferencial para esta quimiocina por las diferentes regiones de las membranas (Flores-Espinosa et al., 2019). Además Hoang y cols. reportaron que la estimulación de membranas corioamnióticas con [100 ng/mL] de LPS (una concentración 5 veces menor a lo que utilizamos en este trabajo) aumenta significativamente la secreción de RANTES (Hoang et al., 2014), indicando que la secreción de esta quimiocina es muy sensible a la dosis de LPS; sin embargo, el co-tratamiento con de LPS + PRL en la coriodecidua mostró una tendencia a disminuir la secreción de RANTES provocado por el LPS.

RANTES es un potente factor quimiotáctico y activador de Monocitos, Linfocitos T, Basófilos y Eosinófilos. Participa en la adhesión y migración de células T al endotelio y es producida por linfocitos T, Macrófagos, células endoteliales y tejidos gestacionales (Gomez-Lopez, Laresgoiti-Servitje, et al., 2010). También está presente en líquido amniótico, donde sus concentraciones disminuyen conforme el progresa el embarazo, pero incrementa durante el trabajo de parto e infecciones en la cavidad amniótica (Gomez-Lopez, et al., 2010).

Finalmente medimos la secreción de IP-10 en los medios condicionados por las membranas fetales. Nuestros resultados mostraron un nivel muy bajo de secreción

de IP-10 por los compartimentos coriodecidual y amniótico de forma basal; sin embargo, al estimular con LPS se observó un aumento significativo en la secreción de esta quimiocina en la coriodecidual y no en el amnios, mientras que los co-tratamientos con PRL, DEXA y MTX no inducen cambios en la secreción de IP-10.

Considerando lo reportado por Kai y cols., en donde el aumento de la secreción de IP-10 es inducible en células estromales del endometrio por concentraciones bajas de LPS [10 ng/mL] podemos pensar que esta quimiocina es probablemente más sensible que RANTES a la dosis de LPS y creemos que en nuestro modelo al utilizar concentraciones 50 veces más altas los co-tratamientos con PRL y DEXA ya no son capaces de regular de forma eficiente la secreción de esta quimiocina (Kai et al., 2002).

IP-10 pertenece a la subfamilia de las quimiocinas CXC y es inducida por distintos factores (IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) en muchos tipos de células. También ejerce propiedades quimiotácticas sobre linfocitos Th1, eosinófilos, monocitos y células dendríticas. Adicionalmente se le atribuyen funciones en la migración de células trofoblásticas, aposición y adhesión inicial durante la etapa temprana del embarazo en rumiantes. Además, cabe mencionar que el receptor de IP-10 (CXCR3) se encuentra presente en células del trofoblasto y endometrio humano (Dominguez et al., 2008).

El efecto inmunomodulador de la PRL sobre la secreción de quimiocinas en las membranas corioamnióticas no ha sido reportada por otros grupos de trabajo; considerando que el embarazo es una condición fisiológica muy particular, es difícil comparar nuestros resultados con otro modelo biológico, ya que cualquier estado de hiperprolactinemia fuera del embarazo, tiene un carácter patológico. Adicionalmente a estos resultados, en nuestro grupo de trabajo se ha observado que el co-tratamiento con PRL de explantes placentarios no modificó la secreción de quimiocinas inducida por LPS (datos no publicados), y en cultivo de células HUVEC (Células Endoteliales de Cordón umbilical humanas) se observó que PRL incrementó la secreción de IL-8 inducida por LPS (datos no publicados), lo que sugiere que el efecto de la PRL es tejido-específico y le da un importante significado biológico al papel de las membranas corioamnióticas en el trabajo de parto normal y patológico.

Estos resultados de la secreción diferencial de las quimiocinas inducidas por el LPS y la regulación de las mismas por PRL en las membranas corioamnióticas dieron pauta a considerar la parte medular de este estudio, que fue evaluar la quimiotaxis de células de CMCU en respuesta a los medios condicionados por estos tejidos.

Este es el primer estudio que aborda el efecto quimiotáctico ejercido por las membranas corioamnióticas en condiciones experimentales, el abordaje que se ha



hecho consideró lisados de tejido de las membranas corioamnióticas con y sin trabajo de parto, observando que los lisados provenientes de las membranas de trabajo de parto se ejerció una mayor migración de leucocitos totales obtenidos de sangre periférica materna (Gomez-Lopez, Vadillo-Perez, Nessim, Olson, & Vadillo-Ortega, 2011).

Considerando que las CMCU son una población representativa de las células que están presentes en la interfase materno-fetal, y sabiendo que las células mononucleares de sangre materna periférica presentan y responden a un microambiente distinto (Vega-Sanchez, Arenas-Hernandez, Vazquez-Perez, Moreno-Valencia, & Gomez-Lopez, 2015), decidimos utilizarlas las CMCU tratando de simular un ambiente más parecido al tercer trimestre del embarazo.

En nuestro trabajo, resultó interesante que el efecto tanto de inducción por LPS como de regulación por PRL de los factores quimiotácticos secretados se observó principalmente en la coriodecidual, en los ensayos de quimiotaxis, el efecto se observó principalmente en respuesta a los medios condicionados provenientes del amnios.

Particularmente en los ensayos de quimiotaxis, el número de células migrantes reflejó el efecto de los co-tratamientos sobre la secreción de las quimiocinas, es decir el incremento de RANTES y MIP-1 $\alpha$  en el amnios en respuesta a LPS, se reflejó en un incremento de linfocitos T.

Por otro lado, aunque el co-tratamiento de PRL solo mostró la tendencia a disminuir estas quimiocinas en el amnios, el número de CMCU migrantes si disminuyó; esto apoya nuestra hipótesis de que esta hormona ejerce un efecto indirecto sobre la capacidad quimiotáctica de las membranas corioamnióticas; hablamos de un efecto indirecto, porque nuestro control de migración con PRL demostró que esta hormona *per se* no induce la migración de las CMCU.

Estos resultados de un efecto indirecto son congruentes con lo descrito por Dill & Walker (2017) en la glándula mamaria; aunque al contrario de nuestros resultados donde la PRL actúa como un factor que limita las propiedades quimiotácticas de los tejidos gestacionales, ellos observaron que los medios condicionados por una línea de células de epitelio mamario (HC11) tratada con [100 ng/mL] de prolactina, se incrementaron la migración de linfocitos T CD4+ y CD8+, linfocitos B, macrófagos, monocitos, eosinófilos y neutrófilos, es decir, en este modelo la PRL actúa de manera indirecta favoreciendo la migración las células inmunes durante el desarrollo de la glándula mamaria (Dill & Walker, 2017).

Con la intención de demostrar que nuestro sistema tiene la capacidad de desinflamarse, en nuestro modelo utilizamos el co-tratamiento de LPS con DEXA, un conocido anti-inflamatorio esteroideo, como era de esperarse, disminuyó la

secreción de quimiocinas en los medios condicionados y también la migración de CMCU tanto corion como en amnios.

Por el contrario, el co-tratamiento con MTX, que utilizamos como un inhibidor inespecífico de la vía JACK/STAT (Thomas et al., 2015) revirtió el efecto indirecto de la PRL aumentando el número de células migrantes principalmente en el amnios, lo cual coincide con el efecto observado en las quimiocinas secretadas en los medios condicionados.

Adicional a la determinación del número de células migrantes, consideramos importante determinar el fenotipo de las células por citometría de flujo. Estos resultados demostraron que la principal población atraída por los medios condicionados tanto de corion como de amnios fueron los linfocitos T, seguidos por las células NK, monocitos y finalmente linfocitos B, lo que indica que no hay una migración específica en cuanto a poblaciones celulares, ya que la proporción de las poblaciones se mantiene en relación a las proporciones de células que se aíslan de la sangre de cordón umbilical.

Sin embargo, se puede decir que los linfocitos T fueron más sensibles a los efectos indirectos de los tratamientos principalmente en la región amniótica. En contraste con nuestros resultados, un estudio donde se utilizaron extractos de membranas corioamnióticas separadas en coriodecidual y amnios, demostró que la coriodecidual durante el trabajo de parto es responsable del reclutamiento de granulocitos, Linfocitos T, Monocitos y NKs; mientras que el amnios es responsable de una mayor quimioatracción de Linfocitos B (Nardhy Gomez-Lopez et al., 2011).

Una importante diferencia entre el trabajo de Gomez-Lopez y colaboradores (Nardhy Gomez-Lopez et al., 2011) y nuestro trabajo recaen en el origen de las células mononucleares, ellos utilizaron células de sangre periférica, mientras que nosotros utilizamos células de sangre de cordón umbilical; en relación a esto Christopherson y colaboradores mediante ensayos con la cámara de Boyden comparó la migración de células mononucleares de sangre periférica de adultos y de CMCU en respuesta a los factores quimiotácticos Exodus-1, 2 y 3 (actualmente llamadas MIP-3 $\alpha$ , SLC y MIP-3 $\beta$  respectivamente) reportó que las CMCU migraron 2.3 veces más que las de sangre periférica en respuesta a estos factores quimiotácticos; además demostró que la población atraída preferentemente fue la de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD45RA<sup>+</sup> (lo que indica que son linfocitos inexpertos); adicionalmente esto sugiere que estas CMCU no requieren de activación o algún otro estímulo de diferenciación para responder a un evento de migración (Christopherson, Brahmi, & Hromas, 1999).

Adicionalmente, evidencia reportada por Taub y colaboradores muestra que en ensayos de migración donde se evalúa la actividad quimiotáctica de RANTES, MIP-

1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  sobre células mononucleares de sangre periférica se observa una mayor atracción de linfocitos T por parte de RANTES, seguido de MIP-1 $\alpha$ ; (Taub, Lloyd, Wang, Oppenheim, & Kelvin, 1993). Adicionalmente se sabe que además de macrófagos, MCP-1 atrae más a las células T tipo Th<sub>1</sub>, por lo que sugerimos que el efecto de regulación en la migración preferencial de Linfocitos T que se observa por parte de la región amniótica podría ser resultado de la suma de estos factores quimiotácticos en nuestro estudio.

Por otro lado, nosotros pensamos que el no ver un perfil diferencial sobre el resto de las poblaciones migrantes en nuestros resultados puede deberse al tamaño de muestra, ya que observamos tendencias de regulación en las NK en respuesta a los medios condicionados por la coriodecidual y de monocitos en respuesta a los medios condicionados por el amnios.

El proceso de reclutamiento y “homing” de los leucocitos mediado por factores específicos es un proceso que involucra como primer paso que los tejidos secreten factores quimiotácticos y, que estos factores solubles recluten selectivamente leucocitos hacia un tejido en particular. Una vez que las células llegan al tejido es necesario que tanto los leucocitos como los tejidos expresen moléculas de adhesión, lo cual les permite adherirse al endotelio vascular y posteriormente poder realizar la extravasación desde los vasos sanguíneos hacia el interior del tejido (Gomez-Lopez et al., 2011).

En este sentido nos pareció interesante abordar la secreción de una molécula de adhesión, ya que existe evidencia en la literatura en donde se caracteriza el aumento de la expresión de ARN mensajero de las moléculas de adhesión ICAM-1 y PECAM en membranas corioamnióticas con trabajo de parto, en comparación con muestras sin trabajo de parto (Osman et al., 2004); y, sabiendo que una de las funciones básicas de estas moléculas son el mediar la migración transendotelial de leucocitos durante un proceso inflamatorio, nos dimos a la tarea de cuantificar la secreción de PECAM-1 en los medios condicionados por las membranas corioamnióticas para saber si existía una relación con el proceso de migración que observamos previamente.

De manera interesante, encontramos que esta molécula también se encuentra regulada en nuestro sistema, ya que el tratamiento con LPS indujo un aumento de la secreción de PECAM-1, mientras que el co-tratamiento con PRL disminuyó de forma significativa el efecto del LPS en los compartimentos coriodecidual y amniótico; si bien no se encuentra reportado algún antecedente sobre la regulación de PECAM-1 por PRL sobre membranas fetales; se ha reportado que se observan cambios de esta molécula en distintas patologías durante el embarazo como lo reportado por Zbucka-Kretowska en donde se observa que PECAM disminuye significativamente sus niveles en muestras de líquido amniótico de neonatos

diagnosticados con Síndrome de Down (Zbucka-Kretowska et al., 2018). Por otro lado, se ha visto que los niveles de E-Selectina, P-Selectina y PECAM-1 se incrementan en el suero de pacientes embarazadas con pre-clampsia en comparación con pacientes embarazadas sanas (Krauss et al., 1998).

Relacionado a esto, se sabe que, durante la progresión de una respuesta inflamatoria, las isoformas solubles de moléculas de adhesión son liberadas de las superficies de las células debido al conjunto de señales que producen daño de tejido, permitiendo que estas moléculas se acumulen en el plasma sanguíneo. Estas isoformas solubles se consideran posibles biomarcadores de la severidad de un proceso inflamatorio por lo que nosotros asociamos la presencia de PECAM-1 en los medios condicionados a daño tisular generado por el estímulo que adicionamos de LPS; así mismo, sugerimos que el co-tratamiento con PRL ejerce un efecto inmunosupresor de la respuesta inflamatoria que genera el LPS y por ello vemos una disminución significativa de su secreción en los medios condicionados por ambos compartimentos.

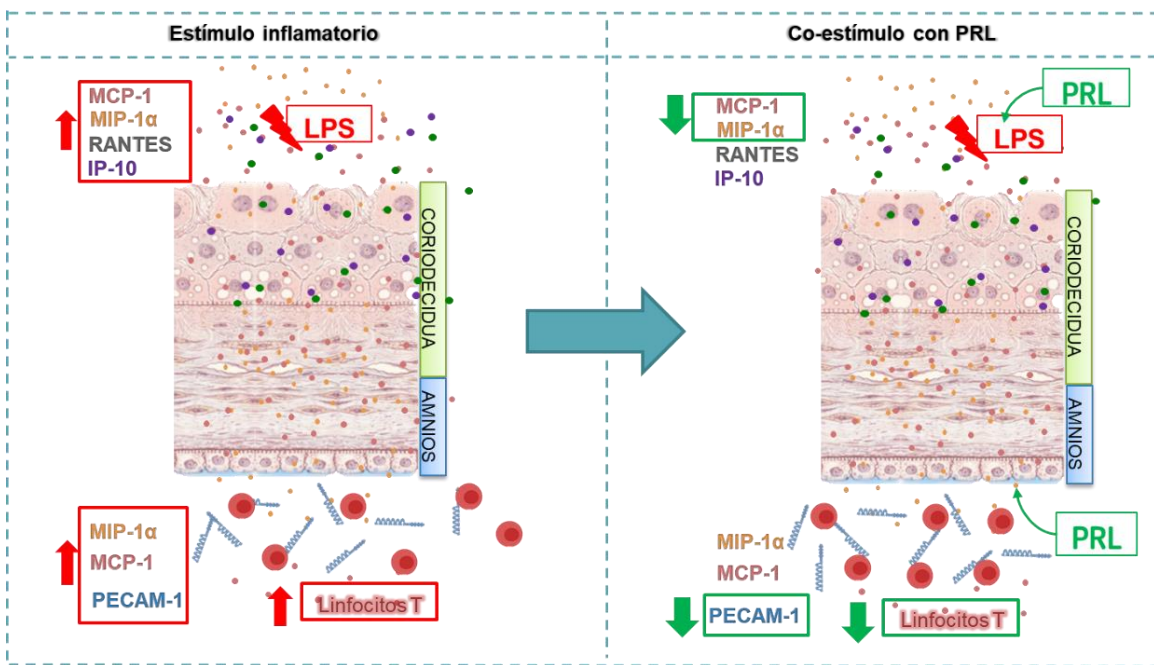


Figura 9. Esquema integrativo de la respuesta de las membranas corioamnióticas ante el estímulo de LPS y el co-estímulo de LPS y PRL

## IX. CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que la PRL ejerce un efecto indirecto en la migración de las células del sistema inmune como los linfocitos T, a través de la inmunoregulación diferencial y selectiva de los factores quimiotácticos y moléculas de adhesión secretados por las membranas corioamnióticas; es decir que la PRL ejerce un efecto profundo sobre la capacidad de respuesta inmune de las membranas corioamnióticas y, eventualmente de la quimiotaxis de estos tejidos durante un evento inflamatorio, aportando evidencia del papel clave y regulador que juega esta hormona durante el embarazo.

## X. REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S., Baker, D. L. (Medical illustrator), & Baker, A. (2015). *Inmunología celular y molecular*.
- Aghaeepour, N., Ganio, E. A., Mcilwain, D., Tsai, A. S., Tingle, M., Van Gassen, S., ... Gaudilliere, B. (2017). An immune clock of human pregnancy. *Science Immunology*, 2(15). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan2946>
- Ander, S. E., Diamond, M. S., & Coyne, C. B. (2019). Immune responses at the maternal-fetal interface. *Science Immunology*, 4(31). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat6114>
- Bao, L., Tessier, C., Prigent-Tessier, A., Li, F., Buzzio, O. L., Callegari, E. A., ... Gibori, G. (2007). Decidual prolactin silences the expression of genes detrimental to pregnancy. *Endocrinology*, 148(5), 2326–2334. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1643>
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R., & LaPensee, E. W. (2008, February). What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine Reviews*, Vol. 29, pp. 1–41. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0017>
- Bernard, V., Young, J., Chanson, P., & Binart, N. (2015). New insights in prolactin: pathological implications. *Nature Reviews. Endocrinology*, 11(5), 265–275. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.36>
- Bryant-Greenwood, G. D. (1998). The extracellular matrix of the human fetal membranes: Structure and function. *Placenta*, 19(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(98\)90092-3](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(98)90092-3)

- Castillo-Castrejon, M., Meraz-Cruz, N., Gomez-Lopez, N., Flores-Pliego, A., Beltrán-Montoya, J., Viveros-Alcaráz, M., & Vadillo-Ortega, F. (2014). Chorionic Decidual Cells From Term Human Pregnancies Show Distinctive Functional Properties Related to the Induction of Labor. *American Journal of Reproductive Immunology*, 71(1), 86–93. <https://doi.org/10.1111/aji.12179>
- Christopherson, K., Brahmi, Z., & Hromas, R. (1999). Regulation of naive fetal T-cell migration by the chemokines Exodus-2 and Exodus-3. *Immunology Letters*, 69(2), 269–273. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(99\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(99)00099-1)
- Cools, P. (2017). The role of Escherichia coli in reproductive health: state of the art. *Research in Microbiology*, 168(9–10), 892–901. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.02.002>
- Dickinson, M. A., Harnett, E. L., Venditti, C. C., & Smith, G. N. (2009). Transient lipopolysaccharide-induced cytokine responses in the maternal serum and amniotic fluid of the guinea pig. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 200(5), 534.e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.12.034>
- Dill, R., & Walker, A. M. (2017). Role of Prolactin in Promotion of Immune Cell Migration into the Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 22(1), 13–26. <https://doi.org/10.1007/s10911-016-9369-0>
- Dominguez, F., Martínez, S., Quiñonero, A., Loro, F., Horcajadas, J. A., Pellicer, A., & Simón, C. (2008). CXCL10 and IL-6 induce chemotaxis in human trophoblast cell lines. *Molecular Human Reproduction*, 14(7), 423–430. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan032>
- Du, M. R., Wang, S. C., & Li, D. J. (2014). The integrative roles of chemokines at the maternal-fetal interface in early pregnancy. *Cellular and Molecular Immunology*, 11(5), 438–448. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.68>
- Dudley, D. J., Hunter, C., Mitchell, M. D., & Varner, M. W. (1996). Elevations of amniotic fluid macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  concentrations in women during term and preterm labor. *Obstetrics and Gynecology*, 87(1), 94–98. [https://doi.org/10.1016/0029-7844\(95\)00366-5](https://doi.org/10.1016/0029-7844(95)00366-5)
- Esplin, M. S., Peltier, M. R., Hamblin, S., Smith, S., Fausett, M. B., Dildy, G. A., ... Adashi, E. Y. (2005). Monocyte chemotactic protein-1 expression is increased in human gestational tissues during term and preterm labor. *Placenta*, 26(8–9), 661–671. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.09.012>
- Esplin, M. S., Romero, R., Chaiworapongsa, T., Kim, Y. M., Edwin, S., Gomez, R., ... Adashi, E. Y. (2005). Monocyte chemotactic protein-1 is increased in the amniotic fluid of women who deliver preterm in the presence or absence of intra-amniotic infection. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the*

*Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 17(6), 365–373.  
<https://doi.org/10.1080/14767050500141329>

- Flores-Espinosa, P, Vega-Sánchez, R., Mancilla-Herrera, I., Bermejo-Martínez, L., Preciado-Martínez, E., Olmos-Ortiz, A., ... Zaga-Clavellina, V. (2019). Prolactin selectively inhibits the LPS-induced chemokine secretion of human foetal membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine : The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 1–7. <https://doi.org/10.1080/14767058.2019.1596255>
- Flores-Espinosa, P, Pineda-Torres, M., Vega-Sánchez, R., Estrada-Gutiérrez, G., Espejel-Nuñez, A., Flores-Pliego, A., ... Zaga-Clavellina, V. (2014). Progesterone Elicits an Inhibitory Effect upon LPS-Induced Innate Immune Response in Pre-Labor Human Amniotic Epithelium. *American Journal of Reproductive Immunology*, 71(1), 61–72. <https://doi.org/10.1111/aji.12163>
- Flores-Espinosa, P, Preciado-Martínez, E., Mejía-Salvador, A., Sedano-González, G., Bermejo-Martínez, L., Parra-Covarruvas, A., ... Zaga-Clavellina, V. (2017). Selective immuno-modulatory effect of prolactin upon pro-inflammatory response in human fetal membranes. *Journal of Reproductive Immunology*, 123, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.09.004>
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*, 80(4), 1523–1631. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>
- Fukamatsu, Y., Tomita, K., & Fukuta, T. (1984). Further evidence of prolactin production from human decidua and its transport across fetal membrane. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 17(6), 309–316. <https://doi.org/10.1159/000299168>
- Goldenberg, R. L., Hauth, J. C., & Andrews, W. W. (2000, May 18). Intrauterine infection and preterm delivery. *New England Journal of Medicine*, Vol. 342, pp. 1500–1507. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005183422007>
- Gomez-Lopez, N., Estrada-Gutierrez, G., Jimenez-Zamudio, L., Vega-Sanchez, R., & Vadillo-Ortega, F. (2009). Fetal membranes exhibit selective leukocyte chemotactic activity during human labor. *Journal of Reproductive Immunology*, 80(1–2), 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.01.002>
- Gomez-Lopez, N., Guilbert, L. J., & Olson, D. M. (2010). Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(4), 625–633. <https://doi.org/10.1189/jlb.1209796>
- Gomez-Lopez, N., Laresgoiti-Servitje, E., Olson, D. M., Estrada-Gutiérrez, G., &

- Vadillo-Ortega, F. (2010a). The Role of Chemokines in Term and Premature Rupture of the Fetal Membranes: A Review1. *Biology of Reproduction*, 82(5), 809–814. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080432>
- Gomez-Lopez, N., Laresgoiti-Servitje, E., Olson, D. M., Estrada-Gutiérrez, G., & Vadillo-Ortega, F. (2010b). The Role of Chemokines in Term and Premature Rupture of the Fetal Membranes: A Review1. *Biology of Reproduction*, 82(5), 809–814. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080432>
- Gomez-Lopez, N., Vadillo-Perez, L., Nessim, S., Olson, D. M., & Vadillo-Ortega, F. (2011). Chorionic decidua and amnion exhibit selective leukocyte chemotaxis during term human labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 204(4), 364.e9-16. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.11.010>
- Guiral, E., Sáez-López, E., Bosch, J., Goncé, A., López, M., Sanz, S., ... Soto, S. M. (2015). Antimicrobial resistance and virulence characterization among escherichia coli clinical isolates causing severe obstetric infections in pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), 1745–1747. <https://doi.org/10.1128/JCM.00487-15>
- Hamilton, S. A., Tower, C. L., & Jones, R. L. (2013). Identification of Chemokines Associated with the Recruitment of Decidual Leukocytes in Human Labour: Potential Novel Targets for Preterm Labour. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056946>
- Harnett, E. L., Dickinson, M. A., & Smith, G. N. (2007). Dose-dependent lipopolysaccharide-induced fetal brain injury in the guinea pig. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 197(2), 179.e1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.03.047>
- Hoang, M., Potter, J. A., Gysler, S. M., Han, C. S., Guller, S., Norwitz, E. R., & Abrahams, V. M. (2014). Human fetal membranes generate distinct cytokine profiles in response to bacterial Toll-like receptor and nod-like receptor agonists. *Biology of Reproduction*, 90(2), 39. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.115428>
- Hunt, J. S. (2006, October). Stranger in a strange land. *Immunological Reviews*, Vol. 213, pp. 36–47. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00436.x>
- Kai, K., Nasu, K., Nakamura, S., Fukuda, J., Nishida, M., & Miyakawa, I. (2002). Expression of interferon-gamma-inducible protein-10 in human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction*, 8(2), 176–180. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.2.176>
- Kim, C. J., Romero, R., Chaemsaitong, P., Chaiyasit, N., Yoon, B. H., & Kim, Y. M. (2015). Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(4)



Suppl), S29-52. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.08.040>

- Kletzky, O. A., Rossman, F., Bertolli, S. I., Platt, L. D., & Mishell, D. R. (1985). Dynamics of human chorionic gonadotropin, prolactin, and growth hormone in serum and amniotic fluid throughout normal human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 151(7), 878–884. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(85\)90665-9](https://doi.org/10.1016/0002-9378(85)90665-9)
- Krauss, T., Osmer, R., Beran, J., Diedrich, F., Fleckenstein, G., & Kuhn, W. (1998). [Soluble adhesion molecules in patients with pre-eclampsia]. *Zentralbl.Gynakol.*, 120(0044-4197 (Print)), 279–283.
- LaPres, J. (2015). Embryology and human development. [Diapositivas en PDF]. Recuperado el 28 de noviembre del 2019, de [http://www.napavalley.edu/people/briddell/Documents/BIO%20218/28\\_LectureOutline.pdf](http://www.napavalley.edu/people/briddell/Documents/BIO%20218/28_LectureOutline.pdf)
- Ledingham, M. A., Thomson, A. J., Jordan, F., Young, A., Crawford, M., & Norman, J. E. (2001). Cell adhesion molecule expression in the cervix and myometrium during pregnancy and parturition. *Obstetrics and Gynecology*, 97(2), 235–242. [https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(00\)01126-1](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(00)01126-1)
- Maaskant, R. A., Bogic, L. V, Gilger, S., Kelly, P. A., & Bryant-Greenwood, G. D. (1996). The human prolactin receptor in the fetal membranes, decidua, and placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(1), 396–405. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.1.8550784>
- Martin, L., Richardson, L., & Menon, R. (2018). Characteristics, Properties, and Functionality of Fetal Membranes: An Overlooked Area in the Field of Parturition. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 387–398). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.64498-7>
- McCoshen, J. A., Tagger, O. Y., Wodzicki, A., & Tyson, J. E. (1982). Chorionic decidua promotes decidua prolactin transport by human fetal membrane. *The American Journal of Physiology*, 243(5), R552-7. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1982.243.5.R552>
- Mendelson, C. R. (2009, July). Minireview: Fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. *Molecular Endocrinology*, Vol. 23, pp. 947–954. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0016>
- Menon, R., Gerber, S., Fortunato, S. J., & Witkin, S. S. (2001). Lipopolysaccharide stimulation of 70 kilo Dalton heat shock protein messenger ribonucleic acid production in cultured human fetal membranes. *Journal of Perinatal Medicine*, 29(2), 133–136. <https://doi.org/10.1515/JPM.2001.017>
- Mor, G., Aldo, P., & Alvero, A. B. (2017, August 1). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 17, pp. 469–482. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.64>

- Nair, R. R., Verma, P., & Singh, K. (2017). Immune-endocrine crosstalk during pregnancy. *General and Comparative Endocrinology*, 242, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.003>
- Osman, I., Crawford, M., Jordan, F., Young, A., Norman, J., & Thomson, A. (2004). Expression and localization of cell adhesion molecules in human fetal membranes during parturition. *Journal of Reproductive Immunology*, 63(1), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2004.04.003>
- Parry, S., & Strauss, J. F. (1998). Premature Rupture of the Fetal Membranes. *New England Journal of Medicine*, 338(10), 663–670. <https://doi.org/10.1056/NEJM199803053381006>
- Peltier, M. R. (2003, December 2). Immunology of term and preterm labor. *Reproductive Biology and Endocrinology*, Vol. 1. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-122>
- Racicot, K., Kwon, J.-Y., Aldo, P., Silasi, M., & Mor, G. (2014). Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 72(2), 107–116. <https://doi.org/10.1111/aji.12289>
- Romero, R., Gomez, R., Galasso, M., Munoz, H., Acosta, L., Yoon, B. H., ... Cotton, D. B. (1994). Macrophage inflammatory protein-1 alpha in term and preterm parturition: effect of microbial invasion of the amniotic cavity. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 32(2), 108–113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1994.tb01101.x>
- Romero, R., Mazor, M., Wu, Y. K., Sirtori, M., Oyarzun, E., Mitchell, M. D., & Hobbins, J. C. (1988). Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Seminars in Perinatology*, 12(4), 262–279. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3065940>
- Romero, R., Dey, S. K., & Fisher, S. J. (2014, August 15). Preterm labor: One syndrome, many causes. *Science*, Vol. 345, pp. 760–765. <https://doi.org/10.1126/science.1251816>
- Schenjken, J., Tolosa, J., Paul, J., Clifton, V. & Smith, R. (2012). Mechanisms of Maternal Immune Tolerance During Pregnancy. In *Recent Advances in Research on the Human Placenta*. <https://doi.org/10.5772/33541>
- Schumacher, A., Costa, S. D., & Zenclussen, A. C. (2014). Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. *Frontiers in Immunology*, Vol. 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00196>
- Shivhare, S. B., Bulmer, J. N., & Lash, G. E. (2015). Immunity at the Maternal-Fetal Interface. In *Mucosal Immunology: Fourth Edition* (Vol. 2–2, pp. 2231–2250). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00114-2>

- Stefanoska, I., Jovanović Krivokuća, M., Vasiljić, S., Čujić, D., & Vićovac, L. (2013). Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro. *Placenta*, 34(9), 775–783. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.06.305>
- Takaono, M., Yogosawa, T., Okawa-Takatsuji, M., & Aotsuka, S. (2002). Effects of intravenous anesthetics on interleukin (IL)-6 and IL-10 production by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear cells from healthy volunteers. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 46(2), 176–179. <https://doi.org/10.1034/j.1399-6576.2002.460209.x>
- Taub, D. D., Lloyd, A. R., Wang, J. M., Oppenheim, J. J., & Kelvin, D. J. (1993). The effects of human recombinant MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and RANTES on the chemotaxis and adhesion of T cell subsets. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 351, 139–146. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2952-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2952-1_15)
- Thomas, S., Fisher, K. H., Snowden, J. A., Danson, S. J., Brown, S., & Zeidler, M. P. (2015). Methotrexate Is a JAK/STAT Pathway Inhibitor. *PloS One*, 10(7), e0130078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130078>
- Tyson, J. E., McCoshen, J. A., & Dubin, N. H. (1985). Inhibition of fetal membrane prostaglandin production by prolactin: Relative importance in the initiation of labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 151(8), 1032–1038. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(85\)90375-8](https://doi.org/10.1016/0002-9378(85)90375-8)
- Vega-Sanchez, R., Arenas-Hernandez, M., Vazquez-Perez, J. A., Moreno-Valencia, Y., & Gomez-Lopez, N. (2015). Evaluation of reference genes for expression studies in leukocytes from term human pregnancy. *Placenta*, 36(2), 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.11.010>
- Weetman, a P. (1999). The immunology of pregnancy. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 9(7), 643–646. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10447007>
- Xu, D.-X., Chen, Y.-H., Wang, H., Zhao, L., Wang, J.-P., & Wei, W. (2006). Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. *Toxicology Letters*, 163(1), 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.09.009>
- Yuan, M., Jordan, F., McInnes, I. B., Harnett, M. M., & Norman, J. E. (2009). Leukocytes are primed in peripheral blood for activation during term and preterm labour. *Molecular Human Reproduction*, 15(11), 713–724. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap054>
- Zaga-Clavellina, Ruiz Velasco-Muñoz, Flores-Espinosa, P. (2012). In vitro secretion profile of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and of human beta-defensins (HBD)-1, HBD-2, and HBD-3 from human chorioamniotic membranes after selective stimulation with *Gardnerella vaginalis*. *American Journal of*

*Reproductive Immunology* (New York, N.Y.: 1989), 67(1), 34–43.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01054.x>

Zaga-Clavellina, V., Garcia-Lopez, G., Flores-Herrera, H., Espejel-Nuñez, A., Flores-Pliego, A., Soriano-Becerril, D., ... Vadillo-Ortega, F. (2007). 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. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 5, 46.  
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-46>

Zaga-Clavellina, V., Parra-Covarrubias, A., Ramirez-Peredo, J., Vega-Sanchez, R., & Vadillo-Ortega, F. (2014). The potential role of prolactin as a modulator of the secretion of proinflammatory mediators in chorioamniotic membranes in term human gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 211(1), 48.e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.01.039>

Zaga, V., Estrada-Gutierrez, G., Beltran-Montoya, J., Maida-Claros, R., Lopez-Vancell, R., & Vadillo-Ortega, F. (2004). Secretions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or chorion with lipopolysaccharides or group B streptococci. *Biology of Reproduction*, 71(4), 1296–1302.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028621>

Zbucka-Kretowska, M., Charkiewicz, K., Czerniecki, J., Goscik, J., Wolczynski, S., & Laudanski, P. (2018). Amniotic Fluid Angiogenic and Inflammatory Factor Profiling in Foetal Down Syndrome. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 44(1), 44–50.  
<https://doi.org/10.1159/000478260>