



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA



**EFFECTO DE LA INSULINA Y LA METFORMINA  
SOBRE LA CAPACIDAD DE DEFENSA INNATA DE  
LA PLACENTA HUMANA ANTE LA INFECCIÓN POR  
*Escherichia coli* EN UN MODELO DE DIABETES  
MELLITUS GESTACIONAL**

**Tesis**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

Rodrigo Jiménez Escutia

**Ciudad de México, 2022**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Dr. Enrique Ortega Soto  
**VOCAL:** Profesor: Dr. José Pedraza Chaverri  
**SECRETARIO:** Profesor: Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez  
**2° SUPLENTE:** Profesor: Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. ANDREA GUADALUPE OLMOS ORTIZ**



**SUSTENTANTE: RODRIGO JIMÉNEZ ESCUTIA**



# AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida para poder realizar este trabajo, durante el periodo Octubre 2020-Septiembre 2021 (número 30513). Este proyecto contó con el apoyo CONACyT con número de registro CB-A1S-27832 perteneciente a la Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz.

Al Instituto Nacional de Perinatología y a la Facultad de Química de la UNAM por ayudar en el proceso de mi formación profesional.

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

A la Dra. Andrea Olmos, por haberme acogido como su alumno, por la confianza que ha depositado en mí, por su apoyo y guía durante estos años, por siempre estar cuando necesitaba ayuda y consejo, por todo. El trayecto hasta este momento ha sido difícil, pero lo hemos logrado. Muchas gracias por ser tan paciente conmigo, y por todas las enseñanzas que me ha dado.

A mi familia, por su amor, apoyo y comprensión que me permiten acabar esta tesis, gracias por haberme dado todo lo necesario para terminar mi formación profesional, sin ustedes jamás habría llegado hasta aquí.

A Addí Shaddai, por reconfortarme cuando era un mal día, por acompañarme en mi vida y permitirme acompañarte en la tuya, por todo tu cariño y comprensión. Por ser mi apoyo incondicional, por ser y estar.

A Donovan y Alejandra, por ser los mejores compañeros de laboratorio que he tenido, por todas las pláticas y alegrías, por ser mis amigos.

A Luis y Atzelvy, por todo su apoyo y amistad a lo largo de estos 8 años, por ser mis mejores amigos y fuente de alegrías.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
SIGLAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	-1-
II. ANTECEDENTES.....	-4-
2.1 Diabetes mellitus gestacional.....	-4-
2.1.1 DMG en México.....	-5-
2.1.2 Fisiopatología de la DMG.....	-6-
2.2 Infecciones urinarias y cervicovaginales asociadas a la DMG. -8-	
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	-9-
2.3 Placenta y su actividad de defensa inmune innata.....	-11-
2.3.1 Morfofisiología de la placenta humana.....	-12-
2.3.2 Expresión de TLRs en la placenta humana.....	-15-
2.3.3 Síntesis de beta defensinas humanas por la placenta humana.....	-17-
2.4 Tratamiento farmacológico de la DMG.....	-19-
2.4.1 Insulina.....	-20-
2.4.2 Metformina.....	-24-
III. HIPÓTESIS.....	-29-
IV. OBJETIVOS.....	-29-
4.1 Objetivo general.....	-29-

4.2	Objetivos específicos.....	-29-
V.	METODOLOGÍA.....	-30-
5.1	Consideraciones éticas.....	-30-
5.2	Toma de muestras.....	-30-
5.3	Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	-31-
5.4	Variables de estudio.....	-32-
5.5	Adición de glucosa al medio de cultivo para generar hiperglucemia.....	-32-
5.6	Modelo <i>ex vivo</i> : cultivo de explantes placentarios.....	-33-
5.7	Modelo <i>in vivo</i> : Cultivo primario de trofoblastos humanos.....	-34-
5.8	Análisis microbiológico de las muestras.....	-37-
5.9	Tratamientos experimentales.....	-37-
5.10	Cuantificación intracelular de HBDs por ensayo de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA).....	-38-
5.11	Método de Bradford para cuantificación de proteína total.....	-39-
5.12	ELISA tipo sándwich.....	-40-
5.13	Extracción de RNA mensajero (mRNA) de células trofoblásticas.....	-42-
5.14	Síntesis de DNA complementario (cDNA) por retrotranscripción.....	-43-
5.15	Expresión génica de los TLRs 1-9 por PCR cuantitativa (qPCR).....	-45-
5.16	Cepa de <i>Escherichia coli</i> .....	-46-
5.17	Ensayo de actividad antimicrobiana por conteo de unidades formadoras de colonias.....	-46-

5.18 Caracterización morfológica del cultivo de explantes placentarios por tinción de Hematoxilina y Eosina.....	<b>-47-</b>
5.19 Seguimiento de la infección placentaria por <i>E.coli</i> a través de la tinción de Gram.....	<b>-47-</b>
5.20 Análisis estadístico.....	<b>-48-</b>
VI. RESULTADOS.....	<b>-49-</b>
6.1 Características clínicas.....	<b>-49-</b>
6.2 Estandarización del modelo <i>ex vivo</i> de diabetes mellitus gestacional.....	<b>-50-</b>
6.3 Efecto de la insulina y la metformina sobre la producción de beta defensinas humanas 1,2,3 y 4 en explantes placentarios del tercer trimestre.....	<b>-52-</b>
6.4 Efecto de la insulina y la metformina sobre la expresión génica de los TLR en la placenta humana.....	<b>-56-</b>
6.5 Efecto de la insulina y la metformina sobre la capacidad de defensa de la placenta humana ante la infección por <i>Escherichia coli</i> .....	<b>-58-</b>
VII. RESUMEN DE RESULTADOS.....	<b>-63-</b>
VIII. ANALISIS DE RESULTADOS.....	<b>-64-</b>
IX. CONCLUSIONES.....	<b>-72-</b>
X. REFERENCIAS.....	<b>-73-</b>
ANEXO 1.....	<b>-83-</b>
ANEXO 2.....	<b>-84-</b>
ANEXO 3.....	<b>-85-</b>
ANEXO 4.....	<b>-87-</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Factores de virulencia de <i>E. coli</i> uropatogénica.....	<b>-11-</b>
<b>Figura 2.</b> Anatomía de la placenta y de las vellosidades placentarias.....	<b>-14-</b>
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos.....	<b>-18-</b>
<b>Figura 4.</b> Activación de la vía de MAPK por acción de la insulina.....	<b>-22-</b>
<b>Figura 5.</b> Activación de la vía de la PI3K por acción de la insulina.....	<b>-23-</b>
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de acción de la metformina dependiente e independiente de AMPK.....	<b>-27-</b>
<b>Figura 7.</b> Distribución de las muestras para cuantificación de proteína total por el método de Bradford.....	<b>-40-</b>
<b>Figura 8.</b> El medio condicionado con glucosa 50 mM estimula la producción de los marcadores inflamatorios TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ .....	<b>-51-</b>
<b>Figura 9.</b> La hiperglucemia disminuye la producción de beta defensina 1 (HBD1) en la placenta humana. El tratamiento con insulina o metformina no modifica el perfil de producción de este péptido.....	<b>-53-</b>
<b>Figura 10.</b> La hiperglucemia disminuye la producción de beta defensina 2 (HBD2) en la placenta humana. El tratamiento con insulina o metformina no modifica el perfil de producción de este péptido.....	<b>-54-</b>
<b>Figura 11.</b> La hiperglucemia disminuye la producción de beta defensina 3 (HBD3) en la placenta humana. El tratamiento con insulina no modifica el perfil de producción de este péptido, el tratamiento con metformina 125 $\mu$ M restituye la producción de este péptido.....	<b>-55-</b>



**Figura 12.** La hiperglucemia disminuye la producción de beta defensina 4 (HBD4) en la placenta humana. El tratamiento con insulina o metformina no modifica el perfil de producción de este péptido..... **-56-**

**Figura 13.** La infección placentaria por *E. coli* es más severa en condiciones de hiperglucemia. El tratamiento con insulina no modifica el crecimiento de esta bacteria. El tratamiento con metformina restituye la capacidad de defensa de la placenta..... **-60-**

**Figura 14.** La infección por *Escherichia coli* es más invasiva en condiciones de hiperglucemia..... **-62-**

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Patrón temporal de expresión de TLRs en el trofoblasto humano.....	<b>-16-</b>
<b>Tabla 2.</b> Soluciones enzimáticas empleadas para digerir los cotiledones placentarios..	<b>-35-</b>
<b>Tabla 3.</b> Preparación del gradiente de Percoll.....	<b>-36-</b>
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones de los anticuerpos de captura y detección, y del estándar de la marca PeproTech utilizados para la técnica de ELISA.....	<b>-42-</b>
<b>Tabla 5.</b> Mezcla de eliminación de DNA genómico.....	<b>-44-</b>
<b>Tabla 6.</b> Mezcla de reacción para retrotranscripción de cDNA.....	<b>-44-</b>
<b>Tabla 7.</b> Protocolo de amplificación del cDNA por qPCR.....	<b>-46-</b>
<b>Tabla 8.</b> Características clínicas de las madres donadoras y sus neonatos.....	<b>-49-</b>
<b>Tabla 9.</b> Expresión génica de los receptores tipo Toll en la placenta humana.....	<b>-57-</b>

## SIGLAS

**ACC1:** Acetil-CoA carboxilasa 1

**ACC2:** Acetil-CoA carboxilasa 2

**ADP:** Adenosina difosfato

**aerJ:** Aerobactina

**AGEs:** Productos de glicación avanzada

**AKT:** Proteína cinasa Akt

**AMPK:** Cinasa activada por AMP

**AMP:** Adenosina monofosfato

**AMPs:** Péptidos antimicrobianos

**APGAR:** Evaluación física del neonato en el que se califica su aspecto, pulso, irritabilidad (del inglés *grimace*), actividad y respiración

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BHI:** Caldo infusión cerebro corazón.

**BSA:** Albúmina sérica bovina

**cAMP:** AMP cíclico

**cDNA:** DNA complementario

**CNF1:** Factor citotóxico necrotizante 1

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**CREB:** Proteína de unión a los elementos de respuesta al AMP cíclico

**CRTC2:** Coactivador transcripcional-2

**CTV:** Citotrofoblasto veloso

**CXCL-16:** Dieciseisavo ligando de quimiocina con motivo CXC

**DAMP:** Patrón molecular asociado a daño

**DE:** Desviación estándar

**DM2:** Diabetes mellitus tipo 2

**DMEM:** Medio de Dulbecco modificado de Eagle

**DMG:** Diabetes mellitus gestacional

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DNAsa:** Desoxirribonucleasa I

**ECEA:** *Escherichia coli* enteroagregativa

**ECEH:** *Escherichia coli* enterohemorrágica

**ECEI:** *Escherichia coli* enteroinvasiva

**ECEP:** *Escherichia coli* enteropatógena

**ECET:** *Escherichia coli* enterotoxigénica

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**ELISA:** Ensayo de enzimoimmunoanálisis de adsorción

**ENSANUT:** Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

**Elk-1:** Factor de transcripción Elk-1

**ERK1/2:** Cinasa reguladora de la señal extracelular 1 y 2

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana

**Glu:** Glucosa

**GLUT4:** Transportador de glucosa 4

**Grb2:** Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento

**GSK3 $\beta$ :** Glicógeno sintasa cinasa 3 $\beta$

**IL-6:** Interleucina 6

**G6Pasa:** Glucosa-6-fosfatasa

**Fe<sup>3+</sup>:** Ión férrico

***fimH:*** Adhesina H

**FOXO:** Caja O de la familia forkhead

**FBPasa:** Fructuosa-1,6-bifosfatasa.

**HBDs:** beta defensinas humanas

**HBD1:** beta defensina humana 1

**HBD2:** beta defensina humana 2

**HBD3:** beta defensina humana 3

**HBD4:** beta defensina humana 4

**HBSS:** Solución salina balanceada de Hank

**hCG:** Gonadotropina coriónica humana

**HEPES:** Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil-(1)] etanosulfónico

**HRP:** Peroxidasa de rábano

***hlyA:***  $\alpha$ -hemolisina

**H&E:** Hematoxilina y Eosina

**IADPSG:** Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta

**IL-10:** Interleucina 10

**IMC:** Índice de masa corporal

**INEGI:** Instituto Nacional de Estadística y Geografía

**INS:** Insulina

**INSP:** Instituto Nacional de Salud Pública

**INPer:** Instituto Nacional de Perinatología

**IR:** Receptor de insulina

**IR-A:** Receptor de insulina A

**IR-B:** Receptor de insulina B

**IRS:** Sustrato del receptor de insulina

**ITU:** Infección del tracto urinario

**LL-37:** Catelicidina

**LPS:** Lipopolisacárido

**MAPK:** Proteína cinasa activada por mitógenos

**MEK:** MAP cinasa que fosforila a ERK

**MET:** Metformina

**mRNA:** RNA mensajero

**mTORC1:** Complejo 1 de la diana de rapamicina de mamíferos

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NaF:** Fluoruro de sodio

**Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:** Fosfato de sodio

**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>:** Ortovanadato de sodio

**NaHCO<sub>3</sub>:** Bicarbonato de sodio

**NFκB:** Factor nuclear kappa B

**NKs:** Células asesinas naturales

**OCT1:** Transportador de cationes orgánicos 1

**OCT3:** Transportador de cationes orgánicos 3

**OGTT:** Estudio de tolerancia oral a la glucosa

**OPD:** o-fenilendiaminadihidrocloruro

**PAMP:** Patrones moleculares asociados a patógenos

**PBS:** Buffer fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDE4B:** 3,5-fosfodiesterasa cíclica 4B específica de AMPc

**PDK:** Cinasa dependiente de fosfoinositol

**PEPCK:** Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

**PIP<sub>3</sub>:** Fosfatidilinositol trifosfato

**PI3K:** Fosfatidilinositol-3-cinasa

**PMAT:** Transportador de monoaminas de la membrana plasmática

**PMNs:** Células polimorfonucleares

**PP:** Parto pretérmino

**PROM:** Ruptura prematura de membranas corioamnióticas

**PRR:** Receptor de reconocimiento de patrones

**p38MAPK:** Proteínas cinasas p38 activadas por mitógenos

**qPCR:** PCR cuantitativa

**Raf-1:** MAP cinasa que fosforila a MEK

**Ras:** GTPasa Ras

**rBD1:**  $\beta$ -defensina 1 de ratón

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RNAse 7:** Ribonucleasa 7

**SCT:** Sinciciotrofoblasto

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**Shc:** Proteína adaptadora Shc

**SII:** Sistema inmune innato

**SOS:** Proteína intercambiadora de nucleótidos SOS

**SPATEs:** Autotransportador de proteasas de serina de *Enterobacteriaceae*

**SREP1c:** Proteína de unión a elementos regulatorios de esterol 1c

**STAT:** Transductor de señal y activador de transcripción

**STNi:** Suero de ternera neonatal inactivado.

**S6K:** Cinasa S6



**TBC1D4:** Miembro 4 del dominio familiar RabGAP TBC1

**Th1:** Linfocitos T cooperadores tipo 1

**TLRs:** Receptores tipo Toll

**TLR1:** Receptor tipo Toll 1

**TLR2:** Receptor tipo Toll 2

**TLR3:** Receptor tipo Toll 3

**TLR4:** Receptor tipo Toll 4

**TLR5:** Receptor tipo Toll 5

**TLR6:** Receptor tipo Toll 6

**TLR7:** Receptor tipo Toll 7

**TLR8:** Receptor tipo Toll 8

**TLR9:** Receptor tipo Toll 9

**TLR10:** Receptor tipo Toll 10

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TRIS-HCl:** Tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico

**TSC2:** Proteína de esclerosis tuberosa 2

**UFC:** Unidades formadoras de colonia

**UPEC:** *Escherichia coli* uropatogénica

# ABREVIATURAS

**°C:** Grados Celsius

**cm:** Centímetros

**G:** Gravedades

**h:** Horas

**Kg:** Kilogramos

**kg/m<sup>2</sup>:** Kilogramos sobre metro cuadrado

**L:** Litro

**M:** Molar

**mg/dL:** Miligramo sobre decilitro

**min:** Minutos

**mL:** Mililitros

**mM:** Milimolar

**mm<sup>2</sup>:** Milímetro cuadrado

**ng/mL:** Nanogramo sobre mililitro

**nM:** Nanomolar

**nm:** Nanómetro

**pg/mL:** Picogramo sobre mililitro

**rpm:** Revoluciones por minuto

**U/mL:** Unidades sobre mililitro

**UFC/mL:** Unidades formadoras de colonia sobre mililitro

**$\mu\text{g}$** : Microgramo

**$\mu\text{g/mL}$** : Microgramo sobre mililitro

**$\mu\text{L}$** : Microlitro

**$\mu\text{M}$** : Micromolar

**$\bar{X}$** : Promedio

## RESUMEN

La diabetes mellitus gestacional (DMG) es una complicación del embarazo caracterizada por hiperglucemia y resistencia periférica a la insulina. La DMG provoca el debilitamiento del sistema inmune innato (SII) al disminuir la expresión de las beta defensinas humanas (HBDs) y modificar el patrón de expresión de los receptores tipo Toll (TLRs). Este debilitamiento se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar infecciones cervicovaginales, además, entre el 5 y el 20% de los embarazos desarrollan infecciones del tracto urinario (ITU) siendo *Escherichia coli* el principal agente etiológico, estando presente en el 86% de los casos. La insulina y la metformina son los fármacos de elección para tratar a pacientes con DMG y ambos han demostrado regular el SII. Este trabajo consistió en estudiar el efecto de la insulina y la metformina sobre la producción de HBDs y la expresión de los TLRs en la placenta humana, así como la capacidad de defensa placentaria ante una infección por *E. coli* en un modelo de DMG. Para ello se utilizó un modelo *ex vivo* de explantes placentarios, a los cuales se les indujo un estado de hiperglucemia (glucosa 50 mM) y se co-trataron con insulina o metformina, para cuantificar la producción de HBDs. Además, se evaluó la capacidad de defensa innata contra la infección con  $1 \times 10^5$  UFC/mL de *E. coli*, para lo cual se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y se observó la invasividad de la bacteria en los explantes placentarios. Por otro lado, se utilizó un modelo *in vitro* de trofoblastos aislados de placentas a término para estudiar la expresión de los TLRs en condiciones de hiperglucemia con insulina o metformina. Como resultados se obtuvo que la hiperglucemia disminuye la producción de HBDs en la placenta, que aumenta la expresión de TLR7 y TLR9, y que disminuye la capacidad de defensa pues aumenta el conteo de UFC y la invasividad de la bacteria respecto a un estado de normoglucemia (Glucosa 10 mM). También se observó que el tratamiento con insulina no mejora la producción de HBDs, pero sí disminuye la expresión de los TLR4, TLR7 y TLR9 respecto a la condición de hiperglucemia, sin observarse una mejora en el conteo de UFC. Finalmente, la metformina restituye la producción de HBD3, y disminuye el conteo de UFC e invasividad en condiciones de hiperglucemia. En conclusión, la metformina mejora la capacidad de defensa placentaria ante una infección por *E. coli* en este modelo de DMG. Estos resultados contribuyen a dilucidar los mecanismos de acción de estos fármacos en la placenta humana en el contexto de la DMG y de la promoción de la salud en el área de medicina perinatal.

## I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, en la región de América del Norte y Caribe se reportó en el 2019 una incidencia del 20.8% de hiperglucemia durante el embarazo, donde el 83.6% fue debido a la DMG. En México se describió una incidencia entre el 8.7% y el 17.7% (González-Ruiz et al., 2014; Hinojosa-Hernández et al., 2010; INPer, 2019). Los principales factores de riesgo conocidos son: la obesidad y sobrepeso pre-gestacional, antecedente personal de DMG en embarazos anteriores o antecedentes familiares en primer grado con diabetes mellitus tipo 2 (Alejandro et al., 2020; Giannakou et al., 2019). Actualmente, México considera a la DMG como una enfermedad de especial importancia en Salud Pública dada su incidencia y sus complicaciones materno-fetales.

Lamentablemente, se estima que este problema podría ser mayor en el futuro debido al incremento en el porcentaje de mujeres en edad reproductiva con sobrepeso o con obesidad (Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública e INEGI, 2018).

Una de las complicaciones más frecuentes en pacientes con DMG es el desarrollo de infecciones del tracto urinario (ITU) e infecciones cervicovaginales durante su embarazo, debido a cambios en la morfología y en la inmunidad local vaginal secundarios a la hiperglucemia (Kalinderi et al., 2018). Asimismo, se ha reportado que la hiperglucemia disminuye la síntesis de factores de la inmunidad innata como las beta defensinas humanas 2 y 3 (HBD2, HBD3) en macrófagos y queratinocitos (Lan et al., 2012; Lan et al., 2011; Montoya-Rosales et al., 2016), y por lo tanto aumenta el riesgo de desarrollar vaginosis (Stapleton, 2016). Finalmente, la DMG es una condición que incrementa el riesgo de parto pretérmino (PP) y ruptura prematura de membranas (PROM) debido al estado de meta-inflamación asociado a esta patología (Chuan et al., 2018). Adicionalmente, las principales complicaciones de las ITU y las infecciones cervicovaginales son justamente PROM y PP (Agger et al., 2014; Bernardo et al., 2021; Dautt-Leyva et

al., 2018), por lo que seguramente existe un sinergismo entre ambas condiciones. Dado que el PP es la principal causa de muerte neonatal (da Fonseca et al., 2020) resulta imperante desarrollar estrategias de intervención clínica que fortalezcan la respuesta inmune de estas pacientes y, de esta forma, potencialmente impactar en la disminución de la tasa de infecciones de mujeres que cursan su embarazo con DMG.

*Escherichia coli* es la bacteria gram negativa más común en las ITU, reportándose en el 80-90% de las ITUs en México (Dautt-Leyva et al., 2018). A su vez, *E. coli* es causante del 11% de las infecciones cervicovaginales en mujeres en edad reproductiva (Monroy-Pérez et al., 2020), y es la bacteria Gram negativa más frecuentemente identificada en este grupo de infecciones. Por ello, nos hemos centrado en este patógeno para estudiar la defensa innata placentaria en el marco de la DMG. Asimismo, se planteó evaluar si la insulina y la metformina pueden regular dicha defensa, específicamente al inducir la producción de HBDs y modular la expresión de los TLRs 1-9 en este tejido.

Esta tesis forma parte del macroproyecto “Evaluación del efecto de la insulina y la metformina sobre el perfil inflamatorio y la inmunidad innata de la placenta humana en un modelo *in vitro* de diabetes mellitus gestacional” dirigido por la Dra. Andrea Olmos, en el que se propone que los hipoglucemiantes insulina y metformina pueden fungir como factores protectores durante el embarazo al disminuir el estado de inflamación asociado a la DMG, disminuir la quimioatracción de células mononucleares inflamatorias y asimismo proteger ante el riesgo del desarrollo de infecciones cérvico-vaginales y urinarias en las pacientes con DMG. Esta propuesta se cimienta en diversos estudios que posicionan a estas moléculas como importantes inmunomoduladores que promueven la respuesta inmune contra bacterias *in vitro* e *in vivo*. Los resultados experimentales obtenidos del presente proyecto pueden contribuir en el entendimiento de los mecanismos de inmunomodulación que ejercen la insulina y la metformina en la placenta humana. Estos resultados permitirán evaluar la capacidad de estos fármacos para regular la respuesta de defensa innata y la actividad antimicrobiana en la placenta en una

población de riesgo como las mujeres con DMG. En conjunto, estas metas podrán impactar en el futuro en el área de promoción de la salud perinatal.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 Diabetes mellitus gestacional**

La DMG es una complicación del embarazo caracterizada por intolerancia a los carbohidratos, hiperglucemia y resistencia periférica a la insulina (De Luccia et al., 2020). Esta enfermedad generalmente debuta entre las semanas 24 a 28 de gestación en mujeres que previo al embarazo no tenían diabetes (International Diabetes Federation, 2019). Existen diversos factores de riesgo para el desarrollo de esta patología. Los dos factores de mayor relevancia en el desarrollo de DMG son el sobrepeso/obesidad pre-gestacional y la acelerada ganancia de peso durante el embarazo (Giannakou et al., 2019). Otros factores de riesgo implicados son: antecedentes familiares de diabetes o DMG, tener una dieta hipercalórica, edad avanzada de la madre o enfermedades que conlleven a resistencia periférica a la insulina como el síndrome de ovario poliquístico (Alejandro et al., 2020; Moon et al., 2017; Olmos-Ortiz et al., 2021).

Lamentablemente, el desarrollo de DMG incrementa diferentes riesgos clínicos tanto para la madre como para el bebé. En el caso de la madre se ha descrito mayor prevalencia de preeclampsia, eclampsia y parto pretérmino en el corto plazo; a largo plazo se ha encontrado que aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Lorenzo-Almorós et al., 2019). En el caso del bebé, los riesgos a corto plazo incluyen macrosomía, distocia de hombros, hipoglicemia neonatal y elección de cesárea; a largo plazo, el bebé tiene mayor riesgo de desarrollar DM2 durante la vida adulta (Chiefari et al., 2017).

Si bien, la madre con DMG presenta profundos cambios metabólicos, en particular en el metabolismo de la glucosa, recientemente se ha descrito también la afectación del eje inmunoendocrino ( Olmos-Ortiz et al., 2021). Derivado de las condiciones hiperglucémicas se favorece una respuesta sistémica denominada meta-inflamación, un estado de inflamación crónica de bajo grado (Li et al., 2020).



El cuadro de meta-inflamación de la DMG se caracteriza por un aumento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias en sangre, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), quimiocinas como el dieciseisavo ligando de quimiocina con motivo CXC (CXCL-16) y elementos de respuesta de linfocitos T cooperadores de tipo 1 (Th1); a la vez que disminuye la concentración de factores anti-inflamatorios como interleucina 10 (IL-10) y adiponectina (Zhang et al., 2017). Estas moléculas inician señales intracelulares de inflamación que son deletéreas para el embarazo, ya que la inflamación crónica y aguda se asocian con pobres pronósticos fetales tales como ruptura de membranas o parto pretérmino (Chuan et al., 2018).

Asimismo, el condicionamiento del sistema inmune innato derivado del curso con DMG, está asociado a un mayor riesgo de desarrollar infecciones del tracto genitourinario (Schneeberger et al., 2018), particularmente de infecciones urinarias, vulvares y cervicovaginales (Zhang et al., 2018; Rafat et al., 2021).

### **2.1.1 DMG en México**

Hasta el momento no se cuenta con la cifra oficial de incidencia de DMG en México (Sosa-Rubi et al., 2019). Diversos autores han reportado dicha estadística en sus Instituciones. Por ejemplo, González-Ruiz et al., (2014) reportó una incidencia de 8.7% a 17.7% a nivel nacional y de 13% en el Hospital Juárez de México. A su vez, el INPer (2019) reportó una tasa combinada de DMG y diabetes preexistente de 9.9%; además, la tasa de neonatos con diagnóstico de trastornos metabólicos de los carbohidratos fue de 20 por cada 1000 (CITA), lo que habla de su impacto transgeneracional. Por otra parte, la Federación Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation, 2019) reportó una incidencia del 20.8% para hiperglucemia durante el embarazo, donde el 83.6% era debido a la DMG, en la región de América del Norte y Caribe.

Actualmente, México considera a la DMG como una enfermedad de especial importancia en Salud Pública dada su alta incidencia y sus complicaciones

materno-fetales. Lamentablemente, se estima que este problema podría ser mayor en el futuro. La ENSANUT de 2018 reportó que tanto la obesidad como el sobrepeso mostraban tendencias al alza en el grupo de mujeres en edad reproductiva, pasando del 73.0% en 2012 al 76.8% en 2018 (Secretaría de Salud, INSP e INEGI, 2018). Tal como se describió previamente, el sobrepeso y la obesidad pre-gestacional están altamente asociados con el desarrollo de DMG, por lo que las cifras de este informe alertan de un altamente probable incremento en la incidencia de DMG en México.

### **2.1.2 Fisiopatología de la DMG**

De forma breve, la DMG es producto de la incapacidad materna para responder a la resistencia fisiológica de insulina que se desarrolla durante el embarazo, lo que resulta en un estado de hiperglucemia crónica (Szmuiłowicz et al., 2019). A continuación, se describirá con mayor detalle cada una de estas etapas.

Primero, se debe partir de que la sensibilidad a la insulina varía a lo largo de la gestación (Filardi et al., 2019). La sensibilidad a la insulina se puede entender como la capacidad de respuesta celular a esta hormona a través de la señalización por su receptor, en especial por parte de células insulino-dependientes como los adipocitos y los miocitos (Barazzoni et al., 2018). Durante el primer trimestre del embarazo existe una mayor sensibilidad periférica a esta hormona en comparación con la sensibilidad observada previa al embarazo. Dicho aumento es necesario para aumentar las reservas energéticas maternas, ya que la insulina promueve la glucólisis, la glucógeno-génesis y la lipogénesis a la par que inhibe la lipólisis y la glucogenólisis. Como resultado neto, la madre incrementa su reserva de tejido adiposo que se utilizará como sustrato energético durante el embarazo tardío (Skajaa et al., 2020).

Conforme el embarazo progresa, el feto requiere de un mayor aporte energético para sostener su tasa de crecimiento. Por lo que gradualmente diversas hormonas placentarias como los estrógenos, progesterona, lactógeno placentario o la leptina

generan un ambiente que promueve la resistencia a la insulina con el objetivo de aumentar los niveles de glucosa en sangre y que ésta pueda ser preferencialmente transportada a través de la placenta hacia el feto para favorecer su crecimiento (Plows et al., 2018). Por lo tanto, a partir del 2<sup>do</sup> trimestre se desarrolla un estado fisiológico de resistencia a la insulina que normalmente desaparece al término de la gestación. La mayoría de las madres son capaces de responder adecuadamente a este reto de resistencia periférica mediante un incremento en la proliferación de las células beta pancreáticas, lo cual lleva a un aumento en la síntesis y secreción de insulina. Sin embargo, otro porcentaje de mujeres no puede adaptarse a estos cambios y desarrollan DMG (Dirar y Doupis, 2017).

Los mecanismos por los cuales se produce la disfunción de las células beta pancreáticas son complejos, pero una de las hipótesis que cuenta con mayor aceptación se centra en la obesidad (Law y Zhang, 2017). En las mujeres con sobrepeso y obesidad pregestacional se genera un ambiente citotóxico e inflamatorio que vulnera la actividad y respuesta de las células beta pancreáticas. De esta forma, las señales celulares que normalmente culminan en la hipertrofia e hiperplasia beta pancreática no pueden activarse debido al ambiente lipotóxico, y finalmente no existe una suficiente síntesis de insulina que contrarreste la resistencia periférica a esta hormona (Boland et al., 2017). La resistencia a la insulina se relaciona con el bloqueo de uno o varios procesos a lo largo de la vía de señalización de la insulina como su síntesis, almacenamiento, secreción, unión con su receptor, factores involucrados en la cascada de señalización o la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) a la membrana celular (Tokarz et al., 2018).

Como resultado final, el estado de resistencia a la insulina favorece la hiperglucemia crónica después de la semana 24 de gestación, y se establece el cuadro de DMG.

## 2.2 Infecciones urinarias y cervicovaginales asociadas a la DMG

Durante el embarazo, se desarrollan diversos cambios anatómicos y funcionales en el tracto urinario, como el aumento en el volumen de orina, la disminución de tono y peristalsis en la uretra, además de los cambios en el pH y en la osmolaridad de la orina. En conjunto, estos cambios incrementan el riesgo de ITU durante el embarazo, ocurriendo en el 5-20% de ellos (Kalinderi et al., 2018). Su sintomatología se manifiesta como dolor en la micción (disuria), alta frecuencia de micción (polaquiuria), fiebre, comezón, dolor, irritación en el área uretral o abdominal, y en casos graves se puede complicar como pielonefritis o cistitis aguda (Bahadi et al., 2010). La bacteriuria sintomática se define con conteos arriba de  $1 \times 10^5$  UFC por cada mililitro de orina.

Según un reciente reporte clínico, la bacteria más frecuente en estas infecciones es *Escherichia coli* (86%), seguido de *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella spp*, y *Enterobacter spp* (Kalinderi et al., 2018). Estas cifras coinciden con el reporte de 80-90% de las infecciones urinarias en embarazadas mexicanas, causadas por *E. coli* (Dautt-Leyva et al., 2018). Parece ser que la DMG no aumenta el riesgo de desarrollar una ITU respecto a pacientes sin DMG (Mekapogu et al., 2016; Schneeberger et al., 2018); sin embargo, la prevalencia de ITU es alta durante el embarazo de manera general (Beksac et al., 2019; Nicolle et al., 2019). Por otra parte, la DMG sí aumenta el riesgo de desarrollar infecciones vulvares y cervicovaginales (Rafat et al., 2021; Zhang et al., 2018), y se ha demostrado un aumento en el tiempo de persistencia de estas infecciones en las pacientes con DMG. Como es de esperar, el descontrol glicémico materno se correlaciona positivamente con el desarrollo de este grupo de infecciones (Nowakowska et al., 2004).

Se considera que existe una infección cervicovaginal por bacterias cuando hay un desequilibrio en la microbiota vaginal, es decir, menor conteo de lactobacilos y la presencia de bacterias patógenas (como *E. coli*) o no patógenas (como *Gardnerella sp.*) (Paniagua-Contreras et al., 2019). Esta condición afecta a prácticamente la mitad de las mujeres en edad reproductiva y se caracteriza por

secreción purulenta, dolor vulvar y ardor (Bagnall y Rizzolo, 2017). Para diagnosticarse se realiza la tinción de Gram junto a la escala de Nugent (Positividad de 7-10) (Chawla et al., 2013).

El principal agente etiológico de las infecciones cervicovaginales durante el embarazo son los estreptococos del grupo B, seguido de *Candida spp* (Lukic et al., 2017). El tercer patógeno más importante en el desarrollo de infecciones cervicovaginales es la *E. coli* uropatogénica, la cual ha despertado especial alarma debido al aumento de sus cepas resistentes a antibióticos (Mazzariol et al., 2017; Rashki, 2014). *E. coli* es causante del 11% de las infecciones cervicovaginales en mujeres en edad reproductiva (Monroy-Pérez et al., 2020) y es la principal bacteria gram negativa dentro del grupo de las infecciones cervicovaginales (Paniagua-Contreras et al., 2019; Sáez-López et al., 2016).

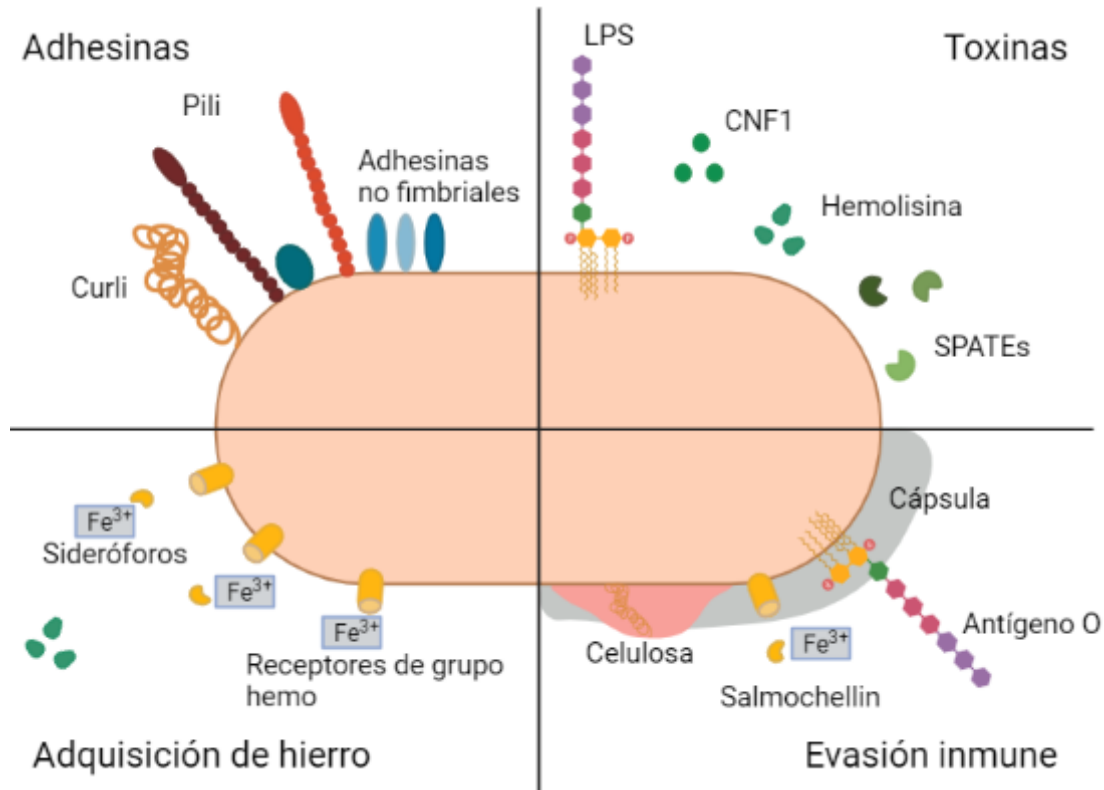
En conjunto, las ITU y las infecciones cervicovaginales condicionan el desarrollo de complicaciones obstétricas como parto pretérmino, ruptura prematura de membranas corioamnióticas (RPM), hipoglicemia neonatal y macrosomía (Benedetto et al., 2004; Kalinderi et al., 2018; Rafat et al., 2021). Por lo tanto, su oportuna detección y tratamiento juegan un papel crucial para mejorar la calidad de vida de las pacientes.

En consideración de que, durante el embarazo, *E. coli* es el principal factor etiológico asociado a ITU y el tercero asociado a infecciones cervicovaginales, a continuación, se describirá con mayor profundidad el papel de esta bacteria durante la gestación.

### **2.2.1 *Escherichia coli***

*E. coli* es un bacilo gram negativo que puede encontrarse formando parte de la microbiota intestinal, pero presenta 6 patotipos asociados a diferentes manifestaciones clínicas. Estos patotipos son: enteropatógena (ECEP), enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH), enteroagregativa (ECEA) y uropatogénica (UPEC).

El principal patotipo de *E. coli* identificado en las ITU e infecciones cervicovaginales, es la UPEC (Kot, 2019). Este patotipo presenta varios factores de virulencia que le permiten evadir mecanismos de defensa del hospedero como el flujo de orina, exfoliación de las células uroteliales, factores antimicrobianos endógenos o la actividad de neutrófilos (Joshua y Raymond, 2014). Entre estos factores de virulencia encontramos adhesinas que le permiten invadir y adherirse a las células huésped como las Fimbria Curli o la Adhesina H (*fimH*); toxinas que le permiten una mayor invasión al destruir la integridad celular o eliminar células inmunes como la  $\alpha$ -hemolisina (*hylA*); moléculas que le permiten adquirir hierro como los sideróforos o la aerobactina (*aerJ*) y aquellas que le permiten evadir al sistema inmune como la cápsula bacteriana (Lüthje y Brauner, 2014). En la **Figura 1** se muestran los principales factores de virulencia de las UPEC.



**Figura 1. Factores de virulencia de *E. coli* uropatogénica. Tomado de Lühje y Brauner (2014).** Este patotipo de *E. coli* expresa factores de virulencia que le permiten adherirse a las células huésped como las adhesinas Curli o los adhesinas afimbriales; también expresa toxinas como la  $\alpha$ -hemolisina que elimina a los neutrófilos, o el LPS que en algunas cepas le permite escapar del sistema de complemento. Debido a la importancia del hierro en las vías metabólicas de esta bacteria, expresa múltiples factores que le ayudan a adquirir este mineral como los sideróforos o la aerobactina; así mismo posee una cápsula que le confiere resistencia ante factores del suero. LPS: lipopolisacárido. CNF1: Factor citotóxico necrotizante 1. SPATEs: Autotransportador de proteasas de serina de *Enterobacteriaceae*.  $Fe^{3+}$ : ión férrico.

### 2.3 Placenta y su actividad de defensa inmune innata

La placenta es el órgano fetal de mayor tamaño y es el primero en desarrollarse tras la fertilización. Juega un papel central en la salud tanto de la madre como del feto, por lo que un defecto en su desarrollo se asocia a patologías como

preeclampsia, restricción de crecimiento intrauterino, abortos recurrentes o muerte fetal (Turco y Moffett, 2019). La placenta ejerce múltiples funciones centrales durante la gestación: por ejemplo, el intercambio selectivo de nutrientes provenientes de la madre hacia el feto; permite el intercambio gaseoso; secreta diversas hormonas que promueven y mantienen el embarazo como la progesterona, la gonadotropina coriónica humana (hCG) o el lactógeno placentario; y promueve la remodelación de las arterias espiraladas, proceso crucial para aumentar el volumen sanguíneo que llega a la placenta a la vez que mantiene una presión arterial adecuada (Knöfler et al., 2019).

### **2.3.1 Morfofisiología de la placenta humana**

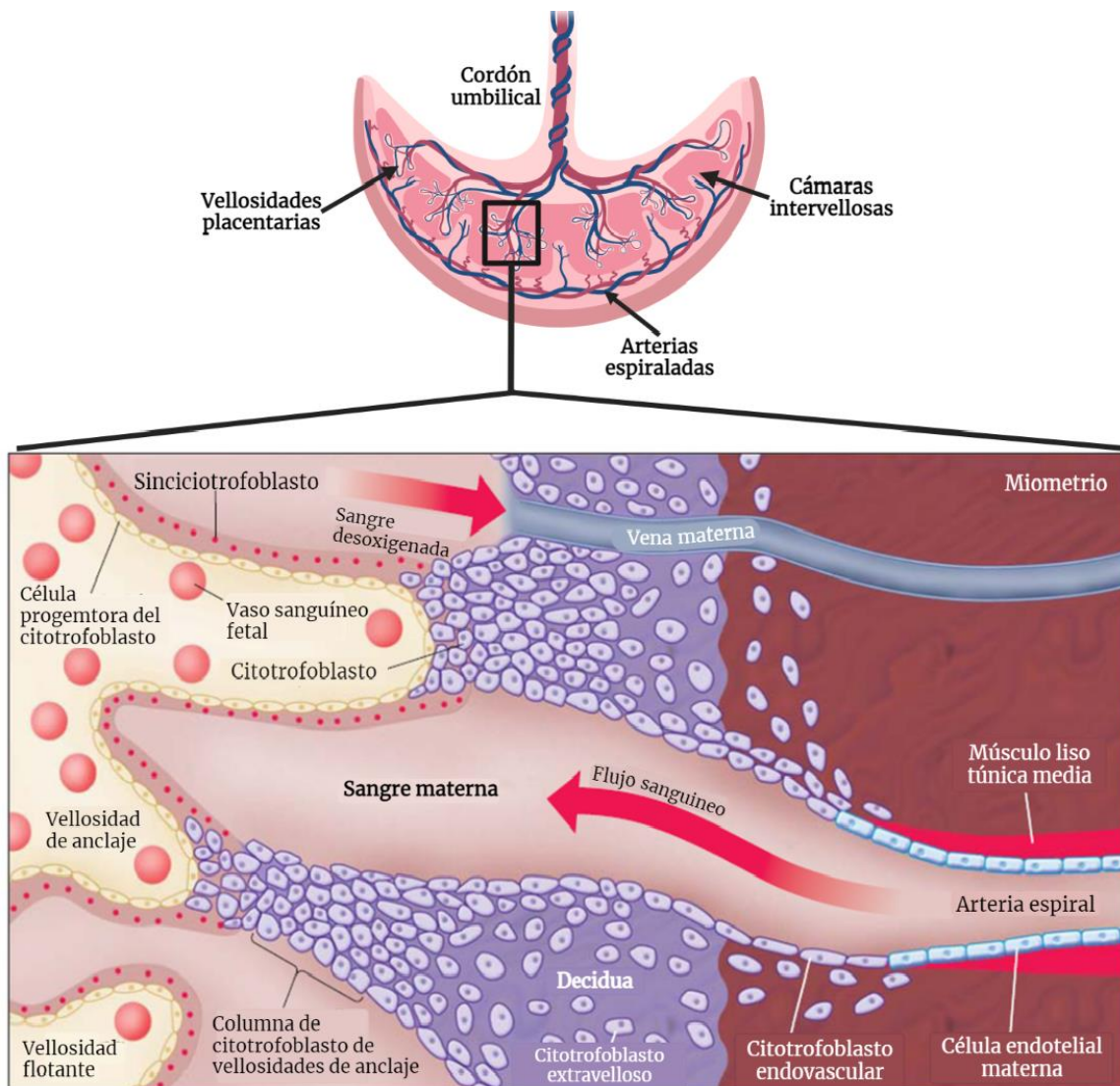
La unidad funcional de la placenta son los árboles vellosos, los cuales se forman de diferentes estirpes de trofoblastos: el sincitiotrofoblasto (SCT) y el citotrofoblasto vellosos (CTV) (Arshad y Rehman, 2015). El SCT es una agrupación multinucleada derivada de la fusión de los CTV (Wang et al., 2009). Al inicio de la gestación los SCT están en contacto con la secreción de las glándulas deciduales y posteriormente con la circulación materna (semana 8-10 de gestación). Los sincicios se encargan del intercambio de gases y nutrientes y sintetizan hormonas como la hCG, lactógeno placentario, progesterona, etc. Además, secreta péptidos antimicrobianos como las HBDs 1-4, y expresa receptores para diversos factores de crecimiento, los transportadores GLUT 1-6, transportadores de aminoácidos, todos los TLRs y el receptor Fc que permite el paso de anticuerpos tipo inmunoglobulina G (IgG). Por lo tanto, la placenta es un órgano complejo con funciones metabólicas, endocrinas y de defensa inmunológica tanto mecánica como humoral (Olmos-Ortiz et al., 2019b; Rath et al., 2014).

La placenta en conjunto con las membranas corioamnióticas, el estroma decidual y los leucocitos y linfocitos deciduales, conforman una macroestructura conocida como interfase materno-placenta-feto (Mimoun et al., 2020). En esta estructura, se desenvuelven múltiples mecanismos de inmunotolerancia para permitir el



desarrollo del bebé semialogénico, a la vez que se conserva la capacidad de responder efectivamente ante una infección (Ander et al., 2019).

Hacia el término del embarazo, la placenta es un órgano discoidal, tiene un diámetro de 15 a 25 cm y alrededor de 3 cm de espesor, su peso presenta una gran variación de placenta a placenta, pero en promedio este valor es de 470 gramos (Bouw et al., 1978). La placenta presenta dos caras: la cara materna y la cara fetal. La cara materna es opaca y esta subdividida en 10 a 15 zonas ligeramente abultadas, los cotiledones. Cada cotiledón consta de varias vellosidades placentarias en forma de tronco y sus ramas. En estos cotiledones se encuentran diversas estirpes celulares, como los trofoblastos extravellosos, CTV, SCT, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, células de Hofbauer, células asesinas naturales (NK) y otras células inmunes (Huppertz, 2008). En la **Figura 2**, se muestra la anatomía de la placenta, así como una ampliación de la vellosidad placentaria.



**Figura 2. Anatomía de la placenta y de las vellosidades placentarias. Modificado de Wang et al. (2009).** La placenta está conformada por las vellosidades placentarias, el espacio intervelloso y el trofoblasto extraveloso. Este órgano permite el intercambio de nutrientes y gases desde la madre hacia el feto, y viceversa. La placenta humana se encuentra en contacto directo con la sangre materna a través de las vellosidades placentarias; por lo que se considera su placentación de tipo hemocorial. A su vez, cada vellosidad está conformada principalmente por citotroblastos rodeados por una capa multinucleada de sincitiotroblastos. Además de los trofoblastos, también se encuentran fibroblastos, células endoteliales y células de Hofbauer en las vellosidades placentarias. Afuera de la vellosidad, se encuentran los citotroblastos extravelosos, los cuales migran hacia la decidua para permitir la remodelación de las arterias espiraladas.

### 2.3.2 Expresión de TLRs en la placenta humana

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa del cuerpo ante una infección (Toche, 2012). Es un sistema compuesto por proteínas como receptores, citocinas o péptidos antimicrobianos (AMPs); células como los macrófagos, neutrófilos, células NK, células dendríticas; y barreras como la piel o las mucosas.

Una parte central de este sistema son los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), proteínas encargadas de detectar la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a daño (DAMP) con la finalidad de detectar la presencia de bacterias, virus, parásitos u hongos y despertar una respuesta encaminada a su eliminación (Male et al., 2021) Entre los PRR se encuentran los TLRs. Este tipo de receptores reconocen moléculas presentes en la membrana de bacterias, ácido desoxirribonucleico (DNA) o ácido ribonucleico RNA viral, o zimosan en los hongos, y posteriormente desencadenan cascadas de señalización que culminan en la liberación de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos (O'Neill et al., 2013). Durante el embarazo los TLR se expresan en la interfase materno-placenta-feto en una manera espacio-temporal dependiente. En la **Tabla 1**, se enlistan los diez TLRs (TLR1-10) descritos en la placenta humana, sus ligandos y su perfil de expresión temporal a lo largo de la gestación.

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

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

El nivel de expresión se presenta en unidades arbitrarias: - indetectable, + expresión baja, ++ expresión moderada, +++ expresión alta. Tomado de Olmos-Ortiz et al. (2019b). DOI: 10.3390/ijms2015365. TLR: Receptor tipo Toll

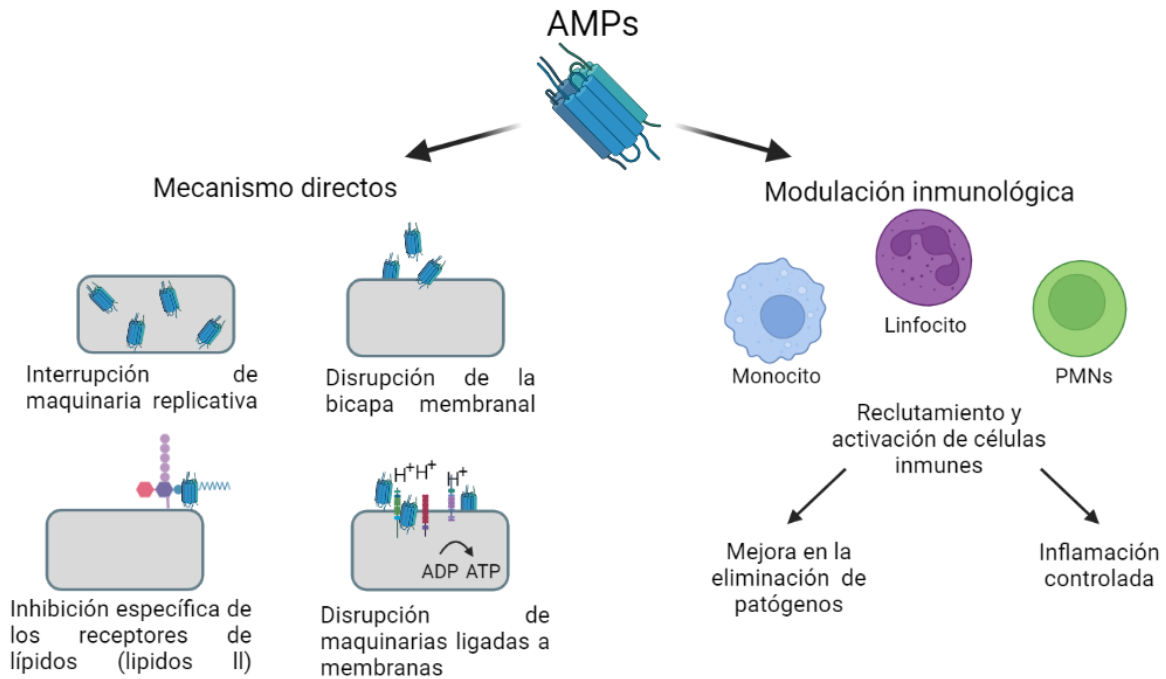
Debido al interés de este proyecto, se centrará especial atención en el TLR4. Este receptor detecta la presencia de bacterias gram negativas mediante el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS) presente en sus membranas (Oliveira & Reygaert, 2021). El TLR4 se expresa en el SCT principalmente durante el segundo y tercer trimestre de la gestación, confiriendo la capacidad de detectar bacterias como *E. coli* y montar una respuesta inmune mediante la secreción de beta defensinas (Firmal et al., 2020; bOlmos-Ortiz et al., 2019; Yang et al., 2016).

Hasta ahora, se cuenta con poca evidencia acerca del efecto de la DMG sobre la expresión de los TLRs. Uno de los antecedentes indica que la hiperglucemia aumenta la expresión del TLR4 en macrófagos provenientes de suero materno (Xie et al., 2013). Además, se ha observado que la diabetes incrementa la expresión de TLR2 y TLR4 en el tejido muscular y tejido adiposo (Sears y Kim, 2010). En contraste, en un modelo murino se demostró que la hiperglucemia disminuye la expresión de TLR2 y TLR4 en el hígado (Froy et al., 2007). Basado en estos antecedentes, resulta de interés estudiar el efecto de la DMG sobre la expresión de los TLRs en la placenta, ya que forman una de las primeras líneas de defensa para reconocer un patógeno y desencadenar una respuesta apropiada para su eliminación. Por lo tanto, si dicha expresión se viera afectada por la hiperglucemia significaría un condicionamiento sobre la capacidad de defensa placentaria.

### **2.3.3. Síntesis de beta defensinas humanas por la placenta humana**

Tal como se describió previamente, al detecta una infección, los TLRs activan diversas cascadas de señalización que culminan con la producción de citocinas, quimiocinas y AMPs. Las HBDs son una familia de los AMPs, secretados principalmente por células de naturaleza epitelial, y cuya función es conferir protección ante infecciones bacterianas, fúngicas y virales (Ghosh et al., 2019). Se trata de moléculas catiónicas con múltiples mecanismos de acción que van desde la formación de poros en la membrana celular, hasta el reclutamiento y activación de células inmunes (Kumar et al., 2018; Téllez y Castaño, 2010) (ver **Figura 3**).

Durante el embarazo, las HBDs se expresan en diferentes estructuras de la unidad feto-placentaria; por ejemplo, se ha descrito que la placenta y la decidua secretan las HBD 1, 2, y 4, y el estímulo con LPS es capaz de incrementar su expresión (Kai-Larsen et al., 2014; King et al., 2007b; Olmos-Ortiz et al., 2021).



**Figura 3. Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos. Modificado de Kumar et al. (2018).** Los AMPs pueden matar directamente mediante la disrupción de la membrana celular o de la maquinaria membranar del patógeno; también pueden interferir directamente con la transcripción. Adicionalmente, pueden reclutar y activar distintas células inmunes con el objetivo de eliminar a los patógenos mientras mantienen una inflamación controlada. Las beta defensinas pueden formar poros para desestabilizar la membrana celular, a la vez que quimioatraen a linfocitos y NK. AMPs: Péptidos antimicrobianos. ADP: Adenosín difosfato. ATP: Adenosín trifosfato. PMNs: Células polimorfonucleares.

Dado que la diabetes es una condición que debilita al sistema inmune innato (Andersen et al., 2016), se ha brindado especial interés en estudiar su efecto sobre la producción de los AMPs. En un modelo *in vitro* de queratinocitos humanos, la hiperglucemia ejerció un efecto negativo sobre la expresión génica de HBD2 y HBD3 (Lan et al., 2012; Lan et al., 2011). Asimismo, la hiperglucemia disminuyó la expresión de la catelicidina en los macrófagos (Montoya-Rosales et al., 2016). De manera semejante, en un modelo animal de diabetes inducida por estreptozotocina en ratas, se observó que éstas presentan una baja expresión renal de  $\beta$ -defensina 1 de ratón (rBD1), en comparación con ratas no diabéticas (Froy et al., 2007).

Esto parece apuntar a que la diabetes es una condición que vulnera la capacidad de producir AMPs, particularmente de tipo HBD, como mediadores importantes de la capacidad de defensa innata. Sin embargo, hasta el momento existe escasa información sobre el efecto de la hiperglucemia o la diabetes sobre la producción de HBD en la placenta (Olmos-Ortiz et al., 2021). En un modelo cercano, se demostró que un ambiente alto en glucosa es capaz de disminuir la producción de HBD2 en células epiteliales amnióticas (Szukiewicz et al., 2016) . De acuerdo con lo anterior, hipotetizamos que la producción placentaria de HBDs se verá comprometida en el escenario de la DMG. Esto podría impactar en la capacidad de responder ante una infección activa (por *E. coli*, por ejemplo), como ocurre con frecuencia en las pacientes con DMG.

#### **2.4 Tratamiento farmacológico de la DMG**

La primera indicación terapéutica para las pacientes con DMG es seguir un régimen alimenticio restringido en azúcares simples y favorecer el ejercicio físico, preferencialmente aeróbico de baja intensidad, con el objetivo de disminuir la hiperglucemia (Mack y Tomich, 2017). Sin embargo, si la paciente no mejora su control glucémico con estos cambios entonces se opta por la terapia farmacológica (Johns et al., 2018).

El principal fármaco utilizado en el tratamiento de la DMG es la insulina. Esta hormona es efectiva para disminuir la hiperglucemia materna y no atraviesa la barrera placentaria por lo que no compromete el desarrollo fetal durante su administración. Sin embargo, su mayor inconveniente es el frecuente mal apego al tratamiento ya que su administración es subdérmica (Brown et al., 2017).

Debido a lo anterior, el segundo fármaco de elección para el tratamiento de la DMG es la metformina, un hipoglucemiante oral de tipo biguanida (Lindsay y Loeken, 2017). A continuación, se describirá con mayor detalle los efectos biológicos de ambos tratamientos.

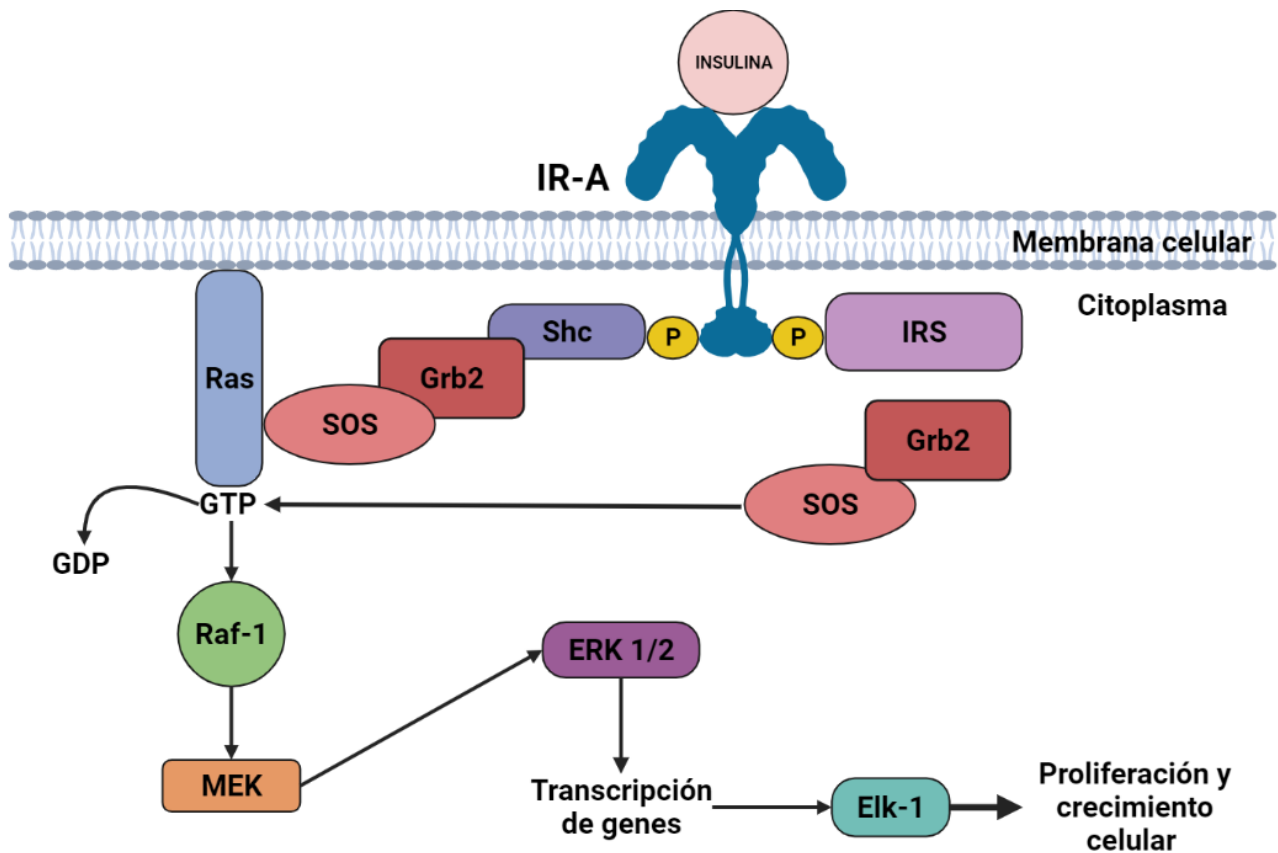
#### **2.4.1. Insulina**

La insulina es una hormona peptídica secretada por las células beta de los Islotes de Langerhans en el páncreas (Guyton & Hall, 2011). Su principal función es regular la concentración de glucosa en sangre al inducir la translocación del transportador de glucosa 4 (como GLUT4), hacia la membrana celular. Adicional a ello, regula negativamente las vías catabólicas de gluconeogénesis y glucogenólisis, favorece la glucógeno-génesis y promueve la división y el crecimiento celular vía sus efectos mitogénicos (Ciaraldi, 2017).

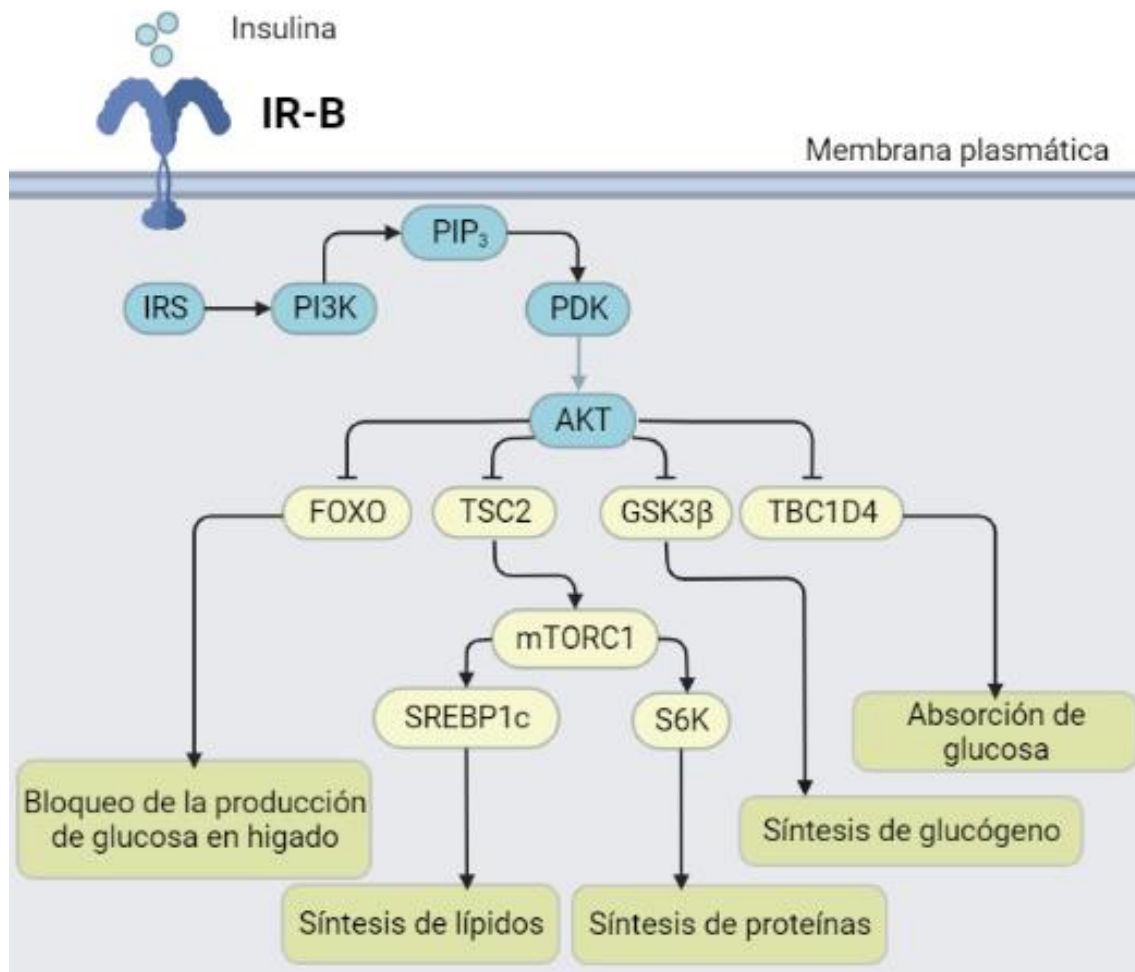
La insulina actúa a través de la unión con su receptor de tipo tirosina cinasa, el receptor de insulina (IR). El IR tiene dos isoformas: a) IR-A que activa la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y b) IR-B que activa la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), (Dupont y Scaramuzzi, 2016). La vía de MAPK participa principalmente en la regulación de genes relacionados con el crecimiento y la proliferación celular (Choi et al., 2019) (**Figura 4**). Por otra parte, la vía de la PI3K es el principal mecanismo por el cual la insulina ejerce sus efectos metabólicos como promover la síntesis de glucógeno y proteínas, favorecer la adipogénesis e inducir la translocación de GLUT4 hacia la membrana celular (Haeusler et al., 2019) (**Figura 5**). Durante el embarazo, las dos isoformas del



receptor de insulina se expresan tanto en tejidos fetales (trofoblastos), como en tejidos maternos (endotelio vascular) (Westermeir et al., 2015).



**Figura 4. Activación de la vía de MAPK por acción de la insulina. Tomado de Olivares & Arrellano, (2008).** La insulina activa esta vía mediante dos mecanismos: en el primero, la activación del IR-A provoca la asociación con la proteína Shc, la cual se une al complejo Grb2/SOS. SOS es un intercambiador de nucleótidos de guanosina, por lo que activa la proteína Ras iniciando la cascada de activación de MAPK; el complejo Ras-GTP se une y activa a Raf-1, el cual fosforila y activa a las proteínas MEK y ERK1/2. Alternativamente existe una vía independiente de Shc, pero dependiente de IRS; en esta vía es IRS quien se une a Grb2/SOS para seguir con la secuencia de activación antes descrita. La activación de esta vía lleva a la regulación de la expresión génica de factores de transcripción, como Elk-1, que participan principalmente en el crecimiento y proliferación celular. Elk-1: Factor de transcripción Elk-1. ERK 1/2: Kinasa reguladora de la señal extracelular 1 y 2. Grb2: Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento. IR-A: receptor de insulina A. IRS: sustrato del receptor de insulina. MEK: MAP cinasa que fosforila a ERK. P: Fosfato. Raf-1: MAP cinasa que fosforila a MEK. Ras: GTPasa Ras. SOS: Proteína intercambiadora de nucleótidos SOS. Shc: Proteína adaptadora Shc.



**Figura 5. Activación de la vía de la PI3K por acción de la insulina. Tomado de Haeusler et al. (2019).** Tras la unión de la insulina al IR-B, éste es activado, causando la fosforilación de IRS. Tras esto, los residuos de tirosina fosforilados del IRS se unen a la cinasa de lípidos PI3K, la cual sintetiza PIP<sub>3</sub> en la membrana celular. PIP<sub>3</sub> recluta a la cinasa PDK que fosforila directamente a AKT. Una vez AKT se encuentra activada, fosforila a varios substratos como los factores de transcripción de la familia FOXO, la proteína TSC2, la glicógeno sintasa cinasa 3β (GSK3β) y TBC1D4. La activación de estas proteínas efectoras media los efectos metabólicos de la insulina como la síntesis de glucógeno, la absorción de glucosa y la síntesis de lípidos y de proteínas. AKT: Proteína cinasa Akt. FOXO: Caja O de la familia forkhead. IR-B: Receptor de insulina B. IRS: substrato del receptor de insulina. . mTORC1: Complejo 1 de la diana de rapamicina de mamíferos. PDK: cinasa dependiente de fosfoinositol. PIP<sub>3</sub>: Fosfatidilinositol trifosfato. PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinasa. SREBP1c: Proteína de unión a elementos regulatorios de estero 1c. S6K: Cinasa S6. TBC1D4: Miembro 4 del dominio familiar RabGAP TBC1. TSC2: Proteína de esclerosis tuberosa 2.

Además de sus efectos metabólicos mediados por estas vías de señalización, la insulina también tiene efectos sobre la respuesta inmune innata. Tal como se describió previamente, en condiciones de hiperglucemia la expresión de las HBDs se ve disminuida (Lan et al., 2012; Lan et al., 2011), y esto se ha asociado con una limitada capacidad de defenderse ante un evento infeccioso. En parte, esto explica el mayor riesgo de infecciones cervicovaginales y urinarias en las mujeres con DMG. Interesantemente, se ha descrito que la administración de insulina en ratas diabéticas restituye la expresión de la HBD1 (Froy et al., 2007). Adicionalmente, se ha demostrado que la insulina es necesaria para la expresión génica de la beta defensina 1 en la línea celular HEK-293 de células embrionarias de riñón humano (Barnea et al., 2008). Todo esto demuestra que la insulina puede tener un papel preponderante en la expresión de AMPs, particularmente del tipo HBDs. Además, se debe considerar que la insulina actúa en la placenta y es actualmente utilizada como tratamiento para pacientes con DMG. Sin embargo, se desconoce cómo la insulina puede regular la producción de AMPs en uno de los tejidos más importantes de la interfase materno-fetal: la placenta; y en particular, en el contexto de la DMG. Por lo que es uno de los objetivos que se desarrollará en esta tesis.

#### **2.4.2. Metformina**

La metformina es uno de los agentes más utilizados para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 en el mundo. Esta biguanida ha mostrado disminuir los niveles de glucosa basal y posprandial y puede ser utilizada en solitario o en combinación con otros agentes hipoglucemiantes (Gong et al., 2012). Durante el embarazo, el uso de metformina ha sido aceptado por varias asociaciones internacionales como el *American College of Obstetrics and Gynecology*, *German Diabetes Association*, *German Society of Gynecology and Obstetrics*, y *The Society for Maternal-Fetal Medicine* (ACOG, 2018; Schäfer-Graf et al., 2018). Este fármaco tiene múltiples efectos hipoglucemiantes tales como mejorar la sensibilidad a la insulina, reduce la gluconeogénesis hepática a la vez que

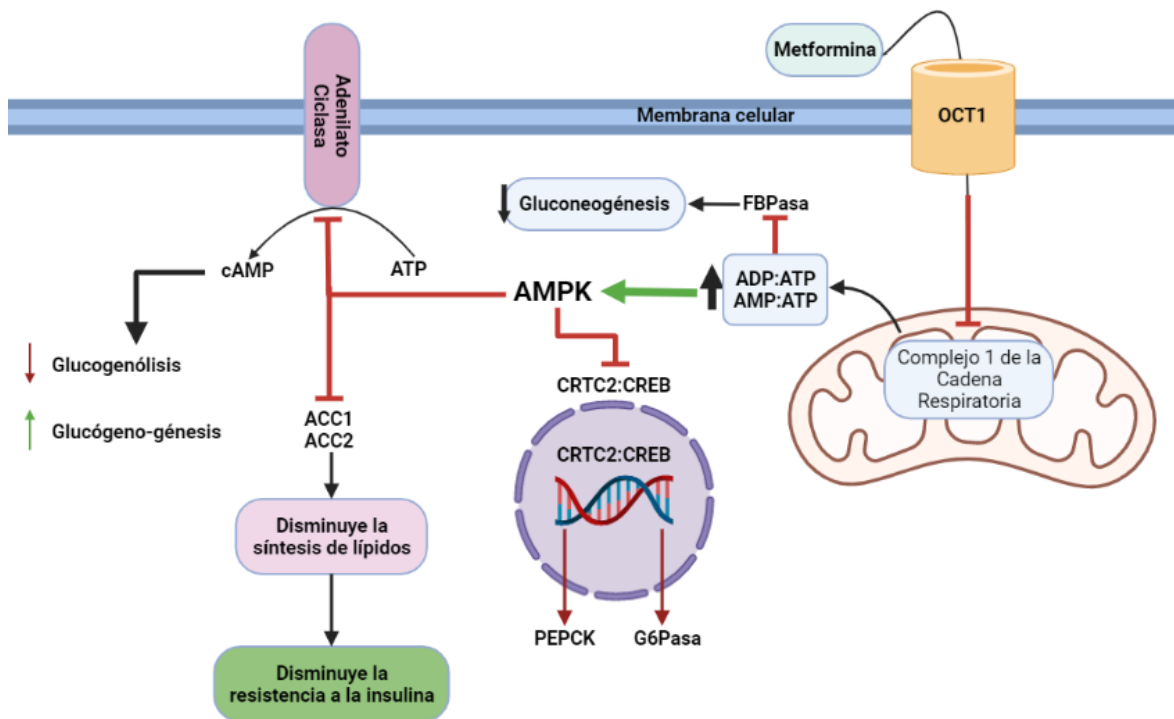
incrementa la glucógeno-génesis e incrementa la absorción de glucosa al aumentar el reclutamiento y actividad del GLUT4 en el músculo esquelético (Hyer et al., 2018).

Si bien no se ha estudiado la señalización de la metformina en la placenta humana, se dispone de evidencias que apuntan a que dicha vía es muy parecida a la del hepatocito. A continuación se describe la ruta de absorción e ingreso de la metformina hacia los hepatocitos: Primero, la metformina tomada por vía oral es absorbida en el intestino delgado mediante el transportador de monoaminas de la membrana plasmática (PMAT) y por los transportadores de cationes orgánicos 1 (OCT1) y 3 (OCT3) (McCreight et al., 2016) presentes en la cara luminal de los enterocitos y la membrana basolateral respectivamente. Una vez dentro de la circulación, el ingreso de la metformina hacia los hepatocitos es mediada por OCT1, y posiblemente por OCT3; esto ha sido comprobado en un modelo de ratones knockout *Oct1*, observándose la supresión total de los efectos de la metformina (Shu et al., 2007).

En el hepatocito, la metformina provoca la fosforilación de la cinasa activada por AMP (AMPK), activándola. Esta proteína es la principal encargada de mediar el efecto hipoglucemiante de este fármaco (Wu et al., 2018). Se ha descrito que la activación de la AMPK es debido a la inhibición del Complejo 1 de la cadena respiratoria por parte de la metformina, esto aumenta la relación entre adenosina difosfato (ADP) y adenosina trifosfato (ATP), así como la relación entre adenosina monofosfato (AMP) y ATP, siendo este cambio lo que induce la fosforilación de la AMPK (Carling, 2017). Una vez activada, la AMPK fosforila y activa la 3,5-fosfodiesterasa cíclica 4B específica de cAMP (PDE4B) impidiendo la síntesis de cAMP y con ello disminuyendo la glucogenólisis mientras promueve la glucógeno-génesis. También bloquea la acción de las acetil-CoA carboxilasas 1 y 2 (ACC1 y ACC2), lo cual favorece la sensibilidad a la insulina al disminuir la toxicidad por lípidos. Finalmente, AMPK fosforila el Coactivador transcripcional-2 (CRTC2) regulado por la proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP 1 (CREB) reteniéndolo en el citoplasma, disminuyendo la síntesis de fosfoenolpiruvato

carboxiquinasa (PEPCK) y glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), enzimas implicadas en la gluconeogénesis (Rena et al., 2017).

En la **Figura 6** se muestra la vía de señalización activada por metformina y sus efectos dependientes e independientes de la activación de AMPK dentro del hepatocito.



**Figura 6. Mecanismo de acción de la metformina dependiente e independiente de AMPK. Modificado de Rena et al., (2017).** La entrada de la metformina al hepatocito es mediada por el transportador OCT1. Esto inhibe el Complejo 1 de la cadena respiratoria, lo que provoca el aumento de la relación ADP:ATP y AMP:ATP, al bloquear la producción de ATP. Este aumento de la relación AMP:ATP activa la AMPK a la vez que bloquea la fructuosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) (disminuyendo la gluconeogénesis) y bloquea a la adenilato ciclasa disminuyendo los niveles de cAMP. De esta forma la metformina inhibe la glucogenólisis y promueve la glucógeno-génesis. Además, la AMPK bloquea las ACC1 y 2 disminuyendo la síntesis de lípidos y mejorando la respuesta a la insulina al disminuir la toxicidad provocada por estas macromoléculas. Finalmente, AMPK fosforila el coactivador transcripcional-2 regulado por CREB (CRTC2), reteniéndolo en el citoplasma, disminuyendo la síntesis de PEPCK y G6Pasa, enzimas implicadas en la gluconeogénesis. ACC1: Acetil-CoA carboxilasa 1. ACC2: Acetil-CoA carboxilasa 2. ADP:ATP: Relación entre adenosina difosfato y adenosina trifosfato. AMP:ATP: Relación entre adenosina monofosfato y adenosina trifosfato. AMPK: Cinasa activada por AMP. cAMP: AMP cíclico. CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP 1. G6Pasa: Glucosa-6-fosfatasa. OCT1: Transportador de cationes orgánicos 1. PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

Además de sus efectos hipoglucemiantes, hay evidencia de que la metformina posee efectos inmunoprotectores. Por ejemplo, se ha descrito que el tratamiento con metformina aumenta la expresión y síntesis de HBD2 y HBD3 en un modelo de neumocitos tipo 2 infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (Rodríguez-Carlos, et al, 2020). También, en modelos *in vivo* se ha observado que gusanos (*C. elegans*) y ratas pretratadas con metformina presentan mayor resistencia a infectarse por bacterias gram negativas (*Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*) o bacterias gram positivas (*Enterococcus faecalis*) (Xiao et al., 2020). En otro estudio reciente se comprobó que la metformina puede estimular la respuesta inmune innata de células epiteliales humanas ante la infección urinaria por *E. coli*. En ese estudio, el tratamiento con indujo la producción de los péptidos antimicrobianos catelicidina (LL-37) y la ribonucleasa 7 (RNAsa 7), lo que favoreció el ataque y defensa contra *E. coli* (Majhi et al., 2021).

En cuanto a la placenta, se sabe que la metformina, puede actuar en la placenta dado que ésta expresa a OCT1 y OCT3 y se ha observado la consecuente activación de la AMPK placentaria (Hasegawa et al., 2020; Lee et al., 2013; Overgaard et al., 2019). En este tejido, se ha propuesto que la metformina regula la biogénesis mitocondrial y puede evitar alteraciones epigenéticas que son de especial interés durante la DMG (Jiang et al., 2020; Lorca et al., 2021).

Considerando los siguientes antecedentes: 1) la metformina induce la síntesis de péptidos antimicrobianos en múltiples modelos; 2) la metformina actúa en la placenta y es actualmente utilizada como tratamiento para pacientes con DMG; nosotros consideramos interesante estudiar su efecto sobre la expresión de las HBDs en la placenta humana durante la DMG, y evaluar su efecto sobre la capacidad de defensa placentaria ante un reto infeccioso, como la infección por *E. coli*.



### III. HIPÓTESIS

El tratamiento con insulina o con metformina inducirá la producción de beta defensinas, regulará la expresión de los TLRs 1-9 y estimulará la defensa innata placentaria ante la infección por *Escherichia coli*, en un modelo *ex vivo* e *in vitro* de DMG.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la insulina y la metformina sobre la capacidad de defensa innata placentaria ante la infección por *Escherichia coli*, en un modelo de DMG.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Estandarizar las condiciones de hiperglucemia para el modelo *ex vivo* e *in vitro* de DMG.
- Cuantificar la producción de HBD 1-4 en respuesta al tratamiento con insulina o metformina ante condiciones de normoglucemia e hiperglucemia.
- Evaluar la expresión génica de los TLRs 1-9 en respuesta al tratamiento con insulina o metformina ante condiciones de hiperglucemia.
- Estandarizar el ensayo funcional de actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* en el cultivo de explantes placentarios.
- Probar y comparar la actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* regulada por el tratamiento con insulina o metformina, ante condiciones de normoglucemia e hiperglucemia.

## **V. METODOLOGÍA**

Para alcanzar los objetivos de esta tesis, se planteó hacer un estudio de investigación biomédica básica en el que se simuló un modelo de DMG *ex vivo* con el cultivo de explantes placentarios, e *in vitro* con el cultivo primario de trofoblastos. Se evaluó el efecto de la insulina y la metformina en la expresión génica de los TLRs 1-9, en la producción de las beta defensinas, y en el crecimiento logarítmico de *Escherichia coli* (principal bacteria gram negativa presente en las ITU y vaginosis bacterianas).

### **5.1 Consideraciones éticas**

El protocolo con título “Evaluación del efecto de la insulina y la metformina sobre el perfil inflamatorio y la inmunidad innata de la placenta humana en un modelo *in vitro* de diabetes mellitus gestacional” fue aprobado en noviembre de 2018 por el Comité de Investigación, Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), con número de registro 2018-1-152 (Ver anexo 1). Este protocolo también fue aprobado en marzo de 2021 por el Director General y el Director de Servicios Clínicos del Hospital Ángeles México para la recolección de muestras biológicas en dicho Instituto (Anexo 2).

La metodología del estudio siguió los estatutos de protección a las pacientes en los protocolos de investigación de acuerdo con los criterios del Informe Belmont de justicia, beneficencia y respeto a las personas y a la Norma General del DHHS para la Protección de Sujetos Humanos en la Investigación. El consentimiento informado por escrito se apega a los estatutos establecidos en la declaración de Helsinki (Anexos 3 y 4).

### **5.2 Toma de muestras**

La toma de muestras biológicas se realizó en el Hospital Ángeles México ubicado en Agrarismo 208, colonia Escandón II Sección, delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México, C.P. 11800. Posteriormente las muestras se transportaron hacia el INPer para su procesamiento experimental en el Laboratorio de

Inmunología de la Unidad feto placentaria. El INPer se localiza en la calle Montes Urales 800, colonia Lomas de Chapultepec IV Sección, delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México, C.P. 11000

### **5.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**

Se recolectó la placenta de aquellas mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión. Estos tejidos biológicos fueron procesados a fin de realizar cultivos para el modelo *ex vivo* de DMG con explantes placentarios o el modelo *in vitro* de DMG con cultivo primario de trofoblastos.

#### **❖ Criterios de inclusión**

Para el desarrollo de este proyecto se obtuvieron las muestras biológicas de un grupo con embarazo normoevolutivo a término (37 a 40 sdg). Sus criterios de inclusión son: pacientes con edad biológica entre 18 y 38 años, sin enfermedades endocrinas o metabólicas subyacentes, con estudios laboratoriales recientes dentro de parámetros normales, sin consumo de medicamentos diferentes a los propios del embarazo y sin desarrollo de infecciones cervicovaginales en el último trimestre de gestación, programadas a operación cesárea y sin evidencia clínica de trabajo de parto.

#### **❖ Criterios de exclusión**

Se excluyó de este estudio a las pacientes con alergia a la penicilina o estreptomycin, que presentaron alteraciones reflejadas en los laboratoriales de rutina, con parto eutócico vaginal, con embarazo múltiple, con infección en el tracto genitourinario durante el último trimestre de gestación o con cualquier enfermedad metabólica o endocrina subyacente.

#### **❖ Criterios de eliminación**

Se eliminó del presente proyecto a pacientes con datos de hiperglucemia durante la cirugía (> 95 mg/dL en ayuno) o aquellas muestras biológicas cuyo análisis microbiológico indicó positivo.

## 5.4 Variables del estudio

### Variables independientes:

- Glucosa en el medio de cultivo (10, 25, 35 y 50 mM)
- Tratamiento con insulina (50, 100 y 500 nM).
- Tratamiento con metformina (125, 250 y 500  $\mu$ M).

### Variables dependientes:

- ✓ Concentración de los marcadores inflamatorios TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 secretados por la placenta. Nivel de medición: escalar (ng/g de tejido o pg/g de tejido).
- ✓ Concentración intracelular placentaria de HBD1, HBD2, HBD3, HBD4. Nivel de medición: escalar (pg/mg de proteína).
- ✓ Expresión génica de los TLRs 1-9. Nivel de medición: escalar, normalizado contra gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH).
- ✓ Actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*. Nivel de medición: escalar (UFC/mL).

## 5.5 Adición de glucosa al medio de cultivo para generar hiperglucemia

Según los criterios diagnósticos de la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo (IADPSG), se considera como normoglucemia durante el embarazo la concentración < 92 mg/dL, que equivale a 5.1 mM. El medio de Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) bajo en glucosa (Thermo, 10567) contiene 5 mM de D-Glucosa, pero es una concentración restringida para el cultivo de tejidos extraembrionarios (Kliman et al., 1986) por lo que se adicionó D-glucosa anhidra al medio de cultivo para semejar las concentraciones de 10 mM (máximo fisiológico esperado a 1 hora post-carga de glucosa en el estudio de tolerancia oral a la glucosa [OGTT]), 25 mM y 35 mM y 50 mM; estas tres últimas concentraciones se consideran de hiperglucemia y se adicionaron a fin de estandarizar el modelo de DMG caracterizado por un estado de meta-inflamación.

Tanto en la placenta como en otros modelos biológicos se ha trabajado con estas condiciones de hiperglucemia (Han et al., 2015; Rice et al., 2015).

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

Se procesaron un total de 11 placentas para el modelo de explantes placentarios, el cual nos permitió cuantificar la producción de las HBD1-4, así como realizar el ensayo funcional de actividad antimicrobiana. A continuación, se describe el procesamiento experimental para este modelo.

Después del alumbramiento, se recolectó la placenta y las membranas corioamnióticas de las pacientes que cubrieron los criterios de inclusión. La muestra biológica se transportó en un contenedor estéril de acero inoxidable con solución salina (cloruro de sodio [NaCl] al 0.9%) a temperatura ambiente hacia el Laboratorio de Inmunología de la Unidad feto-placentaria del INPer para su procesamiento. Las muestras se procesaron en un gabinete de flujo laminar de bioseguridad nivel II para asegurar la esterilidad del procedimiento. Primero, con ayuda de material quirúrgico estéril se eliminaron las membranas corioamnióticas. La placenta se lavó exhaustivamente con solución salina estéril tibia para retirar la sangre presente. Una vez lavada, se cortó el cotiledón central y con ayuda de material quirúrgico estéril se eliminaron los vasos sanguíneos, coágulos y decidua. El cotiledón central limpio se cortó en explantes de 3 a 5 mm<sup>2</sup>, los cuales se mantuvieron en una caja de Petri con solución salina y un poco de medio DMEM. Cuando se contó con el número deseado de explantes, se procedió a colocarlos en una caja de cultivo de 24 pozos de acuerdo con su tratamiento experimental (ver sección 5.9). El medio de tratamiento consistió en DMEM Low Glucose (ajustado con la concentración de glucosa deseada), suplementado con 10% de suero de ternera neonatal inactivado (STNi), 1 mM de piruvato de sodio y 1% antibióticos/antimicóticos (penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL, anfotericina B 25 ng/mL). Los explantes se mantuvieron en un incubador a 37 °C con 5% dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y 95% de humedad relativa (Olmos-Ortiz et al., 2019; Olmos-Ortiz et al., 2016). Los tratamientos se colocaron por triplicado en cajas de 24 pozos y en cada pozo se depositaron de 3 a 4 explantes con 1.5 mL

de medio por pozo. Los explantes se mantuvieron durante 24 horas de cultivo a 37°C. Posteriormente, se refrescó el tratamiento a las 24 horas y se mantuvo hasta las 48 horas totales.

### **5.7 Modelo *in vivo*: Cultivo primario de trofoblastos humanos**

Con la finalidad de medir el efecto de los tratamientos experimentales sobre la expresión génica de los TLRs 1-9, se llevó a cabo el aislamiento y cultivo de células trofoblásticas. Inmediatamente después del alumbramiento se colocó la placenta en solución salina dentro de un recipiente de acero inoxidable a temperatura ambiente y se transportó al laboratorio. A continuación, se describe la técnica que se desarrolló con base en protocolos previamente establecidos (Clabault et al., 2018; Petroff et al., 2016). Utilizando material quirúrgico estéril, se eliminaron las membranas corioamnióticas y el cordón umbilical. Tras ello se cortó la placenta en trozos y se sumergieron varias veces en solución salina esteril para eliminar el exceso de sangre. Después del lavado, se eliminó la decidua y los vasos sanguíneos y se separaron tres porciones de 35 a 40 gramos de tejido placentario; cada porción se colocó en un matraz Erlenmeyer de 1L. En los matraces se realizaron tres digestiones enzimáticas consecutivas de 30 minutos a 37°C con agitación constante. Las soluciones de digestión contenían tripsina de páncreas bovino 10X (T4674 SIGMA) y desoxirribonucleasa I (DNAsa) de páncreas bovino (DN25-1G SIGMA) diluidas en solución balanceada de Hank 1X (HBSS). Las digestiones se hicieron en HBSS libre de calcio y magnesio, adicionada con bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) al 7.5% y ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico (HEPES) 1M. En la **Tabla 2** se describen las concentraciones de tripsina y DNAsa empleadas durante las digestiones.

**Tabla 2. Soluciones enzimáticas empleadas para digerir los cotiledones placentarios**

Digestión	Hank's 1X con NaHCO <sub>3</sub> al 7.5% + HEPES 1M	Tripsina 10X	DNAsa 100 mg/mL
1 <sup>ra</sup>	135 mL	15 mL	85 µL
2 <sup>da</sup>	90 mL	10 mL	45 µL
3 <sup>ra</sup>	67.5 mL	7.5 mL	45 µL

En cada digestión se recolectó el sobrenadante de cada matraz, en el cual se encontraban las células disgregadas. El sobrenadante se depositó en tubos cónicos de 15 mL y posteriormente se adicionó suavemente una cama de suero fetal bovino inactivado. Los tubos recolectados se sometieron a centrifugación de 1,250 g durante 20 minutos. Al término de la centrifugación se aspiró el sobrenadante, y el botón resultante se resuspendió en 1000 µL de medio de cultivo DMEM. En cada etapa, se recolectaron las suspensiones obtenidas en un tubo cónico de 50 mL y se mantuvieron a 37°C hasta recolectar las tres digestiones. La suspensión celular total recolectada se pasó por un filtrador celular de 100 micras y se dividió la solución en tres tubos cónicos para ser centrifugados a 1100 G durante 10 minutos. Cada botón celular obtenido se resuspendió en 6 mL de Hank's 1X. Esta suspensión celular se colocó cuidadosamente sobre tres gradientes de Percoll del 5 al 70% de densidad. En la **Tabla 3** se describe la preparación del gradiente de percoll. El gradiente se centrifugó a 1200 G durante 30 minutos. La obtención de citotrofblastos se llevó a cabo de la zona intermedia del percoll con una densidad de entre 1.046 a 1.065 g/mL, aproximadamente. Las células obtenidas se transfirieron a nuevos tubos cónicos de 50 mL y se lavaron con medio DMEM.

**Tabla 3. Preparación del gradiente de Percoll**

<b>Tubo</b>	<b>% Percoll</b>	<b>mL de Percoll 90%</b>	<b>mL Hank's 1X</b>
1	70	2.33	0.67
2	65	2.17	0.83
3	60	2.00	1.00
4	55	1.83	1.17
5	50	1.67	1.33
6	45	1.50	1.50
7	40	1.33	1.67
8	35	1.17	1.83
9	30	1.00	2.00
10	25	0.83	2.17
11	20	0.67	2.33
12	15	0.50	2.50
13	10	0.33	2.67
14	5	0.17	2.83

Finalmente, se realizó la última centrifugación a 1,050 g durante 5 minutos y se obtuvo el botón celular de interés. Los botones se transportaron hacia el gabinete de bioseguridad y en ambiente de esterilidad se resuspendieron en medio DMEM suplementado (DMEM high glucose + 10% STNi + 1 mM piruvato de sodio + Penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y anfotericina B 25 ng/mL). El total de células obtenidas se estimó a partir del conteo en la cámara de Neubauer con ayuda del colorante azul de tripán.

Para los estudios de expresión génica se sembraron  $2 \times 10^6$  células en cajas de 6 pozos y se dejaron en cultivo toda la noche para permitir su adhesión celular. Al día siguiente se verificó al microscopio la adhesión y se lavaron las células con solución Hank's 1X para eliminar las células flotantes y debris. Posteriormente se agregó el tratamiento correspondiente a cada pozo (medio DMEM suplementado y



ajustado a las concentraciones experimentales de glucosa) y se mantuvo durante 48 horas en incubación, refrescando el medio a las 24 horas de cultivo. Las células obtenidas se mantuvieron en un incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad durante todo el experimento.

### **5.8 Análisis microbiológico de las muestras**

Para garantizar la esterilidad de los tejidos, se procesaron todas las muestras para su análisis microbiológico. Para ello, se utilizó el caldo infusión cerebro corazón (BHI) el cual funciona como un caldo nutritivo que permite el crecimiento de diversas especies de microorganismos. Además, se utilizaron dos caldos para identificar características metabólicas: caldo arginina y caldo urea. El caldo arginina es una prueba bioquímica que permite identificar la capacidad de hidrolizar y descarboxilar a la arginina dando como producto final putrescina (Møller, 1955). El caldo urea evidencia la actividad enzimática de la ureasa, enzima característica de la familia *Enterobacteriaceae* (Farias, 2015; Forbes, 2009).

Este ensayo consistió en colocar de uno a dos explantes en los caldos antes mencionados y se incubaron a 37°C durante 5 días. Este análisis permite detectar microorganismos aerobios (*Candida albicans*, *Neisseria gonorrhoeae*), anaerobios facultativos (*Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus sp*, *Klebsiella sp*) así como *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*. Sólo se utilizaron los datos generados por muestras de tejidos cuya esterilidad fue comprobada después de las pruebas microbiológicas.

### **5.9 Tratamientos experimentales**

El medio de cultivo experimental fue DMEM bajo en glucosa suplementado, ajustado a las siguientes concentraciones de glucosa:

- Glucosa 10 mM
- Glucosa 25 mM
- Glucosa 35 mM
- Glucosa 50 mM

Los medios de cultivo se suplementaron con 10% STNi, 1 mM piruvato de sodio, penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL y anfotericina B 25 ng/mL.

Dependiendo de la naturaleza y el objetivo del experimento (evaluar la producción de beta defensinas, la expresión de los TLRs o el ensayo funcional con *E. coli*), se probaron los siguientes tratamientos:

- Insulina (50, 100 y 500 nM)
- Metformina (125, 250 y 500 µM).
- LPS 500 ng/mL.
- *Escherichia coli* 1 x 10<sup>5</sup> UFC/mL

La elección de las concentraciones de insulina y metformina se basó en estudios previos realizados en tejidos de la interfase materno-fetal (Han et al., 2015; Kaitu'u-Lino et al., 2018; Ujvari et al., 2017). La concentración de LPS se determinó por estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo, en donde se demostró su efecto inflamatorio en la placenta humana (Olmos-Ortiz et al., 2019). La elección de la concentración de *E. coli* para infectar a la placenta humana se determinó por que es la concentración detectada en orina durante una bacteriuria sintomática en una ITU.

#### **5.10 Cuantificación intracelular de HBDs por ensayo de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA)**

Con la finalidad de cuantificar la producción de HBDs, se utilizó la técnica de ELISA tipo sándwich. Por lo que, al término de las 48 horas de incubación los explantes fueron colocados en buffer de lisis tris(hidroximetil)aminometano-ácido Clorhídrico (Tris-HCl) 200 nM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 mM, IGEPAL® 1%, deoxicolato de sodio 5%, dodecil sulfato sódico (SDS) 10%, NaCl 1M, fluoruro de sodio (NaF) 1M, inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich, Catalogo: P8340) 0.1% y ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) 200 mM) y se mantuvieron en congelación a -40°C hasta su procesamiento experimental.

Para la cuantificación de proteína total se procedió a lisar los explantes con un politron (Marca OMNI, modelo 125). Una vez lisados, se tomó los sobrenadantes y mediante el método de Bradford se cuantificó la concentración de proteína en un espectrofotómetro (Bio-Rad, xMark™) a 595 nm (Bradford, 1976). Posteriormente, se ajustó el volumen de muestra necesario para tener 2.5 µg de proteína/µL en un volumen total de 550 µL. Finalmente, se procedió a realizar la cuantificación de HBDs mediante ELISA y se cargaron 100 µL de muestra por pozo (250 µg de proteína total). Se utilizaron estuches comerciales de la marca PeproTech: HBD1 (900-K202), HBD2 (900-K172), HBD3 (900-K210) y HBD4 (900-K435).

A continuación, se describe con mayor detalle el procedimiento experimental seguido para la cuantificación intracelular de HBDs.

### **5.11 Método de Bradford para cuantificación de proteína total**

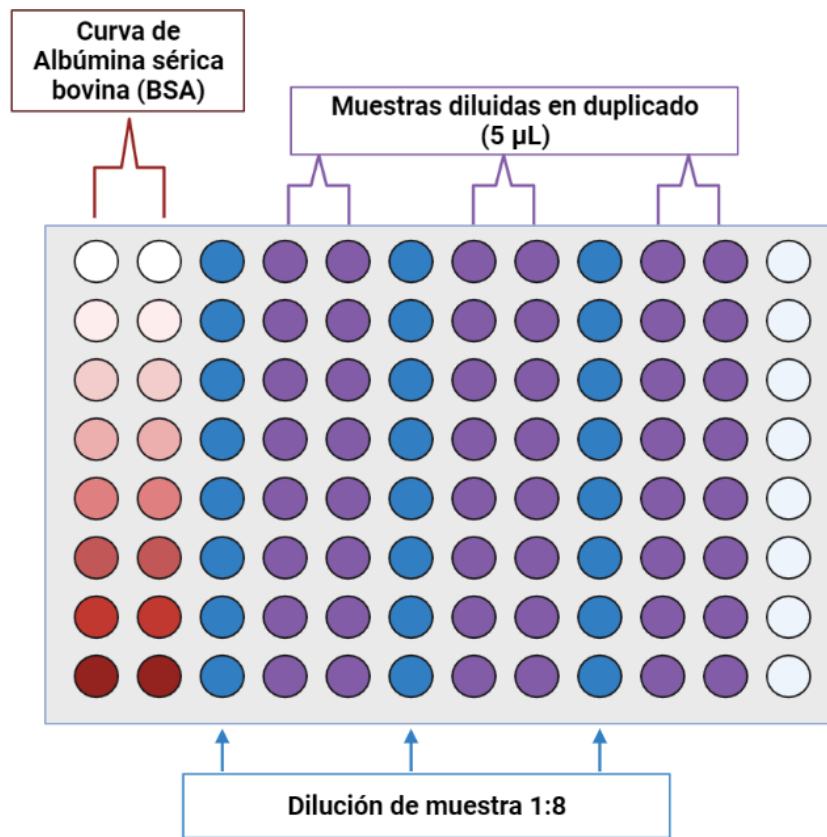
Para este ensayo se utilizaron cajas de 96 pozos, cuya distribución de las muestras y la curva de calibración con albumina sérica bovina (BSA) se muestra en la Figura 7.

Los explantes se lisaron con ayuda de un politron. Se tomó el sobrenadante y se diluyó 1:8 en agua bidestilada. De esta dilución se tomaron 5 µL y se colocó por duplicado tal como se muestra en la **Figura 7**. La curva de calibración se realizó colocando 5 µL por duplicado de concentraciones crecientes de BSA (0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00 y 2.5 µg/mL, utilizando agua bidestilada como concentración cero). Posteriormente, se agregaron 200 µL de reactivo de Bradford tanto a la curva de calibración como al duplicado de la muestras diluidas. Tras verificar que no hubiera burbujas que interfieran con la lectura del espectrofotómetro la placa se leyó a 595 nm. El cálculo de concentración de proteína total se realizó de la siguiente manera:

$$Proteina\ total\ \left(\frac{\mu g}{\mu L}\right) = concentraci3n\ \left(\frac{\mu g}{\mu L}\right) \times Factor\ de\ Diluci3n \quad Ecuaci3n\ 1$$

Hecho esto se procedió a ajustar el volumen de muestra necesario para tener una concentración de 2.5 µg de proteína/µL en un volumen total de 550 µL. El ajuste de volumen se realizó agregando buffer fosfato salino (PBS) adicionado de inhibidor de proteasas (P8340, 1:1000) c.b.p 550 µL.

$$Volumen_{muestra} = \frac{(2.5 \mu g/\mu L)(550 \mu L)}{(concentración_{\frac{\mu g}{\mu L}} \times Dil)} \quad \text{Ecuación 2}$$



**Figura 7. Distribución de las muestras para la cuantificación de proteína total por el método de Bradford.**

### 5.12 ELISA tipo sándwich

Para esta técnica se utilizaron los siguientes estuches comerciales de anticuerpos de PeptoTech: TNF-α (900-K25), IL-1β (900-K95), IL-6 (900-K16), HBD-1 (900-K202), HBD-2 (900-K172), HBD-3 (900-K210) y HBD-4 (900-K435). La técnica de ELISA se utilizó para cuantificar la secreción de las citocinas TNF-α, IL-1β e IL-6, y

la concentración intracelular placentaria de las HBDs. A continuación, se describirá la técnica a seguir.

En la **Tabla 4** se indican las concentraciones de trabajo de todos los reactivos usados para cada ELISA. Por la tarde se sensibilizó la placa de 96 pozos con el anticuerpo de captura diluido en PBS (volumen de 100  $\mu$ L por pozo). Se mantuvo a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavó 3 veces con buffer de lavado (PBS + 0.05% de Tween 20) utilizando un lavaplaquetas automático (BIO-RAD) y se bloqueó con 300  $\mu$ L de solución de bloqueo (PBS + BSA 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Durante el tiempo de incubación se prepararon las curvas de calibración de cada citocina o HBD en buffer diluyente (PBS + 0.1% BSA + 0.05% tween 20). Todas las curvas se prepararon como 7 puntos de diluciones seriadas de acuerdo con el rango indicado en la **Tabla 4**, a partir de estándares a concentración de 1  $\mu$ g/mL. Al término del tiempo de bloqueo, se lavó 3 veces cada placa y se agregó 100  $\mu$ L de muestra o de cada punto de la curva y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se procedió a lavar 3 veces cada placa y se agregó el anticuerpo de detección diluido en reactivo diluyente (volumen de 100  $\mu$ L por pozo), y se mantuvo en incubación durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron 3 veces las placas y se adicionó 100  $\mu$ L/pozo de estreptavidina-peroxidasa de rábano (HRP) diluido en reactivo diluyente; se protegió de la luz dado que estos componentes son foto sensibles y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, la reacción colorimétrica se realizó con el sustrato o-fenilendiaminadihidrocloruro (OPD) de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) en buffer de fosfato de sodio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) 0.2 M, ácido cítrico 0.1 M, 0.05% peróxido de hidrogeno al 30%, pH 5.0. Se utilizó ácido sulfúrico 2N como solución de paro. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm con corrección a 650 nm. La curva de calibración se ajustó a 4 parámetros logísticos y la cuantificación final se normalizó por miligramo de proteína en el caso de las HBD intracelulares y por gramo de tejido en el caso de las citocinas secretadas.

**Tabla 4. Concentraciones de los anticuerpos de captura y detección, y del estándar de la marca PeproTech utilizados para la técnica de ELISA**

<b>Citocina o defensiva</b>	<b>[Anticuerpo de captura]</b>	<b>[Anticuerpo de detección]</b>	<b>Curva estándar de referencia</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$	31.25 – 2000 $\text{pg/mL}$
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	0.5 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$	31.25 – 2000 $\text{pg/mL}$
<b>IL-6</b>	0.5 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	46.9 – 3000 $\text{pg/mL}$
<b>HBD1</b>	0.5 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$	15.62 – 1000 $\text{pg/mL}$
<b>HBD2</b>	0.25 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$	15.62 – 1000 $\text{pg/mL}$
<b>HBD3</b>	1 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$	15.62 – 1000 $\text{pg/mL}$
<b>HBD4</b>	0.25 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$	15.62 – 1000 $\text{pg/mL}$

HBD1: beta defensiva 1. HBD2: beta defensiva 2. HBD3: beta defensiva 3. HBD4: beta defensiva 4. IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta. IL-6: interleucina 6. TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa.

### **5.13 Extracción de RNA mensajero (mRNA) de células trofoblásticas**

Al término de las 48 horas de incubación de los trofoblastos con los tratamientos experimentales, se procedió a realizar la extracción de mRNA para continuar con los estudios de expresión génica de los TLRs 1-9. El proceso se llevó a cabo de la siguiente manera.

Para la extracción de mRNA se utilizó el kit Direct-Zol RNA Miniprep (ZYMO RESEARCH, R2053). Al término del experimento se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de TRIzol a cada pozo con  $2 \times 10^6$  trofoblastos. La suspensión se homogenizó con ayuda de un raspador celular para lisar las células. Se recolectó el volumen total de cada pozo y se transfirió a tubos cónicos de 1.5 mL estériles y libres de RNAsa. A cada tubo se le agregó 600  $\mu\text{L}$  de etanol al 95% y se mezcló vigorosamente durante 30 segundos. Esta mezcla se transfirió a una columna Zymo-spin IICR, colocada dentro de un tubo colector. El homogenado, la columna y el tubo colector se centrifugaron a 12,000 rpm durante 30 segundos, y se decantó el volumen filtrado. Con la finalidad de eliminar el DNA genómico se pretrató la columna con un coctel de DNAsa. Para ello, se lavó la columna con 400  $\mu\text{L}$  de RNA wash buffer, se

centrifugó a 12,000 rpm/30 segundos y se agregó la mezcla de DNAsa I. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación se lavó dos veces la columna con 400 µL de Direct-Zol RNA pre wash. Posteriormente, se adicionaron 700 µL de RNA wash buffer y se centrifugó a 12,000 rpm durante dos minutos para asegurarse de eliminar cualquier contaminante de la columna. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo cónico de 1.5 mL estéril, se adicionó 25 µL de agua libre de DNAsas y RNAsas directamente sobre la matriz de la columna, y se centrifugó a 12,000 rpm durante dos minutos para eluir el mRNA. El mRNA extraído se colocó inmediatamente en hielo seco y se almacenó a -70°C hasta su uso.

#### **5.14 Síntesis de DNA complementario (cDNA) por retrotranscripción**

Para la síntesis de cDNA se utilizó el Kit de síntesis de cDNA RT2 First strand de Qiagen (Qiagen, catalogo 330404). Primero, se cuantificó la concentración de mRNA obtenido del cultivo primario de trofoblasto utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Asimismo, se analizó la pureza del mRNA a través de la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Se consideró que el mRNA tenía una buena pureza si el cociente  $A_{260}/A_{280}$  estaba en el rango de 1.8 a 2.0; en caso de no cumplir este requisito, se descartaron los mRNA para el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Después de cuantificar la concentración de mRNA, se realizaron los cálculos necesarios para retrotranscribir 700 ng de mRNA. Con la finalidad de eliminar contaminaciones por DNA genómico se preparó el MIX de eliminación, y se incubó durante 5 minutos a 42°C, inmediatamente después se colocó en hielo al menos durante un minuto. En la **Tabla 5** se muestra la composición del MIX de eliminación.

**Tabla 5. Mezcla de eliminación de DNA genómico**

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
mRNA	c.b.p 700 ng
Buffer GE	2
Agua libre de nucleasas	c.b.p 10 $\mu\text{L}$

Para preparar la mezcla de trabajo, los componentes del kit (Buffer BC3 5X, Control P2 y el mix de transcriptasa reversa RE3) se descongelaron y centrifugaron a 3000 rpm durante 30 segundos. La mezcla se ajustó a 10  $\mu\text{L}$ ; la composición se muestra en la **Tabla 6**.

**Tabla 6. Mezcla de reacción para retrotranscripción de cDNA**

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer BC3 5X	4
Control P2	1
Mix de transcriptasa reversa RE3	2
Agua libre de nucleasas	c.b.p 10 $\mu\text{L}$

La mezcla de reacción se homogenizó gentilmente por pipeteo y se centrifugó a 2,000 rpm durante 30 segundos. La mezcla se agregó al mRNA pretratado con el mix de eliminación de DNA genómico, y se colocó dentro de un termociclador (Thermo Scientific) ajustado a los siguientes ciclos:

- a) 42°C durante 30 minutos
- b) 95°C durante 5 minutos
- c) Estabilización a 4°C



Al término del ciclo se agregó 91  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas a cada tubo de reacción y se homogenizó gentilmente por pipeteo, el cDNA se almacenó a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

### **5.15 Expresión génica de los TLRs 1-9 por PCR cuantitativa (qPCR)**

La qPCR es una técnica que permite la amplificación y la cuantificación simultáneas de los genes de interés. Tras obtenerse los cDNA por retrotranscripción se utilizó el Kit RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Format F (Qiagen, catálogo 330231, GeneGlobe ID PAHS-052Z). El kit contiene una placa de 96 pozos con 84 genes relacionados a la respuesta inmune innata y adaptativa, entre ellos los TLRs 1-9 y 5 genes constitutivos para normalizar la expresión (cada gen ocupa un pozo), además de controles de PCR (3 pozos), contaminación por DNA genómico (1 pozo) y controles de retrotranscripción (3 pozos). La expresión se normalizó contra la expresión de los genes constitutivos beta actina, beta 2 microglobulina, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, hipoxantina fosforibosil transferasa 1 y la proteína ribosomal larga p0.

Para la amplificación del cDNA se preparó una mezcla que contenía 1248  $\mu\text{L}$  de agua grado PCR, 1350  $\mu\text{L}$  de RT<sup>2</sup> SYBR® Green Mastermix 2X y 102  $\mu\text{L}$  del cDNA obtenido por retrotranscripción. Se agregó 25  $\mu\text{L}$  de esta mezcla a cada pozo de la placa e inmediatamente se selló con una película adhesiva y se cubrió de la luz.

Las placas se centrifugaron previo a su amplificación. La corrida de qPCR se realizó en el equipo LigthCycler480 (Roche), según las características que se muestran en la **Tabla 7**.

**Tabla 7. Protocolo de amplificación del cDNA por qPCR**

Ciclos	Temperatura (°C)	Suceso	Segundos
1	95	Activación de la <i>Hot Start DNA Taq</i> Polimerasa y desnaturalización inicial del cDNA	600
45	95	Desnaturalización del cDNA. Recolección datos de fluorescencia.	15
	60	Alineamiento y alargamiento. Recolección datos de fluorescencia.	60

### 5.16 Cepa de *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli* utilizada para los ensayos de infección en esta tesis, se aisló de la sangre de un neonato con sepsis y cuya madre fue diagnosticada con PROM y corioamniotitis diagnosticado en el INPer. Esta cepa se identificó mediante Vitek® y se confirmó a través de secuenciación de su subunidad 16S ribosomal. Su genotipo se determinó mediante PCR múltiple como parte del filogrupa-B2 y se detectaron los genes de virulencia *papA*, *fimH*, *ibeA*, *fyuA*, *aerJ*, *hlyA* y *traT*.

### 5.17 Ensayo de actividad antimicrobiana por conteo de unidades formadoras de colonias

Se utilizó el método de conteo de UFC para evaluar funcionalmente la actividad antimicrobiana de la insulina y la metformina en el cultivo de explantes placentarios. Para esta técnica se cultivó la cepa de *E. coli* en medio Triptisoya-Caseína (Marca BD, BA-257107.03) y se mantuvo toda la noche a 37°C para estimular su proliferación. Al día siguiente, bajo condiciones de esterilidad se tomó una alícuota del cultivo para determinar su concentración mediante turbidimetría. En el grupo de trabajo se ha estandarizado una curva de crecimiento de *E. coli* a 600 nm, por lo que mediante la ecuación 3 se obtuvo la concentración del cultivo.

$$\frac{UFC}{ml} = (1 \times 10^7) (e^{(4.8213)(Abs_{620 \text{ nm}})}) \quad \text{Ecuación 3}$$

A partir de la concentración obtenida se realizaron diluciones seriadas en solución salina hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. El ensayo se ajustó a una tasa de infección de  $1 \times 10^5$  UFC/mL (Alhousseini et al., 2020) en medio de mantenimiento (Medio DMEM bajo en glucosa, ajustado a glucosa 10 mM + 10% STNi) libre de antibióticos. Se infectó a los explantes placentarios después de las 48 horas de incubación con los tratamientos experimentales. Al término de 2 y 4 h de infección se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 y 1:100,000) de cada pozo experimental, con solución salina + 0.05% de Tween 80, y se sembraron 10  $\mu$ L de cada dilución por triplicado por el método de microgota sobre placas de agar Luria-Bertani (Marca BD 244520). Las placas se mantuvieron en incubación toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se realizó el conteo de colonias visibles para poder realizar el cálculo de UFC/mL de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$UFC/mL = \frac{(UFC)(\text{Factor de dilución})}{\text{Volumen del pozo (1000 } \mu\text{L)}} \quad \text{Ecuación 4}$$

### **5.18 Caracterización morfológica del cultivo de explantes placentarios por tinción de Hematoxilina y Eosina**

Con el fin de evaluar la morfología de la placenta humana se prepararon laminillas teñidas con hematoxilina y eosina, esta tinción es ampliamente utilizada debido a que la hematoxilina por ser de naturaleza catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas en tono azul y púrpura, por ejemplo, los núcleos celulares, en cambio el uso de eosina tiñe componentes básicos en tonos color rosa gracias a su naturaleza ácida, un ejemplo es el citoplasma (Salazar y Moreno, 2016).

### **5.19 Seguimiento de la infección placentaria por *E. coli* a través de la tinción de Gram**

Para evaluar la capacidad de defensa de los explantes placentarios ante la infección por *E. coli*, se prepararon laminillas teñidas con la tinción modificada de

Gram (Tinción de Brown-Hopps) con los explantes que se utilizaron para el conteo de UFC (Becerra et al., 2016). Al término de las 4 horas del ensayo funcional, se guardaron en formol dos explantes placentarios de cada tratamiento experimental. Posteriormente, el tejido se embebió en bloques de parafina y se hicieron cortes con ayuda de un microtomo. Los cortes se colocaron en un cubreobjetos y se desparafinó. Se cubrió el portaobjetos con una solución al 1% de cristal violeta durante dos minutos, y se enjuagó con agua destilada. Posteriormente se agregó el mordente (Yodo de Gram) durante 5 minutos y se enjuagó con agua destilada. Luego, se destiñó utilizando una solución de acetona-alcohol por 10 segundos. Posteriormente, se agregó una solución al 0.5% de fucsina básica durante cinco minutos y se enjuagó con agua destilada. Sobre esta tinción se agregó una solución de ácido pícrico al 0.1% por 30 segundos y se enjuagó rápidamente tres veces con xilol. Finalmente, se cubrió con un cubreobjetos.

Esta tinción permite visualizar bacterias dentro de tejidos histológicos y diferenciar entre bacterias gram negativas y gram positivas. El tejido se observa en una tonalidad amarillenta por la adición de ácido pícrico, mientras que las bacterias gram negativas se observan en color rojo (Procop y Wilson, 2001).

## **5.20 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los ensayos de producción de HBD 1-4, la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  y el ensayo de actividad antimicrobiana, se realizó por ANOVA de una vía. Los post-hoc que se utilizaron para el análisis de las comparaciones múltiples pareadas dependieron de la normalidad de los datos, y fueron los siguientes: a) Dunnett para la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ; b) Dunnett para evaluar la producción intracelular de HBDs; y c) Dunn para el conteo de UFC/mL. En el pie de las figuras se indica el post-hoc empleado. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 9.3.0 (GraphPad Software, Inc.). Se consideró como diferencia estadística significativa el valor de  $P$  inferior a 0.05 ( $P < 0.05$ ).

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Características clínicas

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

**Tabla 8. Características clínicas de las madres donadoras y sus neonatos (n = 16).**

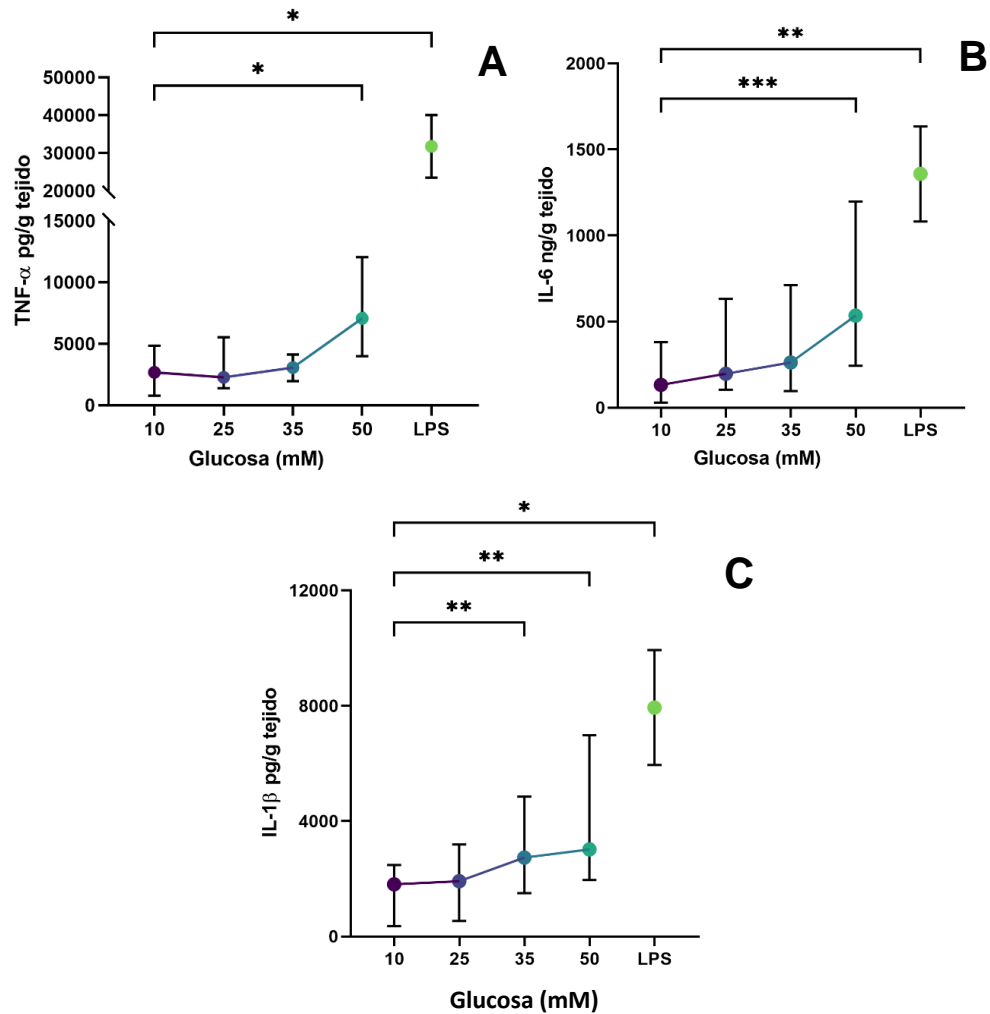
<b>Característica</b>	<b>Promedio ± DE</b>	<b>Intervalo (min – máx.)</b>
<b>Características maternas</b>		
<b>Edad (años)</b>	28.6 ± 5.0	19-37
<b>IMC pre-gestacional (kg/m<sup>2</sup>)</b>	24.6 ± 3.5	18.6 - 29.6
<b>Número de gestas</b>	2.3 ± 0.9	1 - 5
<b>Semanas de gestación</b>	38.5 ± 0.8	37 - 40
<b>Presión sistólica</b>	110.7 ± 7.6	99 - 120
<b>Presión diastólica</b>	74.7 ± 11.6	60 - 85
<b>Ganancia de peso (Kg)</b>	11.020 ± 4.430	5.5 - 18
<b>Características de los recién nacidos</b>		
<b>Peso al nacer (Kg)</b>	3.060 ± 0.350	2.435 – 3.775
<b>Talla (cm)</b>	49.1 ± 1.4	48 - 53
<b>Perímetro cefálico (cm)</b>	34.6 ± 1.7	32 - 39
<b>APGAR 1 min</b>	8.4 ± 0.5	8 - 9
<b>APGAR 5 min</b>	9.1 ± 0.3	9 - 10
<b>Peso de la placenta (g)</b>	561.81 ± 116.87	422.10 – 728.8
<b>Sexo del bebé</b>	10 mujeres, 6 hombres	62.5 % / 37.5 %

**APGAR:** Aspecto, pulso, irritabilidad (del inglés *grimace*), actividad y respiración; prueba para evaluar la salud del neonato al minuto y los 5 minutos de vida. **IMC:** Índice de masa corporal

## 6.2 Estandarización del modelo *ex vivo* de diabetes mellitus gestacional

Como se mencionó anteriormente, la hiperglucemia es una condición que induce un cuadro de meta-inflamación (Chuan et al., 2018; Li et al., 2020; Olmos-Ortiz et al., 2021; Zhang et al., 2017). Por lo tanto, se deseó probar si se podía preservar el estado inflamatorio asociado a la hiperglucemia en nuestro modelo del cultivo de explantes placentarios. Las concentraciones probadas de glucosa fueron 10, 25, 35 y 50 mM, tal como se describió en la sección 5.9 de metodología.

Como se observa en la **Figura 8**, la concentración de glucosa 50 mM aumentó la secreción de las tres citocinas proinflamatorias de forma significativa respecto a la concentración de glucosa 10 mM. La concentración de glucosa 35 mM sólo indujo significativamente la secreción de IL-1 $\beta$ . Como era de esperar, este estímulo metabólico es de menor grado que el alcanzado con el tratamiento con LPS (que imita a un escenario de infección aguda).



**Figura 8.** El medio condicionado con glucosa 50 mM estimula la producción de los marcadores inflamatorios A) factor necrótico tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), B) interleucina 6 (IL-6) y C) interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ). n= 8 ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples pareadas. Los datos se presentan en forma de mediana y rango intercuartil. \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001. LPS = Lipopolisacárido de *E. coli* (500 ng/mL).

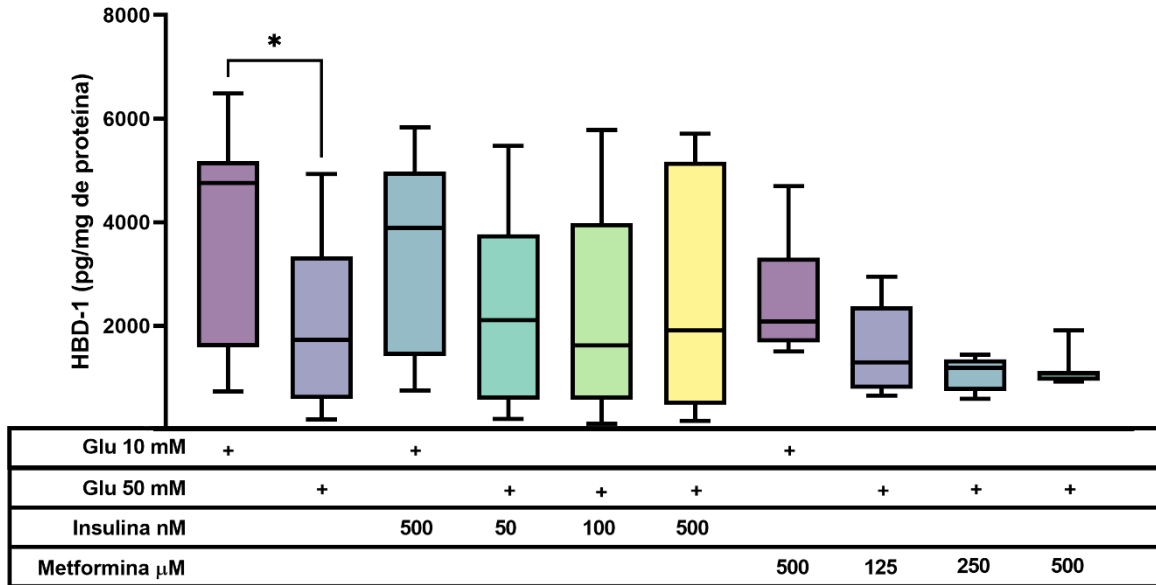
En consideración de los resultados obtenidos, se eligió la concentración de glucosa 50 mM para el desarrollo experimental de esta tesis. Esta concentración fue efectiva para semejar el cuadro inflamatorio en la placenta humana asociado a la hiperglucemia por DMG.

### **6.3 Efecto de la insulina y la metformina sobre la producción de beta defensinas humanas 1, 2, 3 y 4 en explantes placentarios del tercer trimestre**

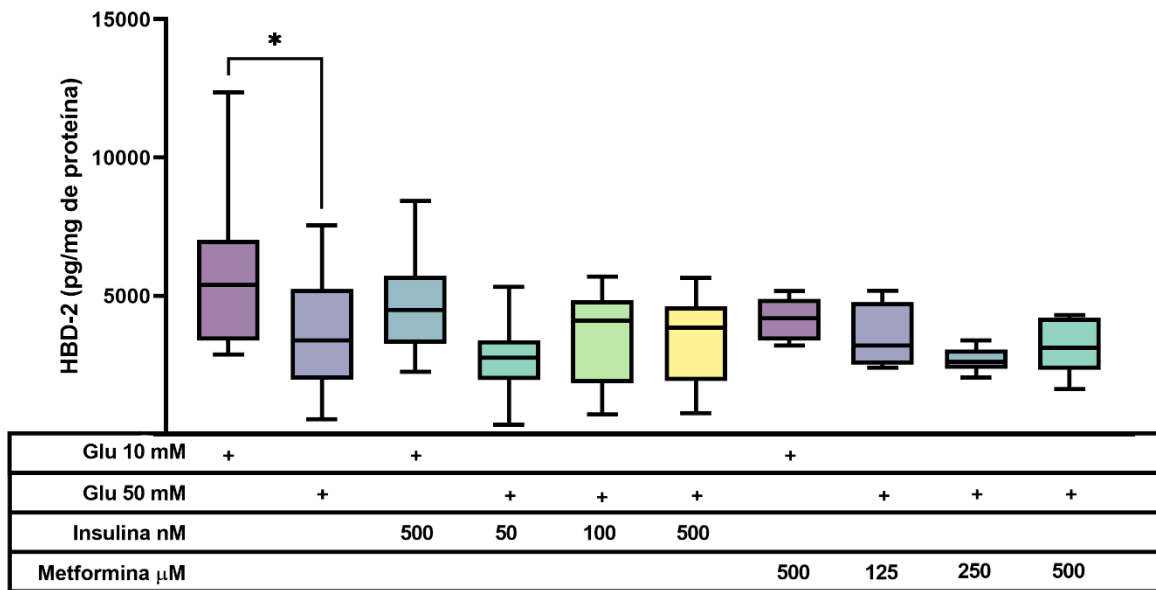
Como siguiente objetivo, se planteó evaluar la capacidad de la insulina y la metformina para modular la producción de las HBDs como componentes del sistema de AMPs. El sinciotrofoblasto expresa las HBD1, HBD2, HBD3 y HBD4, y se ha reportado su disminución debido a la hiperglucemia (Froy et al., 2007; Lan et al., 2012; Lan et al., 2011; Montoya-Rosales et al., 2016; Szmuiłowicz et al., 2019). En las **Figuras 9-12** se observa que la hiperglucemia (Glucosa 50 mM) disminuyó significativamente la producción de las HBDs 1-4. Esto coincide con el debilitamiento de la respuesta innata que se ha reportado en distintos modelos de diabetes y DMG.

Por su parte, ni el tratamiento con insulina ni con metformina fue efectivo para restituir la producción de HBDs. Como se aprecia en las gráficas, el efecto inhibitorio de la hiperglucemia sobre la producción de HBDs, se sostuvo después del cotratamiento con insulina (50, 100 o 500 nM) o con metformina (125, 250 o 500  $\mu$ M). Únicamente se observó un aumento significativo en la síntesis de HBD3 tras el tratamiento con una de las concentraciones de metformina (**Figura 11**). En ese caso, se observó un discreto incremento en la síntesis de esa beta defensina en comparación con la producción observada en hiperglucemia.

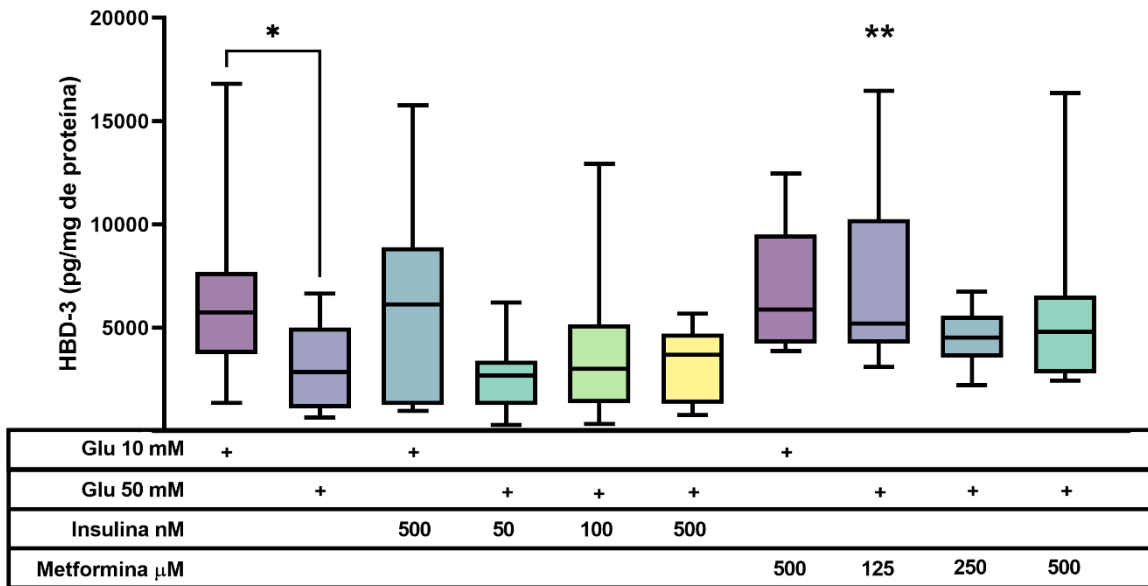




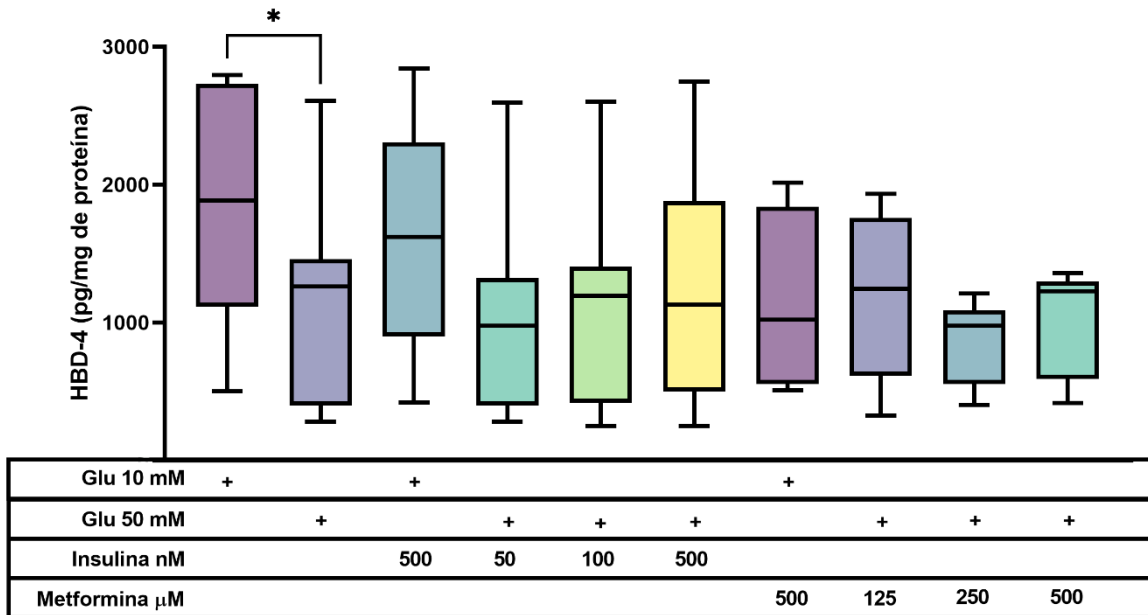
**Figura 9. La hiperglucemia disminuye la producción de beta defensiva 1 (HBD1) en la placenta humana. El tratamiento con insulina o metformina no modifica el perfil de producción de este péptido.** Se muestra la concentración intracelular placentaria de HBD1 después de 48 horas de cultivo con el modelo de diabetes mellitus gestacional y con el tratamiento de insulina (50, 100 o 500 nM) o metformina (125, 250 o 500 μM. n = 4 – 7 experimentos independientes en triplicado. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Los datos se presentan en forma de cajas (mediana y rango intercuartil) y bigotes (mínimo – máximo). \*P < 0.05. Glu: Glucosa



**Figura 10. La hiperglucemia disminuye la producción de beta defensina 2 (HBD2) en la placenta humana. El tratamiento con insulina o metformina no modifica el perfil de producción de este péptido.** Se muestra la concentración intracelular placentaria de HBD2 después de 48 horas de cultivo con el modelo de diabetes mellitus gestacional y con el tratamiento de insulina (50, 100 o 500 nM) o metformina (125, 250 o 500 μM. n = 4 – 7 experimentos independientes en triplicado. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Los datos se presentan en forma de cajas (mediana y rango intercuartil) y bigotes (mínimo – máximo). \*P < 0.05. Glu: Glucosa



**Figura 11. La hiperglucemia disminuye la producción de beta defensina 3 (HBD3) en la placenta humana. El tratamiento con insulina no modifica el perfil de producción de este péptido, el tratamiento con metformina 125  $\mu$ M restituye la producción de este péptido.** Se muestra la concentración intracelular placentaria de HBD3 después de 48 horas de cultivo con el modelo de diabetes mellitus gestacional y con el tratamiento de insulina (50, 100 o 500 nM) o metformina (125, 250 o 500  $\mu$ M). n = 4 – 7 experimentos independientes en triplicado. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Los datos se presentan en forma de cajas (mediana y rango intercuartil) y bigotes (mínimo – máximo). \*P < 0.05. \*\*P < 0.01 vs Glucosa 50 mM. Glu: Glucosa



**Figura 12. La hiperglucemia disminuye la producción de beta defensina 4 (HBD4) en la placenta humana. El tratamiento con insulina o metformina no modifica el perfil de producción de este péptido.** Se muestra la concentración intracelular placentaria de HBD4 después de 48 horas de cultivo con el modelo de diabetes mellitus gestacional y con el tratamiento de insulina (50, 100 o 500 nM) o metformina (125, 250 o 500 μM. n = 4 – 7 experimentos independientes en triplicado. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Los datos se presentan en forma de cajas (mediana y rango intercuartil) y bigotes (mínimo - máximo). \*P < 0.05. Glu: Glucosa

#### **6.4 Efecto de la insulina y la metformina sobre la expresión génica de los TLR en la placenta humana**

Después del establecimiento del modelo experimental para simular las condiciones de DMG en el cultivo de placenta humana, se decidió evaluar la capacidad de defensa innata placentaria en este modelo. Para este fin, se optó por evaluar la expresión génica de los TLRs.

En la **Tabla 9** se presentan los resultados obtenidos acerca de la capacidad de la insulina y la metformina para modular expresión génica de TLRs en el contexto de la DMG.

Tabla 9. Expresión génica de los TLRs en la placenta humana

Nombre	Símbolo	Glu 10 mM	Glu 50 mM	Glu 50 mM + Ins 500 nM	Glu 50 mM + Met 500 µM
Receptor tipo Toll 1	TLR1	1.00	1.14 ± 0.34	1.01 ± 0.39	0.59 ± 0.51
Receptor tipo Toll 2	TLR2	1.00	0.94 ± 0.52	1.04 ± 0.41	1.00 ± 0.27
Receptor tipo Toll 3	TLR3	1.00	1.28 ± 0.06	1.60 ± 0.20	1.40 ± 0.24
Receptor tipo Toll 4	TLR4	1.00	1.04 ± 0.11	0.79 ± 0.33	0.96 ± 0.35
Receptor tipo Toll 5	TLR5	1.00	1.14 ± 0.40	0.90 ± 0.33	1.09 ± 0.46
Receptor tipo Toll 6	TLR6	1.00	1.19 ± 0.50	0.91 ± 0.59	1.06 ± 0.61
Receptor tipo Toll 7	TLR7	1.00	2.11 ± 1.20	1.46 ± 0.65	1.89 ± 1.11
Receptor tipo Toll 8	TLR8	1.00	1.39 ± 0.54	1.08 ± 0.52	1.18 ± 0.48
Receptor tipo Toll 9	TLR9	1.00	2.41 ± 1.59	1.50 ± 0.98	1.59 ± 0.78

Los genes se normalizaron contra un set de 5 genes constitutivos: beta actina, beta 2 microglobulina, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), Hipoxantina fosforibosil transferasa 1 y la proteína ribosomal larga p0. Se resaltan en rojo aquellos genes que parecen ser inducidos, en comparación con glucosa 10 mM. En verde se indican aquellos genes que parecen regularse a la baja, en comparación con glucosa 50 mM. n = 3 experimentos independientes. Los datos se presentan como promedio ± desviación estandar

En esta sección es importante aclarar que sólo se realizaron 3 experimentos independientes por lo que no se pudo realizar un análisis estadístico concluyente y sólo se presentan las tendencias observadas

### **6.5 Efecto de la insulina y la metformina sobre la capacidad de defensa de la placenta humana ante la infección por *Escherichia coli***

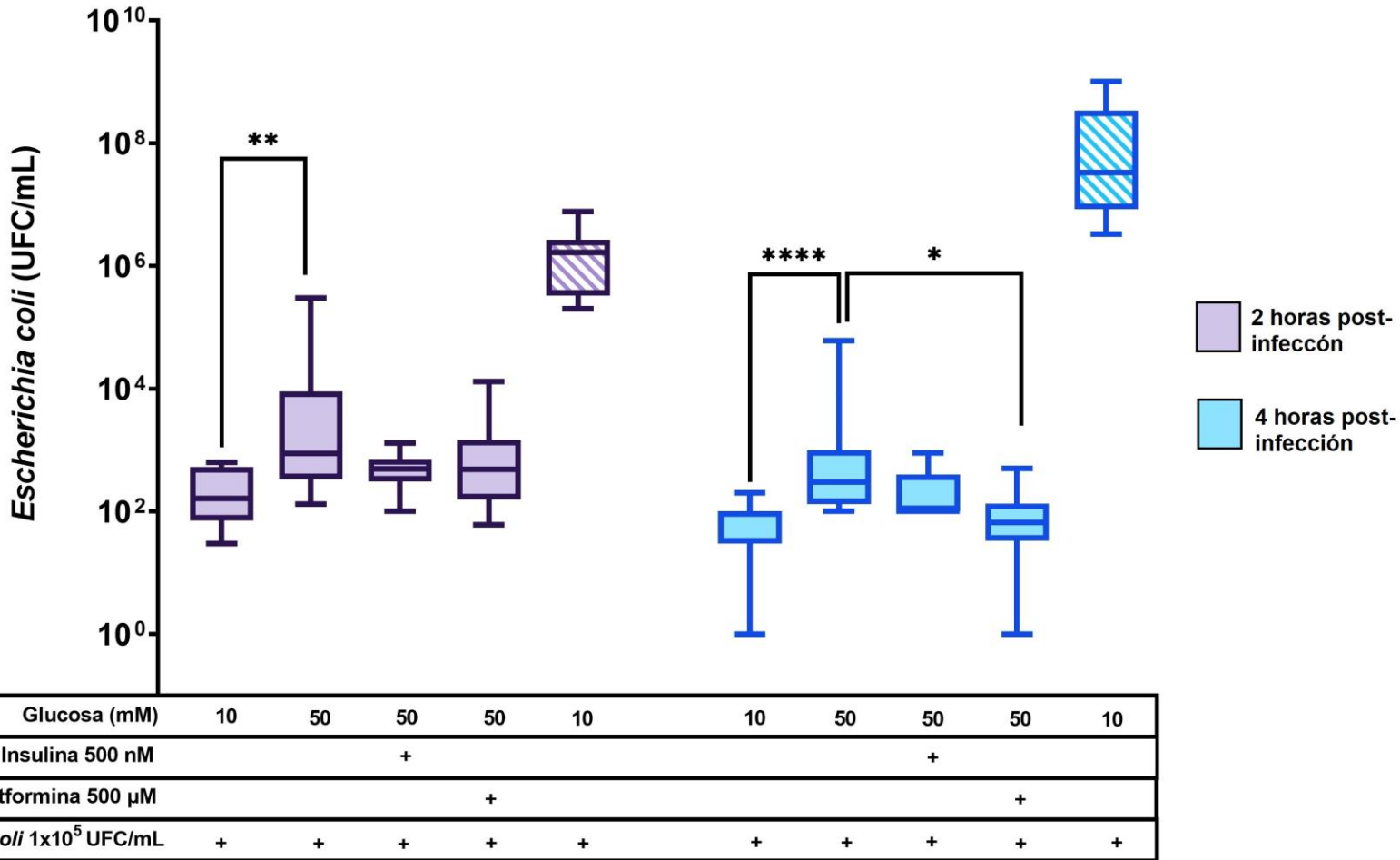
Después de caracterizar la producción de beta defensinas y expresión de TLRs como componentes del sistema de defensa innata placentario, se optó por probar la capacidad de defensa ante un reto infeccioso como *E. coli*. La capacidad funcional de defensa placentaria se evaluó por medio de una técnica cuantitativa (conteo de UFC) y otra cualitativa (Tinción de gram).

Para la realización del ensayo, se infectó con *E. coli* ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) a los explantes placentarios pretratados durante 48 horas con los tratamientos experimentales. Como se observa en la **Figura 13**, el crecimiento bacteriano fue significativamente mayor en hiperglucemia, comparado con el observado en normoglucemia. Estos resultados coinciden con la menor producción placentaria de HBDs por la hiperglucemia (Figuras 9 – 12) y la mayor tasa de infecciones cervicovaginales observada en pacientes con diabetes o DMG. Todo ello, denota importantes cambios en los mecanismos de defensa innata en la placenta humana.

Inesperadamente, el tratamiento con insulina no fue efectivo para disminuir el conteo de bacterias respecto a la condición de hiperglucemia. Es decir, este hipoglucemiante no pudo revertir el exacerbado crecimiento de *E. coli*, que fue resultado de la hiperglucemia. Este resultados no coincide con la actividad antimicrobiana reportada de la insulina en otros modelos experimentales, y será abordado con mayor detalle en la discusión.

Sin embargo, el tratamiento con metformina sí fue efectivo para disminuir el conteo de bacterias respecto a la condición de hiperglucemia a las 4 horas post-infección. Este resultado coincide con lo reportado en otros modelos donde la metformina promovió la actividad antimicrobiana efectiva contra *E. coli*, en la discusión se abordará con mayor detalle este resultado.

Finalmente, se contó con un control de *E. coli* en crecimiento libre (sin presencia de explantes placentarios (**Figura 13**, barra con patrón en diagonales). Este control indica que la bacteria es viable y puede multiplicarse a una tasa de crecimiento logarítmico. Además, se puede comparar que los explantes presentan una importante actividad microbicida ya que son capaces de disminuir en prácticamente tres órdenes de magnitud la carga bacteriana post-infección ( $1 \times 10^5$  UFC/ mL vs  $1 \times 10^2$  UFC/mL).

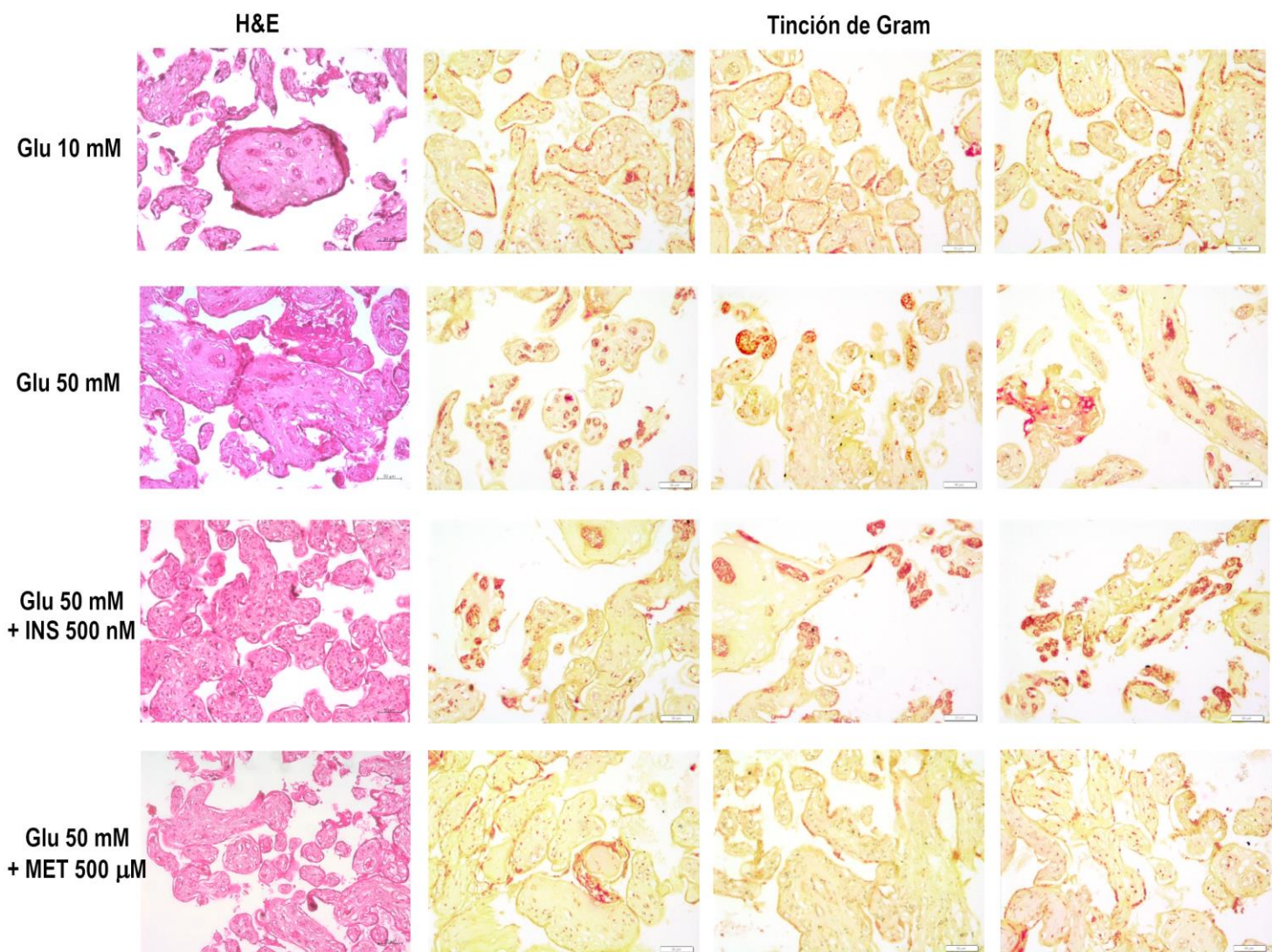


**Figura 13. La infección placentaria por *E. coli* es más severa en condiciones de hiperglucemia. El tratamiento con insulina no modifica el crecimiento de esta bacteria. El tratamiento con metformina restituye la capacidad de defensa de la placenta.** Se infectó con *E. coli* ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) después de dos días de cultivo con el modelo *ex vivo* de diabetes mellitus gestacional y con el tratamiento de insulina 500 nM o metformina 500 µM. El conteo se realizó a las 2 horas (patrón morado) y 4 horas (patrón azul) post-infección. Las barras con patrón en diagonales indican al crecimiento libre de *E. coli*, sin explantes placentarios. n = 4 experimentos independientes en triplicado. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Los datos se presentan en forma de cajas (mediana y rango intercuartil) y bigotes (mínimo - máximo). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .



Asimismo, se realizó la tinción de Brown-Hopps para observar la capacidad de invasión de la vellosidad placentaria por *E. coli*. Como se observa en la **Figura 14**, en condiciones de normoglucemia la bacteria es contenida prioritariamente por la barrera sincitiotrofoblástica. Por el contrario, en hiperglucemia la bacteria logra atravesar esta línea de defensa y parece mostrar un tropismo por los capilares fetales. Esto por supuesto indicaría el paso directo de la infección hacia el feto. Por su parte, el tratamiento con insulina en hiperglucemia no evita que atraviese el sincitiotrofoblasto, y se observa la acumulación bacteriana tanto en el mesénquima vellosa como en los capilares fetales. Por lo tanto, el tratamiento con insulina no mostró protección alguna ante la infección por *E. coli*.

En cuanto al tratamiento con metformina en hiperglucemia, se aprecia una mayor contención de la infección que el observado en hiperglucemia. Sin embargo, la bacteria logra cruzar la barrera sincicial y parece acumularse en el mesénquima vellosa.



**Figura 14. La infección por *Escherichia coli* es más invasiva en condiciones de hiperglucemia.** Tinción modificada de Gram. Fotografías representativas de 3 experimentos independientes. En la esquina inferior derecha se indica la escala de 50  $\mu$ m. H&M: Hematoxilina y Eosina. Glu: Glucosa. INS: Insulina. MET: Metformina.

## VII. RESUMEN DE RESULTADOS

Las principales conclusiones derivadas de esta tesis son las siguientes:

- 1) Se logró establecer un modelo efectivo para simular el ambiente meta-inflamatorio asociado a la DMG en la placenta humana. El modelo se caracteriza por una alta secreción de los marcadores inflamatorios TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6.
- 2) La hiperglucemia disminuye la acumulación intracelular placentaria de las beta defensinas HBD1, HBD2, HBD3 y HBD4.
- 3) El tratamiento con insulina no modifica el perfil de síntesis de HBDs en la placenta humana en condiciones de DMG.
- 4) El tratamiento con metformina (125  $\mu$ M) indujo la síntesis de HBD3 en la placenta humana en condiciones de DMG.
- 5) La hiperglucemia induce la expresión de TLR7 y TLR9 en la placenta humana.
- 6) El tratamiento con insulina disminuye la expresión de TLR4, TLR7 y TLR9 en la placenta humana en condiciones de DMG.
- 7) El tratamiento con metformina disminuye la expresión de TLR9 en la placenta humana en condiciones de DMG.
- 8) Ante la infección por *E. coli*, los explantes pretratados en condiciones de DMG, presentan mayor conteo de bacterias y mayor invasión tisular, lo que indica una menor capacidad de defensa ante esta infección.
- 9) El pretratamiento con insulina no modificó cuantitativamente el perfil de defensa ante la infección por *E. coli* en los explantes placentarios en condiciones DMG.
- 10) El pretratamiento con metformina mejoró cuantitativamente el perfil de defensa ante la infección por *E. coli* en los explantes placentarios en condiciones DMG.
- 11) El pretratamiento con metformina permitió contener la infección por *E. coli* en el mesénquima placentario, sin llegar hacia los capilares fetales. Por lo que proporciona una discreta ventaja ante la infección por *E. coli* en la placenta en el escenario de DMG.

## VIII. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el embarazo, la placenta participa activamente como un órgano inmunoregulatorio para permitir el desarrollo del bebé semiallogénico a la vez que mantiene la capacidad de responder ante un reto infeccioso (Zaga-Clavellina et al., 2021). Uno de los principales actores en este escenario son los trofoblastos, que expresan TLRs y participan en varios de los mecanismos de defensa innata como la síntesis de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos (Olmos-Ortiz et al., 2019). Dentro de los AMPs encontramos, por ejemplo, las beta-defensinas, péptidos catiónicos con la capacidad de desestabilizar las membranas bacterianas a la vez que bloquean la síntesis de componentes bacterianos (Kumar et al., 2018).

Sin embargo, hay condiciones patológicas del embarazo que pueden vulnerar la capacidad de defensa placentaria; una de estas condiciones es la DMG. Se ha descrito que la expresión y producción de péptidos antimicrobianos se encuentra disminuida en pacientes o en modelos de diabetes y DMG (Andersen et al., 2016; Lan et al., 2012; Lan et al., 2011). En este sentido se ha descrito que la producción de AMPs disminuye en células endoteliales amnióticas y en macrófagos en condiciones de hiperglucemia (Szukiewicz et al., 2016; Montoya-Rosales et al., 2016); asimismo, la DMG aumenta el riesgo de infecciones cérvico-urinarias (Rafat et al., 2021; Zhang et al., 2018), por lo que estos dos fenómenos pueden estar relacionados entre sí. En este trabajo se investigó el efecto que tiene la DMG sobre la expresión y producción de las HBDs y TLRs en la placenta humana y su relación con la capacidad de defensa ante la infección por *E. coli*.

En primer lugar, se establecieron las condiciones experimentales para simular un modelo de DMG que preservara *in vitro* no sólo el estado hiperglucémico sino también el estado inflamatorio asociado a esta enfermedad. Como podemos observar en la **Figura 8**, el modelo se obtuvo al mantener los explantes durante 48 horas de cultivo expuestos a medio ajustado en glucosa 50 mM. Con estas condiciones se logró inducir de forma significativa la secreción de los 3

marcadores más importantes de la respuesta inflamatoria en la placenta: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Olmos-Ortiz et al., 2019). Cabe agregar que este estímulo inflamatorio fue de menor grado que el observado con el tratamiento con lipopolisacárido de *E. coli*, ampliamente utilizado como inductor de un proceso inflamatorio agresivo y agudo tanto en cultivos celulares como en modelos animales (Preciado-Martínez et al., 2018; Zavan et al., 2017; Zhou et al., 2017). Esto puede explicarse debido a que el estado inflamatorio asociado a las enfermedades crónicas como diabetes, obesidad o hipertensión es conocido como meta-inflamación (inflamación metabólica). Precisamente una de las características centrales del cuadro meta-inflamatorio es un estado de inflamación de bajo grado, pero sostenido durante largo tiempo, normalmente por meses (en la DMG) o años (en diabetes, obesidad o hipertensión), por lo que presenta efectos adversos a corto y largo plazo.

La hiperglucemia crónica en la DMG es la principal responsable de inducir el característico cuadro meta-inflamatorio; aunque también pueden participar otros actores como la lipotoxicidad y el estrés oxidativo (Li et al., 2020). Las principales alteraciones inflamatorias descritas en la DMG incluyen a) aumento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias en sangre, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , quimiocinas como CXCL-16 y elementos de respuesta Th1 (Hara et al., 2016; Lekva et al., 2017; Zhang et al., 2017); b) disminución en la concentración de factores anti-inflamatorios como IL-10 y adiponectina (Zhang et al., 2017); c) mayor infiltración de macrófagos inflamatorios M1 en el mesénquima placentario (Angelo et al., 2018). Todas estas señales intracelulares de inflamación son deletéreas para el embarazo, ya que la inflamación crónica y aguda se asocia con pobres pronósticos fetales tales como ruptura de membranas o parto pretérmino (Chuan et al., 2018).

Por lo tanto, para el diseño de esta tesis se optó por elegir las concentraciones de glucosa 10 mM y 50 mM para reflejar condiciones de normoglucemia e hiperglucemia, respectivamente, y simular el ambiente inflamatorio asociado a la DMG.

Después de caracterizar el modelo de DMG, se estudió el efecto de la hiperglucemia y del tratamiento con insulina y metformina en la regulación de la síntesis de HBDs y TLRs, como elementos del sistema de defensa innata. Como se puede observar en las **Figuras 9-12**, y de acuerdo con lo reportado previamente en la literatura (Froy et al., 2007; Lan et al., 2012; Lan et al., 2011; Montoya-Rosales et al., 2016; Szmuilowicz et al., 2019), la hiperglucemia disminuyó significativamente la producción de HBD1, HBD2, HBD3 y HBD4 respecto a la condición de normoglucemia. Esto indica que la placenta en hiperglucemia se encuentra limitada para responder de manera efectiva ante un reto infeccioso debido, al menos, a una menor síntesis de HBDs, el grupo de péptidos con actividad antimicrobiana más estudiado en la interfase materno-fetal (King, et al., 2007a, 2007b; Olmos-Ortiz et al., 2015; Olmos-Ortiz et al., 2018; Zaga-Clavellina et al., 2012).

La expresión de AMPs y HBDs está regulada por diversos factores. Distintas evidencias indican que la inflamación o los retos infecciosos inducen el mensajero o proteína de HBD1, HBD2, HBD3 y otros AMPs en la placenta y en las membranas fetales (King, et al., 2007b; Olmos-Ortiz et al., 2015; Olmos-Ortiz et al., 2018; Zaga-Clavellina et al., 2012a, 2012b) debido a la presencia de elementos de respuesta a las vías de señalización del factor nuclear kappa B (NFκB) y p38MAPK en sus regiones promotoras (Lan et al., 2011; Mineshiba et al., 2005; Schröder, 1999). Por el contrario, la hiperglucemia disminuye la síntesis de péptidos y HBDs en múltiples modelos (Barnea et al., 2008; Lan et al., 2012; Lan et al., 2011; Montoya-Rosales et al., 2016; Szukiewicz et al., 2016, 2019; Xia et al., 2018). Se ha propuesto que las principales vías afectadas en la hiperglucemia y que resultarían en una limitada producción de defensinas son las vías del transductor de señal y activador de transcripción (STAT) y de las proteínas cinasas p38 activadas por mitógenos (p38MAPK). El grupo del Dr. Cheng reportó que la exposición crónica a altas concentraciones de glucosa (7 días) resultó en baja fosforilación de STAT1 y baja síntesis de HBD2; asimismo, el silenciamiento de STAT1 por siRNAs inhibió la expresión de HBD2 (Lan et al., 2012). En otro artículo del mismo grupo, se reportó que altas concentraciones de glucosa también

reducen la fosforilación de p38MAPK, lo que resulta en baja expresión de HBD3 (Lan et al., 2011). Por supuesto, otros mecanismos moleculares podrían también estar asociados a la limitada producción de HBDs en la diabetes y la DMG, como el mal funcionamiento (o fosforilación) de distintas proteínas de señalización intracelular debido a la acumulación de productos de glicación avanzada (AGEs) secundario a la hiperglucemia (Lan et al., 2012).

En cuanto a la regulación de HBDs por el tratamiento con insulina y con metformina, se obtuvieron resultados inesperados. En este proyecto se planteó como hipótesis que el tratamiento con ambos hipoglucemiantes ayudaría a fortalecer la defensa innata placentaria. Tal como se describió previamente, varios antecedentes sustentan que la insulina y la metformina tienen un papel positivo en la expresión de péptidos antimicrobianos. Dichos antecedentes son los siguientes: a) aumento en la expresión de HBD1 en ratas diabéticas tratadas con insulina (Froy et al., 2007); b) aumento en la expresión de HBD1 en el cultivo de células embrionarias de riñón estimuladas con insulina (Barnea et al., 2008); c) aumento de la expresión y síntesis de HBD2 y HBD3 en un modelo de neumocitos tipo 2 infectados con *Mycobacterium tuberculosis* y tratados con metformina (Rodríguez-Carlos, et al, 2020); d) mayor resistencia a la infección bacteriana en gusanos y ratas pretratadas con metformina (Xiao et al., 2020); e) mayor síntesis de los péptidos antimicrobianos LL-37 y RNAsa 7 en células epiteliales tratadas con metformina (Majhi et al., 2021). Sin embargo, todos estos modelos distan mucho de las características morfológicas y funcionales de la interfase materno-fetal, y en particular de la placenta. Los resultados derivados de esta tesis indican que la síntesis de HBDs se encuentra comprometida por la hiperglucemia y que, pese a lo esperado, ni el tratamiento con insulina ni con metformina logran incrementar la producción de estos péptidos antimicrobianos.

Ya se había reportado que la síntesis de HBDs por la insulina es tejido-dependiente. Por ejemplo, en el artículo de Froy et al. (2007), la insulina fue efectiva para restituir la expresión de BD1 en el riñón de ratas diabéticas. Sin embargo, la baja expresión de BD1 debido a la diabetes no pudo restituirse tras el

tratamiento con insulina ni en el pulmón ni en el cerebro de estas mismas ratas. Lo que indica que probablemente existen mecanismos represores que controlan la respuesta innata en algunos tejidos, incluida la placenta. Por otra parte, el efecto inductor de AMPs y de fortalecimiento de defensa innata por el tratamiento con metformina, parece estar más conservado en los distintos modelos probados (Majhi et al., 2021; Rodriguez-Carlos et al., 2020; Xiao et al., 2020). El efecto parece que no es atribuible a la incorporación celular de estos hipoglucemiantes, ya que la placenta expresa tanto al receptor de insulina como a los transportadores de metformina OCT1 y OCT3 (Hasegawa et al., 2020; Lee et al., 2013; Overgaard et al., 2019; Westermeir et al., 2015). Por lo que, posiblemente los mecanismos de limitada síntesis de HBDs en la placenta humana después del tratamiento con insulina o metformina podrían estar relacionados con una limitada capacidad de estos hipoglucemiantes para modificar el fosforiloma debido a la hiperglucemia; lo que sería una muy interesante área de estudio en un futuro. Únicamente el uso de metformina a la concentración de 125  $\mu$ M fue capaz de restituir significativamente la síntesis de HBD3, sin existir un efecto dosis-respuesta. No se estudió a profundidad la razón por la que sólo la concentración de 125  $\mu$ M fue capaz de restituir la producción de HBD3, por lo que se necesitan más experimentos que ayuden a dilucidar esta cuestión. Por ejemplo, podría estudiarse la activación de la vía p38MAPK a diferentes concentraciones de metformina y determinar si este efecto sólo se presenta a bajas concentraciones.

Dado que los TLRs son parte central en el reconocimiento de patógenos, así como en la activación de vías de señalización que culminan en la expresión y producción de péptidos antimicrobianos (Firmal et al., 2020; Olmos-Ortiz et al., 2019; Yang et al., 2016), decidimos estudiar su patrón de expresión en la placenta en condiciones de hiperglucemia y con el cotratamiento con insulina o metformina. Antes de discutir los resultados relativos a la expresión génica de TLRs, queremos reconocer como limitación en esta tesis que estos resultados sólo orientan hacia posibles tendencias, ya que sólo se pudieron procesar 3 placentas para los ensayos de qPCR. La intención es ampliar el tamaño de muestra a al menos 5 placentas independientes y poder realizar el análisis estadístico pertinente.



En la literatura se ha descrito que la hiperglucemia induce la expresión de diversos TLRs coincidiendo con un aumento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias ( Olmos-Ortiz et al., 2019; Sears y Kim, 2010; Xie et al., 2013), sin embargo, parece que este efecto es tejido dependiente. En un estudio realizado por Froy et al. (2007), se demostró que la hiperglucemia disminuye la expresión de TLR2 y TLR4 en el hígado de ratones diabéticos mientras que aumenta su expresión en los pulmones. Nuestros resultados parecen indicar que la hiperglucemia induce la expresión placentaria de TLR7 y TLR9, mientras que no modifica el perfil de expresión de los demás TLRs. Dado que TLR7 y TLR9 participan en el reconocimiento de RNA y DNA viral, esto abre camino a futuras investigaciones en torno a la defensa viral placentaria en el contexto de la DMG. Creemos que la sobreexpresión de TLR7 y TLR9 en la placenta hiperglucémica podría impactar en una exacerbada respuesta inflamatoria ante la infección viral, lo que podría conllevar a otras complicaciones como RPM o PP.

Interesantemente, el ensayo de PCR reflejó que el tratamiento con insulina parece disminuir la expresión de TLR4. Este mismo fenómeno fue observado en el hígado de ratas diabéticas (Froy et al., 2007). TLR4 es el encargado de detectar la presencia de LPS, principal antígeno presente en la membrana de bacterias gram negativas como *E. coli* (Lüthje y Brauner, 2014). Por lo tanto, esta disminuida expresión de TLR4 en respuesta al tratamiento con insulina podría explicar parcialmente porqué el pretratamiento con esta hormona no mejoró la capacidad de defensa contra *E. coli*.

Después de estudiar la modulación de HBDs y TLRs por la insulina y la metformina, se decidió evaluar la capacidad de defensa de la placenta ante la infección por UPEC. Debido a los resultados obtenidos, sospechamos que la defensa se vería comprometida en la hiperglucemia y que probablemente el tratamiento con metformina podría ayudar discretamente en la defensa. Se eligió utilizar al patógeno UPEC debido a que es la principal bacteria gram negativa causante de infecciones cérvico-vaginales y urinarias (Dautt-Leyva et al., 2018).

Además, esta bacteria no necesita de medios de cultivo especializados ni condiciones de incubación exigentes, permitiendo su cultivo y fácil conteo de UFC.

Como era esperado, la condición de hiperglucemia disminuyó significativamente la capacidad de defensa de la placenta, reflejándose en el conteo de UFC/mL, siendo significativamente mayor respecto a la condición de normoglucemia (**Figura 13**). Por otra parte, el tratamiento con insulina no modificó el conteo de UFC observado en hiperglucemia, por lo que no mejoró cuantitativamente la capacidad de defensa de la placenta ante esta infección. Por otro lado, la metformina sí disminuyó el conteo de UFC a las cuatro horas post-infección (**Figura 13**), este efecto es consistente con lo reportado por Xiao et al. (2020) en modelos de *C. elegans* y ratas pretratadas con metformina quienes presentaron una mayor resistencia a infectarse por *E. coli* y otros patógenos. Todos estos antecedentes indican que la metformina presenta uno o varios mecanismos que permiten restituir la capacidad de defensa de la placenta ante la infección por *E.coli*. Un punto interesante para considerar es que este conteo se llevó a cabo utilizando los sobrenadantes de los explantes infectados, lo que demuestra la capacidad del tejido para eliminar a las bacterias del medio circundante. Por lo que la siguiente estrategia fue visualizar la capacidad de infección intra tejido. Por el momento esto sólo pudo realizarse de forma cualitativa, y quedó como pendiente realizar el conteo de bacterias viables dentro de la vellosidad.

La tinción de Brown-Hopps demostró que en la condición de normoglucemia, la placenta es capaz de contener la infección por UPEC a nivel de la barrera de sinciotrofoblastos, y de esta forma evitar la invasión hacia el interior, y por tanto hacia el feto (**Figura 14**). Por el contrario, previa exposición a hiperglucemia, la bacteria puede cruzar la barrera sincicial y parece mostrar un tropismo por los capilares. Bajo este desastroso escenario, la infección podría cruzar directamente de la madre hacia el feto. Se debe considerar que, en este caso, los explantes están expuestos a un doble estímulo inflamatorio: el estímulo secundario a la hiperglucemia y el secundario a la infección. Sin embargo, como ya se describió, este escenario combinado es lamentablemente muy frecuente en la práctica

clínica (Beksac et al., 2019; Nicolle et al., 2019; Rafat et al., 2021; Zhang et al., 2018). En conjunto, estos datos indican que las madres expuestas a este escenario inflamatorio combinado presentan un riesgo considerablemente mayor para el desarrollo de RPM y PP, en comparación con mujeres con esta infección, pero sin la hiperglucemia.

Finalmente, el pretratamiento con insulina o metformina mostró efectos diferenciales en la invasión bacteriana en la vellosidad placentaria. El pretratamiento con insulina no mostró ninguna mejoría en la capacidad de contención, en comparación con la hiperglucemia. En ambos casos se aprecia a la bacteria concentrada en el interior de la vellosidad, en particular en los capilares. Esto en parte, podría coincidir con la disminuida expresión de TLR4 bajo el tratamiento con insulina, lo que limitaría la capacidad de responder ante la infección por *E. coli*. Por otro lado, la metformina parece contener de mejor forma la invasividad de *E. coli*. Si bien la bacteria logró cruzar la barrera sincicial, parece que la infección no logra llegar hacia los capilares, lo que proporciona una mayor ventana-tiempo de acción para actuar ante la infección antes de que ésta llegue hacia el bebé. En parte, esta discreta mejora en la defensa podría estar relacionada con el incremento en la síntesis de HBD3. Estos resultados plantean una futura aproximación clínica para estudiar si las pacientes con DMG que están consumiendo metformina como tratamiento hipoglucemiante, podrían presentar una capacidad aumentada de defensa ante la infección por *E. coli*.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis apuntan hacia futuras estrategias que podrían impactar en la mejora de la salud perinatal de las pacientes con DMG; en especial, en aquellas que cursan con infecciones cervicovaginales o urinarias por *E. coli*. Estas estrategias podrían disminuir, en un futuro, el riesgo de desarrollar PP o RPM en este grupo poblacional.

## **IX. CONCLUSION**

La hiperglucemia disminuyó la expresión de las beta defensinas humanas, y alteró el patrón de expresión de los TLRs en la placenta humana, lo cual se relacionó con un aumento en la invasividad de *Escherichia coli* en la vellosidad placentaria, así como un mayor conteo de unidades formadoras de colonia. El tratamiento con insulina no mejoró la producción de beta defensinas ni la capacidad de defensa de la placenta humana, pues se observó un conteo de UFC y una invasividad bacteriana similar a la condición de hiperglucemia. Finalmente, la metformina restituyó la producción de la beta defensina 3 y mejoró la capacidad de defensa al disminuir la invasividad de *Escherichia coli* en la vellosidad placentaria y el conteo de UFC en este modelo de DMG.

## X. REFERENCIAS

- ACOG. (2018). Gestational diabetes mellitus. ACOG Practice Bulletin No. 190. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstetrics and Gynecology*, 131(2), e49–e64.
- Agger, W. A., Siddiqui, D., Lovrich, S. D., Steven, M., Borgert, A. J., Merkitich, K. W., Mason, T. C., Baumgardner, D. J., Burmester, J. K., Shukla, S. K., Welter, D., Stewart, K. S., & Washburn, M. J. (2014). Epidemiologic Factors and Urogenital Infection Associates with Preterm Birth in a Midwestern U.S Population. *Obstet Gynecol*, 124(5), 969–977. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000470>.Epidemiologic
- Alejandro, E. U., Mamerto, T. P., Chung, G., Villavieja, A., Gaus, N. L., Morgan, E., & Pineda-Cortel, M. R. B. (2020). Gestational diabetes mellitus: A harbinger of the vicious cycle of diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21145003>
- Alhousseini, A., Vadillo-Ortega, F., Palacios-Gonzalez, B., Theis, K. R., Winters, A. D., Hassan, S. S., & Meraz-Cruz, N. (2020). Differential Secretion of Inflammatory Cytokines by Human Trophoblasts in the Presence of Escherichia coli, Lactobacillus crispatus, and Lactobacillus jensenii. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 85(3), 277–283. <https://doi.org/10.1159/000507440>
- 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>
- Andersen, C. J., Murphy, K. E., & Fernandez, M. L. (2016). Impact of obesity and metabolic syndrome on immunity. *Advances in Nutrition*, 7(1), 66–75. <https://doi.org/10.3945/an.115.010207>
- Angelo, A. G. S., Neves, C. T. C., Lobo, T. F., Godoy, R. V. C., Ono, É., Mattar, R., & Daher, S. (2018). Monocyte profile in peripheral blood of gestational diabetes mellitus patients. *Cytokine*, 107(December 2017), 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.11.017>
- Arshad, M., & Rehman, F. U. (2015). Histoarchitectural study of chorionic villi in 1st and 2nd trimester placentas. *Journal of the Anatomical Society of India*, 64(2), 141–144. <https://doi.org/10.1016/j.jasi.2015.10.002>
- Bagnall, P., & Rizzolo, D. (2017). Bacterial vaginosis: A practical review. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 30(12), 15–21. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000526770.60197.fa>
- Bahadi, A., El Kabbaj, D., Elfazazi, H., Abbi, R., Hafidi, M., & Hassani, M. (2010). Urinary tract infection in pregnancy. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 21(1), 342–344. <https://doi.org/10.1080/13518040701205365>
- Barazzoni, R., Gortan Cappellari, G., Ragni, M., & Nisoli, E. (2018). Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eating and Weight Disorders*, 23(2), 149–157. <https://doi.org/10.1007/s40519-018-0481-6>
- Barnea, M., Madar, Z., & Froy, O. (2008). Glucose and insulin are needed for optimal defensin expression in human cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(2), 452–456. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.158>
- Becerra, S. C., Roy, D. C., Sanchez, C. J., Christy, R. J., & Burmeister, D. M. (2016). An optimized staining technique for the detection of Gram positive and Gram negative bacteria within tissue. *BMC Research Notes*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1902-0>
- Beksac, A. T., Orgul, G., Tanacan, A., Uckan, H., Sancak, B., Portakal, O., & Beksac, M. S. (2019). Uropathogens and Gestational Outcomes of Urinary Tract Infections in Pregnancies that Necessitate Hospitalization. *Current Urology*, 13(2), 70–73. <https://doi.org/10.1159/000499290>

- Benedetto, C., Tibaldi, C., Marozio, L., Marini, S., Masuelli, G., Pelissetto, S., Sozzani, P., & Latino, M. A. (2004). Cervicovaginal infections during pregnancy: Epidemiological and microbiological aspects. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, *16*(SUPPL. 2), 9–12. <https://doi.org/10.1080/14767050410001727107>
- Bernardo, F. M. M., Veiga, E. C. A., Quintana, S. M., Camayo, F. J. A., Batista, R. F. L., Alves, M. T. S. S. B., Bettioli, H., Barbieri, M. A., Cardoso, V. C., & Cavalli, R. C. (2021). Association of genitourinary infections and cervical length with preterm childbirth. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *54*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1590/1414-431x202010235>
- Boland, B. B., Rhodes, C. J., & Grimsby, J. S. (2017). The dynamic plasticity of insulin production in  $\beta$ -cells. *Molecular Metabolism*, *6*(9), 958–973. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.04.010>
- Bouw, G. M., Stolte, L. A. M., Baak, J. P. A., & Oort, J. (1978). Quantitative morphology of the placenta II. The growth of the placenta and the problem of postmaturity. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, *8*(1), 31–42. [https://doi.org/10.1016/0028-2243\(78\)90007-2](https://doi.org/10.1016/0028-2243(78)90007-2)
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brown, J., Grzeskowiak, L., Williamson, K., Downie, M. R., & Crowther, C. A. (2017). Insulin for the treatment of women with gestational diabetes. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2017*(11). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012037.pub2>
- Carling, D. (n.d.). ScienceDirect AMPK signalling in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, *45*, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.005>
- Chawla, R., Bhalla, P., Chadha, S., Grover, S., & Garg, S. (2013). Comparison of Hay's Criteria with Nugent's scoring system for diagnosis of bacterial vaginosis. *BioMed Research International*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/365194>
- Chiefari, E., Arcidiacono, B., Foti, D., & Brunetti, A. (2017). Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *Journal of Endocrinological Investigation*, *40*(9), 899–909. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0607-5>
- Choi, E., Kikuchi, S., Gao, H., Brodzik, K., Nassour, I., Yopp, A., Singal, A. G., Zhu, H., & Yu, H. (2019). Mitotic regulators and the SHP2-MAPK pathway promote IR endocytosis and feedback regulation of insulin signaling. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09318-3>
- Chuan, L., Xu, M., Wang, K., Adler, A., Vella, A., & Zhou, B. (2018). Macrophage polarization and Metainflammation. *Transl Res*, *191*, 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.10.004.Macrophage>
- Ciaraldi, T. P. (2017). Cellular mechanisms of insulin action. *Principles of Diabetes Mellitus: Third Edition*, 71–86. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18741-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18741-9_5)
- Clabault, H., Laurent, L., Sanderson, J. T., & Vaillancourt, C. (2018). Isolation and purification of villous cytotrophoblast cells from term human placenta. *Methods in Molecular Biology*, *1710*, 219–231. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7498-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7498-6_17)
- da Fonseca, E. B., Damião, R., & Moreira, D. A. (2020). Preterm birth prevention. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, *69*(xxxx), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.09.003>
- Dautt-Leyva, J. G., Canizalez-Román, A., Acosta Alfaro, L. F., Gonzalez-Ibarra, F., & Murillo-Llanes, J. (2018). Maternal and perinatal complications in pregnant women with urinary tract infection caused by Escherichia coli. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *44*(8),

1384–1390. <https://doi.org/10.1111/jog.13687>

- De Luccia, T. P. B., Pendeloski, K. P. T., Ono, E., Mattar, R., Pares, D. B. S., Yazaki Sun, S., & Daher, S. (2020). Unveiling the pathophysiology of gestational diabetes: Studies on local and peripheral immune cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, *91*(4), 1–8. <https://doi.org/10.1111/sji.12860>
- Dupont, J., & Scaramuzzi, R. J. (2016). Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. *Biochemical Journal*, *473*(11), 1483–1501. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160124>
- Farias, E. M. (2015). *Fundamentos de bacteriología*. Editorial Trillas.
- Filardi, T., Panimolle, F., Crescioli, C., Lenzi, A., & Morano, S. (2019). Gestational diabetes mellitus: The impact of carbohydrate quality in diet. *Nutrients*, *11*(7), 1–9. <https://doi.org/10.3390/nu11071549>
- Firmal, P., Shah, V. K., & Chattopadhyay, S. (2020). Insight Into TLR4-Mediated Immunomodulation in Normal Pregnancy and Related Disorders. *Frontiers in Immunology*, *11*(May), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00807>
- Forbes, B. A. (2009). *Diagnostico Mircobiologico*. Editorial Medica Panamerica.
- Froy, O., Hananel, A., Chapnik, N., & Madar, Z. (2007). Differential effect of insulin treatment on decreased levels of beta-defensins and Toll-like receptors in diabetic rats. *Molecular Immunology*, *44*(5), 796–802. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.04.009>
- Ghosh, S. K., McCormick, T. S., & Weinberg, A. (2019). Human beta defensins and cancer: Contradictions and common ground. *Frontiers in Oncology*, *9*(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00341>
- Giannakou, K., Evangelou, E., Yiallourous, P., Christophi, C. A., Middleton, N., Papatheodorou, E., & Papatheodorou, S. I. (2019). Risk factors for gestational diabetes: An umbrella review of meta-analyses of observational studies. *PLoS ONE*, *14*(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215372>
- Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K. M., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2012). Metformin pathways: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and Genomics*, *22*(11), 820–827. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283559b22>
- González-Ruiz, M., Rodríguez-Bandal, C., Salcedo-Vargas, M., Martínez-Lara, E., Enríquez-Espinoza, F., Polo-Soto, S., Saldaña-Rivera, E., Araujo-Betanzos, S., & Floriano-Sánchez, E. (2014). Actualidades en diabetes gestacional. *Revista de Sanidad Militar*, *68*(5), 276–282.
- Guyton, A., & Hall, J. (2011). *Tratado de Fisiología médica* (Duodécima). Elsevier España, S.L.
- Haeusler, R. A., McGraw, T. E., Accili, D., Medicine, C., & Surgery, C. (2019). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*, *19*(1), 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>.Biochemical
- Han, C., Herrin, M., Pitruzzello, M., Mulla, M., Werner, E., Pettker, C., Flannery, C., & Abrahams, V. (2015). Glucose and metformin human first trimester trophoblast function: A model and potencial therapy for diabetes-associated uteroplacental insufficiency. *American Journal of Reproductive Immunology*, *73*(4), 362–371. <https://doi.org/10.1111/aji.12339>.Glucose
- Hara, C. D. C. P., França, E. L., Fagundes, D. L. G., De Queiroz, A. A., Rudge, M. V. C., Honorio-França, A. C., & Calderon, I. D. M. P. (2016). Characterization of Natural Killer Cells and Cytokines in Maternal Placenta and Fetus of Diabetic Mothers. *Journal of Immunology Research*, *2016*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/7154524>
- Hasegawa, N., Furugen, A., Ono, K., Koishikawa, M., Miyazawa, Y., Nishimura, A., Umazume, T.,

- Narumi, K., Kobayashi, M., & Iseki, K. (2020). Cellular uptake properties of lamotrigine in human placental cell lines: Investigation of involvement of organic cation transporters (SLC22A1–5). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 35(3), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2020.01.005>
- Hinojosa-Hernández, M., Hernández-Aldana, F., Barrera-Tenorio, E., & Gayosso-Martínez, M. (2010). Prevalencia de diabetes mellitus gestacional en el Hospital Juárez de México. *Rev Hosp Jua Mex*, 77(2), 123–128.
- Huppertz, B. (2008). The anatomy of the normal placenta. *Journal of Clinical Pathology*, 61(12), 1296–1302. <https://doi.org/10.1136/jcp.2008.055277>
- Hyer, S., Balani, J., & Shehata, H. (2018). Metformin in pregnancy: Mechanisms and clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19071954>
- INPer. (2019). *Causas de morbilidad hospitalaria del INPER*. <https://datos.gob.mx/busca/dataset/causas-de-morbilidad-hospitalaria-de-inper/resource/2c43ecd7-c433-4881-bc76-5c054882b525>
- International Diabetes Federation. (2019). IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium. In *Atlas de la Diabetes de la FID*. [http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014\\_ES.pdf](http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf)
- Jiang, S., Teague, A. M., Tryggstad, J. B., Jensen, M. E., & Chernauskas, S. D. (2020). Role of metformin in epigenetic regulation of placental mitochondrial biogenesis in maternal diabetes. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65415-0>
- Johns, E. C., Denison, F. C., Norman, J. E., & Reynolds, R. M. (2018). Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(11), 743–754. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.09.004>
- Joshua, M., & Raymond, M. (2014). Virulence factors and antibiotic resistance patterns of uropathogenic Escherichia coli. *African Journal of Microbiology Research*, 8(43), 3678–3686. <https://doi.org/10.5897/ajmr2014.7034>
- Kai-Larsen, Y., Gudmundsson, G. H., & Agerberth, B. (2014). A review of the innate immune defence of the human foetus and newborn, with the emphasis on antimicrobial peptides. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 103(10), 1000–1008. <https://doi.org/10.1111/apa.12700>
- Kaitu'u-Lino, T. J., Brownfoot, F. C., Beard, S., Cannon, P., Hastie, R., Nguyen, T. V., Binder, N. K., Tong, S., & Hannan, N. J. (2018). Combining metformin and esomeprazole is additive in reducing sFlt-1 secretion and decreasing endothelial dysfunction – implications for treating preeclampsia. *PLoS ONE*, 13(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188845>
- Kalinderi, K., Delkos, D., Kalinderis, M., Athanasiadis, A., & Kalogiannidis, I. (2018). Urinary tract infection during pregnancy: current concepts on a common multifaceted problem. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 38(4), 448–453. <https://doi.org/10.1080/01443615.2017.1370579>
- King, A. E., Kelly, R. W., Sallenave, J. M., Bocking, A. D., & Challis, J. R. G. (2007). Innate Immune Defences in the Human Uterus during Pregnancy. *Placenta*, 28(11–12), 1099–1106. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.06.002>
- King, A. E., Paltoo, A., Kelly, R. W., Sallenave, J. M., Bocking, A. D., & Challis, J. R. G. (2007). Expression of Natural Antimicrobials by Human Placenta and Fetal Membranes. *Placenta*, 28(2–3), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.01.006>
- Kliman, H. J., Strauss, J. F., Nestler, J. E., Sermasi, E., Strauss, J. F., & Sanger, J. M. (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term



- placentae. *Endocrinology*, 118(4), 1567–1582. <https://doi.org/10.1210/endo-118-4-1567>
- Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J., Gamage, T. K. J. B., & James, J. (2019). Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(18), 3479–3496. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03104-6>
- Kot, B. (2019). Antibiotic Resistance among Uropathogenic Escherichia coli. *Polish Journal of Microbiology*, 68(4), 403–415. <https://doi.org/10.33073/PJM-2019-048>
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- Lan, C. C. E., Wu, C. S., Huang, S. M., Kuo, H. Y., Wu, I. H., Wen, C. H., Chai, C. Y., Fang, A. H., & Chen, G. S. (2011). High-glucose environment inhibits p38MAPK signaling and reduces human  $\beta$ -3 expression in keratinocytes. *Molecular Medicine*, 17(7–8), 771–779. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00091>
- Lan, C., Wu, C., Huang, S., Kuo, H., Wu, I., Liang, C., & Chen, G. (2012). High-glucose environment reduces human  $\beta$ -defensin-2 expression in human keratinocytes: Implications for poor diabetic wound healing. *British Journal of Dermatology*, 166(6), 1221–1229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10847.x>
- Law, K. P., & Zhang, H. (2017). The pathogenesis and pathophysiology of gestational diabetes mellitus: Deductions from a three-part longitudinal metabolomics study in China. *Clinica Chimica Acta*, 468, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.02.008>
- Lee, N., Hebert, M. F., Prasad, B., Easterling, T. R., Kelly, E. J., Unadkat, J. D., & Wang, J. (2013). Effect of gestational age on mRNA and protein expression of polyspecific organic cation transporters during pregnancy. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(12), 2225–2232. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.054072>
- Lekva, T., Michelsen, A. E., Aukrust, P., Paasche Roland, M. C., Henriksen, T., Bollerslev, J., & Ueland, T. (2017). CXC chemokine ligand 16 is increased in gestational diabetes mellitus and preeclampsia and associated with lipoproteins in gestational diabetes mellitus at 5 years follow-up. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 14(6), 525–533. <https://doi.org/10.1177/1479164117728011>
- Li, Y. X., Long, D. L., Liu, J., Qiu, D., Wang, J., Cheng, X., Yang, X., Li, R. M., & Wang, G. (2020). Gestational diabetes mellitus in women increased the risk of neonatal infection via inflammation and autophagy in the placenta. *Medicine*, 99(40), e22152. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000022152>
- Lindsay, R. S., & Loeken, M. R. (2017). Metformin use in pregnancy: promises and uncertainties. *Diabetologia*, 60(9), 1612–1619. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4351-y>
- Lorca, R. A., Houck, J. A., Laurent, L. C., Matarazzo, C. J., Baker, K., Horii, M., Nelson, K. K., Bales, E. S., Euser, A. G., Parast, M. M., Moore, L. G., & Julian, C. G. (2021). High altitude regulates the expression of AMPK pathways in human placenta. *Placenta*, 104(December 2020), 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.01.010>
- Lorenzo-Almorós, A., Hang, T., Peiró, C., Soriano-Guillén, L., Egido, J., Tuñón, J., & Lorenzo. (2019). Predictive and diagnostic biomarkers for gestational diabetes and its associated metabolic and cardiovascular diseases. *Cardiovascular Diabetology*, 18(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0935-9>
- Lukic, A., Napoli, A., Santino, I., Bianchi, P., Nobili, F., Ciampittiello, G., Nardone, M. R., Santomauro, M., Di Properzio, M., & Caserta, D. (2017). Cervicovaginal bacteria and fungi in pregnant diabetic and non-diabetic women a multicenter observational cohort

- study Cervicovaginal bacteria and fungi in pregnant diabetic and non-diabetic women: A multicenter observational cohort study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(10), 2303–2315.
- Lüthje, P., & Brauner, A. (2014). Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. *Advances in Microbial Physiology*, 65, 337–372. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.006>
- Mack, L. R., & Tomich, P. G. (2017). Gestational Diabetes: Diagnosis, Classification, and Clinical Care. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 44(2), 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2017.02.002>
- Majhi, R. K., Mohanty, S., Kamolvit, W., White, J. K., Scheffschick, A., Brauner, H., & Brauner, A. (2021). Metformin strengthens uroepithelial immunity against *E. coli* infection. *Scientific Reports*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98223-1>
- Male, D., Peebles, S., & Male, V. (2021). *Immunology* (Ninth Edit). Elsevier.
- Mazzariol, A., Bazaj, A., & Cornaglia, G. (2017). Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *Journal of Chemotherapy*, 29, 2–9. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2017.1380395>
- McCreight, L. J., Bailey, C. J., & Pearson, E. R. (2016). Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*, 59(3), 426–435. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3844-9>
- Mekapogu, N. P., Gundela, S., & Avula, R. D. (2016). Diabetes mellitus has no significant influence on the prevalence of antenatal asymptomatic bacteriuria. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(4), DC16–DC20. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/14939.7632>
- Mimoun, A., Delignat, S., Peyron, I., Davenport, V., Lecerf, M., Dimitrov, J. D., Kaveri, S. V., Bayry, J., & Lacroix-Desmazes, S. (2020). Relevance of the Materno-Fetal Interface for the Induction of Antigen-Specific Immune Tolerance. *Frontiers in Immunology*, 11(May), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00810>
- Mineshiba, J., Myokai, F., Mineshiba, F., Matsuura, K., Nishimura, F., & Takashiba, S. (2005). Transcriptional regulation of  $\beta$ -defensin-2 by lipopolysaccharide in cultured human cervical carcinoma (HeLa) cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.01.008>
- Mirghani Dirar, A., & Doupis, J. (2017). Gestational diabetes from A to Z. *World Journal of Diabetes*, 8(12), 489–511. <https://doi.org/10.4239/wjd.v8.i12.489>
- Møller, V. (1955). Simplified Tests for Some Amino Acid Decarboxylases and for the Arginine Dihydrolase System. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 36(2), 158–172. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1955.tb04583.x>
- Monroy-Pérez, E., Cerón, A. B., García Cortés, L. R., Alonso, N. N., Domínguez-Trejo, P., Hernández-Jaimes, T., Bustos-Martínez, J., Hamdan-Partida, A., Rojas Jiménez, E. A., Vaca, S., Vaca-Paniagua, F., & Paniagua-Contreras, G. L. (2020). Virulence gene transcription, phylogroups, and antibiotic resistance of cervico-vaginal pathogenic *E. coli* in Mexico. *PLoS ONE*, 15(6 June), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234730>
- Montoya-Rosales, A., Castro-García, P., Torres-Juarez, F., Enciso-Moreno, J. A., & Rivas-Santiago, B. (2016). Glucose levels affect LL-37 expression in monocyte-derived macrophages altering the Mycobacterium tuberculosis intracellular growth control. *Microbial Pathogenesis*, 97, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.002>
- Moon, J. H., Kwak, S. H., & Jang, H. C. (2017). DIAGNOSIS OF GDM AND POSTPARTUM DIABETES Gestational diabetes mellitus. 26–41. <https://www.kjim.org/upload/kjim-2016-203.pdf>
- Nicolle, L. E., Gupta, K., Bradley, S. F., Colgan, R., DeMuri, G. P., Drekonja, D., Eckert, L. O.,

- Geerlings, S. E., Köves, B., Hooton, T. M., Juthani-Mehta, M., Knight, S. L., Saint, S., Schaeffer, A. J., Trautner, B., Wullt, B., & Siemieniuk, R. (2019). Clinical practice guideline for the management of asymptomatic bacteriuria: 2019 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 68(10), E83–E75. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1121>
- Nowakowska, D., Kurnatowska, A., Stray-Pedersen, B., & Wilczyński, J. (2004). Species distribution and influence of glycemic control on fungal infections in pregnant women with diabetes. *Journal of Infection*, 48(4), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.01.017>
- O'Neill, L. A. J., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), 453–460. <https://doi.org/10.1038/nri3446>
- Olivares, J., & Arrellano, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9–18.
- Oliveira, J., & Reygaert, W. (2021). *Gram Negative Bacteria*. StatPearls Publishing.
- a) Olmos-Ortiz, A., Déciga-García, M., Preciado-Martínez, E., Bermejo-Martínez, L., Flores-Espinosa, P., Mancilla-Herrera, I., Irlés, C., Helguera-Repetto, A. C., Quesada-Reyna, B., Goffin, V., Díaz, L., & Zaga-Clavellina, V. (2019). Prolactin decreases LPS-induced inflammatory cytokines by inhibiting TLR-4/NFκB signaling in the human placenta. *Molecular Human Reproduction*, 25(10), 660–667. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaz038>
- b) Olmos-ortiz, A., Flores-espinosa, P., & Mancilla-herrera, I. (2019). Innate Immune Cells and Toll-like Receptor – Dependent Responses at the Maternal – Fetal Interface. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3654), 1–29.
- Olmos-Ortiz, Andrea, Flores-Espinosa, P., Díaz, L., Velázquez, P., Ramírez-Isarraraz, C., & Zaga-Clavellina, V. (2021). Immunoendocrine Dysregulation during Gestational Diabetes Mellitus: The Central Role of the Placenta. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8087. <https://doi.org/10.3390/ijms22158087>
- Olmos-Ortiz, Andrea, García-Quiroz, J., Avila, E., Caldiño-Soto, F., Halhali, A., Larrea, F., & Díaz, L. (2018). Lipopolysaccharide and cAMP modify placental calcitriol biosynthesis reducing antimicrobial peptides gene expression. *American Journal of Reproductive Immunology*, 79(6), 1–10. <https://doi.org/10.1111/aji.12841>
- Olmos-Ortiz, Andrea, García-Quiroz, J., López-Marure, R., González-Curiel, I., Rivas-Santiago, B., Olivares, A., Avila, E., Barrera, D., Halhali, A., Caldiño, F., Larrea, F., & Díaz, L. (2016). Evidence of sexual dimorphism in placental vitamin D metabolism: Testosterone inhibits calcitriol-dependent cathelicidin expression. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 163, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.05.017>
- Olmos-Ortiz, Andrea, Noyola-Martínez, N., Barrera, D., Zaga-Clavellina, V., Avila, E., Halhali, A., Biruete, B., Larrea, F., & Díaz, L. (2015). IL-10 inhibits while calcitriol reestablishes placental antimicrobial peptides gene expression. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 148, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.07.012>
- Overgaard, M. D., Duvald, C. S., Vendelbo, M. H., Pedersen, S. B., Jakobsen, S., Alstrup, A. K. O., Mikkelsen, E., Ovesen, P. G., & Pedersen, M. (2019). Biodistribution of [11C]-Metformin and mRNA Expression of Placentae Metformin Transporters in the Pregnant Chinchilla. *Contrast Media and Molecular Imaging*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9787340>
- Paniagua-Contreras, G. L., Monroy-Pérez, E., Solís, R. R., Cerón, A. B., García Cortés, L. R., Alonso, N. N., Camarillo, D. H., Arreygue, L. S., Domínguez-Trejo, P., Velásquez, C. D., Vaca-Paniagua, F., Uribe-García, A., & Vaca, S. (2019). O-serogroups of multi-drug resistant cervicovaginal *Escherichia coli* harboring a battery of virulence genes. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 25(7), 494–497. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.02.004>

- Petroff, M. G., Phillips, T. A., Ka, H., Pace, J. L., & Hunt, J. S. (2016). Isolation and culture of term human trophoblast cells. *Methods in Molecular Medicine*, 121, 203–217. <https://doi.org/10.1385/1-59259-983-4:201>
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms191113342>
- Preciado-Martínez, E., García-Ruíz, G., Flores-Espinosa, P., Bermejo-Martínez, L., Espejel-Nuñez, A., Estrada-Gutiérrez, G., Razo-Aguilera, G., Granados-Cepeda, M., Helguera-Repetto, A. C., Irlés, C., & Zaga-Clavellina, V. (2018). Progesterone suppresses the lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in primary mononuclear cells isolated from human placental blood. *Immunological Investigations*, 47(2), 181–195. <https://doi.org/10.1080/08820139.2017.1413112>
- Procop, G., & Wilson, M. (2001). Infectious disease pathology. *Clinical Infectious Diseases*, 32(11), 1589–1601. <https://doi.org/10.1086/320537>
- Rafat, D., Singh, S., Nawab, T., Khan, F., Khan, A. U., & Khalid, S. (2021). Association of vaginal dysbiosis and gestational diabetes mellitus with adverse perinatal outcomes. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, April, 1–9. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13945>
- Rashki, A. (2014). Cervico-vaginopathogenic Escherichia coli in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Microbial Pathogenesis*, 75, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.08.004>
- Rath, T., Baker, K., Pyzik, M., & Blumberg, R. S. (2014). Regulation of immune responses by the neonatal Fc receptor and its therapeutic implications. *Frontiers in Immunology*, 5(DEC), 22–29. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00664>
- Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>
- Rice, G. E., Scholz-Romero, K., Sweeney, E., Peiris, H., Kobayashi, M., Duncombe, G., Mitchell, M. D., & Salomon, C. (2015). The effect of glucose on the release and bioactivity of exosomes from first trimester trophoblast cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(10), E1280–E1288. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2270>
- Rodríguez-Carlos, A., Valdez-Miramontes, C., Marin-Luevano, P., González-Curiel, I., Enciso-Moreno, J. A., & Rivas-Santiago, B. (2020). Metformin promotes Mycobacterium tuberculosis killing and increases the production of human  $\beta$ -defensins in lung epithelial cells and macrophages. *Microbes and Infection*, 22(3), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.10.002>
- Sáez-López, E., Cossa, A., Benmessaoud, R., Madrid, L., Moraleda, C., Villanueva, S., Tligui, H., Moiane, B., Alami, H., Massora, S., Beza, R., Mandomando, I., Bosch, J., Vila, J., Bassat, Q., & Soto, S. M. (2016). Characterization of vaginal Escherichia coli isolated from pregnant women in two different African sites. *PLoS ONE*, 11(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158695>
- Salazar, L., & Moreno, F. (2016). Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar. *Salutem Scientia Spiritus*, 2(2), 12–23.
- Schäfer-Graf, U., Gembruch, U., Kainer, F., Groten, T., Hummel, S., Hösli, I., Grieshop, M., Kalthener, M., Bühner, C., Kautzky-willer, A., & Laubner, K. (2018). Gestational Diabetes Mellitus (GDM) – Diagnosis, Treatment and Follow-Up. Guideline of the DDG and DGGG (S3 Level, AWMF Registry Number 057 / 008, February 2018) Gestationsdiabetes mellitus (GDM) – Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Leitlinie. *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde*, 78(12), 1219–1231.

- Schneeberger, C., Erwich, J. J. H. M., van den Heuvel, E. R., Mol, B. W. J., Ott, A., & Geerlings, S. E. (2018). Asymptomatic bacteriuria and urinary tract infection in pregnant women with and without diabetes: Cohort study. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 222, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.12.013>
- Schröder, J. M. (1999). Epithelial antimicrobial peptides: Innate local host response elements. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56(1–2), 32–46. <https://doi.org/10.1007/s000180050004>
- Sears, D. D., & Kim, J. J. (2010). TLR4 and insulin resistance. *Gastroenterology Research and Practice*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/212563>
- Shu, Y., Sheardown, S. A., Brown, C., Owen, R. P., Zhang, S., Castro, R. A., Ianculescu, A. G., Yue, L., Lo, J. C., Burchard, E. G., Brett, C. M., & Giacomini, K. M. (2007). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1422–1431. <https://doi.org/10.1172/JCI30558>
- Skajaa, G. O., Fuglsang, J., Knorr, S., Møller, N., Ovesen, P., & Kampmann, U. (2020). Changes in insulin sensitivity and insulin secretion during pregnancy and post partum in women with gestational diabetes. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 8(2), 4–12. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2020-001728>
- SosaRubi, S. G., Dainelli, L., Silva-Zolezzi, I., Detzel, P., Espino y Sosa, S., Reyes-Muñoz, E., Chivardi, C., Ortiz-Panozo, E., & Lopez-Ridaura, R. (2019). Short-term health and economic burden of gestational diabetes mellitus in Mexico: A modeling study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 153, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.05.014>
- Stapleton, A. E. (2016). The Vaginal Microbiota and Urinary Tract Infection. *Microbiol Spectr*, 4(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0025-2016>.The
- Szmuilowicz, E. D., Josefson, J. L., & Metzger, B. E. (2019). Gestational Diabetes Mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 48(3), 479–493. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2019.05.001>
- Szukiewicz, D., Alkhalayla, H., Pyzlak, M., & Szewczyk, G. (2016). High Glucose Culture Medium Downregulates Production of Human  $\beta$ -Defensin-2 (HBD2) in Human Amniotic Epithelial Cells (HAEC). *Proceedings of the Experimental Biology. FASEB Journal*.
- Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55–67. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(10\)70093-x](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(10)70093-x)
- Toche, P. (2012). PANORAMIC VISION OF THE INMUNE SYSTEM. *Revista Medica Clinica Condes*, 23(4), 446–457.
- Tokarz, V. L., MacDonald, P. E., & Klip, A. (2018). The cell biology of systemic insulin function. *Journal of Cell Biology*, 217(7), 2273–2289. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802095>
- Turco, M. Y., & Moffett, A. (2019). Development of the human placenta. *Development (Cambridge)*, 146(22), 1–14. <https://doi.org/10.1242/dev.163428>
- Ujvari, D., Jakson, I., Babayeva, S., Salamon, D., Rethi, B., Gidlöf, S., & Hirschberg, A. L. (2017). Dysregulation of in vitro decidualization of human endometrial stromal cells by insulin via transcriptional inhibition of forkhead box protein O1. *PLoS ONE*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171004>
- Wang, A., Rana, S., & Karumanchi, S. A. (2009). Preeclampsia: The role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology*, 24(3), 147–158. <https://doi.org/10.1152/physiol.00043.2008>
- Westermeier, F., Sáez, T., Arroyo, P., & Toledo, F. (2015). Insulin receptor isoforms: an integrated view focused on gestational diabetes mellitus. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32(30), 350–365. <https://doi.org/10.1002/dmrr>

- Wu, C., Qiu, S., Zhu, X., Lin, H., & Li, L. (2018). OCT1-Mediated Metformin Uptake Regulates Pancreatic Stellate Cell Activity. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(4), 1711–1720. <https://doi.org/10.1159/000491003>
- Xia, S. lei, Li, X. fei, Abasubong, K. P., Xu, C., Shi, H. juan, Liu, W. bin, & Zhang, D. dong. (2018). Effects of dietary glucose and starch levels on the growth, apparent digestibility, and skin-associated mucosal non-specific immune parameters in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish and Shellfish Immunology*, 79(October 2017), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.001>
- Xiao, Y., Liu, F., Li, S., Jiang, N., Yu, C., Zhu, X., Qin, Y., Hui, J., Meng, L., Song, C., Li, X. F., & Liu, Y. (2020). Metformin promotes innate immunity through a conserved PMK-1/p38 MAPK pathway. *Virulence*, 11(1), 39–48. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1706305>
- Xie, B. G., Jin, S., & Zhu, W. J. (2013). Expression of toll-like receptor 4 in maternal monocytes of patients with gestational diabetes mellitus. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(1), 236–240. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1360>
- Yang, X., Li, M., Haghiac, M., & Catalano, P. (2016). Causal relationship between obesity-related traits and TLR4-driven responses at the maternal-fetal interface. *Diabetologia*, 59(11), 2459–2466. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4073-6.Causal>
- Zaga-Clavellina, Verónica, Diaz, L., Olmos-Ortiz, A., Godínez-Rubí, M., Rojas-Mayorquín, A. E., & Ortuño-Sahagún, D. (2021). Central role of the placenta during viral infection: Immuno-competences and miRNA defensive responses. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1867(10). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166182>
- Zaga-Clavellina, Veronica, Ruiz, M., Flores-Espinosa, P., Vega-Sanchez, R., Flores-Pliego, A., Estrada-Gutierrez, G., Sosa-Gonzalez, I., Morales-Méndez, I., & Osorio-Caballero, M. (2012). Tissue-specific human beta-defensins (HBD)-1, HBD-2 and HBD-3 secretion profile from human amniochorionic membranes stimulated with *Candida albicans* in a two-compartment tissue culture system. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-70>
- Zavan, B., De Almeida, E. M., Salles, É. D. S. L., Do Amarante-Paffaro, A. M., & Paffaro, V. A. (2016). COX-2 plays a role in angiogenic DBA+ uNK cell subsets activation and pregnancy protection in LPS-exposed mice. *Placenta*, 44, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.06.006>
- Zhang, Chi, H., Xiao, H., Tian, X., Wang, Y., Yun, X., & Xu, Y. (2017). Interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) single nucleotide polymorphisms (SNPs), inflammation and metabolism in gestational diabetes mellitus in inner mongolia. *Medical Science Monitor*, 23, 4149–4157. <https://doi.org/10.12659/MSM.903565>
- Zhang, X., Liao, Q., Wang, F., & Li, D. (2018). Association of gestational diabetes mellitus and abnormal vaginal flora with adverse pregnancy outcomes. *Medicine (United States)*, 97(34). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011891>
- Zhou, J., Miao, H., Li, X., Hu, Y., Sun, H., & Hou, Y. (2017). Curcumin inhibits placental inflammation to ameliorate LPS-induced adverse pregnancy outcomes in mice via upregulation of phosphorylated Akt. *Inflammation Research*, 66(2), 177–185. <https://doi.org/10.1007/s00011-016-1004-4>



INSTITUTO NACIONAL  
DE PERINATOLOGÍA  
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

DIRECCIÓN GENERAL

## Anexo 1. Carta de aceptación del protocolo de investigación por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del INPer

CIUDAD DE MÉXICO, A 02 DE OCTUBRE DE 2018.

DRA. ANDREA GUADALUPE OLMOS ORTIZ  
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS  
ADSCRITA AL DEPARTAMENTO DE INMUNOBIOQUIMICA  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
P R E S E N T E

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

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

**Registro: 2018-1-152**

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

Monto autorizado: **\$555,000.00**

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

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

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

ATENTAMENTE

DR. JORGE ARTURO CARDONA PÉREZ  
DIRECTOR GENERAL

## Anexo 2. Carta de aceptación para recolección de muestras en el Hospital Ángeles México



**DIRECCIÓN DE SERVICIOS CLINICOS**



Ciudad de México, a 08 de Marzo del 2021

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

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

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

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

Sin otro particular.

ATENTAMENTE

DR. SERGIO A. SUCILLA PLASCENCIA.  
DIRECTOR DE SERVICIOS CLÍNICOS

LIC. JORGE CABRERA AGUILERA  
DIRECTOR GENERAL

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



### Anexo 3. Carta de consentimiento informado INPer

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

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

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

**Justificación y objetivo del estudio.** Estimada señora, la estamos invitando a participar en este estudio cuyo objetivo es evaluar el efecto de la insulina y la metformina sobre el perfil inflamatorio y la inmunidad innata en los tejidos de la interfase materno-fetal en un modelo *in vitro* de hiperglucemia que semeje el ambiente de la DMG. Tomando en cuenta que usted es una paciente sana y su embarazo no tuvo ninguna complicación importante, consideramos muy valiosa su participación en este estudio.

**Es muy importante aclarar que su participación en este estudio es completamente voluntaria.** Por favor lea toda la información que le proporcionamos y haga todas las preguntas que desee antes de decidir si participa o no en el estudio.

**Procedimientos:** Para la realización de este estudio, no se tendrá contacto físico directo ni con usted ni con su bebé sino únicamente con la placenta después del alumbramiento. Tanto la placenta como las membranas corioamnióticas se colocarán en un recipiente de acero inoxidable estéril. Se podrá tomar una muestra de sangre de la vena de cordón umbilical (25 – 35 mL), una vez expulsada la placenta. Todo el material punzocortante se colocará en el bote de desechos correspondiente.

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

**Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:** Su participación no generará ningún gasto extra ni obligación alguna, así como tampoco recibirá nada a cambio de la donación.

**Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:** Los datos obtenidos en este estudio no tienen ninguna utilidad clínica para usted, por lo que no tendrá acceso a ninguno de los resultados generados.

**Participación o retiro:** En el caso de que lo considere conveniente, usted puede negar

su participación en el estudio. Además, si usted acepta participar puede retirar su consentimiento y abandonar el estudio en cualquier momento que lo desee sin que ello afecte la atención que recibe en este Hospital.

**Privacidad y confidencialidad:** Todos sus datos personales y clínicos serán manejados y resguardados de manera confidencial y ninguno de sus datos aparecerá en presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio.

No autorizo a que se tome la muestra	
Sí autorizo que se tome la muestra solo para este estudio	

**Beneficios al término del estudio:** La información y resultados derivados de este estudio derivará únicamente en productividad de orden científico, usted no tendrá o recibirá ningún tipo de beneficio por su participación en el estudio.

También nos permitimos informarle que toda la información y resultados generados en este proyecto no tendrán ningún uso de tipo comercial.

**En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a la Investigadora responsable del proyecto:**

**Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz.** Tel: 55209900 Ext. 478. Correo electrónico: [nut.aolmos@gmail.com](mailto:nut.aolmos@gmail.com)

---

Nombre y firma de la paciente

---

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

---

Nombre y firma del Testigo 1

---

Nombre y firma del Testigo 2

## **Anexo 4. Carta de consentimiento informado Hospital Ángeles México**

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

**Investigador principal:** Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz

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

**Instituciones participantes:** Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Hospital de Gineco Obstetricia no. 4 IMSS, Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga.

**Presidente del Comité de Ética en Investigación:** Dr. Alejandro Martínez Juárez. **Teléfono:** 55 5520 9900 ext. 316

### **Estimada señora:**

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

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

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

Para el diseño de este estudio se requieren 30 mL de su sangre si usted tiene DMG; o bien se requiere de su placenta y la sangre que hay en ella si usted cursa con un embarazo sano. En caso de que el médico tratante considere conveniente enviar parte de estos tejidos a patología, la toma de esta muestra tendrá prioridad sobre la nuestra y sólo utilizaremos el tejido restante para ser trasladado, procesado y cultivado en el laboratorio del Departamento de Inmunobiología aquí en el INPer. Los residuos de todos los tejidos serán desechados siguiendo los lineamientos de la Ley General de Salud y de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Si usted no acepta donar los 30 mL de sangre o su placenta, ello no afectará de ninguna manera la calidad y calidez de la atención para usted y su bebé en este hospital. Para cualquier queja, pregunta o duda podrá dirigirse con la Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz, Tel. 55209900, Ext. 478 del Instituto Nacional de Perinatología, Depto. Inmunobiología, con la garantía de recibir respuesta y aclaración acerca de asuntos relacionados con la investigación. Es muy importante aclarar que toda la información de tipo clínico y así como sus datos personales sensibles y no sensibles se mantendrán y tratarán con estricta seguridad y confidencialidad.

Yo \_\_\_\_\_ declaro libremente que estoy de acuerdo en donar voluntariamente los siguientes tejidos:

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

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

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

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

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

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

Ciudad de México a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Firma de la participante

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo 1

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo 2

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del investigador