



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE QUÍMICA FARMACEÚTICO BIOLÓGICA

ROL DE LA INSULINA Y LA METFORMINA EN LA MODULACIÓN
DEL PERFIL INFLAMATORIO DE LA PLACENTA HUMANA ANTE LA
HIPERGLUCEMIA Y LA INFECCIÓN POR *Escherichia coli*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

P R E S E N T A

ALINE ARUMI VILLAFUERTE PÉREZ

DIRECTORA: DRA. ANDREA GUADALUPE OLMOS ORTIZ

ASESOR: Q.F.B. GILDARDO HERRERA QUIROZ

ASESORA: Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLÁN

SINODAL: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

SINODAL: DRA. GABRIELA ROSAS GAVILÁN



CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este proyecto contó con la aprobación de los comités de Ética, Bioseguridad e Investigación del INPer (registro INPer: 2018-1-152), del Hospital Ángeles México y del Instituto Mexicano del Seguro Social (registro IMSS: R-2020-785-043), además de ser financiado por el Instituto Nacional de Perinatología (registro INPer: 2018-1-152) y por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (registro CONAHCYT: A1-S-27832).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por consolidar mi formación académica y formarme profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo financiero del proyecto A1-S-27832, del cual es responsable la Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz.

Al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) por el financiamiento del proyecto 2018-1-152, a cargo de la Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz.

A cada miembro del jurado:

- *Q.F.B. Gildardo Herrera Quiroz*
- *Q.F.B. Patricia Vidal Millán*
- *Dra. Leticia Morales Ledesma*
- *Dra. Gabriela Rosas Gavilán*

Por dedicar parte de su tiempo en la revisión de este proyecto y por sus valiosos comentarios.

A la Dra. Claudia Verónica Zaga Clavelina por brindarme un espacio para el desarrollo de mi trabajo de investigación en el laboratorio de “Inmunología de la Unidad feto-placentaria” del Departamento de Inmunobioquímica del INPer.

A mis compañeros de Zaga Lab. Estoy agradecida de haberme encontrado con personas dedicadas que hoy en día puedo llamar amigos. Especialmente a Rodrigo, por compartirme sus conocimientos y experiencias para poder cumplir esta meta.

Por último, de todo corazón le agradezco a mi directora de tesis, Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz, por aceptar guiar mi proyecto de titulación, orientarme, asesorarme y acompañarme durante toda mi estancia en el Instituto.

DEDICATORIAS

A mis padres, Sergio Villafuerte Montoya y Socorro Pérez Palma, su ejemplo de valentía, perseverancia y esfuerzo me demostró que en esta vida todo es posible. Gracias por ser los principales promotores de mis sueños, creer en mi y alentarme a ser cada día mejor. Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes. Tengo a los mejores padres. ¡Los amo!

A mi familia, especialmente a mis abuelos, Ricardo y Eufemia, por estar siempre para mi y demostrarme su amor incondicional desde el día que nací. Los llevo siempre en mi corazón abuelitos.

A mi pequeño hermano, Kito Periquito, siempre lograste sacarme una sonrisa hasta en los días más pesados, mis noches de desvelo siempre fueron mejor con tu compañía. Siempre juntos, futuro Veterinario.

A mi compañero de vida, Alexis, amor fuiste una pieza clave durante mi trayectoria académica, gracias por estar siempre a mi lado, por impulsarme a cumplir mis sueños y hacer mi vida más plena. Eres aquel que deseo para todo. Te amo.

A mi tutora, Dra. Andy, le agradezco haber tomado aquella llamada y aceptar ser mi guía durante este proyecto, me siento muy afortunada de haber encontrado una mujer tan apasionada como usted. Le agradezco por la paciencia que me tuvo, su disposición y la confianza que me brindó. Junto a usted pareciera que no existen imposibles cuando se trata de ciencia.

A mis amigos, Eva y Diego, les agradezco por cada experiencia universitaria que vivimos juntos. Hicieron de mi estancia en la universidad, la más amena.

A las madres que aceptaron donar, muchas gracias por su confianza.

*“PREGÚNTATE SI LO QUE ESTÁS HACIENDO HOY,
TE ACERCA AL LUGAR EN EL QUE QUIERES ESTAR MAÑANA”*

-WALTER ELIAS DISNEY



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	<i>i</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>ii</i>
SIGLAS	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>viii</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Mecanismos de tolerancia durante el embarazo	4
2.2. La placenta	6
2.2.1. Actividad inmune innata de la placenta	9
2.3. Diabetes mellitus gestacional	10
2.3.1. Prevalencia de la DMG	12
2.3.2. Fisiopatología de la DMG	13
2.3.3. Metainflamación asociada a la hiperglucemia	14
2.3.4. Tratamiento farmacológico de la DMG	15
2.3.4.1. Insulina	16
2.3.4.2. Metformina	19
2.4. Infecciones genitourinarias en el embarazo complicado con diabetes mellitus gestacional	22
2.4.1. Infecciones por <i>Escherichia coli</i>	23
3. ANTECEDENTES	28
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	33
5. HIPÓTESIS	33
6. OBJETIVOS	34
6.1. General	34
6.2. Específicos	34
7. MATERIAL Y MÉTODOS	34
7.1. Diseño de estudio	34
7.2. Universo (población o muestra)	34
7.2.1. Aspectos éticos	34
7.2.2. Toma de muestra	35
7.3. Variables	36
7.4. Cultivo primario de explantes placentarios	36
7.5. Análisis microbiológico	39
7.6. Estímulo experimental con glucosa, insulina y metformina	39

7.7. Identificación de <i>Escherichia coli</i>	40
7.8. Infección de explantes placentarios con <i>Escherichia coli</i>	41
7.9. Conteo de colonias por el método de microgota	42
7.10. Cuantificación de TNF- α , IL-1 β e IL-6 por ELISA	42
7.11. Tinción de Gram para evaluar la invasividad de <i>Escherichia coli</i> dentro de la vellosidad placentaria	43
7.12. Análisis estadísticos	44
8. RESULTADOS	46
9. DISCUSIÓN	58
10. CONCLUSIONES	64
11. REFERENCIAS	65
12. ANEXOS	82
ANEXO 1. Resumen del trabajo libre presentado en el XXV Congreso Nacional de Inmunología Querétaro 2023	83
ANEXO 2. Constancia por participar como ponente modalidad CARTEL en el XXV Congreso Nacional de Inmunología Querétaro 2023	84
ANEXO 3. Aprobación del proyecto 2018-1-152 por parte del Comité de Investigación y ética del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa Reyes”	85
ANEXO 4. Extensión de tiempo de vigencia del proyecto 2018-1-152	86
ANEXO 5. Dictamen de aprobación del Hospital Ángeles México	86
ANEXO 6. Aprobación del proyecto R-2020-785-043 por parte del Instituto Mexicano del Seguro Social	88
ANEXO 7. Carta de consentimiento informado	89
ANEXO 8. Hoja de registro de las características clínicas	91
ANEXO 9. Hoja de registro para el análisis microbiológico de la placenta	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la interfase materno-fetal	6
Figura 2. Desarrollo embrionario de la placenta	8
Figura 3. Vía de proteína cinasa activada por mitógenos Ras-Raf (MAPK)	17
Figura 4. Vía de señalización de la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K) y proteína cinasa B (Akt)	18
Figura 5. Mecanismo de acción de la metformina	21
Figura 6. Principales factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> uropatógena	24
Figura 7. Vías de señalización de TLR4	26
Figura 8. Procesamiento de placenta humana.	38
Figura 9. El tratamiento con insulina y metformina ayuda a reducir el conteo de <i>Escherichia coli</i> en explantes placentarios pre expuestos a alta glucosa	49
Figura 10. La hiperglucemia favorece la invasividad de <i>Escherichia coli</i> en la vellosidad placentaria El tratamiento con insulina y metformina ayuda a reducir la invasividad en explantes placentarios pre expuestos a alta glucosa	53
Figura 11. Secreción de IL-1 β en explantes con o sin infección por <i>Escherichia coli</i>	55
Figura 12. Secreción de TNF- α en explantes con o sin infección por <i>Escherichia coli</i>	56
Figura 13. Secreción de IL-6 en explantes con o sin infección por con <i>Escherichia coli</i>	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Papel de la insulina en la modulación de la respuesta inflamatoria y la inmunidad innata _____	29
Tabla 2. Papel de la metformina en la modulación de la respuesta inflamatoria y la inmunidad innata _____	31
Tabla 3. Valores considerados como normales de la curva de tolerancia a la glucosa poscarga de 75 gr, en el embarazo _____	39
Tabla 4. Características clínicas de las madres que donaron su placenta _____	46
Tabla 5. Características clínicas de los neonatos _____	47

SIGLAS

ACC: Acetil-CoA carboxilasa

ADA: Asociación Americana de Diabetes

AGE: Productos finales de glicosilación avanzada

AIDPSG: Asociación Internacional de Grupos de Estudio en Diabetes y Embarazo

Akt: Proteína cinasa B

AMP: Monofosfato de adenosina

AMPK: Proteína cinasa activada por AMP

AS160: Sustrato Akt de 160 kDa

ASC: Proteína tipo speck asociada a apoptosis

ATP: Trifosfato de adenosina

BHI: Cerebro corazón infusión

Ca⁺²: Ion de calcio divalente

cAMP: Monofosfato de adenosina cíclico

CD14: Grupo de diferenciación 14

c-fos: Protooncogen Fos, subunidad del factor de transcripción AP-1

CNF1: Factor necrosante citotóxico

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CPT1: Carnitina palmitonil transferasa 1

CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico

CRP: Proteína C reactiva

CRTC2: Coactivador de transcripción regulado por CREB 2

CTOG: Curva de tolerancia oral a la glucosa

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño

dDC: Células dendríticas deciduales

dILC: Linfoides innatos deciduales no NK

DMG: Diabetes Mellitus Gestacional

dNK: Células asesinas naturales deciduales

Elk-1: Factor de transcripción Elk 1

ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares
EVT: Trofoblasto extravelloso invasivo
ExPEC: *Escherichia coli* patógena extraintestinal
FBP1: Fructosa-1,6-bifosfatasa
FBPase: Fructosa-bisfosfatasa
FOXO: Factor de transcripción Forkhead Box O
G6pc: Glucosa-6-fosfatasa
GLUT2: Transportador de glucosa 2
Glut4: Transportador de glucosa 4
GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
Grb2: Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento
GRO-a: Oncogén relacionado con el crecimiento alfa
GSK3: Glucógeno sintasa cinasa-3
GTP: Trifosfato de guanosina
H₂SO₄: Ácido sulfúrico
HBD: β-defensina humana
hCTD: Catelicidina humana
HGO: Hospital de Gineco Obstetricia
HLA: Antígeno leucocitario humano
HlyA: Lipoproteína α-hemolisina
HNP: Péptidos de neutrófilos humanos
ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1
IFN I: Interferón tipo I
IκB: inhibidor de NF-κB
IKK: Inhibidor del complejo NF-κB/IκB
IKKε: épsilon de la cinasa I kappa-B
IL-10: Interleucina 10
IL-18: Interleucina 18
IL-1β: Interleucina 1 beta
IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

INF: Interferón

IP3-R: Receptor inositol 1,4,5-trifosfato

IPEC: *Escherichia coli* patógena intestinal

IR: Receptor de insulina

IRAKs: Cinasa asociada al receptor de IL1

IRF3: Factor regulador de interferón tipo 3

IRS: Sustrato del receptor de la insulina

ISSSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado

ITU: Infecciones del tracto urinario

KIR: Receptor de inmunoglobulina asesina

LBP: Proteína de unión a lipopolisacáridos

LKB1: Cinasa hepática B1. También conocida como Serina/treonina cinasa 11 (STK11)

LPS: Lipopolisacárido

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1

MD-2: Factor de diferenciación mieloide 2

MEK: Proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK)

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

MMP-9: Metaloproteinasas 9

mTORC1: Complejo 1 sensible a rapamicina en mamíferos

MyD88: Factor de diferenciación mieloide 88

NADH: Dinucleótido de nicotinamida adenina

NaHCO₃: Bicarbonato de sodio

NEMO: Modulador esencial de NF-κB

NF- κB: Factor nuclear κB

NLR: Receptores tipo NOD

NLRP3: Receptor pirina que contiene el dominio 3

OCT: Transportador de cationes orgánicos
OCT1: Transportador de cationes orgánico humano 1
OPD: Diclorhidrato de o-fenilendiamina
PAMM: Macrófagos y monocitos maternos asociados a la placenta
PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos
Pck1: Fosfoenolpiruvato carboxicinasas 1
PCR: Reacción de polimerasa en cadena
PDK1: Isoforma 1 de la piruvato deshidrogenasa cinasa
PDK2: Isoforma 2 de la piruvato deshidrogenasa cinasa
PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa
PIP 2: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP 3: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PROM: Ruptura prematura de membranas
PRR: Receptores de reconocimiento de patrones
Raf: Proteína cinasa de serina/treonina
RAGE: Receptor de productos finales de glicación avanzada
RAS: Proteína GTPasa asociada a la membrana
SAT: Toxina autotransportadora secretada
Shc: Proteína adaptadora SHC
SOS: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
SSA: Secretaría de Salud
TAB 1/2: Proteína que se une a TAK-1
TAK1: Cinasa activada por el factor de crecimiento transformante β .
TBK1: Cinasa de unión a TANK 1
TIRAP: Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR
TLR: Receptores tipo Toll
TLR4: Receptor tipo Toll 4
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF3/6: Factor 3/6 asociado al receptor de TNF
TRAM: Molécula adaptadora relacionada con TRIF

TRIF: Adaptador que contiene el dominio TIR inductor de IFN- β

UMAE: Unidad Médica de Alta Especialidad

UPEC: *Escherichia coli* uropatógena

RESUMEN

La Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) es un trastorno metabólico común durante el embarazo; particularmente en México la prevalencia reportada de DMG fue de 23.7% en 2018. La DMG se asocia con el aumento de marcadores inflamatorios séricos y mayor riesgo de infecciones del tracto urinario (ITU). En México, las bacterias Gram negativas son catalogadas como el agente etiológico número uno causante de las ITU; especialmente *Escherichia coli* es la bacteria más común encontrada en mujeres embarazadas. Además, la hiperglucemia se asocia positivamente con disbiosis vaginal, así como resultados adversos materno-fetales a corto y largo plazo. Por otro lado, la insulina y la metformina se prescriben como tratamientos para el control glucémico durante la DMG y son moléculas que han demostrado un papel inmunomodulador y antimicrobiano en modelos *in vitro*, *in vivo* y en estudios clínicos, sin embargo aún se desconoce si modulan la respuesta inflamatoria y antimicrobiana en la placenta humana. En el presente trabajo utilizamos explantes placentarios del tercer trimestre para evaluar el efecto modulador de la insulina y la metformina en el perfil inflamatorio de la placenta humana frente a la infección bacteriana por *E. coli* y la hiperglucemia. Los explantes placentarios se cultivaron con glucosa (10 y 50 mM), insulina (500 nM) o metformina (500 μ M) durante 48 h, luego se infectaron con *E. coli* (1×10^5 UFC/mL) y finalmente se evaluó la secreción de citocinas inflamatorias mediante ELISA y la invasividad tisular bacteriana tras 4 y 8 h de infección a partir de cortes histológicos teñidos con la tinción de Gram modificada por Brown-Brenn. Como resultados observamos que la hiperglucemia favorece el crecimiento extracelular y la invasividad de *E. coli* en la vellosidad placentaria. Asimismo, el tratamiento con insulina o con metformina fortaleció la defensa innata placentaria a través de disminuir el conteo de colonias de *E. coli* y limitar su adherencia e invasividad en la vellosidad. El doble estímulo inflamatorio por la hiperglucemia y la infección de *E. coli*, disminuyó la secreción placentaria de IL-1 β . Finalmente, el tratamiento con insulina y con metformina no modificó el perfil inflamatorio asociado a la infección más hiperglucemia. En conjunto, nuestros resultados indican que el uso de insulina y metformina disminuye los efectos inflamatorios y refuerzan la respuesta inmune de la placenta humana, de manera que podrían mejorar los resultados adversos maternos y fetales durante la DMG asociados con las infecciones del tracto urinario.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus gestacional (DMG) es un trastorno metabólico común en el embarazo (1). Ésta se define como una “intolerancia a la glucosa que resulta en hiperglucemia de gravedad variable y que comienza y se reconoce por primera vez durante el embarazo” (2). En el mundo, aproximadamente el 17% de los embarazos presentan DMG según los criterios de la Asociación Internacional de Diabetes y Grupos de Estudio del Embarazo; particularmente en México la prevalencia de DMG informada por médicos del sistema de la Secretaría de Salud, IMSS e ISSSTE es del 23.7% (3).

Los principales eventos etiopatológicos implicados en el desarrollo de la DMG son la resistencia periférica a la insulina y la disfunción de las células β del páncreas (4). La resistencia a la insulina indica la resistencia que presentan las células de los tejidos diana (como músculoesquelético y adiposo) a la acción de la insulina debido a defectos en la expresión o señalización del receptor de insulina. Por otra parte, la disfunción de las células beta pancreáticas se refiere a la incapacidad de estas células para proliferar durante el embarazo, tal como se describirá con mayor detalle más adelante (5).

Además del descontrol en el metabolismo de la glucosa, la DMG provoca un desequilibrio en cuanto a la expresión de marcadores inflamatorios (6). Diversos estudios han demostrado el aumento de citocinas proinflamatorias en el suero de mujeres con DMG, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), proteína C reactiva (CRP), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18) (7). En un embarazo saludable se requiere que las respuestas inmunitarias se encuentren reguladas, por lo que la respuesta inflamatoria exacerbada en la DMG puede alterar las vías de desarrollo fetal y placentario, provocando defectos en el nacimiento y complicaciones en el embarazo (8).

Asimismo, las infecciones del tracto urinario (ITU) se consideran las infecciones bacterianas más comunes en las mujeres y en el embarazo (aproximadamente 20%) (9). Clínicamente, las ITU pueden presentarse como cistitis, pielonefritis o bacteriuria asintomática; además, se ha reportado que el principal patógeno de las ITU es *Escherichia coli* uropatógeno, puesto que es el responsable del 70-95% de las cistitis

y pielonefritis no complicadas (10). Cabe agregar que las mujeres con DMG tienen una prevalencia significativamente mayor de vaginosis bacteriana en comparación con mujeres euglicémicas, y también tienen una alta incidencia de ITU, siendo *E.coli* el principal patógeno asociado (11,12).

Durante el embarazo, la placenta actúa como una barrera mecánica e inmunitaria entre la madre y el feto para evitar infecciones. Desafortunadamente, algunos patógenos invasores, como *E. coli*, pueden llegar a romper esta barrera y favorecer la infección vertical del feto (13,14).

En cuanto al tratamiento farmacológico de la DMG, la insulina es considerada el medicamento de primera línea para tratar la hiperglucemia debido a su eficacia y seguridad (15,16). Por otra parte, la metformina es una biguanida oral considerada como tratamiento alternativo para la DMG ya que ha demostrado un mejor control glucémico postprandial junto con menos eventos hipoglucémicos y un menor aumento de peso materno en comparación con mujeres tratadas con insulina (17). El uso de ambos fármacos en mujeres con DMG está aprobado por múltiples asociaciones en Obstetricia y Diabetes (18,19).

Por ende, en el presente trabajo se desarrolló un modelo *in vitro* de hiperglucemia que asemeja las condiciones de la DMG empleando explantes placentarios de tercer trimestre. En esta tesis se evaluó el efecto modulador de la insulina y la metformina en el perfil inflamatorio de la placenta humana ante la infección bacteriana por *E. coli*. Nuestra hipótesis es que la insulina y la metformina son capaces de disminuir la respuesta inflamatoria placentaria tanto en un ambiente infeccioso como no infeccioso. De igual manera, proponemos que estos fármacos reforzarán la respuesta innata de la placenta ante la infección por *E. coli*. Por último, estos hallazgos resultan relevantes considerando que la inflamación y las ITU se relacionan de forma negativa con el embarazo. Por lo tanto, el uso de estos hipoglucemiantes podría mejorar los resultados adversos maternos y fetales durante la DMG.

Finalmente, cabe agregar que los resultados de esta tesis fueron presentados en formato póster en el XXV Congreso Nacional de Inmunología 2023, celebrado en la ciudad de Querétaro, Querétaro (**Ver anexos 1 y 2**). Asimismo, estos resultados, en

conjunto con los derivados de otras tesis de nuestro grupo de investigación fueron recientemente publicados en la revista *International Journal of Molecular Sciences* (20).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Mecanismos de tolerancia inmunológica durante el embarazo

El embarazo es una condición immunoendocrina única, en la que se producen diversos mediadores hormonales, anatómicos y metabólicos que permiten el crecimiento, desarrollo y supervivencia del feto (21).

La duración del embarazo toma aproximadamente 266 días, pero como este periodo se mide a partir del primer día del último período menstrual, su duración es alrededor de 280 días, es decir entre 37 y 41 semanas (22).

El embarazo representa el encuentro inmunológico más desafiante durante la vida de una mujer (23). El feto, a pesar de tener una mezcla de antígenos paternos y maternos, no es rechazado por el sistema inmunitario de la madre; lo que significa que la madre tolera transitoriamente el "injerto" semialogénico (24). Por lo tanto, la supresión de la respuesta materna a estos antígenos es fundamental para lograr un embarazo exitoso (25). La interfase materno-fetal está conformada por la decidua que deriva de la madre, y la placenta y las membranas corioamnióticas que derivan del feto. Esta unidad participa activamente en los mecanismos inmunológicos de tolerancia y de protección fetal, con el fin de poder llevar a buen término el desarrollo del embarazo. La mediación de estas respuestas inmunes está ligada a la actividad de múltiples estirpes celulares, receptores, citocinas, quimiocinas y péptidos. A continuación, se describirá de manera general las interacciones inmunes que se desarrollan en la unidad feto-placentaria.

La placenta es un órgano clave para este proceso, que se desarrolla durante el primer trimestre del embarazo y da lugar al trofoblasto extraveloso invasivo (EVT) que penetra la decidua, transforma las arterias espirales uterinas que se encargan de proveer de sangre materna a la placenta y por ende al feto. Se piensa que existe una interacción benéfica entre el EVT y los leucocitos maternos (células asesinas naturales deciduales [dNK] y los macrófagos), a través de las interacciones entre los ligandos de clase I del antígeno leucocitario humano (HLA) y los receptores NK (26,27).

El EVT expresa simultáneamente 3 antígenos de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) no clásico, los cuales son: HLA-E, HLA-F y HLA-G, cuya presencia varía dependiendo de la etapa gestacional, ubicación del tejido y el sexo del feto. Además, el EVT expresa una molécula HLA de clase I clásica, la cual es HLA-C (28). El papel de las moléculas HLA en el embarazo se lleva a cabo cuando el trofoblasto interactúa con las células dNK. Las interacciones entre HLA-C y el receptor de inmunoglobulina asesina (KIR) estimula las células NK para que secreten las quimiocinas GM-CSF e IL-8 y la proteína 10 inducible por interferón (IP-10), lo que promueve la migración del trofoblasto y contribuye a la remodelación de las arterias espiraladas. Por otra parte, HLA-G promueve la actividad de las células NK e inhibe su citotoxicidad tras unirse a los receptores inhibidores como KIR2DL4, KIR2DL1, KIR2DL2 / L3 e ILT-2 (26), mientras que tanto HLA-E como HLA-F se unen a los receptores inhibidores de dNK KIR2DL2/3, KIR3DL1/2, ILT-2 e IL-4 (26,29,30).

Otro mecanismo de tolerancia fetal se encuentra dado por la interacción entre células del sistema inmune materno y las células de la unidad feto-placentaria (**Figura 1**). Esta interacción se desarrolla de forma primordial en el lecho decidual materno, que es sitio de reclutamiento de leucocitos y linfocitos maternos. Las células inmunitarias que provienen de la madre y que anidan en la decidua son las dNK, los linfoides innatos deciduales no NK (dILC), macrófagos y monocitos maternos asociados a la placenta (PAMM) y células dendríticas deciduales (dDC) (31). Todas estas células deben experimentar múltiples cambios en la expresión de marcadores y receptores para conferir su fenotipo decidual.

Finalmente, las células de Hofbauer son los únicos macrófagos de origen fetal que se encuentran inmersos en las vellosidades placentarias y presentan un perfil antiinflamatorio (M2) y participan activamente en la angiogénesis vellosa (32,33).

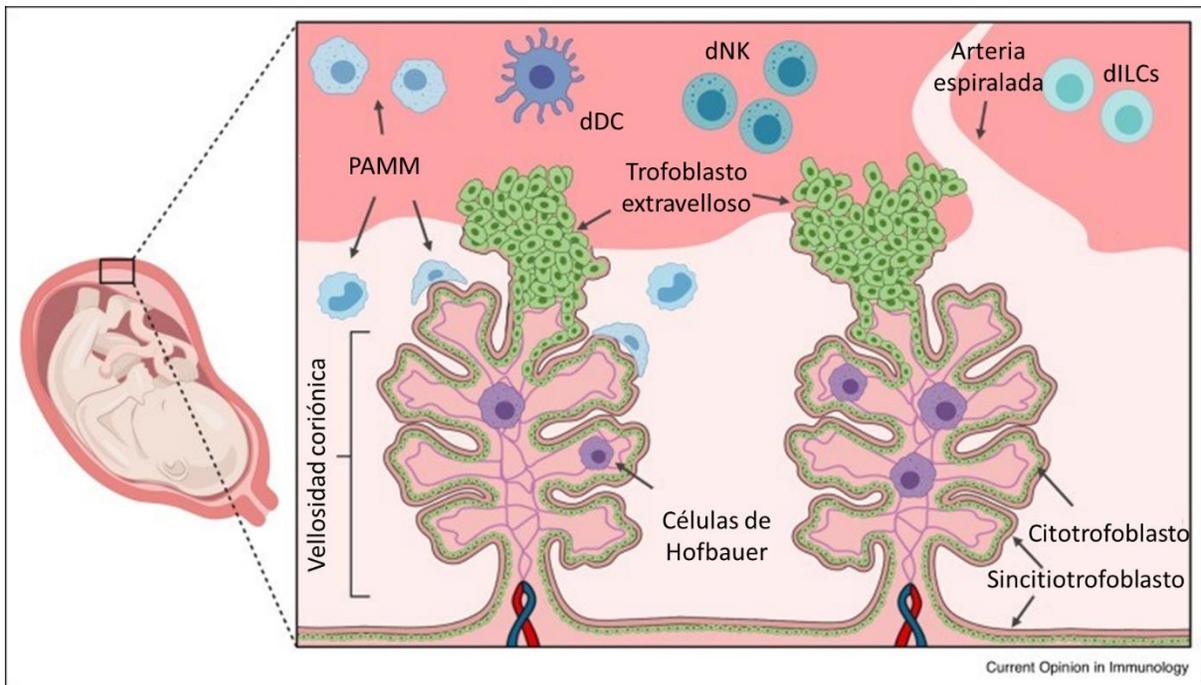


Figura 1. Anatomía de la la interfase materno-fetal.

PAMM, macrófagos y monocitos maternos asociados a la placenta; dDC, células dendríticas deciduales; dNK, células asesinas naturales deciduales; dILC, células linfoides innatos deciduales no NK (dILC). Modificado de Semmes (31).

2.2. La placenta

Uno de los tejidos de la interfase materno-fetal que es central para el crecimiento del feto es la placenta. La placenta es el órgano extraembrionario más grande y es el primero en desarrollarse (34). Se trata de un órgano temporal con el mismo genotipo que el feto y tiene múltiples funciones endocrinas, inmunitarias y metabólicas (35). El desarrollo embrionario de la placenta humana comprende seis etapas: 1) adhesión, 2) prelagunar, 3) lagunar, 4) vellosidades primarias, 5) vellosidades secundarias y 6) vellosidades terciarias.

El desarrollo de la placenta inicia a los 5 días post-fecundación (dpf), a partir de la capa trofoectodérmica del blastocisto (34). La zona del trofoectodermo (TE) que es adyacente a la masa celular interna (trofoectodermo polar) se adhiere al epitelio luminal uterino (endometrio) aproximadamente a los 6-7 dpf (**Figura 2a**). Posteriormente, durante la etapa prelagunar, el TE se internaliza en el estroma

endometrial materno, se fusiona y origina el tejido sincitial primario (36) (**Figura 2b**). Cabe señalar que la penetración del TE en el endometrio permitirá distintos cambios hormonales que derivarán en la transformación del endometrio en la decidua materna (37).

En la etapa lagunar aparecen espacios denominados “lagunas” dentro del sincitiotrofoblasto que dividen entre una serie de trabéculas (**Figura 2c**). Las lagunas en crecimiento (precursoras del espacio intervelloso) reciben secreciones glandulares de la decidua que permiten la nutrición histiotrófica durante las primeras semanas de gestación (34,37).

Durante la etapa vellosa primaria, las células del citotrofoblasto proliferan y penetran por completo entre las trabéculas. Esto originará las vellosidades primarias (**Figura 2d**). Posteriormente, a los 17-18 dpf comienza la formación de las vellosidades secundarias. En este tiempo, el mesodermo extraembrionario (que se diferenciará en células mesenquimales de tipo estromales y fibroblásticas) penetra el núcleo de citotrofoblastos sin llegar a tocar la capa de sincitiotrofoblastos (**Figura 2e**). Asimismo, en algunas vellosidades, los citotrofoblastos hacen contacto directo con la decidua para formar columnas citotrofoblásticas que funcionarán como vellosidades de anclaje (37,38).

Finalmente, después de 18 dpf, las vellosidades terciarias se forman cuando la red de capilares fetales se infiltra dentro del núcleo del mesodermo extraembrionario (**Figura 2f**). En esta etapa es activa la ramificación de las vellosidades, permitiendo generar vellosidades maduras y muy vascularizadas (36,37). A partir de ese momento y hasta las 7 – 8 semanas de gestación, se establece un activo proceso de migración y diferenciación de células citotrofoblásticas extravellosas.

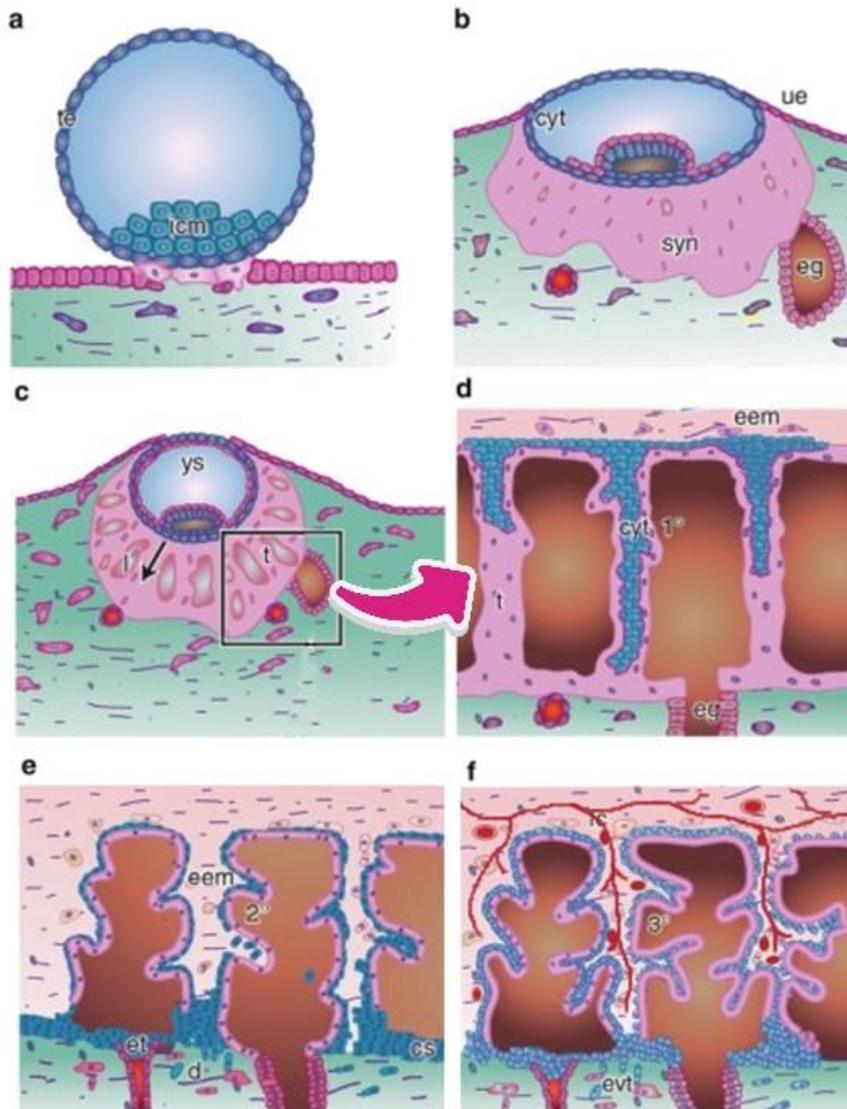


Figura 2. Desarrollo embrionario de la placenta. a) Adhesión del blastocisto con el epitelio luminal uterino. *te*, trofoectodermo; *icm*, masa celular interna. b) Etapa prelagunar. *cyt*, citotrofoblasto; *syn*, sincitiotrofoblasto; *ue*, epitelio uterino; *eg*, glándula endometrial c) Etapa lagunar. *ys*, vitelino primario (saco de yolk); *t*, trabécula; *l*, laguna. d) Vellosidad primaria. *eem*, mesodermo extraembrionario e) Vellosidad secundaria. *et*, trofoblasto endovascular; *cs*, capa citrofoblástica; *d*, decidua. f) Vellosidad terciaria. *fc*, capilar fetal; *evt*, trofoblasto extravelloso. Modificado de Burton (37).

La placenta presenta su fenotipo maduro y totalmente diferenciado después de las 8 semanas de gestación; por lo que a partir de este momento y hasta el término del embarazo, las estirpes celulares de la placenta continúan proliferando y fusionándose para permitir la ganancia de tamaño y peso de este órgano (39).

Las principales funciones de la placenta son realizadas por las vellosidades terciarias placentarias, también conocidas como árboles vellosos. Las vellosidades están delimitadas por una capa externa de sincitiotrofbastos multinucleados que están en contacto directo con la sangre materna y representan el sitio donde ocurre el intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto. Debajo del sincitiotrofbasto se encuentran varias capas de citotrofbastos vellosos mononucleares; se le considera una capa germinativa ya que es mitótica y expresa marcadores proliferativos. Cabe señalar que el sincitiotrofbasto se origina de la fusión de los citotrofbastos, generando un recambio continuo hasta el final del embarazo. Además, los árboles vellosos también presentan otras estirpes celulares como las células endoteliales de los capilares fetales, fibroblastos de la mesénquima vellosa y células que regulan la arborización como Hofbauers (40).

2.2.1. Actividad inmune innata de la placenta

Todos los subtipos de trofbasto son capaces de detectar patógenos y de responder a ellos mediante la expresión de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y los receptores tipo NOD (NLRs) (41,42). Particularmente los receptores tipo Toll (TLRs), son un grupo de PRRs que forman parte del sistema innato de la placenta (43). El trofbasto placentario expresa los diez tipos diferentes de TLRs (TLR1 – TLR-10) con un perfil temporo-específico para poder sensar la presencia de patógenos (44).

La activación de estos receptores por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), conduce a vías inflamatorias como la del factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB) que finalmente favorecen la producción de citocinas inflamatorias y quimiocinas. Entre las citocinas inflamatorias reguladas por la vía de NFκB y que resultan de central importancia para el control del ambiente inflamatorio en la interfase materno-fetal se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina (IL)- 1 β y la IL-6 (45).

Las citocinas son pequeñas proteínas o glucoproteínas que son liberadas por diversas estirpes celulares y actúan fundamentalmente en la regulación de la respuesta inmunitaria e inflamatoria (46).

La respuesta inflamatoria está controlada por citocinas que inducen una respuesta de fase aguda con la finalidad de proteger al huésped frente a una lesión o infección. Esta respuesta comienza con la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 y la IL-1 β , entre otras. Su papel principal es notificar a los tejidos circundantes de la aparición de una infección o lesión. Además, pueden ingresar a la circulación sistémica, activar a las células inmunitarias y desencadenar alteraciones fisiológicas del huésped como fiebre y la reacción de fase aguda (47).

Además, la activación de TLRs también favorece la síntesis de péptidos antimicrobianos. Se ha caracterizado que las células trofoblásticas de la placenta, las células del estroma decidual y las membranas fetales producen los siguientes péptidos antimicrobianos: β -defensina humana (HBD)-1, HBD-2, HBD-3 y HBD-4, S100A9, catelicidina humana (hCTD), alfa defensinas o péptidos de neutrófilos humanos 1–4 (HNP 1–4), entre otros (32). Estos péptidos presentan un amplio espectro de actividad antimicrobiana, y participan en la lisis de bacterias, hongos e incluso virus (48).

Por lo tanto, la placenta posee una importante actividad inmunomoduladora que es indispensable para mantener el estado de tolerancia y de protección fetal.

2.3. Diabetes mellitus gestacional

La diabetes mellitus gestacional (DMG) es una de las enfermedades metabólicas más comunes en el embarazo (1). Ésta se define como “intolerancia a la glucosa que resulta en una hiperglucemia de gravedad variable que comienza y se reconoce por primera vez durante el embarazo” (2).

La DMG se caracteriza por un diverso grupo de afectaciones sistémicas, entre las que se encuentran la intolerancia a los carbohidratos, hiperglucemia, resistencia a la insulina, secreción o actividad insuficiente de la insulina, disfunción endotelial e inflamación de bajo grado durante el embarazo (49).

Múltiples evidencias clínicas y epidemiológicas han demostrado que la patología de DMG produce distintos resultados adversos a corto y largo plazo tanto para la madre como para el bebé (18,50–52). Por una parte, la madre tiene mayor riesgo a corto plazo de desarrollar hipertensión gestacional, preeclampsia y finalizar su embarazo por operación cesárea; a largo plazo existe una alta probabilidad de recurrencia de la DMG en un embarazo posterior (aproximadamente 48%) así como un mayor riesgo de que la madre desarrolle diabetes tipo 2 en una edad posterior. De hecho, el 50% de las mujeres con DMG desarrollarán diabetes tipo 2 en un plazo de 5 a 10 años, lo que indica un riesgo 7 veces mayor que el de las mujeres normoevolutivas (53).

En el caso del bebé, a corto plazo hay riesgo de macrosomía (peso excesivo al nacer generalmente definido como mayor de 4 kg), lo que a su vez se asocia con mayor riesgo de distocia de hombros y traumatismo al nacimiento; mientras que, a futuro, los bebés de mujeres con DMG presentan mayor riesgo de desarrollar eventos crónico-metabólicos en su juventud y en la vida adulta como obesidad, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, diabetes y enfermedades cardiovasculares (53,54). Además, la DMG puede conducir a hipoglucemia neonatal en el período del posparto inmediato debido a que el recién nacido todavía se encuentra en estado de hiperinsulinemia (55).

En el algoritmo clínico de identificación de población en alto riesgo de desarrollar DMG, se toman en consideración los siguientes criterios: índice de masa corporal > 25 kg/m² en adición a uno o más de los siguientes factores de riesgo: inactividad física, familiar de primer grado con diabetes, embarazo previo con peso neonatal de 4000 g o más, antecedente de síndrome de ovario poliquístico, DMG o hipertensión (140/90 mm Hg o tratamiento para la hipertensión), lipoproteínas de alta densidad < 35 mg/dL y triglicéridos > 250 mg/dL (56).

La detección de la DMG se realiza comúnmente entre la semana 24 y 28 del embarazo. Para su diagnóstico, se recomienda emplear la curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG). En esta prueba se le pide a la paciente tomar un bolo de 75 g de glucosa diluidos en agua y se toma la medición de glucosa sérica al inicio de la prueba (en ayuno), y a la hora y dos horas post-prandio. Los resultados normales para una mujer embarazada deben ser ayuno <95 mg/dL, 1 h <180 mg/dL y 2 h <153 mg/dL.

En el caso de que alguno de los resultados se encuentre por arriba de los valores, se procede a hacer el diagnóstico de DMG (57).

De forma adicional, también existe la prueba postcarga en dos pasos, en donde se emplea una CTOG con 50 g de glucosa (sin ayuno previo). Si la glucemia una hora postcarga es ≥ 140 mg/dL se debe realizar una segunda CTOG (otro día y con ayuno previo) con carga de 100 g y se debe interpretar según los criterios de Carnter/Coustan o los criterios propuestos por el Grupo Nacional de Datos en Diabetes. Por ende, los resultados según los criterios Carpenter/Coustan: ayuno < 95 mg/dL, 1 h < 180 mg/dL, 2 h < 155 mg/dL y 3 h < 140 mg/dL (58). Por lo tanto, la detección temprana de la DMG, así como su adecuado tratamiento y monitoreo puede ayudar a reducir la morbilidad materno-fetal asociada a esta enfermedad.

2.3.1. Prevalencia de la DMG

La prevalencia de la diabetes pregestacional y DMG se ha incrementado en los últimos años (59). En todo el mundo, afecta a alrededor del 17% de los embarazos según los criterios de la Asociación Internacional de Grupos de Estudio en Diabetes y Embarazo (AIDPSG), pero su incidencia puede variar según los factores de riesgo maternos (60). Particularmente en México, se estima que la prevalencia nacional de DMG varía entre 10.3 y 30.1%, según criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la AIDPSG (61). En el 2018, a partir de datos proporcionados por la Secretaría de Salud (SSA), el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado (ISSSTE), se reportó que la proporción de DMG en México es del 23.7% (62). Por su parte, el Instituto Nacional de Perinatología en el año 2021 reportó 10.9% de diabetes mellitus durante el embarazo (preexistente y la gestacional) (63). Por lo tanto, la incidencia exacta de DMG en nuestro país es desconocida ya que los porcentajes reportados en la literatura son variables y dependen en gran medida de las características de la población estudiada y de los criterios que son utilizados para el diagnóstico (64). Sin embargo, una conclusión clara es que esta cifra podría incrementarse a futuro debido al aumento en el sobrepeso y la obesidad en mujeres mexicanas de edad fértil (65).

Además, esta patología se asocia con un alto costo clínico debido a las complicaciones y eventos adversos para la madre y el bebé. Si bien no se tiene un estimado del costo por DMG en México, se piensa que puede oscilar entre los 125 mil y 250 mil millones de pesos al año (principalmente por gastos asociados a infecciones y a partos prematuros, así como el control de la hipoglucemia neonatal) (66).

2.3.2. Fisiopatología de la DMG

En condiciones óptimas, el cuerpo de una mujer embarazada presenta una serie de cambios metabólicos para permitir la embriogénesis, el crecimiento del feto, la maduración y la supervivencia del mismo (67). Una adaptación metabólica importante es la sensibilidad a la insulina que a lo largo del embarazo puede cambiar según los requerimientos que éste demande. Durante el primer trimestre, se incrementa la sensibilidad materna a la insulina, promoviendo la captación de glucosa en el tejido adiposo con el fin de aumentar las reservas energéticas y satisfacer las demandas materno-fetales que se lleguen a presentar en los siguientes trimestres (68,69).

Posteriormente, a partir del segundo trimestre del embarazo se reduce aproximadamente a la mitad la sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos insulino-dependientes, como el músculo y el tejido adiposo (67). Este aumento transitorio en la resistencia a la insulina tiene el objetivo de favorecer el transporte de glucosa de la madre hacia el feto. Como mecanismo compensatorio, la madre incrementa a más del doble su producción pancreática de insulina con el fin de mantener la euglucemia (70). Para ello, la prolactina participa activamente para inducir el aumento de la masa y número de las células beta pancreáticas, así como estimular su capacidad de secreción de insulina (69).

Además de estos cambios hormono-metabólicos, durante la segunda mitad del embarazo la madre genera un ambiente predominantemente catabólico caracterizado por aumento en la glucogenólisis (degradación del glucógeno para aumentar la concentración de glucosa periférica), gluconeogénesis (síntesis de glucosa a partir de sustratos no glucídicos), y lipólisis (ruptura de triglicéridos que aumenta la concentración de ácidos grasos en sangre); todos estos cambios favorecen, de

manera fisiológica, el aumento de glucosa en sangre y de ácidos grasos libres que serán usados como sustrato energético para el feto en crecimiento (68).

Las evidencias clínicas y experimentales apuntan a que el aumento de hormonas periféricas y placentarias asociadas a la gestación como el estradiol, la progesterona, la leptina, el cortisol, el lactógeno placentario y las hormonas del crecimiento placentario, promueven el estado de resistencia materna a la insulina que se presenta después del segundo trimestre de gestación (68).

En el caso de la DMG, la exposición a los factores de riesgo como la obesidad pregestacional o la ganancia acelerada de peso durante la gestación genera diversas alteraciones metabólicas incompatibles con la euglucemia. Como se describió previamente, la prolactina es uno de los principales detonadores para favorecer la hipertrofia e hiperplasia beta pancreática en el segundo trimestre de gestación. Sin embargo, se ha propuesto que, a consecuencia de la obesidad y el aumento de ácidos grasos libres, se establece un entorno lipotóxico que bloquea las cascadas de señalización que culminarían en la proliferación beta pancreática para contrarrestar la resistencia periférica a la insulina.

De esta forma, en el cuadro clínico inicial, las pacientes con estas características no son capaces de secretar la insulina necesaria para disminuir las cifras de glucosa en sangre. Como resultado, poco a poco se incrementa la glucemia hasta establecer el cuadro hiperglucémico característico de esta enfermedad (68,69).

2.3.3. Metainflamación asociada a la hiperglucemia

La DMG se asocia con un estado de inflamación crónica de bajo grado denominada “metainflamación”. A diferencia de una inflamación aguda que se caracteriza por vasodilatación e infiltración de células inmunitarias frente a una lesión o infección, la metainflamación se caracteriza por ser inducida metabólicamente debido al consumo excesivo de nutrientes. Se trata de una respuesta modesta de bajo grado, caracterizada por el aumento de citocinas proinflamatorias e infiltración tisular de macrófagos en ausencia de daño tisular (32,71).

Las citocinas proinflamatorias que se han encontrado aumentadas en el suero de mujeres con DMG en diversos estudios son TNF- α , IL-6, proteína C reactiva (CRP), IL-1 β e IL-18 (7). Además, se ha observado una disminución de las moléculas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 y adiponectina (70).

Por otra parte, estudios recientes sugieren que los productos finales de glicosilación avanzada (AGE) son los responsables del aumento de citocinas inflamatorias (72). Pues bien, la unión de AGE con su receptor (RAGE) que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas (Ig), activan una serie de vías de señalización río abajo que promueve el estrés oxidativo, producción de citocinas proinflamatorias y disfunción endotelial (73,74). Las principales vías de señalización dependientes de RAGE son: JAK2-STAT1, PI3K –Akt, MAPK–Erk y NADPH oxidasa–ROS, las cuales generalmente convergen en la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) (73,75).

Finalmente, las mujeres con DMG presentan niveles más elevados de AGE durante el tercer trimestre del embarazo en comparación con mujeres embarazadas sin DMG, lo cual sugiere que la formación de AGE se incrementa en presencia de hiperglucemia (76–78).

2.3.4. Tratamiento farmacológico de la DMG

De acuerdo con su tratamiento clínico, la DMG se clasifica en dos subgrupos: a) A1, la DMG que se controla adecuadamente sin medicación y que a menudo se controla por dieta o ejercicio; y b) A2, la DMG que requiere medicación para lograr la euglicemia (18).

Una vez que se ha establecido el diagnóstico de la DMG el siguiente objetivo es controlar la hiperglucemia en el embarazo y así prevenir los resultados adversos en la madre y el feto. Para ello, se deben considerar dos estrategias para su tratamiento: modificaciones del estilo de vida y la terapia farmacológica.

En cuanto a la terapia farmacológica, la insulina se ha considerado como el estándar de oro en caso de que la terapia nutricional no logre alcanzar los niveles normoglucémicos esperados (79,80). Sin embargo, desde hace poco más de una

década se ha empezado a aceptar el uso de la metformina, como segunda línea de acción.

2.3.4.1. Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica compuesta por 51 aminoácidos, con un peso molecular de 5.8 kDa sintetizada y liberada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas (81).

Las acciones de la insulina son anabólicas y es responsable de mantener la homeostasis del metabolismo de la glucosa (82). Principalmente la insulina promueve la entrada de glucosa a los tejidos insulino-dependientes como el músculo esquelético y el tejido adiposo. (45). Además, en el hígado, la insulina disminuye la gluconeogénesis e incrementa la síntesis de glucógeno (glucógeno-génesis). Por otra parte, la insulina estimula la lipogénesis y la síntesis de proteínas (82).

La acción de la insulina se genera por la activación de los receptores de insulina (IR) situados en la membrana celular (81). El IR es una proteína heterotetramérica de la familia de receptores tirosina cinasa (83). Se encuentra organizado por dos subunidades alfa extracelulares y dos subunidades beta que atraviesan la membrana (84).

El IR se presenta en dos isoformas: IR-A que carece de 36 aminoácidos codificados por el exón 11 e IR-B que cuenta con los 36 aminoácidos en el carboxi-terminal de la subunidad alfa (85). Existen dos vías de señalización que se activan a partir de la unión de la insulina a las subunidades alfa, dependiendo del receptor; por una parte, el IR-A (**Figura 3**) conduce al crecimiento y proliferación celular mediante la activación de la cascada de proteína cinasa activada por mitógeno Ras-Raf (MAPK) y por otra parte, el IR-B (**Figura 4**) genera efectos metabólicos a partir de la activación de la vía fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y proteína cinasa B (Akt) (85,86).

La placenta humana expresa ambos receptores, aunque el IR-A se expresa en mayor concentración que el IR-B (87). Durante el inicio de la gestación, el IR se expresa preferencialmente en el sincitiotrofoblasto, mientras que hacia el término la expresión ocurre principalmente en el endotelio placentario (88–91). Los citotrofoblastos y las células de Hofbauer también expresan al IR, aunque en menor concentración (92).

Por lo tanto, la placenta es sensible a los efectos biológicos de la insulina, mediado por la interacción con sus receptores.

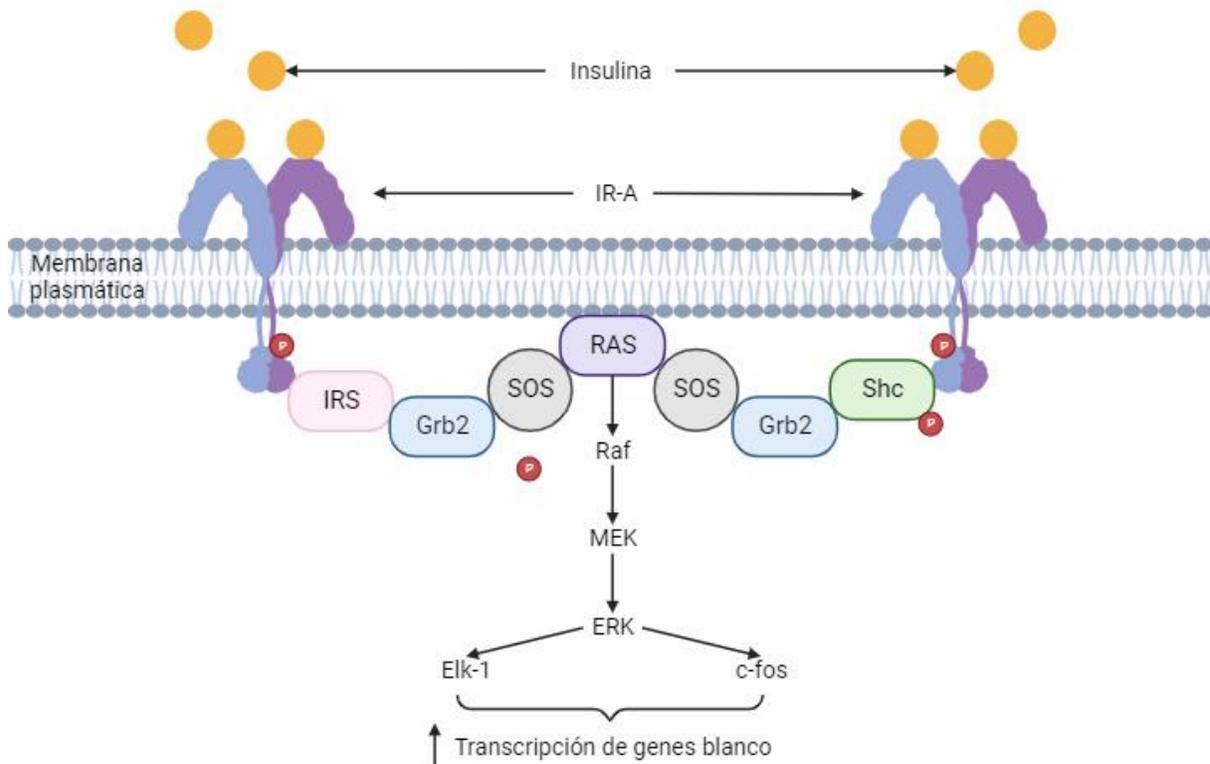


Figura 3. Vía de proteína cinasa activada por mitógenos Ras-Raf (MAPK). Cuando la insulina se une al receptor IR-A, éste se transfosforila en sus residuos de tirosina, y procede a reclutar proteínas adaptadoras que poseen dominio SH2. Esta vía inicia con la proteína Shc que se asocia al IR-A, se fosforila y es reconocido por Grb2. Posteriormente SOS y RAS forman un complejo intercambiador de nucleótidos de guanina. De esta forma, el complejo inicia la consecuente cascada de fosforilaciones de Raf, MEK y ERK. Finalmente, ERK tiene como blanco a p90RSK que promueve la síntesis de factores de transcripción como Elk-1, que aumenta la proliferación celular. Adicionalmente, la vía de las MAPK tiene una ruta alterna de activación que es independiente de Shc, en donde el complejo Grb2/SOS se asocia con IRS, lo que conlleva a que SOS pueda activar a Ras y continúe con la vía como se describió previamente. IRS: Sustrato del receptor de la insulina. Grb2: Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento. SOS: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina. RAS: Proteína GTPasa asociada a la membrana. Shc: Proteína adaptadora SHC. Raf: Proteína cinasa de serina/treonina. MEK: La proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares. Elk-1: Factor de transcripción Elk 1. c-fos: Protooncogen Fos, subunidad del factor de transcripción AP-1. Realizado por Villafuerte-Pérez A en el programa Biorender y Modificado de Sandoval (93).

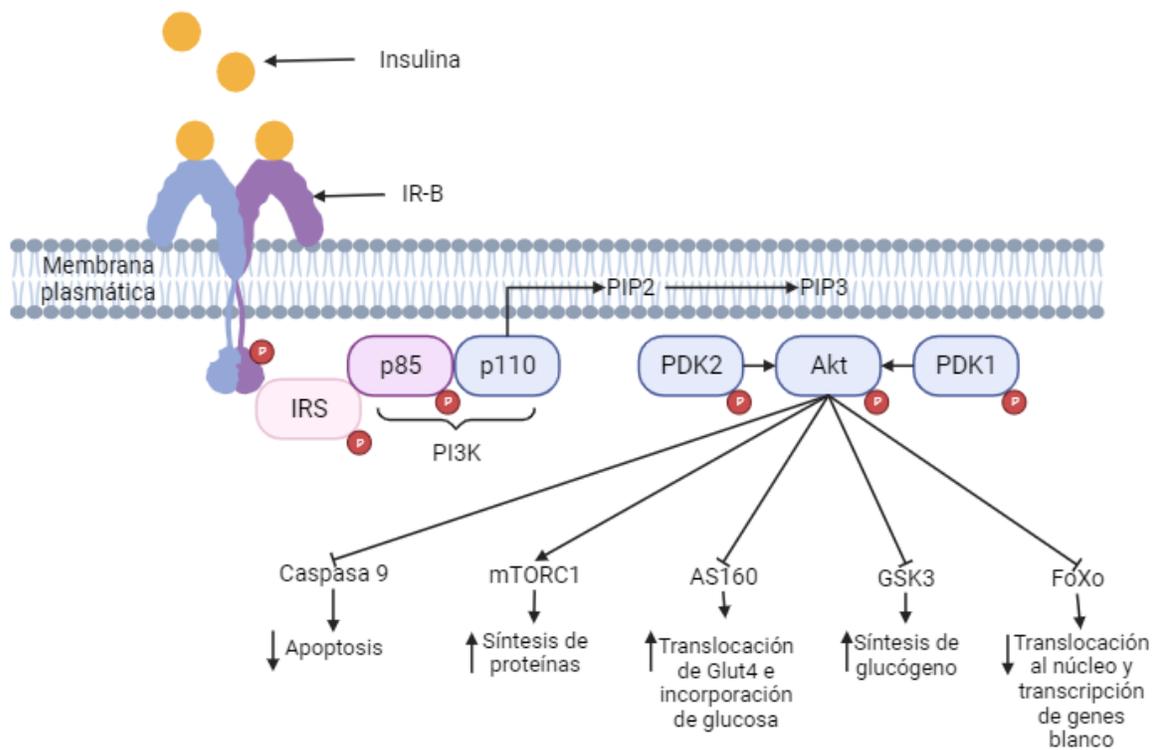


Figura 4. Vía de señalización de la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K) y proteína cinasa B (Akt). Después de la unión de la insulina con el receptor IR-B, éste se transfosforila y recluta a IRS. La fosforilación de IRS promueve la fosforilación de la subunidad reguladora (p85) de PI3K, lo que a su vez promueve la actividad de la subunidad catalítica (p110) para generar PIP3 a partir de la fosforilación de PIP2. Posteriormente se recluta PDK1 y Akt en la membrana celular. Enseguida, Akt se activa tras su fosforilación por PKD1 o PDK2 (mTORC2). Finalmente, cuando Akt esta activa, fosforila a mTORC1 y promueve la síntesis de proteínas, o bien inhibe a AS160, GSK3, FoxO y la caspasa 9 para mediar la translocación de GLUT-4, la síntesis de glucógeno y la supervivencia celular. IRS: Sustrato del receptor de la insulina. PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa. PIP3: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. PDK2: Piruvato deshidrogenasa cinasa 2. Akt: Proteína cinasa B. PDK1: Piruvato deshidrogenasa cinasa 1. mTORC1: Complejo sensible a rampamicina. AS160: Sustrato Akt de 160 kDa. GSK3: Glucógeno sintasa cinasa-3. FOXO: Factor de transcripción Forkhead Box O. Glut4: Transportador de glucosa tipo 4. Realizado por Villafuerte-Pérez A en el programa Biorender y modificado de Sandoval (93).

2.3.4.2. Metformina

La metformina es una biguanida sintética y es empleada como un medicamento antidiabético oral. Desde hace una década, este medicamento se ha incorporado como terapia de segunda línea en las pacientes con DMG. Presenta la desventaja de que puede atravesar la placenta y llegar a la circulación fetal manteniendo niveles parecidos a los de la madre. Sin embargo, hasta el momento no se ha informado de algún resultado adverso por su uso ni en la madre ni en el feto (94,95). Tampoco se han descrito eventos adversos en hijos de madres tratadas con metformina durante su embarazo hasta los 2 años de seguimiento postnatal (96–98). Incluso, se ha reportado que las pacientes tratadas con metformina presentan mejor control glucémico postprandial que aquellas tratadas con insulina (99). Asimismo, la metformina ha sido útil para la prevención de macrosomía, hipoglucemia neonatal grave, preeclampsia, hipertensión gestacional o ganancia excesiva de peso durante el embarazo (80).

Por lo tanto, la metformina se considera actualmente como un medicamento hipoglucemiante seguro y sin efectos teratogénicos; no obstante, los efectos a largo plazo por su administración durante la vida intrauterina requieren de mayor evidencia (94).

A pesar de que su mecanismo de acción no se ha descrito completamente, varios estudios indican que la metformina actúa principalmente en el hígado materno (100,101), donde es captada por medio de los transportadores de cationes orgánicos 1, 2 y 3 (OCT1/2/3) (102). En el caso de OCT3, éste se encuentra en varios tejidos, incluida la placenta, específicamente en la placa basal y en los capilares fetales (103). Ensayos moleculares indican que la placenta humana expresa preferencialmente el OCT1 en el primer trimestre, posteriormente su expresión decae, y se induce la del OCT3 hacia el tercer trimestre de gestación (104–106). La placenta también expresa a OCT1 y OCT2, aunque en mucho menor concentración que OCT3 (107). Por lo tanto, la metformina es capaz de ejercer acciones biológicas en la placenta humana.

Dentro de su célula diana, la metformina inhibe la gluconeogénesis, aumenta la sensibilidad a la insulina y mejora la captación periférica de la glucosa

(18,94,108,109). En la **Figura 5a-d** se describen las vías de señalización de la metformina.

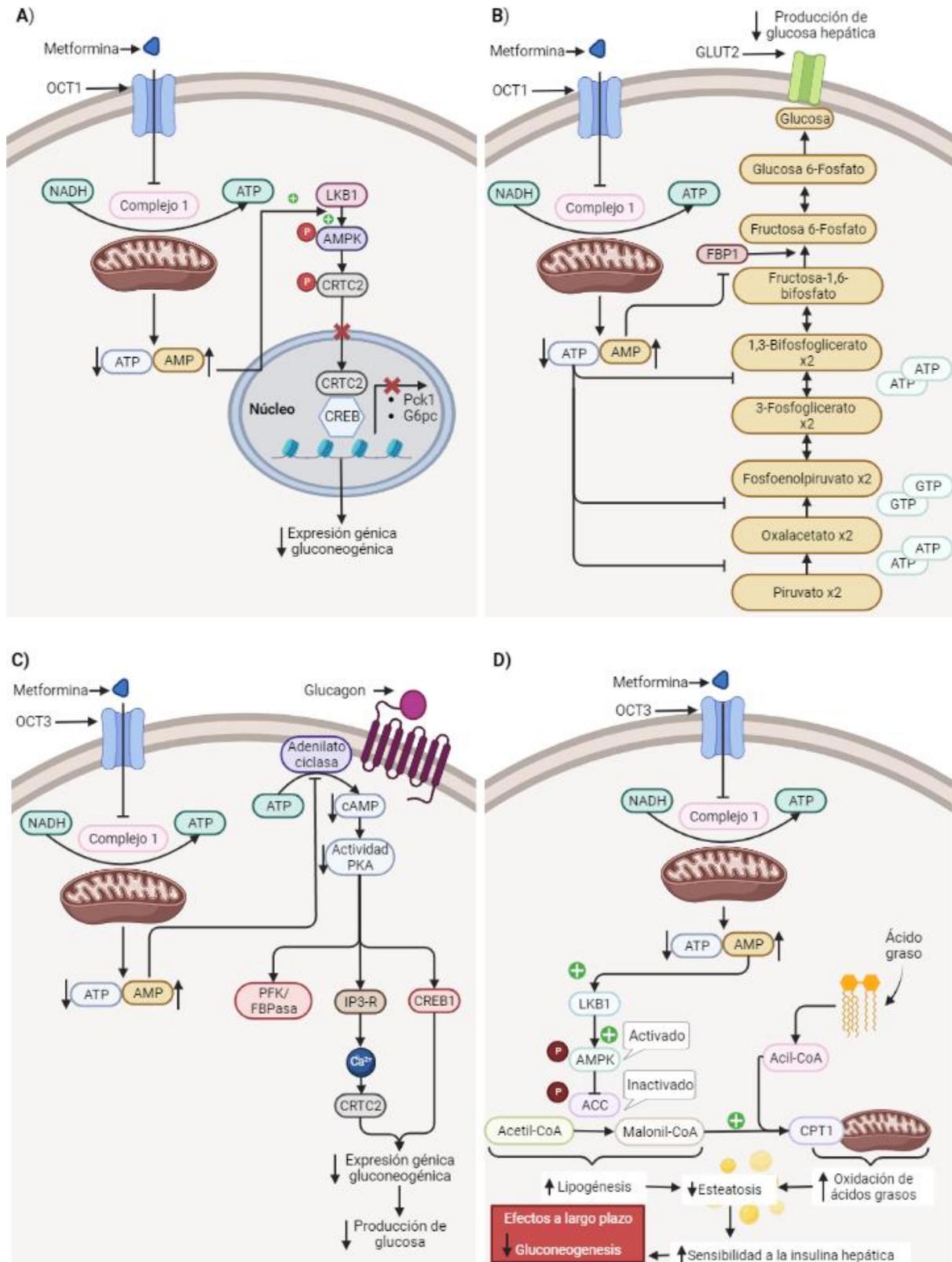


Figura 5. Mecanismo de acción de la metformina.

A) La metformina ingresa a las células de la placenta (trofoblastos) preferencialmente por medio del OCT3, inhibe el complejo mitocondrial I, suprime la síntesis de ATP y provoca una acumulación de AMP, por lo que se incrementa la relación AMP:ATP. Por consiguiente, se activa la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) debido a la fosforilación por LKB1. AMPK se encarga de sensar los niveles de energía en las células, enfatizando en las vías catabólicas para producir más ATP e inhibiendo aquellas vías anabólicas como por ejemplo la gluconeogénesis, ya que inhibe la transcripción de genes gluconeogénicos (como Pck1 y G6pc) por medio de la fosforilación y el secuestro del cofactor transcripcional CRTC2. B) La gluconeogénesis es una vía muy demandante de energía, por ende, la reducción de ATP es un indicador para disminuir la producción de glucosa. El aumento de AMP y la reducción de ATP inhibe alostéricamente a la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP1), con lo que se limita la síntesis de glucosa. C) Los niveles elevados de AMP inhiben la actividad de la adenilato ciclasa y con ello la síntesis de AMP cíclico. La reducción de AMPc, impide la actividad de la proteína cinasa A (PKA) y sus siguientes vías de señalización. D) La activación de AMPK favorece la sensibilidad a la insulina. Por una parte, inhibe la lipogénesis mediante la fosforilación e inhibición de la acetil-Coenzima A carboxilasa (ACC), lo que disminuye la síntesis de malonil-CoA y la activación de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1). Además, promueve la oxidación de ácidos grasos a través del aumento en la importación de acetil-CoA hacia el interior de la mitocondria. OCT1: Transportador de cationes orgánico humano 1. NADH: Nicotinamida adenina dinucleótida. ATP: Adenosín trifosfato. AMP: Adenosín monofosfato. LKB1: Serina/treonina cinasa 11. AMPK: Proteína cinasa activada por AMP. CRTC2: Coactivador de transcripción regulado por CREB 2. CREB: Proteína de unión a elementos sensible a AMP cíclico. Pck1: Fosfoenolpiruvato carboxicinasa 1. G6pc: Glucosa-6-fosfatasa. GLUT2: Transportador de glucosa 2. FBP1: Fructosa-1,6-bisfosfatasa. GTP: Guanosín trifosfato. cAMP: Adenosina-monofosfato cíclico. FBPase: Fructosa-bisfosfatasa. IP3-R: Receptor inositol 1,4,5-trifosfato. CREB1: Proteína 1 de unión al elemento sensible al AMPc. Ca⁺²: Ion calcio en su forma divalente. ACC: Acetil-CoA carboxilasa. CPT1: Carnitina palmitoil transferasa 1. Realizado por Villafuerte-Pérez A en el programa Biorender y Modificado de Foretz (110).

2.4. Infecciones genitourinarias en el embarazo complicado con diabetes mellitus gestacional

Las ITU se consideran las infecciones bacterianas más comunes en las mujeres, representando el 20% de las complicaciones durante el embarazo (111). En cuanto a la prevalencia de las ITU en mujeres con DMG, recientemente se reportó en un etanálisis que las mujeres embarazadas con DMG presentan alrededor de un 20% más de riesgo de desarrollar ITU [OR combinado de 1.2 (IC del 95 %: 1.1 a 1.3)] (112). Además, las ITU se han asociado significativamente con un mal control de la glucemia (113,114).

Durante el embarazo, las ITU representan un peligro para el feto y la madre (115). Se ha descrito una asociación positiva entre las ITU y el desarrollo de parto prematuro, preeclampsia, pielonefritis, infección urinaria recurrente, amnionitis, ruptura prematura de las membranas fetales, bajo peso al nacer, infección neonatal e ingreso en la unidad de cuidados intensivos neonatales (116–118).

En condiciones normales, la orina no provee de un ambiente óptimo para el crecimiento de bacterias, esto debido a su pH ácido, alta osmolaridad y su contenido de urea; sin embargo, durante el embarazo, el tracto urinario de la mujer experimenta ciertos cambios fisiológicos y anatómicos lo cual incrementa la posibilidad de ITU facilitando el crecimiento bacteriano en la orina (119).

Los riñones aumentan 1 cm de longitud, por ende, la tasa de filtración glomerular se incrementa entre un 30 a 50%, aumentan los niveles de glucosuria y el pH urinario se vuelve alcalino. Además, la pelvis renal y los uréteres se comienzan a dilatar desde las 7 semanas de gestación (9). Sin embargo, debido a la presión del útero grávido sobre los uréteres se ocasiona estasis del flujo de orina. La progesterona, por otro lado, relaja los músculos lisos del tracto urinario ocasionando una disminución del peristaltismo del uréter, la relajación de la vejiga y la retención de orina (120).

Es importante mencionar que la microbiota vaginal es un factor importante para prevenir la vaginosis bacteriana, la candidiasis vaginal, así como otras infecciones bacterianas. Sin embargo, cuando ocurre una disbiosis vaginal se llegan a presentar resultados adversos durante el embarazo, como riesgo de abortos espontáneos,

ruptura prematura de membranas, parto prematuro y corioamnionitis (121). Rafat menciona que el 62.7% de las mujeres embarazadas con hiperglucemia presentaban disbiosis vaginal a diferencia del 26.3% de mujeres normoglucémicas (122). Además, se ha reportado una prevalencia significativamente mayor de vaginosis bacteriana en mujeres con DMG en el tercer trimestre del embarazo (122–124).

2.4.1. Infecciones por *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (125) y habita preferencialmente el tracto gastrointestinal de los mamíferos. Sin embargo, por el hecho de adquirir elementos génicos mediante transferencia horizontal ha dado origen a cepas patógenas que se dividen en *E. coli* patógena intestinal (IPEC) y *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC). En este último grupo se encuentran las cepas uropatógenas (UPEC), las cuales son responsables de las infecciones urogenitales (126).

Clínicamente, durante el embarazo las ITU pueden presentarse como cistitis, pielonefritis o bacteriuria asintomática y se ha reportado que el principal patógeno urinario de las ITU es *Escherichia coli* uropatógeno, puesto que es el responsable de 70-95% de cistitis y pielonefritis no complicadas (12).

Se ha descrito que las cepas ExPEC que incluyen las causantes de sepsis y de infecciones urinarias, derivan en primer lugar del filogrupo B2 y en segundo lugar del grupo D. Particularmente el filogrupo B2 se caracteriza por varias determinantes de virulencia, promoviendo adherencia, adquisición de hierro, evasión de los mecanismos de defensa del hospedero e invasión celular, facilitando el crecimiento bacteriano (127).

Particularmente UPEC codifica diversos factores de virulencia permitiendo la colonización del tracto urinario. Estos factores se dividen en dos grupos: los situados en la superficie celular y los que son secretados, como se muestra en la **Figura 6**.

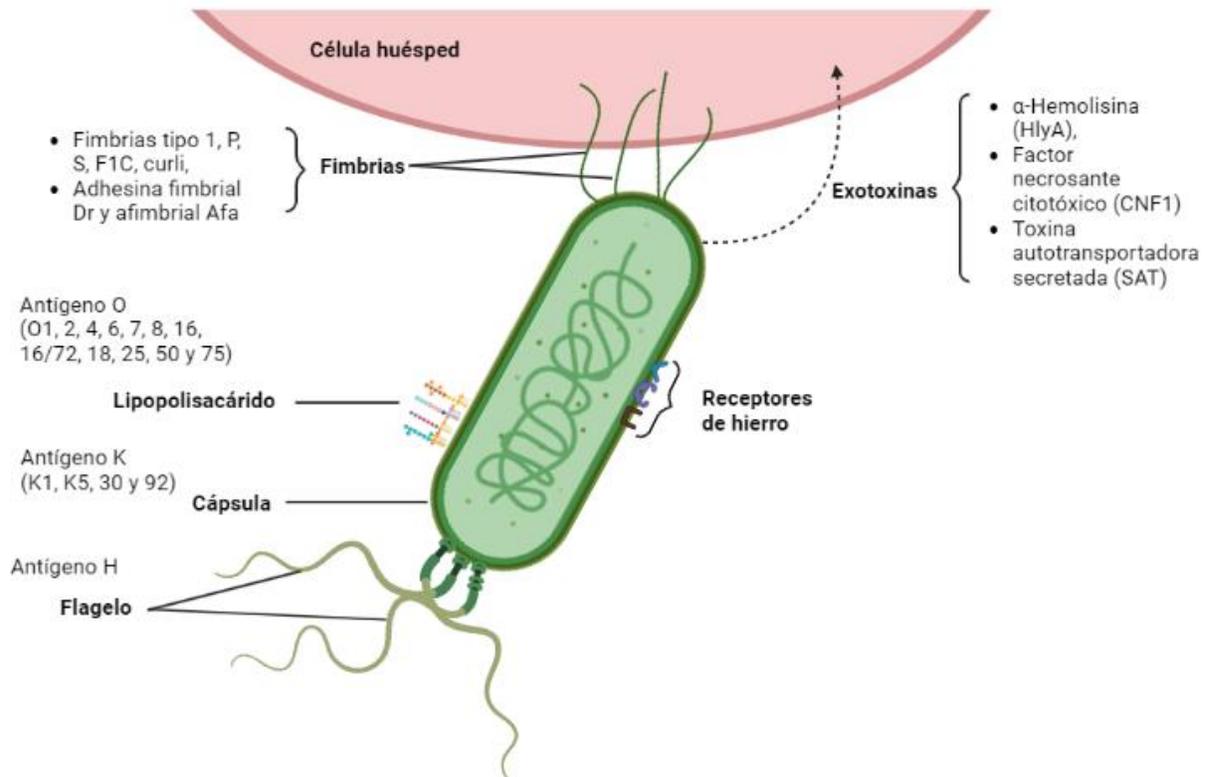


Figura 6. Principales factores de virulencia de Escherichia coli uropatógena. *Escherichia coli* interactúa con sus células diana a través de: 1) factores de virulencia situados en la superficie celular (que ayudan a la colonización bacteriana), 2) factores que son secretados y producen un daño celular, y 3) factores que evaden la respuesta inmune innata. Realizado por Villafuerte-Pérez A en el programa Biorender y Modificado de Brumbaugh (128).

Por una parte, dentro de los factores de virulencia de la superficie celular se encuentran orgánulos adhesivos como las fimbrias tipo 1, fimbrias P, fimbrias S y fimbrias F1C que ayudan a la unión entre la bacteria y los tejidos del huésped (129–132); además, estas adhesinas también participan en la formación de biofilms (133). Asimismo, UPEC expresa la adhesina fimbrial Dr y afimbrial Afa (130,134). Otros factores de virulencia situados en la superficie bacteriana son: 1) La cápsula, que protege a la bacteria del engullimiento fagocítico, 2) El lipopolisacárido (LPS), componente encargado de estimular la respuesta inmunitaria tras ser reconocido por el TLR4 y 3) El flagelo que es responsable de la motilidad de la bacteria (130,135).

Por otra parte, dentro de los factores de virulencia secretados se encuentran la lipoproteína α -hemolisina (HlyA), el factor necrosante citotóxico (CNF1) y la toxina autotransportadora secretada (SAT) (129,130,133,136). Cabe señalar que el

lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas, como *E. coli*, es detectado a través del TLR4 (137). La activación de TLR4 inicia vías de señalización celular que conllevan a la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B). El encendido de estas vías culmina en la transcripción de genes que codifican para citocinas inflamatorias, incluido el TNF- α y los interferones IFN tipo I (IFN- α e IFN- β) como se muestra en la **Figura 7** (13,41,138).

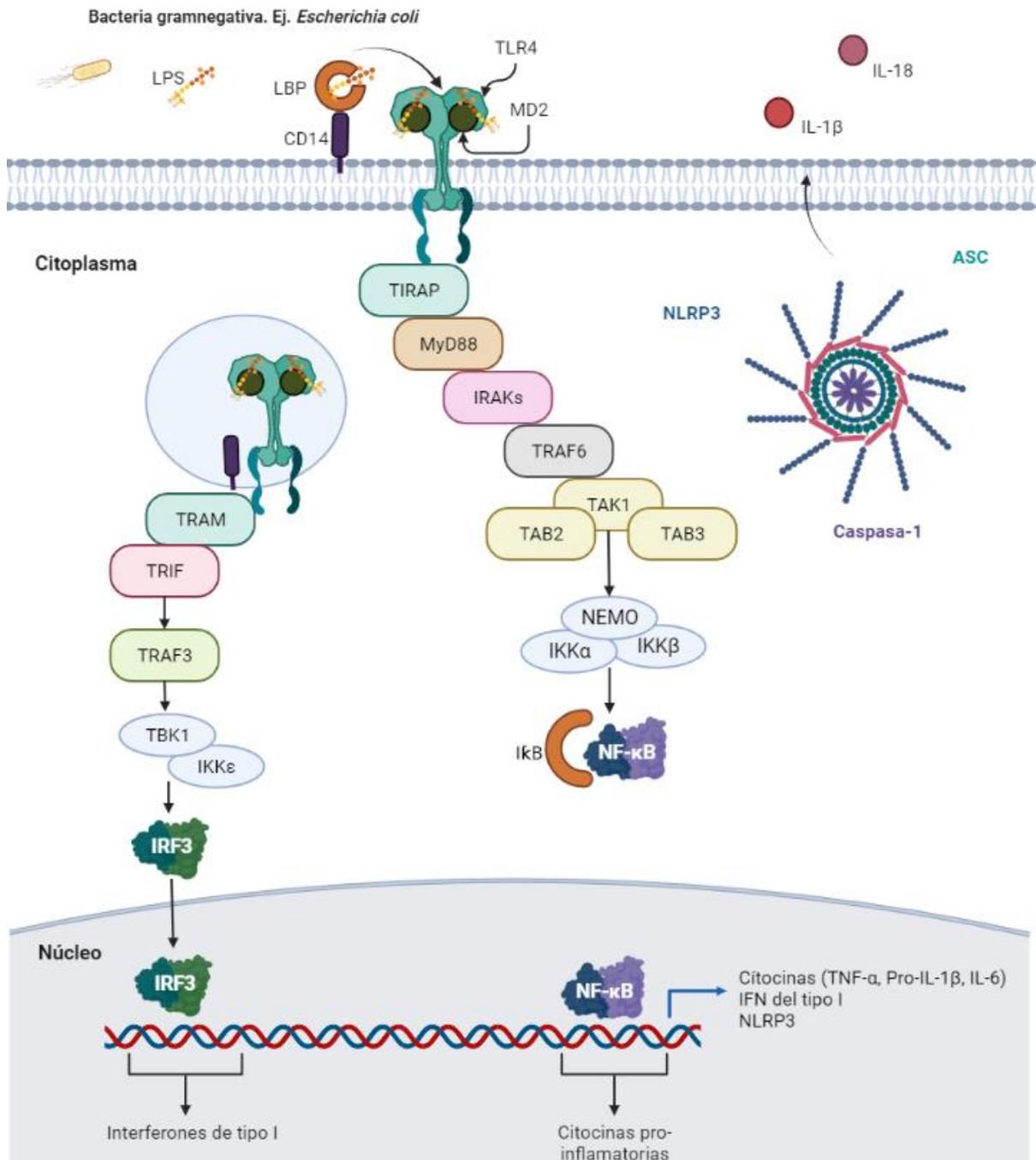


Figura 7. Vías de señalización de TLR4. TLR4 puede activar tanto la vía dependiente e independiente de MyD88. La vía dependiente de MyD88 inicia con la unión del lipopolisacárido (LPS) al TLR4. Esta unión permite reclutar a TIRAP, seguido de MyD88 que interacciona con IRAK4 así como IRAK1 o IRAK2 (IRAKs), que son fosforilados en el mismo orden. Después se libera IRAK1 fosforilado y activa a TRAF6 el cual se autoubiquitina agregando K63-ubiquitina, que es reconocida por el complejo conformado por TAK1 y TAB2-3. Este complejo activa mediante fosforilación al complejo IKK que finalmente fosforila la proteína IκB. La fosforilación de IκB libera a NF-κB y éste se puede translocar al núcleo. En el caso de la vía independiente de MyD88, se recluta indirectamente a TRIF hacia el TLR4 por medio de la

proteína adaptadora TRAM. TRAM interviene en la activación de TRIF, que se asocia con TRAF3, lo que provoca la ubiquitinación de TBK1 e IKK ϵ . Finalmente, TBK1 fosforila a IRF3 lo que conlleva a su homodimerización o heterodimerización, su translocación al núcleo y la expresión de los genes diana como los interferones tipo I (IFN-I) (139,140). LPS: Lipopolisacárido. LBP: Proteína de unión a lipopolisacáridos. CD14: Grupo de diferenciación 14. TLR4: Receptor tipo Toll 4. MD-2: Factor de diferenciación mieloide 2. TRIF: Adaptador que contiene el dominio TIR inductor de IFN- β . TRAM: Molécula adaptadora relacionada con TRIF. TBK1 Quinasa de unión a TANK 1. IKK ϵ : Inducible por IKK o IKK-i. IRF3: Factor regulador de interferón. TIRAP: Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR. MyD88: Factor de diferenciación mieloide 88. IRAKs: Cinasa asociada al receptor de IL1. TRAF3/6: factor 3/6 asociado al receptor de TNF. TAK1: Cinasa activada por el factor de crecimiento transformante β . TAB 1/2: Proteína que se une a TAK-1. NEMO: Modulador esencial de NF- κ B. IKK: Inhibidor del complejo NF- κ B/I κ B. I κ B: inhibidor de NF- κ B. NF- κ B: Factor nuclear κ B. NLRP3: Receptor pirina que contiene el dominio 3. ASC: Proteína tipo speck asociada a apoptosis. IL-1 β : Interleucina 1 beta. IL-6: Interleucina 6. TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa. IFN I: Interferón tipo I. Realizado por Villafuerte-Pérez A en el programa Biorender.

3. ANTECEDENTES

Tal como ya se describió en el marco teórico, la insulina y la metformina son medicamentos que además de ejercer acción euglicemiante, también pueden modular la respuesta inmune en términos de la producción de citocinas pro y antiinflamatorias, así como la defensa contra infecciones.

Desde hace poco más de 20 años, múltiples estudios han demostrado la capacidad de la insulina y de la metformina para modular la respuesta inmune tanto en modelos *in vitro*, *in vivo*, así como con ensayos clínicos controlados. De manera general, estos estudios señalan que ambos fármacos pueden disminuir la síntesis de citocinas inflamatorias (por lo que ejercen un efecto antiinflamatorio) y pueden mejorar la respuesta inmune innata contra las infecciones bacterianas (**Tablas 1 y 2**). Sin embargo, ninguno de estos antecedentes coincide con la fisiología de la placenta, y menos aún en el contexto de hiperglicemia asociado a la DMG. Por lo tanto, este proyecto se encuentra sustentado en múltiples evidencias experimentales y a la vez, posee la originalidad de que no había sido previamente descrito en la placenta humana.

A continuación, se engloban en las siguientes dos tablas los estudios que describen la capacidad inmunomoduladora de la insulina y la metformina y se señala el modelo de estudio y su principal hallazgo.

Tabla 1. Papel de la insulina en la modulación de la respuesta inflamatoria y la inmunidad innata.

	Referencia	Modelo de estudio	Principal hallazgo en comparación con grupo control
Estudios clínicos	Ghanim, 2008 (141)	Pacientes con diabetes mellitus tipo 2	La infusión de insulina en los pacientes disminuyó la expresión de ARNm de TLR1, -2, -4, -7 y -9 en células mononucleares de sangre periférica.
	Inayat, 2019 (142)	Pacientes con diabetes mellitus tipo 2	El tratamiento con insulina disminuyó la expresión de NF- κ B, RANTES y las caspasas 1 y 5 en leucocitos de sangre periférica.
Estudios <i>in vivo</i>	Zhu, 2018 (143)	Ratas con quemadura severa	El tratamiento con insulina redujo los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-6.
	Jescheke, 2004 (144)	Ratas estimuladas con LPS (endotoxémicas)	La administración de insulina disminuyó la expresión de citocinas en el hígado y niveles séricos de IL-1 β , IL-6, factor inflamatorio de macrófagos y TNF- α .
	Brix-Christensen, 2004 (145)	Cerdos endotoxémicos	El uso de la insulina redujo la concentración plasmática de TNF- α y glucagón.
	Murtha, 2018 (146)	Ratones con deleción del receptor de insulina (IR) en los túbulos colectores renales	La deleción genética del IR, aumentó la carga de <i>E. coli</i> uropatógena (UPEC) en orina y en la vejiga de los ratones.
Estudios <i>in vitro</i>	Aljada, 2001 (147)	Línea de células aórticas humanas (HAEC)	La insulina disminuyó la unión de NF κ B a DNA y la expresión de MCP-1.
	Leffler, 2007 (148)	Línea de macrófagos humanos (THP-1) endotoxémicos	La insulina disminuyó la secreción de TF- α e IL-1 β .

	Ho, 2021 (149)	Línea de epitelio de vejiga humana (SV-HUC-1)	La insulina redujo la infección por UPEC en un ambiente hiperglucémico.
Estudio de revisión	Van Niekerk, 2020 (150)	Análisis de literatura científica	La insulina puede modular la diferenciación de células inmunes y la polarización de macrófagos, así como la producción de especies reactivas de oxígeno. Además, puede regular de manera directa e indirecta múltiples mediadores inflamatorios.

Tabla 2. Papel de la metformina en la modulación de la respuesta inflamatoria y la inmunidad innata.

	Referencia	Modelo de estudio	Principal hallazgo en comparación con grupo control
Estudios clínicos	Inayat, 2019 (142)	Pacientes con diabetes mellitus tipo 2	El tratamiento con metformina disminuye la expresión de NF- κ B, RANTES y las caspasas 1 y 5 en leucocitos de sangre periférica.
	Bulatova, 2018 (151)	Pacientes con diabetes mellitus tipo 2	El tratamiento con metformina redujo la concentración sérica de TNF- α y disminuyó marcadores de estrés oxidativo.
Estudios <i>in vivo</i>	De Souza Teixeira, 2018 (152)	Hígado y macrófagos de ratones obesos	El tratamiento con metformina redujo los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en macrófagos estimulados con LPS. Sin embargo, en el hígado se observó el efecto opuesto.
	Jing, 2018 (153)	Ratones obesos	El tratamiento con metformina disminuyó el nivel sérico de IL-6 y TNF- α , y disminuyó la proporción de macrófagos M1.
	Peixoto, 2017 (154)	Ratas diabéticas	El tratamiento con metformina disminuyó la abundancia de TLR4, TNF- α y NF- κ B en el músculo esquelético.
	De Araújo, 2017 (155)	Modelo de periodontitis por ligadura en ratas	El uso de la metformina redujo las concentraciones séricas de IL-1 β y TNF- α . Además, disminuyó la abundancia de COX-2 y MMP-9 en el tejido periodontal.

Estudios <i>in vitro</i>	Han, 2018 (156)	Células endoteliales vasculares de la retina humana estimuladas con TNF- α .	La metformina disminuyó la síntesis de NF κ B, ICAM-1, MCP-1 e IL-8.
	Majhi, 2021 (157)	Células uroepiteliales infectadas con <i>E.coli</i>	La metformina reforzó la inmunidad innata, y redujo la carga microbiana de <i>E.coli</i> uropatógena a nivel extra e intra celular.
	Han, 2015 (158)	Línea de trofoblasto extraveloso (HTR-8 SV/neo)	La metformina redujo la secreción de IL-6, IL-8, IL-1 β y GRO- α .
Estudio de revisión	Malik, 2018 (159)	Análisis de literatura científica	La metformina es activa contra la infección por <i>Trichomonas spiralis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y el virus de hepatitis B. También tiene un papel importante contra la sepsis.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Con base en los reportes del 2019 publicados por la Federación Internacional de Diabetes, se estima que la prevalencia mundial de diabetes durante el embarazo es del 15.8%. Particularmente en México, se informó que la proporción general de DMG es del 23.7%. Asimismo, se ha reportado que las ITU representan el 20% de las complicaciones durante el embarazo y existe una asociación significativa con un mal control de la glucemia, además de existir una prevalencia significativamente mayor de vaginosis bacteriana en mujeres que presentan DMG. Sin embargo, hasta el día de hoy no se conoce el efecto de la hiperglucemia en la regulación de los mecanismos de defensa innata placentaria contra la infección por *Escherichia coli*, tales como la síntesis de citocinas pro-inflamatorias. Asimismo, también se desconoce el efecto inmunomodulador de la insulina y la metformina en el perfil inflamatorio de la placenta humana en respuesta a la infección por *Escherichia coli*.

De manera que, en el presente trabajo de investigación se plantearon las siguientes preguntas.

- ¿Cuál es el efecto modulador de la insulina y la metformina en el perfil inflamatorio de la placenta humana en un ambiente hiperglucémico ante una infección causada por *Escherichia coli*?
- ¿Cuál es el efecto de la hiperglucemia en la regulación de los mecanismos de defensa innata placentaria contra la infección por *Escherichia coli*, tales como el crecimiento y la invasividad bacteriana?

5. HIPÓTESIS

El uso de la insulina y la metformina disminuirán la secreción placentaria de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) frente a la infección bacteriana causada por *Escherichia coli*, en un modelo *in vitro* de hiperglucemia. Además, estos hipoglucemiantes podrán fortalecer la defensa innata de la placenta humana a través de la reducción del crecimiento y la invasividad bacteriana.

6. OBJETIVOS

6.1. General

Evaluar el efecto modulador de la insulina y la metformina en el perfil inflamatorio y la capacidad de defensa de la placenta humana de tercer trimestre frente a la hiperglucemia y la infección por *Escherichia coli*.

6.2. Específicos

1. Evaluar el crecimiento bacteriano ante la infección por *Escherichia coli* en un modelo *in vitro* de hiperglucemia placentaria, empleando insulina y metformina como tratamiento.
2. Analizar la invasividad de *Escherichia coli* en la vellosidad placentaria, en respuesta a la hiperglucemia y la ausencia o presencia de insulina y metformina.
3. Evaluar la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) en respuesta a la infección por *Escherichia coli* en un modelo *in vitro* de hiperglucemia placentaria.
4. Analizar el efecto de la insulina y la metformina sobre la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) en la placenta humana en respuesta a la infección por *Escherichia coli* y la hiperglucemia.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Diseño de estudio

Tipo de estudio: experimental, analítico y transversal.

7.2. Universo (población o muestra)

7.2.1. Aspectos éticos

Este proyecto contó con la aprobación de los comités de Ética, Bioseguridad e Investigación del INPer (registro INPer: 2018-1-152) (**Anexo 3 y 4**), del Hospital Ángeles México (**Anexo 5**) y del Instituto Mexicano del Seguro Social (registro IMSS: R-2020-785-043) (**Anexo 6**), además de ser financiado por el Instituto Nacional de

Perinatología (registro INPer: 2018-1-152) (**Anexo 3**) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (registro CONACyT: A1-S-27832).

Se informó del proyecto a pacientes sanas programadas para operación cesárea y se les invitó a donar su placenta. Se obtuvo la firma voluntaria del consentimiento informado previo a la cirugía (**Anexo 7**), siguiendo los lineamientos de ética en investigación en seres humanos establecidos en la Declaración de Helsinki. Los consentimientos se encuentran en custodia de la Dra. Andrea Olmos Ortiz.

7.2.2. Toma de muestra

Las placentas fueron recolectadas de los siguientes hospitales: 1) Hospital Ángeles México, ubicado en calle Agrarismo 208, Escandón II Sección, Miguel Hidalgo, 11800 Ciudad de México; y 2) Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) Hospital de Gineco Obstetricia (HGO) No. 4 “Luis Castelazo Ayala”, del IMSS, ubicado en Río de la Magdalena 289, Tizapán San Ángel, Progreso Tizapán, Álvaro Obregón, 01090 Ciudad de México, Ciudad de México.

7.2.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

- Criterios de inclusión: Únicamente se procesaron muestras de placenta provenientes de pacientes sanas, con embarazo normoevolutivo a término (entre la semana 37 a 40 de gestación), con edad materna entre 18 y 38 años y que firmaron el consentimiento informado. En todos los casos, la cirugía cesárea se programó por desproporción cefalopélvica, presentación oblicua o pélvica, por antecedente de miomectomía o cirugía uterina, o por elección materna.

- Criterios de exclusión: No se recolectó la placenta de aquellas pacientes que no otorgaron su consentimiento informado. Tampoco se tomó muestra de pacientes con alergia a antibióticos como penicilina o estreptomicina, con estudios de laboratorio que indicaran alguna alteración metabólica o clínica, con parto eutócico vaginal, con trabajo de parto activo, con embarazo múltiple,

infección cervicovaginal o de vías urinarias en el último trimestre del embarazo o que presentaran alguna enfermedad metabólica o endocrina.

- Criterios de eliminación: Se descartaron las muestras biológicas que resultaron positivas en el análisis microbiológico (ver sección 7.5).

Las características clínicas maternas y fetales de las pacientes participantes fueron registradas en el formato del **Anexo 8**.

7.3. Variables

Variables independientes:

- Concentración de glucosa en el medio DMEM: 10 mM (condición de glucosa control) y 50 mM (condición hiperglucemia).
- Concentración de insulina: 500 nM
- Concentración de metformina: 500 μ M
- Concentración de *Escherichia coli*: 1×10^5 UFC/mL

Variables dependientes:

- Secreción de citocinas proinflamatorias: TNF- α , IL-6, IL-1 β . Nivel de medición: escalar (pg/g tejido)
- Crecimiento bacteriano ante la infección placentaria por *Escherichia coli*. Nivel de medición: escalar (UFC/mL).
- Invasividad de *Escherichia coli* en la vellosidad placentaria. Nivel de medición: cualitativo

7.4. Cultivo primario de explantes placentarios

Al término de la cirugía se trasladó la muestra biológica hacia el laboratorio de Inmunología de la Unidad feto-placentaria del INPer. Para su transporte, la muestra se colocó dentro de un contenedor estéril de acero inoxidable, o bien en una bolsa para muestras biológicas dentro de una hielera destinada exclusivamente para tal fin. A continuación, en el cuarto de cultivo del laboratorio, y en campana de flujo con nivel

de bioseguridad II, se prosiguió a procesar la muestra (**Figura 8**). En primer lugar, con la ayuda de una pinza de disección y una tijera recta estéril se realizó un corte en el cordón umbilical para poder tomar una gota de sangre y depositarla en una prueba rápida para COVID-19 de Anticuerpos IgG e IgM con la finalidad de verificar que la madre no tuviera infección reciente por el virus SARS-CoV-2. Luego, se retiró el cordón umbilical y las membranas corioamnióticas para poder registrar el peso de la placenta manteniendo su esterilidad. A continuación, la placenta se lavó con solución de cloruro de sodio (NaCl) estéril al 0.9%, y previamente calentada a 37°C, hasta eliminar la mayoría de sangre materna. Seguidamente, se eliminaron los vasos sanguíneos, coágulos, decidua y se seleccionó el cotiledón central y próximo al cordón umbilical. Ya limpios, se cortaron alrededor de 108 pequeños explantes de 3 a 5 mm² y se mantuvieron en una caja Petri que contenía solución de NaCl 0.9% más ~2 mL de medio DMEM bajo en glucosa, ajustado a glucosa 10 mM + 10% suero de ternera neonatal + 1% de piruvato de sodio + penicilina 100 U/mL + estreptomicina 100 µg/mL.

Finalmente, se prosiguió a colocar los explantes en su tratamiento correspondiente (ver sección 7.6 “Estímulo experimental con glucosa, insulina y metformina”). Los tratamientos experimentales se colocaron por triplicado en placas para cultivo de 24 pozos, con 3 explantes placentarios por pozo y se mantuvieron en un incubador a 37 °C con 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Al cabo de 24 horas se refrescó el tratamiento experimental y nuevamente se incubó por 24 horas más para concluir con un total de 48 horas de incubación. El tiempo de 48 horas se estandarizó con trabajos previos de otros compañeros de laboratorio (20), con la intención de inducir la respuesta inflamatoria placentaria.

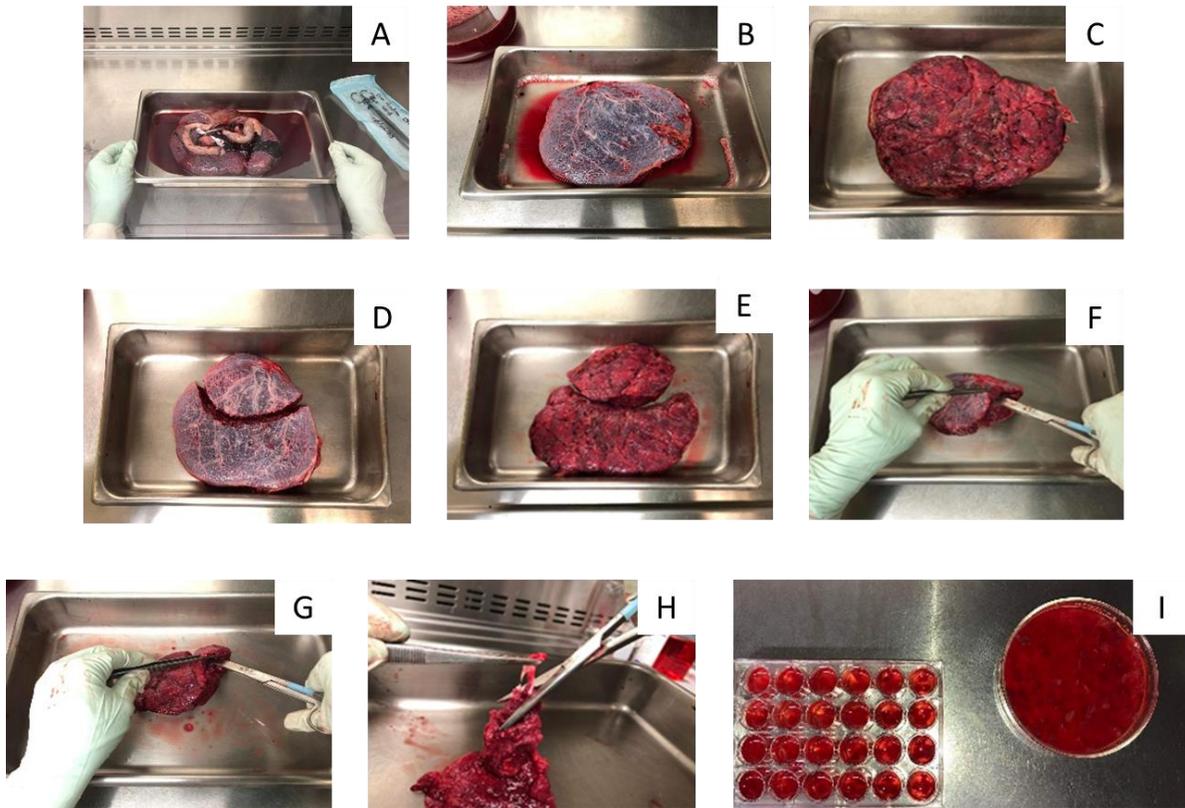


Figura 8. Procesamiento de placenta humana. A) Placenta en campana de flujo con nivel de bioseguridad II, B) Retiro de membranas y cordón umbilical, C) Cara materna de la placenta en la que se exponen los cotiledones, D) Corte de cotiledón adyacente al cordón umbilical (vista de cara fetal), E) Corte de cotiledón adyacente al cordón umbilical (cara materna), F) Retiro de la placa coriónica y amnios placentario, G) Retiro de decidua basal, H) Retiro de capilares, e I) Placa para cultivo de explantes placentarios.

7.5. Análisis microbiológico

Con el fin de asegurar que las muestras seleccionadas para llevar a cabo los experimentos se encontraran en condiciones de esterilidad libres de patógenos, se les realizó análisis microbiológico por parte del departamento de microbiología del Instituto Nacional de Perinatología.

Para realizar el examen se colocó un explante placentario en 3 medios de cultivo microbiológico: caldo Cerebro Corazón Infusión (BHI), Caldo Urea y Caldo Arginina. Los viales de medio con los tejidos se colocaron en la incubadora a 37 °C con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa durante 5 días. Finalmente, a partir de estas pruebas bioquímicas se evaluó la presencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *Klebsiella sp*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* u otros microorganismos (**Anexo 9**). En el caso de obtenerse un resultado positivo de cualquier patógeno, se eliminó a la muestra del estudio.

7.6. Estímulo experimental con glucosa, insulina y metformina

Considerando los valores reportados como normales de la curva de tolerancia a la glucosa poscarga de 75 gr en el embarazo por la Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-2016, los cuales son:

Tabla 3. Valores considerados como normales de la curva de tolerancia a la glucosa poscarga de 75 gr, en el embarazo.

Estado de tiempo	mg/dL	mmol/L
Ayuno	92	5.1
1 hora	180	10.0
2 horas	153	8.5
3 horas	140	7.8

Tomado de DOF- Diario Oficial de la Federación (160).

Comúnmente, el cultivo de explantes placentarios se realiza con medios que contienen entre 11 mM de glucosa (medio RPMI-1640) y 25 mM de glucosa (DMEM-HG) (161–166). Por lo tanto, y con la intención de poder preservar un ambiente

apegado a condiciones más fisiológicas, en el presente trabajo se optó por utilizar la concentración de 10 mM (equivalente a 180 mg/dL) como condición de glucosa control, y la de 50 mM (equivalente a 900 mg/dL) como condición de hiperglucemia severa asociada a inflamación.

Cabe mencionar que estas concentraciones han sido empleadas en otros modelos biológicos, incluido el de placenta humana, y se ajustan a condiciones experimentales de inflamación, más que a un contexto clínico (20,161–165,167–170). Además, la condición de glucosa 10 y 50 mM representa un modelo bien conocido y empleado en nuestro laboratorio de Inmunología de la unidad feto-placentaria (20). En este trabajo previo, nuestro grupo reportó que con estas condiciones experimentales aumentan los depósitos de glucógeno placentario e inducen la respuesta inflamatoria placentaria, ambos como alteraciones morfofuncionales comúnmente descritas en las placentas de pacientes con DMG (171–174).

En cuanto al tratamiento con insulina y metformina, las concentraciones empleadas para este trabajo fueron insulina 500 nM y metformina 500 μ M, dichas concentraciones se tomaron a partir de experimentos previos llevados a cabo en tejidos de la interfase materno-fetal y que además no afectaron la viabilidad de las células trofoblásticas (20,175,176) .

7.7. Identificación de *Escherichia coli*

La identificación de la especie se realizó por medio del sistema VITEK® y por la secuenciación del ADNr 16S. Además, a partir del genotipo obtenido por medio de una reacción de polimerasa en cadena (PCR) múltiple se comprobó que se trataba del grupo filogenético B2, y presentaba los siguientes genes que codifican la virulencia, como *fimH*, *papA*, *fyuA*, *ibeA*, *hlyA*, *aerJ* y *traT*. Esta cepa se aisló de la sangre de un neonato que presentó septicemia y la madre fue diagnosticada con ruptura prematura de membranas (PROM) y corioamnionitis.

7.8. Infección de explantes placentarios con *Escherichia coli*

Después de las 48 h de incubación con glucosa, insulina o metformina, se prosiguió a realizar el protocolo de infección. Se eligió una carga de inóculo de 1×10^5 UFC/mL de *E. coli*. Esta concentración representa el punto de corte en un urocultivo para diagnosticar una infección clínica urinaria (177,178).

El día previo a la infección se descongeló una alícuota de *E. coli* (preservada en caldo BHI con 30% de glicerol) y se mantuvo en incubación toda la noche en medio fresco de triptisoya caseína a 37 °C. Al día siguiente, en una campana de extracción nivel de seguridad II, se tomó una alícuota de 1 mL para leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nm. Con el dato de la absorbancia, se calculó la concentración bacteriana total mediante la siguiente fórmula (estandarizada previamente en nuestro grupo de laboratorio):

$$\frac{UFC}{mL} = (1 \times 10^7) (e^{(4.8213)(Abs_{nm})})$$

Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril (NaCl al 0.9%) hasta llegar a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Finalmente, el tubo con 1×10^6 UFC/mL se diluyó en un orden de magnitud para obtener la concentración final de infección de 1×10^5 UFC/mL. El medio de infección fue DMEM sin antibiótico, sin suero, con 0.2% de hidrolizado de lactoalbúmina y 1% de piruvato de sodio, ajustado a glucosa 10 mM. Cabe señalar que el medio BHI y el medio de triptisoya caseína contienen 11.1 mM y 13.8 mM de glucosa, respectivamente, por lo que el medio de infección presenta una concentración similar de glucosa en la que crece normalmente esta bacteria.

Además, se contó con explantes que no fueron infectados, pero sí estimulados con el mismo medio. Los explantes infectados y sin infectar se mantuvieron en un incubador a 37 °C con 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Se realizó cinética de tiempo a las 4 y 8 h post-infección (h.p.i.) para el subsecuente análisis experimental.

Al cabo de las 4 y 8 h.p.i:

- a) Se tomó una alícuota de 100 μL para realizar diluciones seriadas y sembrar 10 μL de cada dilución en cajas Petri con agar Luria-Bertani para realizar el conteo de UFC/mL;
- b) Se guardaron alícuotas de 500 μL del medio de cultivo para cuantificar citocinas proinflamatorias por ELISA. Las alícuotas se conservaron a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso;
- c) Se tomó un explante de cada triplicado y se colocó en 2 mL de formol para realizar tinción de Gram y evaluar la invasividad placentaria de *E. coli*.

7.9. Conteo de colonias por el método de microgota

Al término de las 4 y 8 h.p.i se tomó una alícuota de 100 μL para realizar el conteo de unidades formadoras de colonias por el método de microgota. Se realizaron diluciones seriadas de la alícuota inicial (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10,000 y 1:100,000) en solución salina + 0.05% de Tween 80. Finalmente se sembraron 10 μL de cada dilución por triplicado en cajas Petri de Agar Luria y se mantuvieron en incubación toda la noche a 37°C .

Al día siguiente se examinaron las placas de agar y se eligió el factor de dilución en el que se podían visualizar las colonias de forma aislada entre sí. Se registró el crecimiento de colonias en el triplicado de la dilución elegida y se obtuvo el promedio. El cálculo de UFC/mL se determinó con la siguiente fórmula:

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

7.10. Cuantificación de TNF- α , IL-1 β e IL-6 por ELISA

Para la detección de marcadores inflamatorios que se encuentran desregulados en la DMG, se emplearon kits de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Se emplearon estuches comerciales de la marca R&D Systems para la cuantificación de TNF- α (DY210), IL-1 β (DY201) e IL-6 (DY206).

La descripción general de la técnica es la siguiente: El día antes del ensayo se sensibilizó las placas con el anticuerpo de captura. Para tal fin se centrifugó la alícuota a 3000 rpm x 15 seg, y se colocó en 10.2 mL de PBS 1X; se colocaron 100 µL por pozo en una placa de 96 pozos para ELISA y se refrigeró a 4°C toda la noche. Al siguiente día se lavó la placa con wash buffer (PBS 1X + 0.05% de Tween 20), y enseguida se bloqueó con Buffer de bloqueo (PBS 1X + 1% de BSA) durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se preparó la curva estándar a 8 puntos para la cual se utiliza el estándar y el buffer de bloqueo. Al término del bloqueo se prosiguió a lavar la placa con wash buffer y se agregaron 100 µL de la curva de forma creciente por duplicado en la columna 1 y 2; se empleó como blanco el reactivo buffer de bloqueo. En el resto de la placa se agregaron 100 µL de la muestra por pozo, y se dejó incubar por 2 h; en el caso de haber realizado diluciones se mantuvo en agitación constante. Después del tiempo de incubación se lavó nuevamente la placa con wash buffer y se preparó la solución con el anticuerpo de detección. Para tal fin se centrifugó la alícuota a 3000 rpm x 15 seg y se colocó en 10.2 mL de buffer de bloqueo. Se depositaron 100 µL por pozo del anticuerpo de detección y se refrigeró a 4 °C toda la noche o a temperatura ambiente por 2 h. Finalmente, se lavó la placa con wash buffer y se agregó 100 µL de avidina o estreptavidina diluida en buffer de bloqueo. Se incubó por 30 min a temperatura ambiente y se mantuvo cubiertas las placas con papel aluminio ya que este compuesto es fotosensible. Seguidamente se lavó la placa con wash buffer y se agregó 100 µL por pozo del sustrato OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina). Se cubrió la placa con aluminio y se vigiló el viraje de color durante aproximadamente 5 a 20 min. Por último, se detuvo la reacción agregando 50 µL de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄) y se leyó la absorbancia a 492 nm. La curva se ajustó a 4 parámetros logísticos y se normalizó por mg de peso de tejido húmedo.

7.11. Tinción de Gram para evaluar la invasividad de *Escherichia coli* dentro de la vellosidad placentaria

Para la identificación de bacterias Gram negativas (*E. coli*) en el tejido, se utilizó la tinción de Gram modificada por Brown-Brenn. Los explantes placentarios se conservaron en formol y después se embebieron en una matriz de parafina.

Posteriormente, se hicieron cortes de 5 μm , se colocaron sobre un portaobjetos y se procedió a desparafinar e hidratar. Después se les agregó una mezcla de 4 mL de cristal violeta con 1 mL de NaHCO_3 durante 1 min, enseguida se lavó con agua de la llave y se le agregó solución de yodo de Gram por 1 min. Nuevamente se lavó con agua de la llave y se secó con papel filtro casi en su totalidad. Luego se decoloró con alcohol-acetona, se le colocó solución fushina básica durante 1 min y se lavó con agua. Enseguida se diferenció con acetona y posteriormente con acetona-ácido pícrico hasta que se observara un color rosa amarillento. Por último, se le aplicaron baños rápidos en acetona, acetona-xilol, se aclaró con xilol y se montó con resina sintética. El principio de esta tinción se basa en la capacidad de la pared celular del microorganismo para contener el colorante primario cristal violeta durante el tratamiento con el solvente. Los microorganismos Gram positivos presentan un mayor contenido de peptidoglicano en comparación con los Gram negativos que en su caso tienen una mayor proporción de lípidos (179).

En primer lugar, todas las bacterias absorben el colorante primario cristal violeta, pero tras el uso de solventes, la capa lipídica de los microorganismos Gram negativos se disuelven perdiendo el tinte del colorante primario. En el caso de los microorganismos Gram positivos, el solvente deshidrata su pared celular, cierra los poros e impide la salida del complejo cristal violeta-yodo permaneciendo de color purpura, Finalmente, se usa el colorante secundario fucsina que le da el color rosa característicos de los microorganismos Gram negativos (179,180).

7.12. Análisis estadísticos

Se analizó la normalidad en la distribución de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente se realizaron las comparaciones estadísticas por ANOVA y el post-hoc que se ajustaba a la distribución de los datos. Por ejemplo, si los datos asumieron normalidad, se procedió a realizar ANOVA ordinaria de una vía y se evaluaron las comparaciones múltiples pareadas por Tukey. Por otro lado, si los datos no asumieron normalidad, entonces correspondió aplicar una prueba no paramétrica como la ANOVA de Kruskal Wallis y una post-hoc pertinente como Dunn. En los gráficos y tablas se indica si los datos se presentan como promedio o mediana, desviación

estándar o rango intercuartílico. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 9.5.0 (San Diego, CA, USA). El valor de $P < 0.05$ se empleó para denotar diferencias estadísticamente significativas.

8. RESULTADOS

8.1. Características clínicas

Para el desarrollo de esta tesis se recolectaron y analizaron 5 muestras de placentas. A continuación, se describen las características clínicas de las madres, así como de sus neonatos en las **Tablas 4 y 5**.

Tabla 4. Características clínicas de las madres que donaron su placenta.

	Codificación de las pacientes donadoras					Promedio \pm DE	Intervalo (mín-máx)
	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5		
<i>Edad (años)</i>	35	34	33	39	31	34 \pm 2.9	31 - 39
<i>IMC pre-gestacional (kg/m²)</i>	19.90	30.80	28.95	21.60	24.90	26.1 \pm 4.8	19.9 - 30.8
<i>Número de gestas</i>	1	1	1	4	3	2 \pm 1	1 - 4
<i>Semanas de gestación</i>	38.60	38.30	38.60	37.00	40.20	38.5 \pm 1.1	37 - 40.2
<i>Presión sistólica (mm Hg)</i>	125	121	119	107	120	118 \pm 6	107 - 125
<i>Presión diastólica (mm Hg)</i>	85	81	78	72	70	77 \pm 6	70 - 85
<i>Ganancia de peso (kg)</i>	10	9	17	11	9	11.2 \pm 3.3	9 - 17

IMC: Índice de masa corporal.

Tabla 5. Características clínicas de los neonatos.

Característica	Codificación de las pacientes donadoras					Promedio ± DE	Intervalo (min-máx)
	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5		
<i>Peso al nacer (kg)</i>	3.020	3.845	3.350	2.300	3.300	3.1 ± 0.5	2.3 - 3.8
<i>Talla (cm)</i>	46	50	49	45	50	48 ± 2.3	45 - 50
<i>Perímetro cefálico (cm)</i>	33.50	35.50	34.00	34.00	35.50	34.5 ± 0.9	33.5 - 35.5
<i>Puntuación APGAR al minuto 1</i>	9	9	9	9	9	9 ± 0	9 - 9
<i>Puntuación APGAR al minuto 5</i>	10	9	9	9	9	9.2 ± 0.4	9 - 10
<i>Peso de la placenta (g)</i>	541.90	571.83	595.50	464.00	685.90	571 ± 80	464 - 686
<i>Sexo del bebé</i>	M	F	M	M	F	40% F / 60% M	

APGAR: Apariencia (color de piel, rosa o azul), Pulso (frecuencia cardíaca o latidos por minuto), G representa la respuesta de la mueca (reflejos y llanto), Actividad (tono muscular y flexión) y Respiración (tasa de respiración, esfuerzo y patrón) (181).

8.2. Crecimiento bacteriano en respuesta a la hiperglucemia, insulina y metformina en explantes placentarios infectados con *Escherichia coli*

Con la intención de evaluar la capacidad de defensa de la placenta humana frente a la infección por *Escherichia coli*, se decidió analizar la invasividad de esta bacteria en la vellosidad placentaria (análisis cualitativo) así como su crecimiento logarítmico (análisis cuantitativo).

En primer término, se describirán los resultados observados en cuanto al crecimiento bacteriano. Tal como se puede observar en la **Figura 9**, nuestros resultados muestran que a las 4 y 8 h.p.i. el número de colonias de *E. coli* en explantes pretratados con glucosa 50 mM, fue significativamente mayor con respecto a explantes pretratados con glucosa 10 mM. Por otra parte, y de forma interesante, tanto la insulina como la metformina disminuyeron significativamente el número de colonias de *E. coli* en condiciones de hiperglucemia frente a los explantes pretratados con glucosa 50 mM y sin tratamiento adicional. Esto quiere decir que la insulina y la metformina actúan como reguladores de la defensa placentaria, lo que resulta en la inhibición del crecimiento bacteriano; este efecto se sostiene hasta las 8 h.p.i.

Cabe señalar que en este gráfico se puede evidenciar que la placenta presenta una importante actividad microbicida. Esto puede comprobarse al observar que la cepa de *E. coli* libre (es decir, sin presencia de explantes placentarios) crece más de 3 órdenes de magnitud (1000 veces) en comparación con el crecimiento observado en cualquiera de los explantes placentarios tratados.

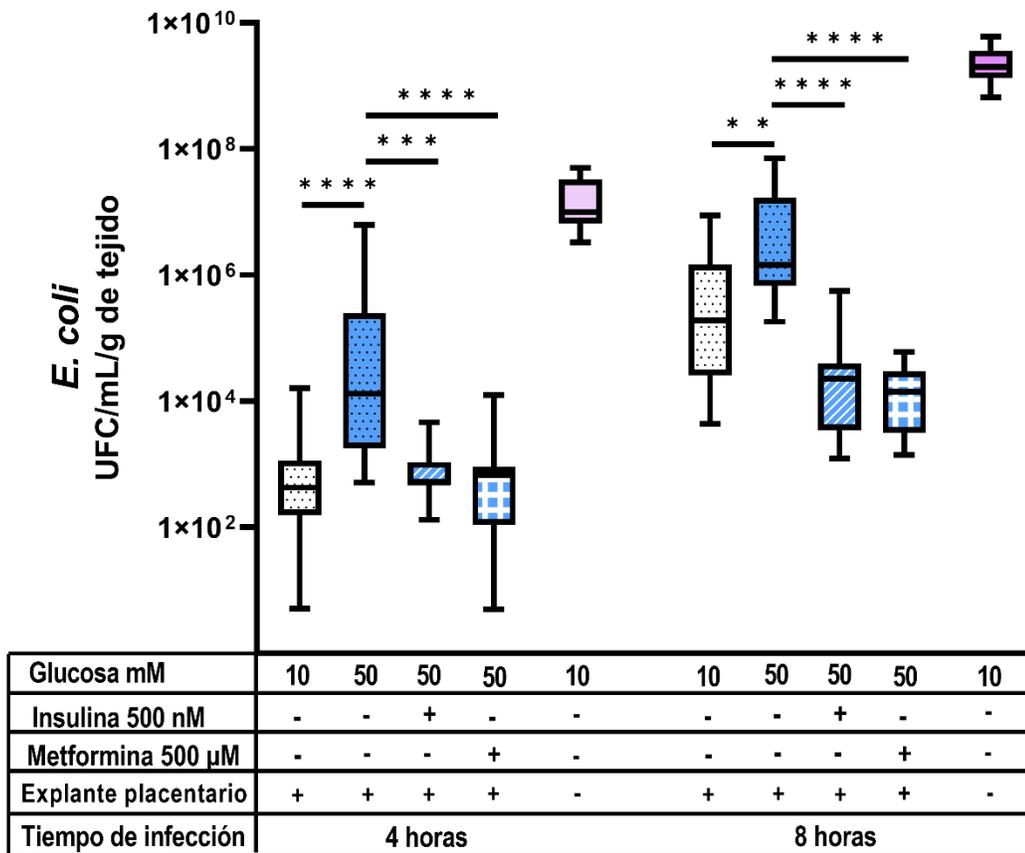


Figura 9. El tratamiento con insulina y metformina ayuda a reducir el conteo de Escherichia coli en explantes placentarios pre expuestos a alta glucosa. Los explantes se pretrataron con glucosa 10 o 50 mM, insulina 500 nM o metformina 500 µM durante 48 h. Después se infectaron con *E. coli* (1×10^5 UFC/mL) y se siguió la infección durante 4 y 8 h a 37°C. Posteriormente se recolectó una alícuota de los medios de infección a las 4 y 8 h para determinar el número de UFC/mL por el método de microgota. $n =$ Cinco experimentos independientes con triplicado experimental. Kruskal-Wallis seguida de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunn. Representación de los datos por medio de un diagrama de cajas (Q1, Q2 y Q3) y bigotes (Valor mínimo y máximo). Las comparaciones se llevaron a cabo frente a glucosa 50 mM **; $p < 0.01$. ***; $p < 0.001$. ****; $p < 0.0001$. Q = Cuartil.

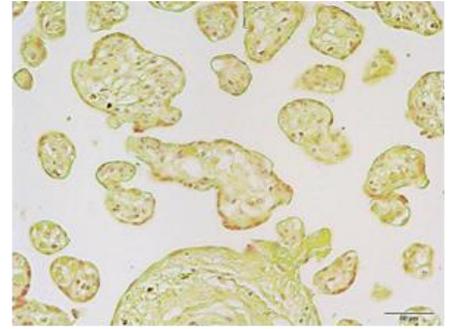
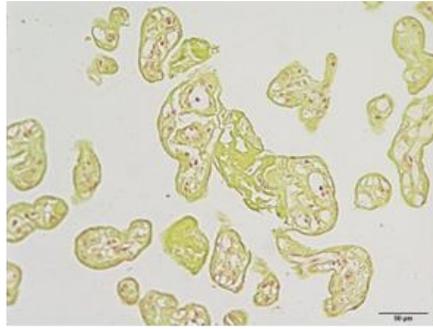
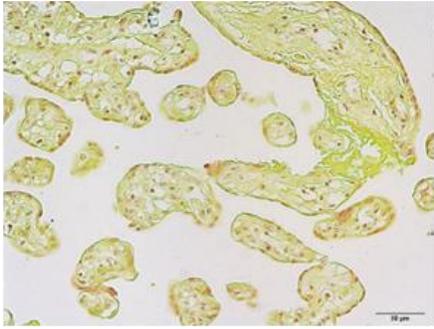
8.3. Invasividad de *Escherichia coli* en la vellosidad placentaria en respuesta a la hiperglucemia, insulina y metformina

En la sección pasada se demostró de forma cuantitativa que el tratamiento de insulina y metformina en un ambiente hiperglucémico ayuda a disminuir el crecimiento de *E. coli*. Ahora se presentarán los efectos cualitativos derivados del examen histológico de las vellosidades infectadas con *E. coli*. Para ello, se evaluó la invasividad bacteriana en la vellosidad placentaria a partir de cortes histológicos teñidos con la tinción de Gram modificada por Brown-Brenn en donde la bacteria se puede observar teñida de color rosa-rojizo.

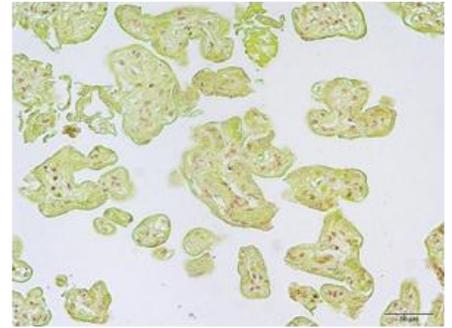
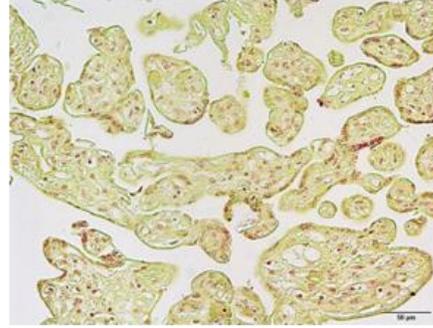
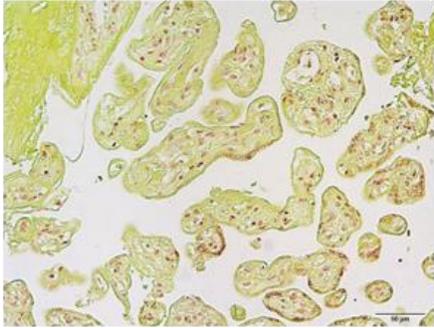
La **Figura 10** está dividida en el panel A (que indica el efecto a las 4 h.p.i) y el panel B (que indica el efecto a las 8 h.p.i). En los explantes pre-expuestos con glucosa 10 mM se puede observar que la infección se detiene a nivel de la capa de sincitiotrofoblasto, denotando su capacidad de defensa innata contra la infección. Este efecto se puede observar tanto a las 4 como a las 8 h.p.i. Sin embargo, en los explantes pre-expuestos a alta glucosa, se puede observar el paso de *E. coli* hacia el interior de la vellosidad, con abundantes cuerpos entre el mesénquima placentario. Este efecto es más notorio a las 8 h.p.i.

En cuanto al efecto de la insulina y la metformina, puede apreciarse que el pre-estímulo con ambos medicamentos ayuda a disminuir la invasividad de *E. coli*, volviendo a limitar su presencia a la capa sincicial, de modo similar al comportamiento en los explantes pre-expuestos a glucosa 10 mM. Por lo tanto, ambos hipoglucemiantes fortalecen la capacidad de barrera de la placenta contra la infección por *E. coli*.

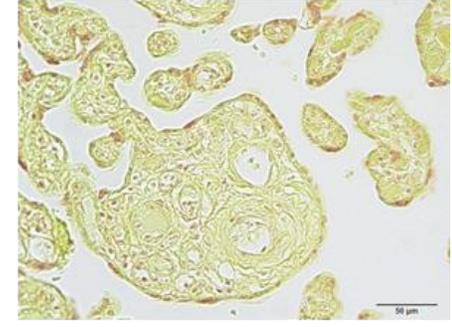
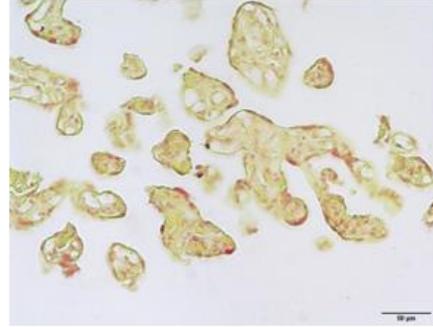
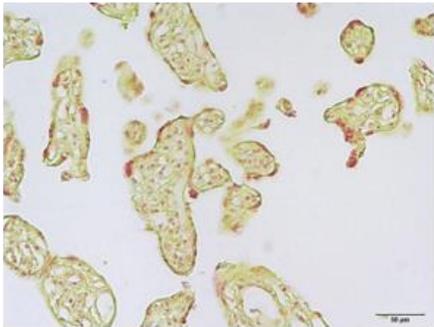
Glucosa 10 mM



Glucosa 50 mM



Glucosa 50 mM +
Insulina 500 nM



Glucosa 50 mM +
Metformina 500 µM

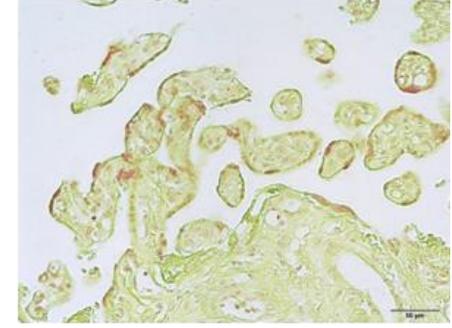
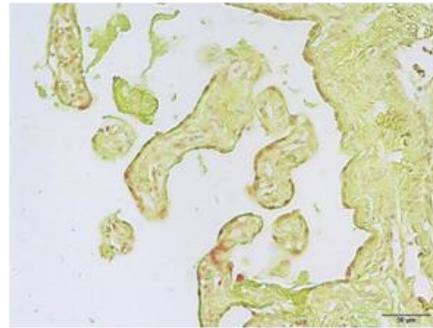
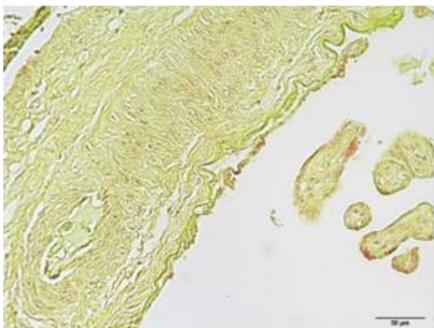
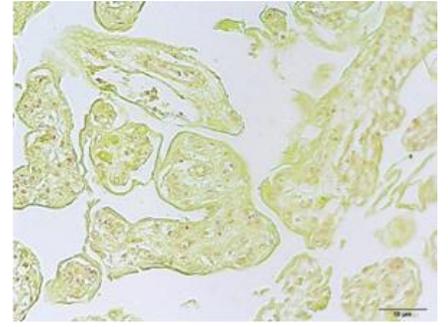
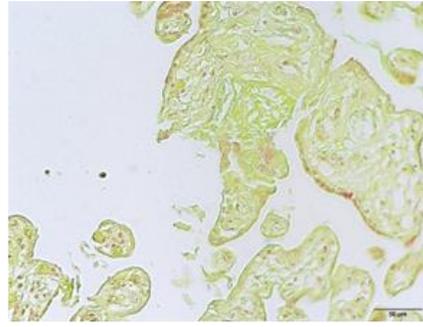
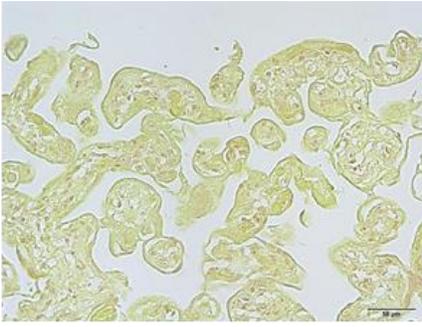
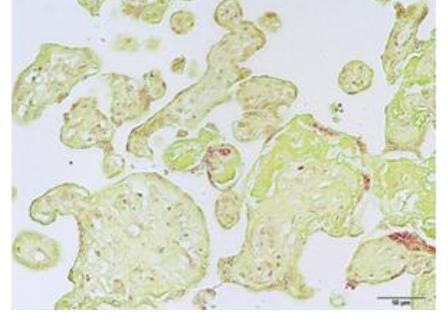
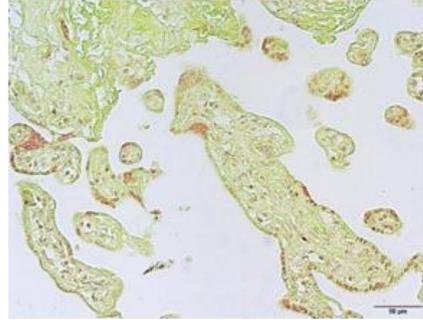
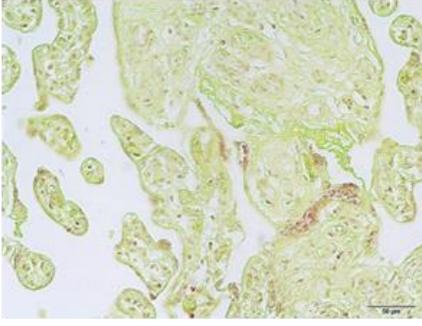


Figura 10A
(continúa)

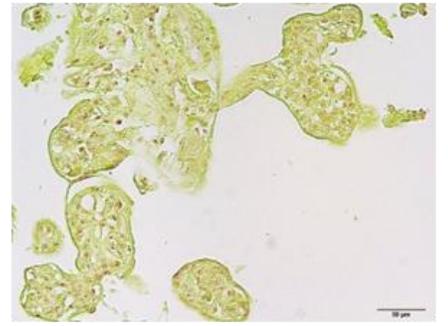
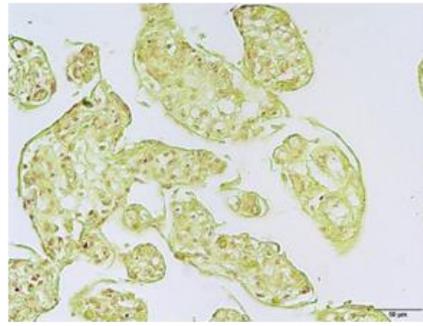
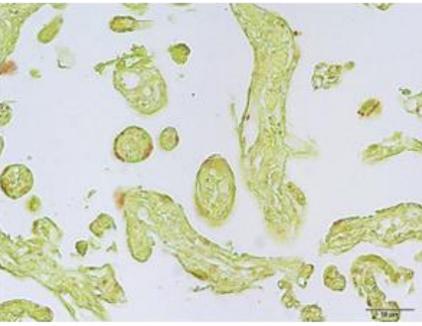
Glucosa 10 mM



Glucosa 50 mM



Glucosa 50 mM +
Insulina 500 nM



Glucosa 50 mM +
Metformina 500 µM

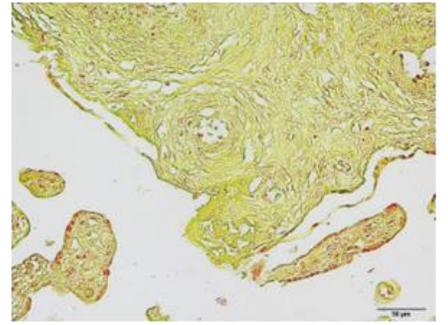
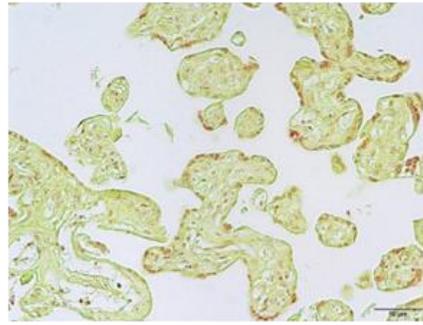
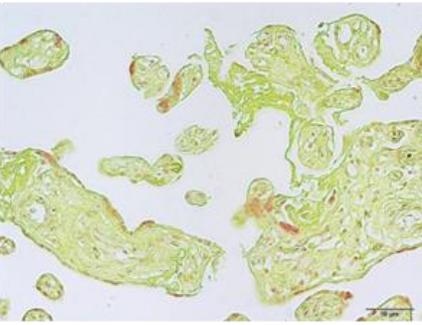


Figura 10B

Figura 10. La hiperglucemia favorece la invasividad de *Escherichia coli* en la vellosidad placentaria. El tratamiento con insulina y metformina ayuda a reducir la invasividad en explantes placentarios pre expuestos a alta glucosa.

Corte histológico de vellosidades infectadas con *E. coli* y teñidas con la técnica de Gram modificada por Brown-Brenn. A) Efecto a las 4 h.p.i; B) Efecto a las 8 h.p.i. Se muestran las microfotografías procedentes de tres experimentos independientes. La escala en la esquina inferior derecha indica 50 μm .

8.4. Rol de la insulina y la metformina en la secreción de citocinas proinflamatorias ante la infección por *Escherichia coli* en explantes placentarios expuestos previamente a condiciones hiperglucémicas

Después de evaluar el crecimiento y la invasividad bacteriana en el modelo de hiperglucemia placentaria, se prosiguió a evaluar la modulación de la respuesta inflamatoria a través de la cuantificación de las citocinas inflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-6.

En primer lugar, en la **Figura 11** se observa que la infección en condición de glucosa control (barra blanca punteada) induce una marcada respuesta pro-inflamatoria en la placenta a través del aumento de la secreción de IL-1 β y este efecto es significativo desde las 4 horas.

Sin embargo, los explantes placentarios que se incubaron con glucosa 50 mM y luego fueron infectados con *E. coli* (barra azul punteada) mostraron una secreción significativamente menor de IL-1 β con respecto a los explantes infectados con *E. coli* e incubados con glucosa 10 mM.

Finalmente, el tratamiento de insulina o metformina no modificó la secreción de IL-1 β en condiciones de hiperglucemia comparado con los explantes que fueron infectados y pretratados con glucosa 50 mM. Sin embargo, fueron significativamente menores a diferencia de los explantes infectados en condiciones de glucosa control.

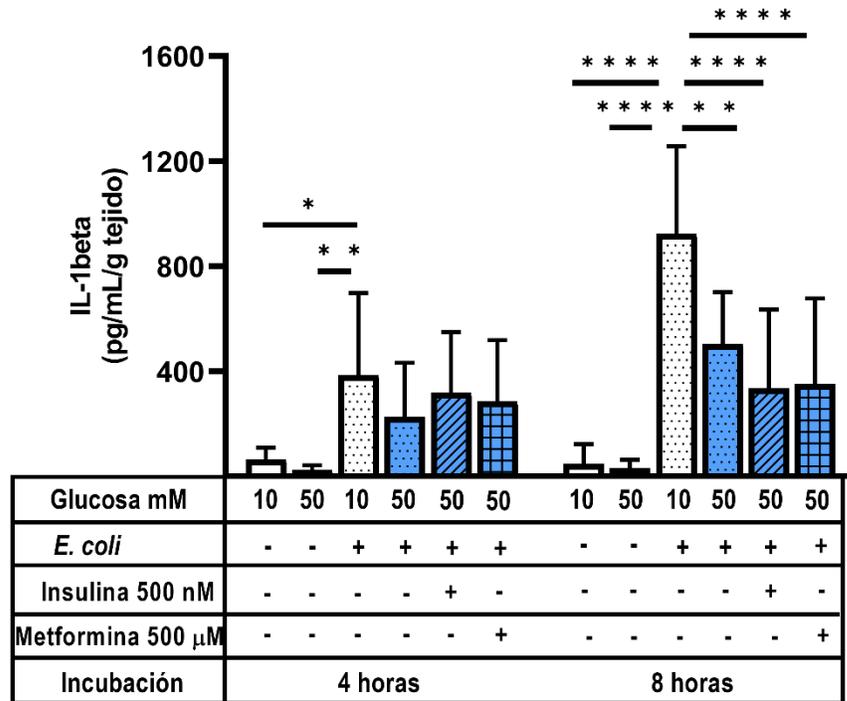


Figura 11. Secreción de IL-1 β en explantes con o sin infección por *Escherichia coli*. Los explantes se pretrataron con glucosa 10 o 50 mM, insulina 500 nM o metformina 500 μ M durante 48 h. Después se infectaron con *E. coli* (1×10^5 UFC/mL) y se siguió la infección durante 4 y 8 h a 37 °C. n = Cinco experimentos independientes con triplicado experimental. ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey. Las comparaciones se llevaron a cabo contra infección + glucosa 10 mM: *, $p \leq 0.05$. **, $p < 0.01$. ***, $p < 0.0001$.

En la **Figura 12** de igual manera se puede observar que la infección en condición de glucosa control induce una marcada respuesta pro-inflamatoria en la placenta a través del aumento de la secreción de TNF- α y mantiene la diferencia significativa desde las 4 horas.

Por otra parte, los explantes placentarios que se incubaron con glucosa 50 mM y luego fueron infectados con *E. coli* no mostraron diferencia en la secreción de TNF- α con respecto a los explantes infectados con *E. coli* e incubados con glucosa 10 mM.

Por último, el tratamiento de insulina o metformina no modificó la secreción de TNF- α , en condiciones de hiperglucemia comparado con los explantes que fueron infectados y pretratados con glucosa 50 mM.

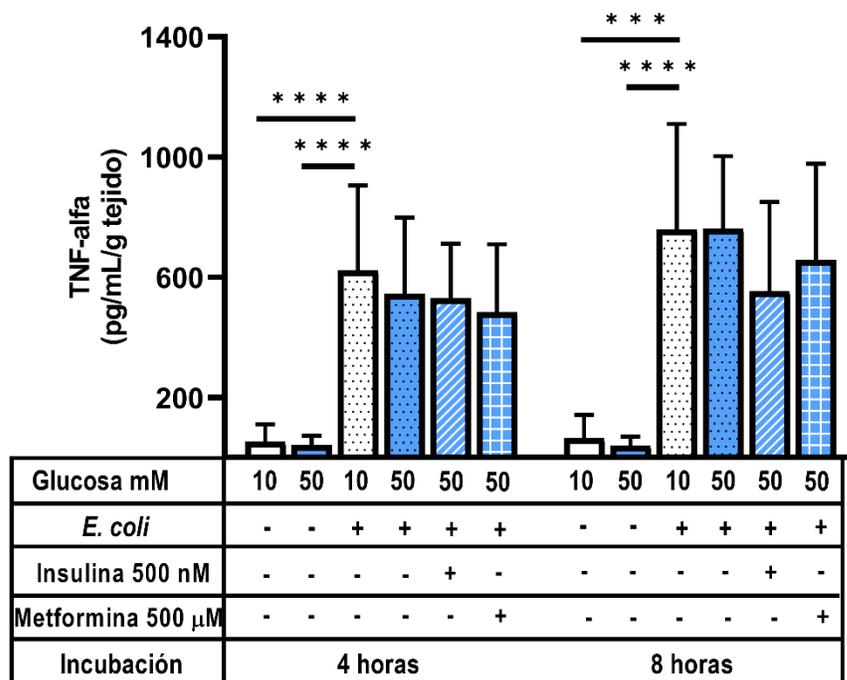


Figura 12. Secreción de TNF- α en explantes con o sin infección por *Escherichia coli*. Los explantes se pretrataron con glucosa 10 o 50 mM, insulina 500 nM o metformina 500 μ M durante 48 h. Después se infectaron con *E. coli* (1×10^5 UFC/mL) y se siguió la infección durante 4 y 8 h a 37°C. n = Cinco experimentos independientes con triplicado experimental. Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunn. Las comparaciones se llevaron a cabo contra infección + glucosa 10 mM: ***, p < 0.001. ****, p < 0.0001.

En la **Figura 13**, podemos observar que la infección en condición de glucosa control induce una respuesta pro-inflamatoria en la placenta a través del aumento de la secreción de IL-6 hasta las 8 h.p.i.

Los explantes placentarios que se incubaron con glucosa 50 mM y luego fueron infectados con *E. coli* no mostraron diferencia en la secreción de IL-6 con respecto a los explantes infectados con *E. coli* e incubados con glucosa 10 mM.

Para finalizar, el tratamiento de insulina o metformina no modificó la secreción de IL-6 en condiciones de hiperglucemia comparado con los explantes que fueron infectados y pretratados con glucosa 50 mM.

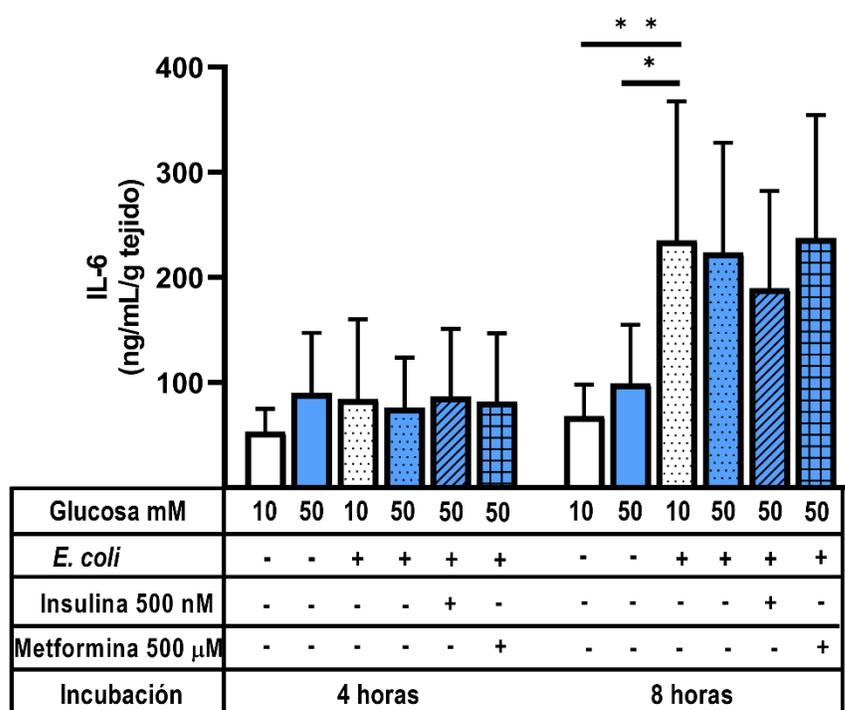


Figura 13. Secreción de IL-6 en explantes con o sin infección por con *Escherichia coli*. Los explantes se pretrataron con glucosa 10 o 50 mM, insulina 500 nM o metformina 500 μM durante 48 h. Después se infectaron con *E. coli* (1×10^5 UFC/mL) y se siguió la infección durante 4 y 8 h a 37°C. n = Cinco experimentos independientes con triplicado experimental. Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunn. Las comparaciones se llevaron a cabo contra infección + glucosa 10 mM: *, $p \leq 0.05$. **, $p < 0.01$.

9. DISCUSIÓN

Desde las primeras etapas del embarazo, el sistema inmunitario materno debe mantener un equilibrio de los mediadores de la respuesta inmune con el fin de evitar enfermedades y/o la interrupción del embarazo (182). Desafortunadamente, las pacientes con DMG y las gestantes con DM2 presentan una inflamación crónica de bajo grado caracterizada por niveles elevados de marcadores inflamatorios circulantes como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (183–189). Esta desregulación inmunológica posiciona a las pacientes con DMG en una situación de vulnerabilidad para el desarrollo de otras comorbilidades maternas y fetales.

Asimismo, la DMG se asocia con el desarrollo de infecciones (11). Particularmente, las ITU durante el embarazo son una causa común de infección y se han asociado con varias complicaciones materno-fetales, como el parto prematuro, preeclampsia, restricción de crecimiento intrauterino, bajo peso al nacer y corioamnionitis (190–192). Estos efectos adversos derivados de las ITU durante el embarazo son principalmente generados por el marcado ambiente pro-inflamatorio a consecuencia de la infección (193,194), y no tanto por la infección en sí misma.

La discusión de los resultados obtenidos se dividirá en dos secciones: primero, la capacidad física de la placenta para resistir a la infección por *E. coli* (conteo de colonias e invasividad intravellosa); y segundo, el montaje de la respuesta inmune placentaria derivado del reto infeccioso por *E. coli*.

9.1. Capacidad física de la placenta para resistir a la infección por *E. coli*

La placenta es una de las barreras físicas que separa al feto del ambiente externo, y participa en la protección anatómica e inmune hacia el feto. En esta sección se discutirán los mecanismos físicos que están activados o disminuidos en presencia de la hiperglucemia, la insulina, la metformina y la infección por *E. coli*.

Los análisis de tinción Gram y de crecimiento bacteriano en placas de agar, mostraron que la hiperglucemia favorece el conteo extracelular de colonias y la invasividad de *E. coli* en la vellosidad placentaria. Este resultado coincide con la práctica clínica, en la

que se ha reportado una mayor proporción de infecciones cervicovaginales en pacientes con diabetes o con DMG (122) y mayor frecuencia de corioamnionitis de origen bacteriano (123,195) lo que señala una asociación entre el descontrol metabólico de glucosa y el pobre control contra infecciones bacterianas.

Asimismo, evidencias *in vitro* e *in vivo* señalan que la hiperglucemia favorece la adhesión de *E. coli* a las células epiteliales. En 2015, Ozer y colaboradores identificaron que los AGE se pueden acumular en el uroepitelio de la vejiga de ratones diabéticos, lo que favorece la atracción y adhesión de UPEC fimbriada tipo 1 (196). Los autores identificaron que las lectinas son un sitio importante de adhesión epitelial para *E. coli*, y asimismo observaron que los AGE tienen una alta unión a estas lectinas; por lo tanto, el incremento de AGE debido a la hiperglucemia modifica los sitios de lectinas y les confiere mayor afinidad para *E. coli*. En este sentido, las mujeres con DMG y alto descontrol metabólico presentan niveles de AGE significativamente más altos con respecto a mujeres sin DMG (197). Adicionalmente, otro estudio en células uroepiteliales humanas demostró que la preincubación con glucosa aumenta la expresión y señalización de JAK/STAT1 y TLR4, lo que promueve el crecimiento y la infección por UPEC (198). Asimismo, vale la pena recordar que el trofoblasto placentario es de naturaleza epitelial, por lo que es un sitio afín a la infección por *E. coli*. En conjunto, estas evidencias podrían ayudar a explicar cómo la hiperglicemia favorece la adherencia y tropismo de *E. coli* por la placenta durante la gestación. Asimismo, estos resultados ayudan a explicar por qué las mujeres con DMG y altos niveles de glucosa son más propensas a las infecciones del tracto urinario.

En cuanto al efecto de la insulina y la metformina sobre el crecimiento y la invasividad bacteriana, en general se observó un efecto benéfico y protector con ambos hipoglucemiantes. El tratamiento con insulina o metformina en explantes preincubados con glucosa 50 mM disminuyó el número de colonias y la adherencia e invasividad de *E. coli* con respecto a los explantes preincubados con glucosa 50 mM y que no recibieron tratamiento.

Distintas evidencias experimentales sustentan el papel protector de la metformina contra la infección por bacterias. Por ejemplo, en pacientes diabéticos y con tuberculosis, el tratamiento con metformina redujo el crecimiento intracelular de

Mycobacterium tuberculosis, impidió el crecimiento de cepas resistentes a antibióticos, disminuyó la gravedad de la enfermedad y mejoró el control de ésta (199). Además, un estudio que examinó la función inmunomoduladora de la metformina en la infección por *Legionella pneumophila* en macrófagos demostró que este hipoglucemiante disminuye el crecimiento intracelular de esta bacteria de forma dependiente de la concentración y del tiempo (200). Asimismo, en este mismo estudio se reportó que ratones infectados con *Legionella pneumophila* y tratados con metformina mostraron una reducción significativa del número de bacterias en el pulmón. Por lo tanto, la metformina estimula la inmunidad innata para mejorar la defensa contra la infección por bacterias. Uno de los mecanismos de la metformina para reforzar la inmunidad innata es a través del aumento en la expresión de péptidos antimicrobianos, como la LL-37. Esta actividad fue reportada en células uroepiteliales en donde la metformina logró incrementar los niveles de LL-37 en los lisosomas (157). Asimismo, otra evidencia indica que la metformina también puede modificar el sentido de movimiento de *E. coli*; particularmente se observó que los quimiorreceptores *Tsr* de *E. coli* se unen a la metformina, promoviendo una acción de tipo repelente e inhibiendo su motilidad flagelar (201). Con base en nuestros datos, sugerimos que este fármaco también estimula una respuesta protectora por parte de la placenta lo que conlleva a la eliminación intra y extracelular de *E. coli*.

Por otra parte, en esta tesis demostramos que la insulina puede reducir de manera efectiva la infección por *E. coli* en la placenta humana de tercer trimestre. Esto concuerda con evidencia en otro modelo, en donde se demostró que la insulina disminuye la infección de UPEC en las células de la vejiga en un ambiente hiperglucémico por medio de la vía de señalización de JAK/STAT (149). Además, en un modelo de delección del receptor de insulina específicamente en los ductos renales en ratones diabéticos, se observó que la ausencia de este receptor resultó en mayor conteo de colonias de *E. coli* y mayor riesgo de ITU (146). Estas evidencias indican que la insulina, y su señalización celular, representan un eje fundamental en la defensa antibacteriana contra *E. coli*. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la insulina y la metformina ejercen efectos protectores contra la infección por *E. coli* en la placenta humana en condiciones de hiperglucemia. Tal como se describió en la literatura previamente citada, muchos de estos efectos protectores son

independientes del efecto hipoglucemiante de la insulina y la metformina, sin embargo, no se puede descartar otros efectos relacionados directamente con la disminución de las cifras de glucosa, lo que vale la pena explorar a futuro.

9.2. Respuesta inmune placentaria derivada del reto infeccioso por *E. coli*

Además de ser una barrera física, la placenta también es un órgano con actividad inmunológica capaz de responder a la infección mediante la síntesis de diversas quimiocinas, citocinas y péptidos antimicrobianos, como un mecanismo de defensa frente a las bacterias que llegan a invadir la interfase materno-fetal (202).

Tal como era esperado, observamos que la infección por *E. coli* en la placenta humana induce la secreción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β a las 4 y 8 h.p.i. La razón por la que se esperaba el aumento de citocinas inflamatorias en respuesta a la infección placentaria está relacionado con las vías de reconocimiento y señalización por las bacterias.

Particularmente, la activación del sistema inmunitario innato de la placenta por productos microbianos como el LPS (presente en la membrana de *E. coli*), desencadena la producción de citocinas pro-inflamatorias que es mediada en su mayoría por la señalización de TLRs/NF-kB; entre los TLRs, TLR4 es el principal receptor que reconoce bacterias Gram negativas. De esta forma, tras la unión del LPS al receptor TLR4, se activan cascadas de señalización que culminan en la producción de citocinas como TNF α , IL-1 β , IL-6, así como IFN tipo I (IFN- α , IFN- β , IFN- δ , entre otros), que son fundamentales para transmitir la respuesta inflamatoria y destruir al patógeno (203).

Sin embargo, y de manera interesante, en los explantes pretratados con glucosa 50 mM e infectados con *E. coli* se observó un comportamiento distinto en respuesta a la infección. La secreción de IL-1 β fue significativamente menor en los explantes infectados y pretratados con glucosa 50 mM con respecto a los explantes infectados y con glucosa control; las demás citocinas no mostraron cambios significativos. Nosotros hipotetizamos que el doble desafío de hiperglucemia más la infección

bacteriana desencadena una respuesta inmunosupresora, semejante a la respuesta homeostática inmunitaria denominada “Tolerancia a la endotoxina (TE)” (204).

La TE es una respuesta de las células inmunes que evita la sobreactivación innecesaria de la respuesta inflamatoria. Este mecanismo se describió tanto en macrófagos de ratón, como en ratas previamente expuestas al estímulo de LPS, en los que un segundo estímulo (por re-exposición al LPS) resultó en una capacidad reducida para producir citocinas inflamatorias (205,206). Se piensa que esta atenuación de la respuesta inflamatoria es un mecanismo de protección ante el daño citotóxico que podría resultar la generación de un ambiente inflamatorio exacerbado. Asimismo, también se ha descrito que el mecanismo de TE también puede ser originado por la exposición con estímulos cruzados. Por ejemplo, se observó la caída en la respuesta inflamatoria en macrófagos murinos expuestos al ácido lipoteicoico (que forma parte de la membrana de bacterias Gram positivas) y posteriormente expuestas al LPS (207,208). Por lo tanto, esta respuesta de tolerización no es exclusiva al LPS sino que parece ser generada por la sobreposición de estímulos inflamatorios. Finalmente, la TE es un fenómeno que no se limita a la sepsis, ya que se ha observado en otras patologías como el síndrome coronario agudo, cáncer y fibrosis quística, siendo un mecanismo de protección frente al choque séptico (209).

Por lo tanto, nosotros hipotetizamos que el estado hiperglucémico empleado en este modelo *in vitro* de DMG, resulta en un primer “hit” o golpe inflamatorio, mientras que la infección por *E. coli* representa el segundo “hit” inflamatorio. Como resultado de la TE, se produce un estado de tolerancia cruzada caracterizada por una baja producción de IL-1 β . Para reforzar esta teoría, en el laboratorio también se probó el doble estímulo placentario con hiperglucemia e infección por *S. agalactiae* (una bacteria Gram positiva común en las infecciones cervicovaginales), y se observó nuevamente el mecanismo de TE, pero en ese caso caracterizado por una baja producción de TNF- α e IL-6 (20). Por lo tanto, ésta es la primera evidencia en la que se plantea un nuevo mecanismo de tolerancia cruzada entre la infección por *E. coli* y la hiperglucemia, lo que resulta en la atenuación de la respuesta inflamatoria placentaria.

Para poder entender por qué la pre-exposición a hiperglucemia resulta en una disminuida síntesis de IL-1 β (y no de otras citocinas) en respuesta a la infección por

E. coli, vale la pena describir la producción, maduración y liberación de IL-1 β mediante el inflamasoma. El inflamasoma es un tipo de PRR de localización citoplasmática de la familia de los NLRP (NOD con dominios de pirina y repeticiones ricas en leucina). El inflamasoma mejor caracterizado es el NLRP3 que participa en la maduración y síntesis de IL-1 β . Brevemente, se requiere de dos señales para activar al inflamasoma NLRP3. En primer término, un antígeno inespecífico activa a NF κ B. Este factor de transcripción induce la expresión génica de NLRP3 y pro-IL-1 β . Posteriormente, y como segunda etapa, se activa el inflamasoma en respuesta a estímulos originados por PAMPs (como derivados bacterianos, fúngicos y virales), así como DAMPs estériles. La activación del inflamasoma induce la actividad proteolítica de la pro-caspasa-1, que a su vez corta un extremo de la pro-IL-1 β , para dar origen a la forma madura y biológicamente activa de IL-1 β (210).

Distintas evidencias soportan la idea del control de la síntesis de IL-1 β por el inflamasoma en ambientes altos en glucosa. Por ejemplo, la hiperglucemia favorece la producción de NLRP3, la pro-caspasa 1 e IL-1 β en el ventrículo izquierdo de ratones diabéticos (211). Por lo tanto, nosotros consideramos que la secreción disminuida de IL-1 β en la placenta hiperglucémica podría deberse a una inhibición en la formación del inflamasoma o bien por la inhibición de la caspasa 1 (20). Si bien esta interpretación se basa en múltiples modelos y revisión de la literatura científica, en realidad no ha sido desarrollada en el cultivo de explantes placentarios sometido a ambientes altos en glucosa. Por lo que, a modo de perspectiva a futuro, vale la pena su desarrollo experimental para comprobar estas hipótesis.

Con relación a los tratamientos con insulina y metformina, no se observó una respuesta diferencial respecto a los explantes infectados y pre-expuestos a glucosa 50 mM; únicamente mostraron diferencias significativas respecto a la condición de infección y glucosa 10 mM. Por lo tanto, la insulina y la metformina no fungieron como moduladores adicionales de la respuesta inflamatoria secundarios a la hiperglucemia y la infección por *E. coli*. Sin embargo, en un reporte previo de nuestro grupo de laboratorio se demostró que la insulina y la metformina sí actúan como antiinflamatorios en respuesta a la hiperglucemia en la placenta humana libre de infección (20).

10. CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros resultados demuestran que:

- a) La hiperglucemia favorece el crecimiento extracelular y la invasividad de *E. coli* en la vellosidad placentaria.
- b) El tratamiento con insulina o con metformina fortalece la defensa innata placentaria a través de disminuir el conteo de colonias de *E. coli* y limitar su adherencia e invasividad en la vellosidad.
- c) El doble estímulo inflamatorio por la hiperglucemia y la infección de *E. coli*, disminuye la secreción placentaria de IL-1 β , lo que podría estar relacionado con un mecanismo de Tolerancia a Endotoxina.
- d) El tratamiento con insulina y con metformina no modificó el perfil inflamatorio asociado a la infección + hiperglucemia.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la hiperglucemia es una condición que vulnera a las pacientes con DMG, aumentando el riesgo de infección placentaria, su crecimiento e invasividad. Por otro lado, la insulina y la metformina son inmunomoduladores eficaces y su administración podría mejorar resultados adversos maternos y fetales directamente relacionados con la infección en pacientes con DMG.

11. REFERENCIAS

1. Restrepo Ochoa O. Diabetes y embarazo - actualización. *Rev Colomb Obstet Ginecol*. 2000;51(1).
2. Baz B, Riveline JP, Gautier JF. Endocrinology of Pregnancy: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(2).
3. Dainelli L, Prieto-Patron A, Silva-Zolezzi I, Sosa-Rubi SG, Sosa SEY, Reyes-Muñoz E, et al. Screening and management of gestational diabetes in Mexico: results from a survey of multilocation, multi-health care institution practitioners. *Diabetes Metab Syndr Obes* [Internet]. 2018 [cited 2023 Mar 28];11:105. Available from: /pmc/articles/PMC5896662/
4. Sharma AK, Singh S, Singh H, Mahajan D, Kolli P, Mandadapu G, et al. Deep Insight of the Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. Vol. 11, *Cells*. MDPI; 2022.
5. Cerf ME. Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2013 [cited 2023 Aug 23];4(MAR). Available from: /pmc/articles/PMC3608918/
6. Abell SK, De Courten B, Boyle JA, Teede HJ. Inflammatory and Other Biomarkers: Role in Pathophysiology and Prediction of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* 2015, Vol 16, Pages 13442-13473 [Internet]. 2015 Jun 11 [cited 2023 Feb 1];16(6):13442–73. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/6/13442/htm>
7. Lekva T, Norwitz ER, Aukrust P, Ueland T. Impact of Systemic Inflammation on the Progression of Gestational Diabetes Mellitus. *Curr Diab Rep* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2023 Feb 1];16(4):1–11. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11892-016-0715-9>
8. Yockey LJ, Iwasaki A. Role of Interferons and Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. *Immunity* [Internet]. 2018 Sep 9 [cited 2023 Feb 1];49(3):397. Available from: /pmc/articles/PMC6152841/
9. De Jesús J, Gallego G. Infección urinaria durante el embarazo. *Memorias Curso De Actualización En Ginecología Y Obstetricia*. 2013;19:55.
10. Zboromyrska Y, De Cueto López M, Alonso-Tarrés C, Sánchez-Hellín V. 14b. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario [Internet]. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, editors. 2019 [cited 2023 Feb 1]. 1–78 p. Available from: www.seimc.org
11. Hengmei Z, Shenglang Z, Jiehui C, Yun Y, Yan H. Clinical characteristics and risk factors of urinary tract infection in patients with gestational diabetes mellitus. *Chinese Journal of Clinical Infectious Diseases*. 2018 Jun 28;11(3):179–85.
12. Nikathnasreen N, Yuvarani R. Study of Prevalence of Asymptomatic Bacteriuria in Gestationaldiabetes Mellitus. *Ann Rom Soc Cell Biol* [Internet]. 2021 Mar 27 [cited 2023 Feb 1];25:3368–80. Available from: <https://www.annalsofrscb.ro/index.php/journal/article/view/1837>
13. Hoo R, Nakimuli A, Vento-Tormo R. Innate Immune Mechanisms to Protect Against Infection at the Human Decidual-Placental Interface. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Sep 10 [cited 2023 Feb 25];11:2070. Available from: /pmc/articles/PMC7511589/

14. Yang L, Semmes EC, Ovies C, Megli C, Permar S, Gilner JB, et al. Innate immune signaling in trophoblast and decidua organoids defines differential antiviral defenses at the maternal-fetal interface. *Elife*. 2022 Aug 1;11.
15. Association AD. 14. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. *Diabetes Care* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Feb 1];43(Supplement_1):S183–92. Available from: https://diabetesjournals.org/care/article/43/Supplement_1/S183/30619/14-Management-of-Diabetes-in-Pregnancy-Standards
16. Patricia W, Torres R. Diabetes gestacional: fisiopatología, diagnóstico, tratamiento y nuevas perspectivas Resumen. [cited 2023 Feb 1]; Available from: <https://orcid.org/0000-0002-4592-8481>,
17. Picón-César MJ, Molina-Vega M, Suárez-Arana M, González-Mesa E, Sola-Moyano AP, Roldan-López R, et al. Metformin for gestational diabetes study: metformin vs insulin in gestational diabetes: glycemic control and obstetrical and perinatal outcomes: randomized prospective trial. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Feb 1];225(5):517.e1-517.e17. Available from: <http://www.ajog.org/article/S0002937821004592/fulltext>
18. Committee on Practice Bulletins - Obstetrics. ACOG Practice Bulletin Number 190: Gestational Diabetes Mellitus Interim Update. *Obstetrics & Gynecology*. 2018;131(180).
19. Schäfer-Graf UM, Gembruch U, Kainer F, Groten T, Hummel S, Hösl I, et al. Gestational Diabetes Mellitus (GDM) - Diagnosis, Treatment and Follow-Up. Guideline of the DDG and DGGG (S3 Level, AWMF Registry Number 057/008, February 2018). *Geburtshilfe Frauenheilkd* [Internet]. 2018 [cited 2023 Mar 4];78(12):1219–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30651660/>
20. Jiménez-Escutia R, Vargas-Alcantar D, Flores-Espinosa P, Helguera-Repetto AC, Villavicencio-Carrisoza O, Mancilla-Herrera I, et al. High Glucose Promotes Inflammation and Weakens Placental Defenses against *E. coli* and *S. agalactiae* Infection: Protective Role of Insulin and Metformin. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Mar 9 [cited 2023 Apr 18];24(6):5243. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/6/5243/htm>
21. Johnson MS, Jackson DL, Schust DJ. Endocrinology of Pregnancy. *Encyclopedia of Reproduction* [Internet]. 2021 Mar 18 [cited 2023 Aug 18];469–76. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278962/>
22. Pascual ZN, Langaker MD. Physiology, Pregnancy. *StatPearls* [Internet]. 2023 May 16 [cited 2023 Jul 19]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559304/>
23. Balasundaram P, Farhana A. Immunology at the Maternal-Fetal Interface. *Textbook of Perinatal Medicine* [Internet]. 2023 Apr 16 [cited 2023 Jul 19];988–96. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574542/>
24. von Rango U. Fetal tolerance in human pregnancy—A crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. *Immunol Lett*. 2008 Jan 15;115(1):21–32.
25. Rackaityte E, Halkias J. Mechanisms of Fetal T Cell Tolerance and Immune Regulation. *Front Immunol*. 2020 Apr 9;11:518221.
26. Hackmon R, Pinnaduwage L, Zhang J, Lye SJ, Geraghty DE, Dunk CE. Definitive class I human leukocyte antigen expression in gestational placentation: HLA-F, HLA-E, HLA-C,

and HLA-G in extravillous trophoblast invasion on placentation, pregnancy, and parturition. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2017 Jun 1;77(6).

27. Ander SE, Diamond MS, Coyne CB. Immune responses at the maternal-fetal interface. *Sci Immunol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Jul 19];4(31). Available from: [/pmc/articles/PMC6744611/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32744611/)
28. Dunk CE, Bucher M, Zhang J, Hayder H, Geraghty DE, Lye SJ, et al. Human leukocyte antigen HLA-C, HLA-G, HLA-F, and HLA-E placental profiles are altered in early severe preeclampsia and preterm birth with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol*. 2022 Oct 1;227(4):641.e1-641.e13.
29. Aisagbonhi O, Morris GP. Human Leukocyte Antigens in Pregnancy and Preeclampsia. *Front Genet*. 2022 Apr 27;13:884275.
30. Lin XX, Xie YM, Zhao SJ, Liu CY, Mor G, Liao AH. Human leukocyte antigens: the unique expression in trophoblasts and their crosstalk with local immune cells. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jul 19];18(10):4043–52. Available from: <https://www.ijbs.com//creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
31. Semmes EC, Coyne CB. Innate immune defenses at the maternal-fetal interface. *Curr Opin Immunol*. 2022 Feb 1;74:60–7.
32. Olmos-ortiz A, Flores-espinoza P, Díaz L, Velázquez P, Ramírez-isarraraz C, Zaga-clavellina V. Immunoendocrine Dysregulation during Gestational Diabetes Mellitus: The Central Role of the Placenta. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 8087 [Internet]. 2021 Jul 28 [cited 2023 Apr 10];22(15):8087. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/15/8087/htm>
33. Hussain T, Murtaza G, Kalhoro DH, Kalhoro MS, Yin Y, Chughtai MI, et al. Understanding the Immune System in Fetal Protection and Maternal Infections during Pregnancy. *J Immunol Res* [Internet]. 2022 [cited 2023 Apr 13];2022. Available from: [/pmc/articles/PMC9249541/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36249541/)
34. Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Development (Cambridge)* [Internet]. 2019 Nov 15 [cited 2023 Apr 16];146(22). Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/146/22/dev163428/223131/Development-of-the-human-placenta>
35. Herrick EJ, Bordoni B. Embryology, Placenta. *StatPearls* [Internet]. 2022 May 8 [cited 2023 Apr 16]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551634/>
36. Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage TKJB, James J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2019 76:18 [Internet]. 2019 May 3 [cited 2023 Apr 16];76(18):3479–96. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-019-03104-6>
37. Burton GJ, Jauniaux E. Early Development of the Human Placenta. *Benirschke's Pathology of the Human Placenta* [Internet]. 2022 [cited 2023 Apr 16];39–57. Available from: [https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/chapter/10.1007/978-3-030-84725-8_5](https://link.springer-com.pbidi.unam.mx:2443/chapter/10.1007/978-3-030-84725-8_5)
38. Lecarpentier E, Fournier T, Guibourdenche J, Gil S, Tsatsaris V. La placenta humana. *EMC - Ginecología-Obstetricia*. 2015;51(3).
39. Silini AR, Di Pietro R, Lang-Olip I, Alviano F, Banerjee A, Basile M, et al. Perinatal Derivatives: Where Do We Stand? A Roadmap of the Human Placenta and Consensus

- for Tissue and Cell Nomenclature. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 Dec 17 [cited 2023 Aug 18];8. Available from: [/pmc/articles/PMC7773933/](https://pmc/articles/PMC7773933/)
40. Kojima J, Ono M, Kuji N, Nishi H. Human Chorionic Villous Differentiation and Placental Development. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2023 Aug 18];23(14). Available from: [/pmc/articles/PMC9325306/](https://pmc/articles/PMC9325306/)
 41. Ding J, Maxwell A, Adzibolusu N, Hu A, You Y, Liao A, et al. Mechanisms of immune regulation by the placenta: Role of type I interferon and interferon-stimulated genes signaling during pregnancy*. *Immunol Rev* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2023 Apr 13];308(1):9–24. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.pbidi.unam.mx:2443/doi/full/10.1111/imr.13077>
 42. Semmes EC, Coyne CB. Innate immune defenses at the maternal-fetal interface. *Curr Opin Immunol*. 2022 Feb 1;74:60–7.
 43. Hussain T, Murtaza G, Kalhoro DH, Kalhoro MS, Yin Y, Chughtai MI, et al. Understanding the Immune System in Fetal Protection and Maternal Infections during Pregnancy. *J Immunol Res*. 2022;2022.
 44. Riley JK, Nelson DM. Toll-like receptors in pregnancy disorders and placental dysfunction. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2010 Dec 29 [cited 2023 Feb 25];39(3):185–93. Available from: <https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/article/10.1007/s12016-009-8178-2>
 45. Kramann N, Menken L, Hayardeny L, Hanisch UK, Brück W. Laquinimod prevents cuprizone-induced demyelination independent of Toll-like receptor signaling. *Neuro Immunol Neuroinflamm*. 2016 Jun 1;3(3).
 46. Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin* [Internet]. 2007 Mar [cited 2023 Jul 26];45(2):27. Available from: [/pmc/articles/PMC2785020/](https://pmc/articles/PMC2785020/)
 47. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced Science* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2023 Jul 26];8(15):2004433. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/advs.202004433>
 48. Revisión A DE, Samael Olascoaga-Del Angel Grecia Sánchez-Evangelista Israel Carmona-Navarrete María del Carmen Galicia-Sanchez Angélica Gómez-Luna Susan Janneth Islas-Arollo Jorge Ismael Castañeda-Sánchez K, Ismael Castañeda-Sánchez J. Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas Péptidos antimicrobianos de humanos. Primera publicación en *Gac Med Mex* [Internet]. 2018 [cited 2023 Aug 18];154(6):681–8. Available from: www.karger.com/kxn
 49. Olmos-ortiz A, Flores-espinoza P, Díaz L, Velázquez P, Ramírez-isarraraz C, Zaga-clavellina V. Immunoendocrine dysregulation during gestational diabetes mellitus: The central role of the placenta. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
 50. McElwain CJ, McCarthy FP, McCarthy CM. Gestational diabetes mellitus and maternal immune dysregulation: What we know so far. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
 51. Zhuang W, Lv J, Liang Q, Chen W, Zhang S, Sun X. Adverse effects of gestational diabetes-related risk factors on pregnancy outcomes and intervention measures. *Exp Ther Med* [Internet]. 2020 Jul 27 [cited 2023 Apr 10];20(4):3361. Available from: [/pmc/articles/PMC7444321/](https://pmc/articles/PMC7444321/)

52. Ye W, Luo C, Huang J, Li C, Liu Z, Liu F. Gestational diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ* [Internet]. 2022 May 25 [cited 2023 Apr 10];377. Available from: <https://www.bmj.com/content/377/bmj-2021-067946>
53. Murray SR, Reynolds RM. Short- and long-term outcomes of gestational diabetes and its treatment on fetal development. *Prenat Diagn.* 2020;40(9).
54. Szmuiłowicz ED, Josefson JL, Metzger BE. Gestational Diabetes Mellitus. Vol. 48, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* W.B. Saunders; 2019. p. 479–93.
55. Cortada ÁP, Iglesias Platas I. Hipoglucemia neonatal. *Anales de Pediatría Continuada* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2023 Aug 26];11(3):142–51. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-anales-pediatría-continuada-51-articulo-hipoglucemia-neonatal-S1696281813701306>
56. Perichart-Perera O, Mier-Cabrera J, Flores-Robles CM, Martínez-Cruz N, Arce-Sánchez L, Alvarado-Maldonado IN, et al. Intensive medical nutrition therapy alone or with added metformin to prevent gestational diabetes mellitus among high-risk mexican women: A randomized clinical trial. *Nutrients.* 2022;14(1).
57. DOF - Diario Oficial de la Federación [Internet]. [cited 2023 Aug 18]. Available from: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5521405&fecha=03/05/2018#gsc.tab=0
58. DOF - Diario Oficial de la Federación [Internet]. [cited 2023 Apr 10]. Available from: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5521405&fecha=03/05/2018#gsc.tab=0
59. Subsecretaría de Prevención y Promoción a la Salud. Diabetes y embarazo. Lineamiento técnico. Secretaría de Salud. 2017;
60. Dainelli L, Prieto-Patron A, Silva-Zolezzi I, Sosa-Rubi SG, Sosa SEY, Reyes-Muñoz E, et al. Screening and management of gestational diabetes in Mexico: Results from a survey of multilocation, multi-health care institution practitioners. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2018;11.
61. Reyes-Muñoz E, Parra A, Castillo-Mora A, Ortega-González C. Effect of the diagnostic criteria of the international association of diabetes and pregnancy study groups on the prevalence of gestational diabetes mellitus in urban mexican women: A cross-sectional study. *Endocrine Practice.* 2012;18(2).
62. Dainelli L, Prieto-Patron A, Silva-Zolezzi I, Sosa-Rubi SG, Sosa SEY, Reyes-Muñoz E, et al. Screening and management of gestational diabetes in Mexico: Results from a survey of multilocation, multi-health care institution practitioners. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2018;11:105–16.
63. Datos Abiertos de México - Causas de morbilidad hospitalaria de INPER [Internet]. [cited 2023 Apr 10]. Available from: <https://datos.gob.mx/busca/dataset/causas-de-morbilidad-hospitalaria-de-inper>
64. HinojosaHernández M, HernándezAldana F, EF Barrera Tenorio, MT Gayosso Martínez. Prevalencia de diabetes mellitus gestacional en el Hospital Juárez de México. *Rev Hosp Jua Mex.* 2010;77(2).
65. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición [Internet]. [cited 2023 Apr 10]. Available from: <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanutcontinua2021/informes.php>

66. Bello-Chavolla OY, Rojas-Martinez R, Aguilar-Salinas CA, Hernández-Avila M. Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico. *Nutr Rev* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2023 Apr 10];75(suppl 1):4–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28049745/>
67. Medina-Pérez EA, Sánchez-Reyes A, Hernández-Peredo AR, Martínez-López MA, Jiménez-Flores CN, Serrano-Ortiz I, et al. Diabetes gestacional. Diagnóstico y tratamiento en el primer nivel de atención. *Medicina Interna de Mexico*. 2017;33(1).
68. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. 2018.
69. Moyce BL, Dolinsky VW. Maternal β -Cell adaptations in pregnancy and placental signalling: Implications for gestational diabetes. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. 2018.
70. Lorenzo PI, Martín-Montalvo A, Vuilleumier NC, Gauthier BR. Molecular modelling of islet β -cell adaptation to inflammation in pregnancy and gestational diabetes mellitus. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. 2019.
71. Pantham P, Aye ILMH, Powell TL. Inflammation in Maternal Obesity and Gestational Diabetes Mellitus. *Placenta* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2023 Apr 10];36(7):709. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4466145/>
72. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Apr 10];18(1):1. Available from: </pmc/articles/PMC3951818/>
73. Shen CY, Lu CH, Wu CH, Li KJ, Kuo YM, Hsieh SC, et al. The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases. *Molecules* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Apr 10];25(23):5591. Available from: </pmc/articles/PMC7729569/>
74. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Apr 10];2(1):411. Available from: </pmc/articles/PMC3949097/>
75. Nedić O, Rattan SIS, Grune T, Trougakos IP. Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. <http://dx.doi.org/10.3109/107157622013806798> [Internet]. 2013 Aug [cited 2023 Apr 10];47(S1):28–38. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10715762.2013.806798>
76. Sisay M, Edessa D, Ali T, Mekuria AN, Gebrie A. The relationship between advanced glycation end products and gestational diabetes: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Apr 10];15(10). Available from: </pmc/articles/PMC7577486/>
77. Mengstie MA, Chekol Abebe E, Behaile Teklemariam A, Tilahun Mulu A, Agidew MM, Teshome Azezew M, et al. Endogenous advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic diabetic complications. *Front Mol Biosci*. 2022 Sep 15;9:1042.
78. Kawaharada R, Masuda H, Chen Z, Blough E, Kohama T, Nakamura A. Intrauterine hyperglycemia-induced inflammatory signalling via the receptor for advanced glycation end products in the cardiac muscle of the infants of diabetic mother rats. *Eur J Nutr* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Apr 10];57(8):2701–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28942514/>

79. Oskovi-Kaplan ZA, Ozgu-Erdinc AS. Management of Gestational Diabetes Mellitus. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2021 [cited 2023 Apr 10];1307:257–72. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/5584_2020_552
80. Moses RG, Morris GJ, Petocz P, Sangil F, Garg D. The impact of potential new diagnostic criteria on the prevalence of gestational diabetes mellitus in Australia. *Med J Aust* [Internet]. 2011 [cited 2023 Apr 10];194(7):338–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21470082/>
81. Subiabre M, Villalobos-Labra R, Silva L, Fuentes G, Toledo F, Sobrevia L. Role of insulin, adenosine, and adipokine receptors in the foetoplacental vascular dysfunction in gestational diabetes mellitus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2020 Feb 1;1866(2):165370.
82. Vargas E, Joy N V., Sepulveda MAC. Biochemistry, Insulin Metabolic Effects. *StatPearls* [Internet]. 2022 Sep 26 [cited 2023 Apr 10]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525983/>
83. Cruz-Pineda WD, Parra-Rojas I, Rodríguez-Ruíz HA, Illades-Aguiar B, Matia-García I, Garibay-Cerdenares OL. The regulatory role of insulin in energy metabolism and leukocyte functions. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2023 Apr 10];111(1):197–208. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/JLB.2RU1220-847R>
84. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev* [Internet]. 2018 Oct 10 [cited 2023 Apr 10];98(4):2133. Available from: </pmc/articles/PMC6170977/>
85. Massimino M, Sciacca L, Parrinello NL, Scalisi NM, Belfiore A, Vigneri R, et al. Insulin Receptor Isoforms Differently Regulate Cell Proliferation and Apoptosis in the Ligand-Occupied and Unoccupied State. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 8729 [Internet]. 2021 Aug 13 [cited 2023 Apr 10];22(16):8729. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/16/8729/htm>
86. Gallagher EJ, LeRoith D. Insulin Mechanisms/Metabolic Actions. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*. 2013 Jan 1;602–7.
87. Sesti G, Tullio AN, D'Alfonso R, Napolitano ML, Marini MA, Borboni P, et al. Tissue-specific expression of two alternatively spliced isoforms of the human insulin receptor protein. *Acta Diabetol*. 1994;31(2).
88. Pérez-Pérez A, Maymó J, Gambino Y, Guadix P, Dueñas JL, Varone C, et al. Insulin enhances leptin expression in human trophoblastic cells. *Biol Reprod*. 2013;89(1).
89. Desoye G, Hauguel-De Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes mellitus: The insulin and cytokine network. *Diabetes Care*. 2007;30(SUPPL. 2).
90. Desoye G, Hahn T, Hartmann M, Blaschitz A, Dohr G, Kohnen G, et al. Insulin receptors in syncytiotrophoblast and fetal endothelium of human placenta. Immunohistochemical evidence for developmental changes in distribution pattern. *Histochemistry*. 1994;101(4).
91. Hiden U, Maier A, Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Wadsack C, Lang I, et al. Insulin control of placental gene expression shifts from mother to foetus over the course of pregnancy. *Diabetologia*. 2006;49(1).
92. Hiden U, Glitzner E, Hartmann M, Desoye G. Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. In: *Journal of Anatomy*. 2009.

93. Sandoval L. La activación del Receptor para el factor liberador de corticotropina tipo1 (CRF1) estimula la vías PI3K/Akt y MAPK, involucradas en la señalización de la insulina. [Ciudad de México]: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; 2015.
94. Jorquera G, Echiburú B, Crisosto N, Sotomayor-Zárate R, Maliqueo M, Cruz G. Metformin during Pregnancy: Effects on Offspring Development and Metabolic Function. *Front Pharmacol.* 2020 Jun 17;11:653.
95. Nguyen L, Chan SY, Teo AKK. Metformin from mother to unborn child – Are there unwarranted effects? *EBioMedicine* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2023 Apr 16];35:394. Available from: [/pmc/articles/PMC6156706/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32111111/)
96. Woudes TA, Battin M, Coat S, Rush EC, Hague WM, Rowan JA. Neurodevelopmental outcome at 2 years in offspring of women randomised to metformin or insulin treatment for gestational diabetes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2016;101(6).
97. Brzozowska MM, Puvanendran A, Bliuc D, Zuschmann A, Piotrowicz AK, O'Sullivan A. Predictors for pharmacological therapy and perinatal outcomes with metformin treatment in women with gestational diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 Jan 30;14.
98. Li C, Gao C, Zhang X, Zhang L, Shi H, Jia X. Comparison of the effectiveness and safety of insulin and oral hypoglycemic drugs in the treatment of gestational diabetes mellitus: a meta-analysis of 26 randomized controlled trials. Vol. 38, *Gynecological Endocrinology.* 2022.
99. Picón-César MJ, Molina-Vega M, Suárez-Arana M, González-Mesa E, Sola-Moyano AP, Roldan-López R, et al. Metformin for gestational diabetes study: metformin vs insulin in gestational diabetes: glycemic control and obstetrical and perinatal outcomes: randomized prospective trial. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Apr 10];225(5):517.e1-517.e17. Available from: <https://www.ajog.org/article/S0002937821004592/fulltext>
100. Wang DS, Jonker JW, Kato Y, Kusuhara H, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement of Organic Cation Transporter 1 in Hepatic and Intestinal Distribution of Metformin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2023 May 2];302(2):510–5. Available from: <https://jpet.aspetjournals.org/content/302/2/510>
101. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest* [Internet]. 2007 May 1 [cited 2023 May 2];117(5):1422–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17476361/>
102. He L, Wondisford FE. Metformin Action: Concentrations Matter. *Cell Metab.* 2015 Feb 3;21(2):159–62.
103. Lee N, Hebert MF, Wagner DJ, Easterling TR, Liang CJ, Rice K, et al. Organic cation Transporter 3 facilitates fetal exposure to metformin during pregnancy. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 May 2];94(4):1125–31. Available from: [/pmc/articles/PMC6108571/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32111111/)
104. Overgaard MD, Duvald CS, Vendelbo MH, Pedersen SB, Jakobsen S, Alstrup AKO, et al. Biodistribution of [11C]-Metformin and mRNA Expression of Placentae Metformin Transporters in the Pregnant Chinchilla. *Contrast Media Mol Imaging.* 2019;2019.
105. Ahmadimoghaddam D, Zemankova L, Nachtigal P, Dolezelova E, Neumanova Z, Cerveny L, et al. Organic cation transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and multidrug and toxin

- extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) transporter in the placenta and fetal tissues: Expression profile and fetus protective role at different stages of gestation. *Biol Reprod.* 2013;88(3).
106. Hasegawa N, Furugen A, Ono K, Koishikawa M, Miyazawa Y, Nishimura A, et al. Cellular uptake properties of lamotrigine in human placental cell lines: Investigation of involvement of organic cation transporters (SLC22A1–5). *Drug Metab Pharmacokinet.* 2020;35(3).
 107. Lee N, Hebert MF, Prasad B, Easterling TR, Kelly EJ, Unadkat JD, et al. Effect of gestational age on mRNA and protein expression of polyspecific organic cation transporters during pregnancy. *Drug Metabolism and Disposition.* 2013;41(12).
 108. Priya G, Kalra S. Metformin in the management of diabetes during pregnancy and lactation. *Drugs Context [Internet].* 2018 [cited 2023 Apr 16];7. Available from: </pmc/articles/PMC6012930/>
 109. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia [Internet].* 2017 Sep 1 [cited 2023 Apr 16];60(9):1577. Available from: </pmc/articles/PMC5552828/>
 110. Foretz M, Guigas B, Viollet B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. Vol. 15, *Nature Reviews Endocrinology.* 2019.
 111. Vista de Infección urinaria durante el embarazo [Internet]. [cited 2023 Apr 10]. Available from: https://revistas.udea.edu.co/index.php/ginecologia_y_obstetricia/article/view/17723/15247
 112. Yefet E, Bejerano A, Iskander R, Zilberman Kimhi T, Nachum Z. The Association between Gestational Diabetes Mellitus and Infections in Pregnancy—Systematic Review and Meta-Analysis. *Microorganisms* 2023, Vol 11, Page 1956 [Internet]. 2023 Jul 31 [cited 2023 Sep 18];11(8):1956. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/8/1956/htm>
 113. ZHU H, ZHU S, CHEN J, YANG Y, HE Y. Clinical characteristics and risk factors of urinary tract infection in patients with gestational diabetes mellitus. *Chinese Journal of Clinical Infectious Diseases [Internet].* 2018 [cited 2023 Apr 10];179–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2018.03.004>
 114. Prevalence and Associated Factors of Urinary Tract Infections among Diabetic Patients [Internet]. [cited 2023 Apr 10]. Available from: <https://www.itmedicalteam.pl/articles/prevalence-and-associated-factors-of-urinary-tract-infections-among-diabetic-patients-106100.html>
 115. al-issa M, Moad Ben Jabal Hospital Jordan G. Urinary Tract Infection among Pregnant Women in North Jordan. *WORLD FAMILY MEDICINE/MIDDLE EAST JOURNAL OF FAMILY MEDICINE.* 2017;15(8).
 116. Balachandran L, Jacob L, Awadhi R Al, Yahya LO, Catroon KM, Soundararajan LP, et al. Urinary Tract Infection in Pregnancy and Its Effects on Maternal and Perinatal Outcome: A Retrospective Study. *Cureus [Internet].* 2022 Jan 22 [cited 2023 Apr 10];14(1). Available from: <https://www.cureus.com/articles/77265-urinary-tract-infection-in-pregnancy-and-its-effects-on-maternal-and-perinatal-outcome-a-retrospective-study>
 117. Yan L, Jin Y, Hang H, Yan B. The association between urinary tract infection during pregnancy and preeclampsia: A meta-analysis. *Medicine (United States) [Internet].* 2018 Sep 1 [cited 2023 Apr 10];97(36). Available from: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2018/09070/The_association_between_urinary_tract_infection.66.aspx

118. Egbe TO, Omarine N, Henri E, Francine WWCD, Egbe DN, Enow-Orock GE, et al. Uropathogens of Urinary Tract Infection in Pregnancy and Maternal-Fetal Outcomes at the Douala Referral Hospital, Cameroon: A Case-Control Study. *Open J Obstet Gynecol* [Internet]. 2020 Jul 2 [cited 2023 Apr 10];10(7):914–29. Available from: <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=101595>
119. Mekapogu NP, Gundela S, Avula RD. Diabetes Mellitus has no Significant Influence on the Prevalence of Antenatal Asymptomatic Bacteriuria. *J Clin Diagn Res* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2023 Apr 10];10(4):DC16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111110/>
120. Vista de Infecciones del tracto urinario en mujeres embarazadas | *Revista Medica Sinergia* [Internet]. [cited 2023 Apr 10]. Available from: <https://revistamedicasinergia.com/index.php/rms/article/view/482/842>
121. Rafat D, Singh S, Nawab T, Khan F, Khan AU, Khalid S. Association of vaginal dysbiosis and gestational diabetes mellitus with adverse perinatal outcomes. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2023 Apr 10];158(1):70–8. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.pbidi.unam.mx:2443/doi/full/10.1002/ijgo.13945>
122. Rafat D, Singh S, Nawab T, Khan F, Khan AU, Khalid S. Association of vaginal dysbiosis and gestational diabetes mellitus with adverse perinatal outcomes. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2023 Apr 10];158(1):70–8. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.pbidi.unam.mx:2443/doi/full/10.1002/ijgo.13945>
123. Zhang X, Liao Q, Wang F, Li D. Association of gestational diabetes mellitus and abnormal vaginal flora with adverse pregnancy outcomes. *Medicine* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2023 Apr 10];97(34). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30142788/>
124. Cortez R V., Taddei CR, Sparvoli LG, Ângelo AGS, Padilha M, Mattar R, et al. Microbiome and its relation to gestational diabetes. *Endocrine* [Internet]. 2019 May 15 [cited 2023 Apr 10];64(2):254–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30421135/>
125. Pakbin B, Brück WM, Rossen JWA. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 9922 [Internet]. 2021 Sep 14 [cited 2023 Apr 12];22(18):9922. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/18/9922/htm>
126. Cundon CC, Ameal A, Maubecín E, Bentancor A. Caracterización de cepas patógenas extraintestinales de *Escherichia coli* aisladas de perros y gatos de compañía de Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2018 Jul 1;50(3):290–4.
127. María R, Santoyo R, Reyes CF, Elena L, Rodríguez V. Características de patogenicidad en *Escherichia coli* aislada de tracto intestinal. *Investigación Científica* [Internet]. 2020 [cited 2023 Apr 12];14(2):62–6. Available from: <https://revistas.uaz.edu.mx/index.php/investigacioncientifica/article/view/975>
128. Brumbaugh AR, Mobley HL. Preventing urinary tract infection: Progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. Vol. 11, *Expert Review of Vaccines*. 2012.
129. Shah C, Baral R, Bartaula B, Shrestha LB. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiol* [Internet]. 2019 Sep 2 [cited 2023 Apr 12];19(1):1–6. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-019-1587-3>

130. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int J Nephrol* [Internet]. 2012 [cited 2023 Apr 12];2012:15. Available from: [/pmc/articles/PMC3312279/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23312279/)
131. Parvez SA, Rahman D, Parvez SA, Rahman D. Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli*. *Microbiology of Urinary Tract Infections - Microbial Agents and Predisposing Factors* [Internet]. 2018 Nov 15 [cited 2023 Apr 12]; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/63203>
132. Baby S, Kumar Karnaker V, K GR, Professor A. Adhesins of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). *Review Article International Journal of Medical Microbiology and Tropical Diseases*. 2(1):10–8.
133. María L, González J. Evaluación de la capacidad de *Escherichia coli* uropatogénica de aislamientos clínicos de formar biofilms y comunidades bacterianas intracelulares y la efectividad de diferentes antibióticos. 2018;
134. Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* | IntechOpen [Internet]. [cited 2023 Apr 12]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/78395>
135. Aldapa-Vega G, Pastelín-Palacios R, Isibasi A, Moreno-Eutimio MA, López-Macías C. Modulación de la respuesta inmune por los lipopolisacáridos bacterianos. *Rev Alerg Mex* [Internet]. 2016 Aug 27 [cited 2023 Apr 12];63(3):293–302. Available from: <https://revistaalergia.mx/ojs/index.php/ram/article/view/207>
136. Luna-Pineda VM, Ochoa S, Cruz-Córdova A, Cázares-Domínguez V, Vélez-González F, Hernández-Castro R, et al. Infecciones del tracto urinario, inmunidad y vacunación. *Bol Med Hosp Infant Mex* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2023 Apr 12];75(2):67–78. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext_plus&pid=S1665-11462018000200067&lng=es&tlng=es&nrm=iso
137. Aldapa-Vega G, Pastelín-Palacios R, Isibasi A, Moreno-Eutimio MA, López-Macías C. Modulación de la respuesta inmune por los lipopolisacáridos bacterianos. *Rev Alerg Mex* [Internet]. 2016 Aug 27 [cited 2023 Mar 28];63(3):293–302. Available from: <https://revistaalergia.mx/ojs/index.php/ram/article/view/207>
138. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014 Sep 25;5(SEP):461.
139. Fuentes V. Señalización mediada por receptores tipo Toll: regulación y evasión
FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE TRABAJO FIN DE GRADO TÍTULO: Señalización mediada por receptores tipo Toll: regulación y evasión. [Madrid]: Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid; 2017.
140. Lannoy V, Côté-Biron A, Asselin C, Rivard N. Phosphatases in toll-like receptors signaling: the unfairly-forgotten. Vol. 19, *Cell Communication and Signaling*. 2021.
141. Ghanim H, Mohanty P, Deopurkar R, Sia CL, Korzeniewski K, Abuaysheh S, et al. Acute Modulation of Toll-Like Receptors by Insulin. *Diabetes Care* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2023 Jul 25];31(9):1827–31. Available from: <https://dx.doi.org/10.2337/dc08-0561>
142. Inayat H, Azim MK, Baloch AA. Analysis of Inflammatory Gene Expression Profile of Peripheral Blood Leukocytes in Type 2 Diabetes. *Immunol Invest*. 2019 Aug 18;48(6):618–31.
143. Zhu Z, Hu T, Wang Z, Wang J, Liu R, Yang Q, et al. Anti-inflammatory and organ protective effect of insulin in scalded MODS rats without controlling hyperglycemia. *Am J Emerg Med*. 2018 Feb 1;36(2):202–7.

144. Jeschke MG, Klein D, Bolder U, Einspanier R. Insulin Attenuates the Systemic Inflammatory Response in Endotoxemic Rats. *Endocrinology* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2023 Jul 25];145(9):4084–93. Available from: <https://dx.doi.org/10.1210/en.2004-0592>
145. Brix-Christensen V, Andersen SK, Andersen R, Mengel A, Dyhr T, Andersen NT, et al. Acute Hyperinsulinemia Restrains Endotoxin-induced Systemic Inflammatory Response An Experimental Study in a Porcine Model. *Anesthesiology* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2023 Jul 25];100(4):861–70. Available from: <https://dx.doi.org/10.1097/00000542-200404000-00016>
146. Murtha MJ, Eichler T, Bender K, Metheny J, Li B, Schwaderer AL, et al. Insulin receptor signaling regulates renal collecting duct and intercalated cell antibacterial defenses. *J Clin Invest* [Internet]. 2018 Dec 3 [cited 2023 Jun 21];128(12):5634–46. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI98595DS1>
147. Aljada A, Ghanim H, Saadeh R, Dandona P. Insulin inhibits NFkappaB and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2023 Jul 25];86(1):450–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11232040/>
148. Leffler M, Hrach T, Stuerzl M, Horch RE, Herndon DN, Jeschke MG. Insulin Attenuates Apoptosis and Exerts Anti-Inflammatory Effects in Endotoxemic Human Macrophages. *Journal of Surgical Research* [Internet]. 2007 Dec 1 [cited 2023 Jul 25];143(2):398–406. Available from: <http://www.journalofsurgicalresearch.com/article/S002248040700039X/fulltext>
149. Ho CH, Liu SP, Fan CK, Tzou KY, Wu CC, Cheng PC. Insulin downregulated the infection of uropathogenic escherichia coli (UPEC) in bladder cells in a high-glucose environment through JAK/STAT signaling pathway. *Microorganisms* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Jun 21];9(12):2421. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/12/2421/htm>
150. van Niekerk G, Christowitz C, Conradie D, Engelbrecht AM. Insulin as an immunomodulatory hormone. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020 Apr 1;52:34–44.
151. Bulatova N, Kasabri V, Qotineh A, AL-Athami T, Yousef AM, AbuRuz S, et al. Effect of metformin combined with lifestyle modification versus lifestyle modification alone on proinflammatory-oxidative status in drug-naïve pre-diabetic and diabetic patients: A randomized controlled study. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2018 May 1;12(3):257–67.
152. de Souza Teixeira AA, Souza CO, Biondo LA, Sanches Silveira L, Lima EA, Batatinha HA, et al. Short-term treatment with metformin reduces hepatic lipid accumulation but induces liver inflammation in obese mice. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2023 Jul 25];26(4):1103–15. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10787-018-0443-7>
153. Jing Y, Wu F, Li D, Yang L, Li Q, Li R. Metformin improves obesity-associated inflammation by altering macrophages polarization. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2018 Feb 5 [cited 2023 Jul 25];461:256–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28935544/>
154. Peixoto LG, Teixeira RR, Vilela DD, Barbosa LN, Caixeta DC, Deconte SR, et al. Metformin attenuates the TLR4 inflammatory pathway in skeletal muscle of diabetic rats. *Acta Diabetol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2023 Jul 25];54(10):943–51. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00592-017-1027-5>

155. De Araújo AA, Pereira ADSBF, De Medeiros CACX, Brito GADC, Leitão RFDC, Araújo LDS, et al. Effects of metformin on inflammation, oxidative stress, and bone loss in a rat model of periodontitis. *PLoS One* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2023 Jul 25];12(8). Available from: [/pmc/articles/PMC5573680/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35573680/)
156. Han J, Li Y, Liu X, Zhou T, Sun H, Edwards P, et al. Metformin suppresses retinal angiogenesis and inflammation in vitro and in vivo. *PLoS One* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2023 Jul 25];13(3):e0193031. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0193031>
157. Majhi RK, Mohanty S, Kamolvit W, White JK, Scheffschick A, Brauner H, et al. Metformin strengthens uroepithelial immunity against *E. coli* infection. *Scientific Reports* 2021 11:1 [Internet]. 2021 Sep 28 [cited 2023 Jun 21];11(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-98223-1>
158. Han CS, Herrin MA, Pitruzzello MC, Mulla MJ, Werner EF, Pettker CM, et al. Glucose and metformin modulate human first trimester trophoblast function: a model and potential therapy for diabetes-associated uteroplacental insufficiency. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2023 Jul 25];73(4):362–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25394884/>
159. Malik F, Mehdi SF, Ali H, Patel P, Basharat A, Kumar A, et al. Is metformin poised for a second career as an antimicrobial? *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2023 Apr 16];34(4):e2975. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dmrr.2975>
160. DOF - Diario Oficial de la Federación [Internet]. [cited 2023 Mar 25]. Available from: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5432289&fecha=07/04/2016&print=true
161. Miller RK, Genbacev O, Turner MA, Aplin JD, Caniggia I, Huppertz B. Human placental explants in culture: Approaches and assessments. *Placenta*. 2005 Jul 1;26(6):439–48.
162. Basak S, Vilasagaram S, Naidu K, Duttaroy AK. Insulin-dependent, glucose transporter 1 mediated glucose uptake and tube formation in the human placental first trimester trophoblast cells. *Mol Cell Biochem*. 2019 Jan 30;451(1–2):91–106.
163. Han CS, Herrin MA, Pitruzzello MC, Mulla MJ, Werner EF, Pettker CM, et al. Glucose and Metformin Modulate Human First Trimester Trophoblast Function: a Model and Potential Therapy for Diabetes-Associated Uteroplacental Insufficiency. *American Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2023 Mar 25];73(4):362–71. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aji.12339>
164. Bailey-Hytholt CM, Sayeed S, Kraus M, Joseph R, Shukla A, Tripathi A. A Rapid Method for Label-Free Enrichment of Rare Trophoblast Cells from Cervical Samples. *Scientific Reports* 2019 9:1 [Internet]. 2019 Aug 20 [cited 2023 Mar 25];9(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-48346-3>
165. Zhang L, Yu X, Wu Y, Fu H, Xu P, Zheng Y, et al. Gestational Diabetes Mellitus-Associated Hyperglycemia Impairs Glucose Transporter 3 Trafficking in Trophoblasts Through the Downregulation of AMP-Activated Protein Kinase. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Nov 2;9:3032.
166. Sagrillo-Fagundes L, Clabault H, Laurent L, Hudon-Thibeault AA, Salustiano EMA, Fortier M, et al. Human Primary Trophoblast Cell Culture Model to Study the Protective Effects

- of Melatonin Against Hypoxia/reoxygenation-induced Disruption. *J Vis Exp* [Internet]. 2016 Jul 30 [cited 2023 Jul 17];(113):54228. Available from: [/pmc/articles/PMC5091709/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111133/)
167. McCaig WD, Patel PS, Sosunov SA, Shakerley NL, Smiraglia TA, Craft MM, et al. Hyperglycemia potentiates a shift from apoptosis to RIP1-dependent necroptosis. *Cell Death Discovery* 2018 4:1 [Internet]. 2018 May 10 [cited 2023 Mar 25];4(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41420-018-0058-1>
 168. Chen ACH, Huang W, Fong SW, Chan C, Lee KC, Yeung WSB, et al. Hyperglycemia altered DNA methylation status and impaired pancreatic differentiation from embryonic stem cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 Mar 25];22(19):10729. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/19/10729/htm>
 169. View of The role of circRNA polyribonucleotide nucleoside transferase 1 on Gestational Diabetes Mellitus [Internet]. [cited 2023 Mar 25]. Available from: <https://www.cellmolbiol.org/index.php/CMB/article/view/4441/2192>
 170. Nursalim YNS, Blenkiron C, Groom KM, Chamley LW. Growing human trophoblasts in vitro: a review of the media commonly used in trophoblast cell culture. *Reproduction* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Mar 25];160(6):R119–28. Available from: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/160/6/REP-19-0605.xml>
 171. Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P, Hauguel-De Mouzon S. Gestational Diabetes Induces Placental Genes for Chronic Stress and Inflammatory Pathways. *Diabetes* [Internet]. 2003 Dec 1 [cited 2023 Jul 11];52(12):2951–8. Available from: <https://dx.doi.org/10.2337/diabetes.52.12.2951>
 172. Akison LK, Nitert MD, Clifton VL, Moritz KM, Simmons DG. Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. *Placenta*. 2017 Jun 1;54:52–8.
 173. Hara CDCP, França EL, Fagundes DLG, De Queiroz AA, Rudge MVC, Honorio-França AC, et al. Characterization of Natural Killer Cells and Cytokines in Maternal Placenta and Fetus of Diabetic Mothers. *J Immunol Res*. 2016;2016.
 174. Carrasco-Wong I, Moller A, Giachini FR, Lima V V., Toledo F, Stojanova J, et al. Placental structure in gestational diabetes mellitus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2020 Feb 1;1866(2):165535.
 175. Han CS, Herrin MA, Pitruzzello MC, Mulla MJ, Werner EF, Pettker CM, et al. Glucose and metformin modulate human first trimester trophoblast function:A model and potential therapy for diabetes-associated uteroplacental insufficiency. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2023 Mar 25];73(4):362. Available from: [/pmc/articles/PMC4356646/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25811113/)
 176. Ujvari D, Jakson I, Babayeva S, Salamon D, Rethi B, Gidlöf S, et al. Dysregulation of In Vitro Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells by Insulin via Transcriptional Inhibition of Forkhead Box Protein O1. *PLoS One* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2023 Jul 16];12(1):e0171004. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0171004>
 177. Management of suspected bacterial lower urinary tract infection in adult women A national clinical guideline. 2020 [cited 2023 Jul 23]; Available from: www.nice.org.uk/accreditation
 178. Kass EH. Bacteriuria and the Diagnosis of Infections of the Urinary Tract: With Observations on the Use of Methionine as a Urinary Antiseptic. *AMA Arch Intern Med*

- [Internet]. 1957 Nov 1 [cited 2023 Jul 23];100(5):709–14. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/561778>
179. Tripathi N, Sapra A. Gram Staining. StatPearls [Internet]. 2022 Aug 8 [cited 2023 Jul 15]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
 180. Erkmen O. Gram staining technique. *Laboratory Practices in Microbiology*. 2021 Jan 1;99–105.
 181. Papile LA. The Apgar Score in the 21st Century. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2001 Feb 15 [cited 2023 May 7];344(7):519–20. Available from: <https://www.acog.org/en/clinical/clinical-guidance/committee-opinion/articles/2015/10/the-apgar-score>
 182. McElwain CJ, McCarthy FP, McCarthy CM. Gestational Diabetes Mellitus and Maternal Immune Dysregulation: What We Know So Far. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Apr 2 [cited 2023 May 21];22(8). Available from: </pmc/articles/PMC8073796/>
 183. Wei W, Zhang X. Expression of ADP and TNF- α in patients with gestational diabetes mellitus and its relationship with pregnancy outcomes. *Exp Ther Med* [Internet]. 2020 Jun 29 [cited 2023 May 21];20(3):2184. Available from: </pmc/articles/PMC7401910/>
 184. Mohammed A, Aliyu IS, Manu M. Correlation between circulating level of tumor necrosis factor-alpha and insulin resistance in Nigerian women with gestational diabetes mellitus. *Ann Afr Med*. 2018 Oct 1;17(4):168–71.
 185. Lekva T, Norwitz ER, Aukrust P, Ueland T. Impact of Systemic Inflammation on the Progression of Gestational Diabetes Mellitus.
 186. Amirian A, Mahani MB, Abdi F. Role of interleukin-6 (IL-6) in predicting gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol Sci* [Internet]. 2020 [cited 2023 May 21];63(4):407. Available from: </pmc/articles/PMC7393755/>
 187. SIDDIQUI S, WAGHDHARE S, PANDA M, DUBEY S, JHA S. Association of IL-6 and CRP Levels with Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2023 May 21];67(Supplement_1). Available from: https://diabetesjournals.org/diabetes/article/67/Supplement_1/2417-PUB/57262/Association-of-IL-6-and-CRP-Levels-with
 188. Liu T, Deng JM, Liu YL, Chang L, Jiang YM. The relationship between gestational diabetes mellitus and interleukin 1beta gene polymorphisms in southwest of China. *Medicine* [Internet]. 2020 Oct 10 [cited 2023 May 21];99(43):e22679. Available from: </pmc/articles/PMC7581114/>
 189. Liu T, Zheng W, Wang L, Wang L, Zhang Y. TLR4/NF- κ B Signaling Pathway Participates in the Protective Effects of Apocynin on Gestational Diabetes Mellitus Induced Placental Oxidative Stress and Inflammation. [cited 2023 May 22]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00078-5>
 190. Carpentier PA, Dingman AL, Palmer TD. Placental TNF- α Signaling in Illness-Induced Complications of Pregnancy. *Am J Pathol* [Internet]. 2011 [cited 2023 May 21];178(6):2802. Available from: </pmc/articles/PMC3124299/>
 191. Beksac AT, Orgul G, Tanacan A, Uckan H, Sancak B, Portakal O, et al. Uropathogens and Gestational Outcomes of Urinary Tract Infections in Pregnancies that Necessitate Hospitalization. *Curr Urol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2023 May 21];13(2):70–3. Available from: <https://karger.com/cur/article/13/2/70/102445/Uropathogens-and-Gestational-Outcomes-of-Urinary>

192. Cohen R, Gutvirtz G, Wainstock T, Sheiner E. Maternal urinary tract infection during pregnancy and long-term infectious morbidity of the offspring. *Early Hum Dev.* 2019 Sep 1;136:54–9.
193. Villalón H, Pantoja S, Vergara N, Caussade MC, Vial M de los Á, Pinto M, et al. SÍNDROME INFLAMATORIO PERINATAL PERSISTENTE DEL PREMATURO EXTREMO. IMPORTANTE FACTOR DE MORBIMORTALIDAD. PARTE II: COMPROMISO MULTISISTÉMICO. *Revista Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 May 21];32(6):672–81. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-sindrome-inflamatorio-perinatal-persistente-del-S071686402100105X>
194. (PDF) Relación de las citoquinas proinflamatorias con la corioamnionitis subclínica y el parto pretérmino [Internet]. [cited 2023 May 21]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/260770401_Relacion_de_las_citoquinas_proinflamatorias_con_la_corioamnionitis_subclinica_y_el_parto_pretermino
195. Kari A, Sahhaf F, Abbasalizadeh F. Maternal, Fetal and Neonatal Outcomes in Mothers With Diabetes Mellitus or Gestational Diabetes That Complicated With Preterm Premature Rupture of the Membrane (PPROM). 2017 [cited 2023 Jul 17]; Available from: <http://www.ijwhr.net>
196. Ozer A, Altuntas CZ, Izgi K, Bicer F, Hultgren SJ, Liu G, et al. Advanced glycation end products facilitate bacterial adherence in urinary tract infection in diabetic mice. *Pathog Dis* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2023 Jun 21];73(5). Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftu004>
197. Li S, Yang H. Relationship between advanced glycation end products and gestational diabetes mellitus. <https://doi.org/101080/1476705820181449201> [Internet]. 2018 Sep 2 [cited 2023 Jun 21];32(17):2783–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14767058.2018.1449201>
198. Ho CH, Fan CK, Wu CC, Yu HJ, Liu HT, Chen KC, et al. Enhanced uropathogenic *Escherichia coli*-induced infection in uroepithelial cells by sugar through TLR-4 and JAK/STAT1 signaling pathways. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2021 Apr 1;54(2):193–205.
199. Singhal A, Jie L, Kumar P, Hong GS, Leow MKS, Paleja B, et al. Metformin as adjunct antituberculosis therapy. *Sci Transl Med* [Internet]. 2014 Nov 19 [cited 2023 Jun 21];6(263). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3009885>
200. Kajiwara C, Kusaka Y, Kimura S, Yamaguchi T, Nanjo Y, Ishii Y, et al. Metformin Mediates Protection against *Legionella* Pneumonia through Activation of AMPK and Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2018 Jan 15 [cited 2023 Jun 21];200(2):623–31. Available from: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1700474>
201. Ye Y, Jiang P, Huang C, Li J, Chen J, Wang L, et al. Metformin Alters the Chemotaxis and Flagellar Motility of *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2022 Jan 11;12:792406.
202. Olmos-Ortiz A, Déciga-García M, Preciado-Martínez E, Bermejo-Martínez L, Flores-Espinosa P, Mancilla-Herrera I, et al. Prolactin decreases LPS-induced inflammatory cytokines by inhibiting TLR-4/NFκB signaling in the human placenta. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2019 Aug 8 [cited 2023 May 21];25(10):660. Available from: </pmc/articles/PMC6821386/>
203. Swanson L, Katkar GD, Tam J, Pranadinata RF, Chareddy Y, Coates J, et al. TLR4 signaling and macrophage inflammatory responses are dampened by GIV/Girdin. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2020 Oct 27 [cited 2023 May 21];117(43):26895–906. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2011667117>
204. Mbongue JC, Vanterpool E, Firek A, Langridge WHR. Lipopolysaccharide-Induced Immunological Tolerance in Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immuno*. 2022;2(3).
 205. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Signal Transduction in Endotoxin-Tolerized Mouse Macrophages: Dysregulation of Cytokine, Chemokine, and Toll-Like Receptor 2 and 4 Gene Expression. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2000 Jun 1 [cited 2023 Jul 17];164(11):5564–74. Available from: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5564>
 206. Lang CH, Spitzer JA. Glucose kinetics and development of endotoxin tolerance during long-term continuous endotoxin infusion. *Metabolism* [Internet]. 1987 May 1 [cited 2023 Jul 17];36(5):469–74. Available from: <http://www.metabolismjournal.com/article/002604958790045X/fulltext>
 207. Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, et al. Induction of In Vitro Reprogramming by Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 Agonists in Murine Macrophages: Effects of TLR “Homotolerance” Versus “Heterotolerance” on NF- κ B Signaling Pathway Components. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2023 Jun 21];170(1):508–19. Available from: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.508>
 208. Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* [Internet]. 2001 Apr 15 [cited 2023 Jun 21];166(8):5161–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11290799/>
 209. Fernández-Ruiz I, Arnalich F, Cubillos-Zapata C, Hernández-Jiménez E, Moreno-González R, Toledano V, et al. Mitochondrial DAMPs Induce Endotoxin Tolerance in Human Monocytes: An Observation in Patients with Myocardial Infarction. *PLoS One* [Internet]. 2014 May 5 [cited 2023 Jun 21];9(5):e95073. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0095073>
 210. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Jun 21];20(13). Available from: </pmc/articles/PMC6651423/>
 211. Yang F, Qin Y, Wang Y, Meng S, Xian H, Che H, et al. Metformin Inhibits the NLRP3 Inflammasome via AMPK/mTOR-dependent Effects in Diabetic Cardiomyopathy. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2019 [cited 2023 Jun 21];15(5):1010. Available from: </pmc/articles/PMC6535781/>

12. ANEXOS

Role of Insulin and metformin in the modulation of inflammatory profile against *Escherichia coli* infection in a model of hyperglycemia in human placenta

Villafuerte Pérez AA^{1,2*}, Jiménez Escutia R^{1,3}, Vargas Alcantar D^{1,4}, Flores Espinosa P¹, Zaga Clavellina V¹, Velázquez Sánchez MP⁵ and Olmos Ortiz A¹

¹Departamento de Inmunobioquímica, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Ciudad de México 11000, México. ²Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 09230, México. ³Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México. ⁴Posgrado en Ciencias de la Salud, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México 11340, México. ⁵Departamento de Ginecología y Obstetricia, Hospital Ángeles México, Ciudad de México 11800, México. alinearumi@comunidad.unam.mx

Gestational Diabetes Mellitus (GDM) is a common metabolic disorder during the pregnancy, particularly in Mexico the reported prevalence of GDM was 23.7% in 2018. GDM is associated with the increase of serum inflammatory markers and increased risk for genitourinary infections during pregnancy. In addition, hyperglycemia is positively associated with vaginal dysbiosis and adverse maternal-fetal outcomes. On the other hand, insulin and metformin are prescribed as treatments for the glycemic control during GDM, however, its modulatory role in the inflammatory profile of placenta as well as its antimicrobial activity is not yet known. Therefore, in the present work we developed an *in vitro* model of hyperglycemia that resembles the conditions of GDM using third trimester placental explants to evaluate the modulatory effect of insulin and metformin on the inflammatory profile of the human placenta against *Escherichia coli* bacterial infection. Placental explants were cultured with glucose (10 and 50 mM), insulin (500 mM) or metformin (500 μ M) for 48h, then infected with *Escherichia coli* (1×10^5 CFU/mL) and finally we evaluated the inflammatory cytokine secretion (TNF- α , IL-1 β and IL-6) by ELISA and bacterial tissue invasiveness after 4 and 8 h of infection. We found that under hyperglycemia conditions the two hypoglycemic agents decreased the inflammatory effects and reinforced the immune placental response by decreasing the number of CFU/mL and cytokine release. Altogether, these results suggest that the use of insulin and metformin could improve adverse maternal and fetal outcomes during GDM. Funding: CONACyT CB-A1-S-27832 and INPer 2018-1-152.

ANEXO 2. Constancia por participar como ponente modalidad CARTEL en el XXV Congreso Nacional de Inmunología Querétaro 2023



SOCIEDAD MEXICANA
DE INMUNOLOGÍA
En la lucha contra las enfermedades
infecciosas, autoinmunes, alérgicas y el cáncer



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

Aline Arumi Villafuerte Pérez

Por su participación como **ponente modalidad CARTEL** con el
trabajo titulado:

Role of Insulin and metformin in the modulation of inflammatory profile against
Escherichia coli infection in a model hyperglycemia in human placenta

**XXV Congreso Nacional de Inmunología
Querétaro 2023**

Querétaro, Qro., México, del 4 al 8 de junio del 2023


DR. JOSÉ ANTONIO ENCISO MORENO
PRESIDENTE
SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA


DR. JULIO ENRIQUE CASTAÑEDA DELGADO
SECRETARIO
SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA

ANEXO 3. Aprobación del proyecto 2018-1-152 por parte del Comité de Investigación y ética del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa Reyes"



INSTITUTO NACIONAL
DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

DIRECCIÓN GENERAL

INPER-DG - 000760 -2018

CIUDAD DE MÉXICO, A 02 DE OCTUBRE DE 2018.

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

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

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

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

ANEXO 4. Extensión de vigencia del proyecto 2018-1-152

Fecha de la Solicitud:	13.Oct.22 - 12:25
Proyecto:	 Protocolo de investigación Número de registro de Proyecto: 2018-1-152 Título descriptivo del 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
Fecha de Aceptación de Solicitud:	11.Nov.22
Tipo de Solicitud:	Extensión de Tiempo

Conforme a la siguiente propuesta:

Protocolo Original Extensión

Fecha Inicio:	01.Nov.18
Fecha Terminación:	30.Oct.22

Nueva Propuesta Extensión

Fecha Inicio :	01.Nov.18
Nueva Fecha Terminación:	01.Nov.23

Observaciones a la Solicitud: Me permito informarle la decisión tomada en el pleno del comité de investigación en su sesión del 25 de octubre de 2022, con respecto a la extensión de tiempo para el 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” con no. de reg. 2018-1-152

DICTAMEN: SE APRUEBA LA EXTENSIÓN DE TIEMPO PARA 01 DE NOVIEMBRE DE 2023

ANEXO 5. Dictamen de aprobación del Hospital Ángeles México



DIRECCIÓN DE SERVICIOS CLÍNICOS



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 "**EFFECTO DE LA INSULINA Y LA METFORMINA SOBRE LA INSULINA E INMUNIDAD INNATA EN TEJIDOS DE LA INTERFASE MATERNO-FETAL EN UN MODELO DE DIABETES MELLITUS GESTACIONAL**", con registro, aprobación y financiamiento en el Instituto número 2018-1-152 y en CONACyT CB-A1-S-27832.

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

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

Sin otro particular.

ATENTAMENTE

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

LIC. JORGE CABRERA ÁGUILA
DIRECTOR GENERAL

ANEXO 6. Aprobación del proyecto R-2020-785-043 por parte del Instituto Mexicano del Seguro Social



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



Dictamen de Aprobación

Martes, 28 de abril de 2020

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

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

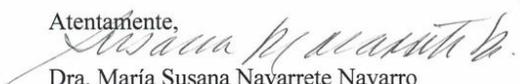
Presente:

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

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

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

Atentamente,


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

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

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos Av. Consultémoc 330 Col. Doctores México 06720 56276900 ext 21210 casis@cis.gob.mx

ANEXO 7. Carta de consentimiento informado

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

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 derivara únicamente en productividad de orden científico, usted no tendrá o recibirá ningún tipo de beneficio por su participación en el estudio.

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

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

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

Nombre y firma de la paciente

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Nombre y firma del Testigo 1

Nombre y firma del Testigo 2

ANEXO 8. Hoja de registro de las características clínicas

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA PACIENTE

Nombre de la paciente _____

No. De expediente _____ Edad _____ No. de cama _____

Fecha de última menstruación _____ SDG _____

#Gestas _____ Partos _____ Cesáreas _____ Abortos _____

Náuseas: Sí ____ No ____ Vómito: Sí ____ No ____

Toma de Aspirina: Sí ____ No ____ Dosis /SDG _____

Toma de Multivitamínicos: Sí ____ No ____ Dosis /SDG _____

Transfusión sanguínea durante el embarazo actual: Sí ____ No ____ SDG _____

Alergia a la Penicilina _____ Otras _____

Enfermedad subyacente _____ TX/ SDG _____

Infección _____ TX/ SDG _____

Presión arterial _____

Peso materno al inicio de la gestación _____ Peso actual _____

Talla _____ IMC pre-gestacional (peso [kg]/altura [m]²) _____

Ganancia de peso durante el embarazo (kg) _____

Peso de placenta (húmedo en gramos) _____

DATOS DEL RECIÉN NACIDO

Sexo _____	APGAR _____
Peso _____	Percentila peso/ edad gestacional: _____
Talla _____	Percentila Talla/ edad gestacional: _____
Perímetro cefálico _____	Percentila PC/ edad gestacional: _____

Observaciones generales:

ANEXO 9. Hoja de registro para el análisis microbiológico de la placenta



Instituto Nacional de Perinatología

Isidro Espinosa de los Reyes

DEPARTAMENTO DE INMUNOBIOQUÍMICA

Laboratorio de Inmunología de la Unidad Feto-Placentaria

Formato de análisis microbiológico

Protocolo:

2018-1-152 (Insulina) 2019-1-15 (Galectina-1) 2020-1-14 (Melatonina)

La muestra se tomó en: INPer IMSS H.A.M H.A.IL

FECHA: _____

Tipo de muestra: _____

Clave de experimento (s): _____

No. De expediente: _____

Pruebas microbiológicas:

Microorganismo	Negativo	Positivo
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Streptococcus agalactiae</i>		
<i>Candida albicans</i>		
<i>Klebsiella sp</i>		
<i>Ureaplasma urealyticum</i>		
<i>Mycoplasma hominis</i>		
Otros:		

Observaciones: _____

Nombre y firma del responsable del análisis