



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de la insulina y la metformina en la respuesta  
inflamatoria placentaria ante la infección por *Candida*  
*albicans* en un modelo de diabetes mellitus gestacional

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A  
P R E S E N T A :

VALERIA PÉREZ ALPIZAR



DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. ANDREA GUADALUPE  
OLMOS ORTIZ

Ciudad Universitaria, CDMX,  
2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

1. Datos del alumno  
Pérez  
Alpizar  
Valeria  
55 66 78 79 09  
Universidad Nacional  
Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
315225817

63 p  
2023

2. Datos del tutor  
Dra.  
Andrea Guadalupe  
Olmos  
Ortiz

3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
José Eduardo  
Rodríguez  
Bustamante

4. Datos del sinodal 2  
Dra.  
Erika  
Chavira  
Suárez

5. Datos del sinodal 3  
Dra.  
María Sol  
Robledo y  
Monterrubio

6. Datos del sinodal 4  
Dra.  
Fernanda Artemisa  
Espinoza  
Hernández

7. Datos del trabajo  
escrito.  
Efecto de la insulina y la  
metformina en la  
respuesta inflamatoria  
placentaria ante la  
infección por *Candida*  
*albicans* en un modelo  
de diabetes mellitus  
gestacional

# Tabla contenido

SIGLAS

ABREVIATURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

I.	Introducción .....	1
	1.1 Diabetes mellitus .....	2
	1.2 Diabetes mellitus gestacional .....	3
	1.2.1 Diagnóstico .....	4
	1.2.2 Resistencia a la insulina en la DMG .....	4
	1.3 Infecciones cervicovaginales asociadas a la DMG .....	5
	1.3.1 <i>Candida albicans</i> .....	6
	1.3.2 Candidiasis .....	8
	1.4 Inflamación en la DMG .....	10
	1.5 Placenta humana y su disfunción en la DMG .....	10
	1.5.1 Defensa inmunoplacentaria .....	12
	1.6 Tratamiento farmacológico .....	13
	1.6.1 Insulina .....	13
	1.6.2 Metformina .....	14
II.	Justificación .....	16
III.	Hipótesis .....	17
IV.	Objetivos .....	17
	4.1 Objetivo general .....	17
	4.2 Objetivos específicos .....	17
V.	Metodología .....	
	5.1 Generalidades del protocolo experimental .....	17
	5.2 Lugar donde se realizó el protocolo .....	18
	5.3 Toma de muestras .....	18
	5.4 Cálculo del tamaño de muestra .....	19
	5.5 Criterios de inclusión y exclusión .....	19
	5.6 Consideraciones bioéticas para la recolección y procesamiento de la placenta .....	20
	5.7 Variables del estudio .....	20
	5.7.1 Variables independientes .....	20
	5.7.2 Variables dependientes .....	20
	5.8 Aislamiento y cultivo de explantes placentarios .....	21
	5.9 Montaje del modelo in vitro de DMG .....	22
	5.10 Cultivo, crecimiento y manipulación de <i>C. albicans</i> .....	23
	5.11 Tinción gram para caracterización morfológica de levaduras .....	24
	5.12 PCR de punto final para identificación de <i>C. albicans</i> .....	26
	5.13 Conteo de unidades formadoras de colonias de <i>C. albicans</i> .....	26
	5.14 Tinción Grocott para evaluar la presencia de hifas de <i>C. albicans</i> en los explantes placentarios cultivados .....	26
	5.15 Obtención de extractos proteicos totales y cuantificación de proteínas por Bradford .....	27
	5.16 Cuantificación de IL6, IL8 y HBD 1 - 4 por la técnica de ELISA .....	27
	5.17 Análisis estadístico .....	30

VI.	Resultados .....	31
	6.1 Caracterización de <i>C. albicans</i> .....	31
	6.2 Curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> .....	32
	6.3 Características clínicas .....	35
	6.4 Efecto cuantitativo de la capacidad de defensa innata de la placenta humana ante la infección por <i>C. albicans</i> y su tratamiento con insulina y metformina .....	37
	6.5 Efecto cualitativo de la insulina y la metformina sobre la capacidad de defensa innata placentaria ante la infección por <i>C. albicans</i> .....	38
	6.6 Efecto de la hiperglucemia y el tratamiento con insulina o metformina sobre la secreción de las citocinas proinflamatorias IL6 e IL8 en explantes placentarios infectados con <i>C. albicans</i> .....	41
	6.7 Efecto en la producción de las beta defensinas 1 - 4 en explantes placentarios así como con el tratamiento con insulina y metformina .....	42
VII.	Bibliografía	
VIII.	Anexos	

# SIGLAS

ACOG: Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos  
AIS3: Proteína similar a la aglutinina 3  
BHI: Caldo infusión cerebro corazón  
BSA: Albúmina sérica bovina  
cAMP: AMP cíclico  
CONAHCYT: Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías  
DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño  
DM: Diabetes mellitus  
DMT1: Diabetes mellitus tipo 1  
DMT2: Diabetes mellitus tipo 2  
DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco  
DMG: Diabetes mellitus gestacional  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
ELISA: Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas  
ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición  
FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos  
FPG: Glucosa plasmática en ayunas  
GPI: Glicosilfosfatidilinositol  
HBDs: beta defensinas humanas  
HBD1: beta defensina humana 1  
HBD2: beta defensina humana 2  
HBD3: beta defensina humana 3  
HBD4: beta defensina humana 4  
HRP: Peroxidasa de rábano  
Hwp1: Proteína de la pared hifal 1  
ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1  
IDF: Federación Internacional de Diabetes  
IL1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$   
IL6: Interleucina 6  
IL8: Interleucina 8  
IMC: Índice de masa corporal  
INPer: Instituto Nacional de Perinatología  
ITU: Infección del tracto urinario  
LB: Medio de cultivo Luria Bertani  
LPS: Lipopolisacárido  
LTA: Ácido lipoteicoico  
MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos  
MCP 1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1  
NaCl: Cloruro de sodio  
NaF: Fluoruro de sodio  
Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato de sodio  
Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>: Ortovanadato de sodio  
NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonato de sodio

NFκB: Factor nuclear kappa B  
OCT: Transportadores de cationes orgánicos  
OGCT: Prueba de desafío de tolerancia a la glucosa  
OGTT: Prueba de tolerancia a la glucosa oral  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos  
PBS: Buffer fosfato salino  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PMN: Neutrófilos polimorfonucleares  
PP: Parto pretérmino  
PRR: Receptores de reconocimiento de patógenos  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
RPM: Ruptura prematura de membranas  
SARS-CoV-2: Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2  
SOP: Síndrome de ovario poliquístico  
STNi: Suero de ternera neonatal inactivado  
TNF-α: Factor de necrosis tumoral-α  
UFC: Unidades formadoras de colonias  
VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

# ABREVIATURAS

%: porcentaje  
°C: grados Celsius  
C. P.: código postal  
cm: centímetros  
cm<sup>3</sup>: centímetro cúbico  
g: gravedades  
g/mL: gramos por mililitro  
h: horas  
h.p.i.: horas post infección  
kg: kilogramos  
kg/m<sup>2</sup>: kilogramos sobre metro cuadrado  
L: litro  
M: molar  
mmHg: milímetros de mercurio  
mg/dL: miligramo por decilitro  
min: minutos  
mL: mililitros  
mM: milimolar  
mm<sup>2</sup>: milímetro cuadrado  
ng/g: nanogramo por gramo  
ng/mL: nanogramo por mililitro  
nM: nanomolar  
nm: nanómetro  
pb: pares de bases  
pg/mL: picogramo por mililitro  
pH: concentración de iones de hidrógeno en el agua  
rpm: revoluciones por minuto  
sdg: semanas de gestación  
U/mL: unidades por mililitro  
UFC/mL: unidades formadoras de colonia por mililitro  
V: voltios  
µg: microgramo  
µg/mL: microgramo por mililitro  
µL: microlitro  
µM: micromolar

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Infección ascendente cervicovaginal en el embarazo .....	6
Figura 2. Microfotografía y representación esquemática de la pared interna y externa de <i>Candida albicans</i> .....	7
Figura 3. Invasividad de <i>C. albicans</i> en los tejidos. Inicia con la adhesión celular epitelial .....	9
Figura 4. Representación esquemática de la placenta humana .....	11
Figura 5. Tratamientos experimentales para el procesamiento de explantes placentarios .....	23
Figura 6. Caracterización microbiológica y molecular de <i>C. albicans</i> .....	32
Figura 7. Crecimiento de <i>C. albicans</i> .....	33
Figura 8. Crecimiento de <i>C. albicans</i> en el medio de cultivo de explantes placentarios .....	34
Figura 9. Tinción Grocott en explantes placentarios infectados durante 24 h con <i>C. albicans</i> .....	35
Figura 10. Crecimiento de colonias de <i>C. albicans</i> en el medio de cultivo de explantes placentarios tratados con glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500 µM) .....	37
Figura 11. Cortes histológicos de vellosidades placentarias infectadas con <i>C. albicans</i> .....	40
Figura 12. Secreción de IL6 en explantes placentarios infectados con <i>C. albicans</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/mL) en respuesta a la glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500 µM) .....	41
Figura 13. Secreción de IL8 en explantes placentarios infectados con <i>C. albicans</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/mL) en respuesta a la glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500 µM) .....	42
Figura 14. Síntesis de HBD1 en explantes placentarios infectados con <i>C. albicans</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/mL) en respuesta a la glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500 µM) .....	43
Figura 15. Síntesis de HBD2 en explantes placentarios infectados con <i>C. albicans</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/mL) en respuesta a la glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500 µM) .....	43
Figura 16. Síntesis de HBD3 en explantes placentarios infectados con <i>C. albicans</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/mL) en respuesta a la glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500 µM) .....	44
Figura 17. Síntesis de HBD4 en explantes placentarios infectados con <i>C. albicans</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/mL) en respuesta a la glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500 µM) .....	44

# ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo para medir la concentración de UFC/mL de <i>C. albicans</i> .....	24
Ecuación 2. Cálculo UFC/mL de <i>C. albicans</i> de acuerdo con su factor de dilución .....	26

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones analíticas para los kits de ELISA empleados en el proyecto .....	29
Tabla 2. Características clínicas maternas y fetales .....	36

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Nacional de Perinatología (registro INPer: 2018-1-152) y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (registro CONAHCyT: A1-S-27832) por el financiamiento de este proyecto.

A CONAHCYT por la beca recibida para poder realizar este trabajo, durante el periodo comprendido de julio 2022 - junio 2023 (número de registro 31912)

A mis padres y hermana por ser mi guía y soporte en toda mi trayectoria escolar

A mi compañero de aventuras, Luis, por ser mi soporte y motor hacia mi superación personal y profesional

A mi asesora Andrea Olmos, ya que sin su implacable guía nada de esto hubiera sido posible

A la Facultad de Ciencias, a la UNAM y a sus excelentes profesores que día a día me ayudaron a formarme profesionalmente



# I. Introducción

La presente tesis se realizó en el marco del proyecto INPer 2018-1-152 y CB-A1-S-27832 titulado “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”.

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica con alteración del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas como resultado de la disfunción en la producción de la insulina por el páncreas o desregulación en sus vías de señalización. La diabetes mellitus gestacional (DMG) es un tipo de diabetes que se define como la intolerancia a la glucosa que comienza o se vuelve detectable por primera vez en el embarazo. Es la enfermedad metabólica más frecuente en mujeres embarazadas afectando hasta al 25 %. La DMG se relaciona con varias complicaciones en la madre y en el feto. En la madre se asocia con parto pretérmino (PP), preeclampsia, intervención por cesárea y ruptura prematura de membranas corioamnióticas (RPM). Por otra parte, el feto puede desarrollar macrosomía, hipoglucemia neonatal, distocia de hombros, o bien, puede tener desenlace de óbito (muerte al nacer). Además, a largo plazo, las mujeres con DMG tienen alrededor de diez veces más probabilidades de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) en el futuro e, incluso, se ha reportado que hasta la mitad de ellas desarrollarán DMT2 en la década siguiente (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021).

En México es difícil establecer con precisión la tasa de incidencia de pacientes con DMG, debido a la variabilidad en los criterios diagnósticos y puntos de corte establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Federación Internacional de Diabetes (IDF), y el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG). Se estima que el 17% de los embarazos en el mundo cursan con DMG (Dainelli *et al.*, 2018). Asimismo, la IDF en el 2022 estimó una prevalencia de 7.8% en América del Norte y el Caribe (Wang *et al.*, 2022). Desafortunadamente, en México las cifras no son menores. Un reporte publicado recientemente indica que a lo largo de los últimos 30 años ha ido en aumento la incidencia de DMG en nuestro país, pasando de un 4% a un 30% aumentando en un 26% (Dainelli *et al.*, 2018). Además, estos datos indican una tendencia al alza si se toman en cuenta los factores de riesgo para esta enfermedad. Uno de ellos es el aumento de la proporción de mujeres con obesidad en edad fértil que ha pasado de un 37.6% en el año 2020 a un 39% para el año 2021 (ENSANUT, 2022).

De manera breve, en las mujeres sanas se desarrolla un estado fisiológico de resistencia periférica a la insulina a partir del segundo trimestre de gestación con el fin de incrementar el suministro de glucosa hacia el feto. Sin embargo, las mujeres con DMG no logran compensar esta resistencia a la insulina y terminan desarrollando el cuadro de hiperglucemia característico de esta enfermedad (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021).

Además de la hiperglucemia, las pacientes con DMG experimentan cambios en su sistema inmune innato, lo que las hace más propensas al desarrollo de infecciones tanto bacterianas como fúngicas. El 90% de los casos de infecciones por hongos son de tipo candidiasis vulvovaginal a causa de *Candida albicans* (Pradenas & Marcelo Pradenas, 2014). En conjunto, los cambios en la respuesta inmune innata en la DMG y la producción de estrógenos

incrementada durante el embarazo resultan en un incremento de los depósitos de glucógeno vaginal, asociándose con altos índices de colonización, infección y recurrencias por *C. albicans*. Dado que hasta el 30% de los PP son debidos a una infección, y que *C. albicans* es la causa más frecuente de infecciones durante el embarazo (Akinbiyi *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2017; Marschalek *et al.*, 2016; Mucci *et al.*, 2017), podemos inferir que este hongo contribuye de manera relevante con el desarrollo del PP y RPM.

Se ha documentado que, en promedio 40.6% de los casos de DMG se controlan con dieta y ejercicio únicamente, mientras que el 59.4% restante debe ser tratado con medicación, siendo la insulina la primera línea de intervención. Como segunda opción se administra la metformina, la cual es el medicamento más utilizado (en más del 63%), reduciendo el uso exclusivo de insulina hasta en un 22% y la combinación insulina - metformina en un 13% de los casos (Dainelli *et al.*, 2018). La insulina no atraviesa la barrera placentaria por lo que no representa un riesgo directo para el bebé. Sin embargo, el dolor y las molestias asociadas a su aplicación subdérmica resultan en una menor tasa de apego al tratamiento. Por esta razón, varios países aprueban el uso de metformina para tratamiento de la diabetes durante el embarazo. El mecanismo de acción de la metformina es a través del bloqueo de la enzima transportadora mitocondrial glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Esta enzima, favorece la actividad en la ruta de la glucogeno-génesis, inhibe la gluconeogénesis hepática y sensibiliza los tejidos dependientes de insulina (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021). Además, se sabe que la combinación de insulina y metformina tienen acciones hipoglucemiantes por su acción antiinflamatoria en distintos tipos celulares (Adams Waldorf & McAdams, 2013; Choudhury & Devi Rajeswari, 2021; Postler *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2014).

Si consideramos que *C. albicans* es la primera causa de infección durante el embarazo y que la hiperglucemia libera citocinas y quimioquinas que generan un ambiente proinflamatorio, el tratamiento controlado con insulina y metformina podría ser un tratamiento efectivo para la DMG. El objetivo de esta tesis es evaluar las potenciales propiedades antiinflamatorias de estos fármacos para ayudar a contrarrestar el daño que provoca dicho ambiente inflamatorio. Dado lo anterior, en este proyecto nos planteamos evaluar cómo la insulina y la metformina podrían modificar favorablemente la respuesta inflamatoria de la placenta humana cuando es retada por una infección por *C. albicans* en el contexto de la DMG.

## 1.1 Diabetes mellitus (DM)

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica que afecta al sistema endócrino asociada a un grupo de trastornos que derivan en afecciones al corazón, ojos, nervios y riñones (Cho *et al.*, 2018). Se caracteriza por altas concentraciones de glucosa en sangre debido a un mal funcionamiento en la producción de la insulina por el páncreas y/o en su acción en los tejidos diana, alterando el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Depende de múltiples factores entre los que se encuentran el origen étnico, la raza, la edad, el género, composición corporal, así como de los criterios tomados en cuenta para la detección y diagnóstico (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021).

La diabetes ha mostrado un rápido crecimiento en el mundo y actualmente se le considera uno de los principales problemas de salud pública (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021). La IDF realizó un estudio de proyección y estima que hacia el año 2045 habrá 784 millones de

casos (11.2%); en comparación, la cifra en 2021 fue de 537 millones (9.8%) (International Diabetes Federation, 2021).

En la práctica clínica, la DM se agrupa en cuatro amplios grupos de mayor frecuencia: la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), tipos específicos debidos a otras causas y la DMG. La DMT1 es una entidad autoinmune y se caracteriza por una deficiente o nula secreción de insulina, por lo que los pacientes requieren de su administración exógena de por vida. Por otro lado, la DMT2 es el tipo de diabetes más prevalente, y se debe a una inadecuada secreción de insulina, así como resistencia periférica a su acción. Del tercer tipo son dadas por síndromes de diabetes monogénica o inducidas por fármacos o sustancias químicas (American Diabetes Association, 2023; ElSayed *et al.*, 2023). Del cuarto tipo, la DMG, se describe con profundidad en el siguiente apartado.

## 1.2 Diabetes mellitus gestacional (DMG)

La DMG se define como aquella intolerancia a la glucosa detectada por primera vez en el embarazo. El cuerpo no puede compensar este desequilibrio metabólico asociado con la condición del embarazo para satisfacer la demanda de energía del feto, generando resistencia a la insulina e hiperglucemia. Esta demanda energética fetal aumenta a partir de la segunda mitad del embarazo, por lo que esta condición comúnmente se manifiesta y diagnostica en el segundo o tercer trimestre. La alta concentración de glucosa periférica genera un ambiente glucotóxico para las células  $\beta$  pancreáticas, así como para otros órganos, favoreciendo la producción de IL1 $\beta$  y otras citocinas pro-inflamatorias (American Diabetes Association, 2014; Choudhury & Devi Rajeswari, 2021; Katra *et al.*, 2016).

La prevalencia mundial reportada de casos con algún tipo de hiperglucemia durante el embarazo en el 2017 fue de aproximadamente 21.3 millones (16.2%), de los cuales, el 86.4% fue debido a la DMG (18.4 millones). Uno de los factores de riesgo es la edad materna avanzada. Por ejemplo, en madres con edad entre 20 a 24 años se reportó una prevalencia de 9.8%, mientras que al considerar un rango de 45 a 49 años, la prevalencia aumentó a un 45.1% (Cho *et al.*, 2018). Otros factores de riesgo que aumentan la probabilidad de presentar DMG durante el embarazo, incluyen los antecedentes heredofamiliares de diabetes, origen étnico, obesidad y antecedentes personales de intolerancia a los carbohidratos, DMG en embarazos previos o síndrome de ovario poliquístico (SOP) (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021).

Finalmente, las madres con DMG tienen mayor riesgo de presentar los siguientes eventos adversos del embarazo: PP, preeclampsia, intervención por cesárea y PROM. En el feto, los eventos adversos a corto plazo incluyen hiperinsulinemia neonatal, macrosomía, hipoglucemia neonatal e hiperbilirrubinemia. Tal como ya se describió, en el largo plazo aumenta el riesgo tanto en la madre como en el feto de desarrollar DMT2 (Wani *et al.*, 2020).

### 1.2.1 Diagnóstico

La detección y diagnóstico de la DMG debe de realizarse a partir de las 24 a 28 semanas (inicio del tercer trimestre de gestación). Existen dos enfoques recomendados para el diagnóstico de la DMG, el enfoque de un paso y el enfoque de dos pasos. La prueba recomendada es la que conlleva un enfoque de dos pasos. Consiste en una prueba de desafío de tolerancia a la glucosa (OGCT) 50 g sin ayuno y medición de glucosa plasmática a la hora. Si los valores obtenidos son  $\geq 140$  mg/dL se realiza la prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT). Esta prueba consiste en administrar un bolo de 100 g de glucosa en ayuno, en donde el diagnóstico de DMG se realiza si se obtienen al menos dos de los siguientes valores de glucosa en plasma (Mack & MDb, 2017):

FPG: 95 mg/dL

1 h:  $\geq 180$  mg/dL

2 h:  $\geq 155$  mg/dL

3 h:  $\geq 140$  mg/dL

El enfoque de un paso de OGTT se realiza con bolo en ayuno de 75 g de glucosa. En este caso, el diagnóstico de DMG se realiza si se obtiene al menos uno de los siguientes valores de glucosa plasmática (Metzger *et al.*, 2010):

FPG:  $\geq 92$  mg/dL

1 h:  $\geq 180$  mg/dL

2 h:  $\geq 153$  mg/dL

### 1.2.2 Resistencia a la insulina en la DMG

Durante el embarazo se desarrolla un estado fisiológico de resistencia a la insulina con la intención de mantener un adecuado suministro de glucosa hacia el feto. Esta resistencia a la insulina suele ser más evidente a partir del segundo trimestre de gestación, por lo que es fundamental la detección temprana en las pacientes. Incluso, se ha planteado el poder detectarla desde el primer trimestre midiendo biomarcadores asociados a la resistencia de insulina, y a la inflamación, al aumento del factor de crecimiento placentario, proteína C reactiva elevada, deficiencia de vitamina D, niveles altos de glucosa y triglicéridos, e incluso el síndrome metabólico (Wani *et al.*, 2020).

La resistencia fisiológica a la insulina se presenta debido a que en el embarazo se producen múltiples hormonas contrarreguladoras de la glucosa, como hormona del crecimiento, cortisol, estrógenos, progesterona, lactógeno placentario humano, y la insulina placentaria (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021). En conjunto todas estas hormonas aumentan la glucemia y favorecen la resistencia a la insulina. Para responder a esta resistencia, la madre experimenta cambios con el fin de favorecer la biomasa y actividad de las células  $\beta$ -pancreáticas, y de esta forma favorecer la síntesis de insulina. El exceso de insulina puede

entonces compensar la resistencia fisiológica a esta hormona, y permitir la continuación del embarazo en condiciones euglicémicas (Zhang *et al.*, 2013).

Las pacientes que presentan los factores de riesgo como obesidad pregestacional, intolerancia a los carbohidratos, y antecedentes de diabetes gestacional, producen entornos glucotóxicos y lipotóxicos que bloquean los mecanismos de proliferación y actividad de las células  $\beta$ -pancreáticas (Bensellam *et al.*, 2012). Por lo tanto, estas pacientes son incapaces de sintetizar más insulina y responder a la resistencia fisiológica a esta hormona. Como resultado, los niveles de glucosa comienzan a incrementar y se establece el cuadro característico de hiperglucemia (Salazar-Petres & Sferruzzi-Perri, 2022)

Además del descontrol glucémico, las pacientes con DMG también pueden presentar desbalance lipídico. Por ejemplo, las pacientes con DMG presentan valores mucho más altos de colesterol y triglicéridos en comparación de las mujeres embarazadas que no presentan esta condición (Hu *et al.*, 2021). Asimismo, y de manera redundante, esto promueve la resistencia a la insulina en estas pacientes.

Finalmente, debido a la alta probabilidad de desarrollar DM2 después de haber presentado DMG en el embarazo, se recomienda realizar pruebas de detección rutinarias de diabetes, desde las 6 a 12 semanas después del parto. Las pruebas de rutina incluyen la medición de la glucosa en ayuno y la hemoglobina glicosilada (Katra *et al.*, 2016).

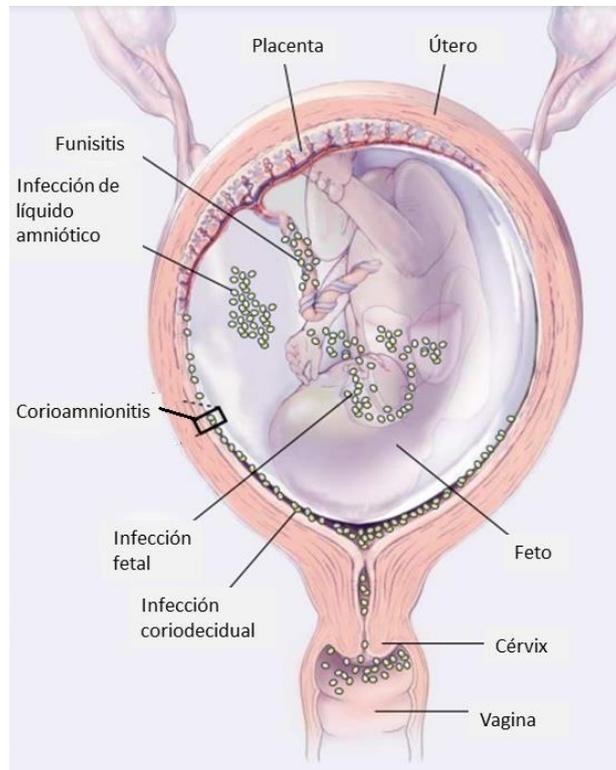
## 1.3 Infecciones vulvovaginales en la DMG

La DMG se ha asociado con resultados perinatales adversos, como la RPM, PP, macrosomía, hipoglucemia neonatal, alteración en la microbiota vaginal e infecciones asociadas como las infecciones vulvovaginales (Zhang *et al.*, 2018). En particular, este último punto se puede explicar parcialmente debido a que en el embarazo con DMG, la hiperglucemia y la alta concentración de estrógeno favorecen los altos depósitos de glucógeno en el epitelio vaginal. Este cambio morfoanatómico predispone a la colonización de *C. albicans* (Zhang *et al.*, 2018).

La alteración de la microbiota vaginal, también conocida como disbiosis, se caracteriza por la colonización de microorganismos patógenos, como *Candida* spp. o estreptococos del grupo B (como *Streptococcus agalactiae*), o bien, una infección combinada, generando el escenario de vaginitis mixta (Akinbiyi *et al.*, 2008). Los cambios en las poblaciones de lactobacilos vaginales favorecen la disbiosis, la colonización de microorganismos patógenos, y, en consecuencia, el desarrollo de infecciones vaginales. Si el desequilibrio es persistente, se asocia con inflamación crónica, que conlleva a vaginitis e infecciones vulvovaginales (Kalia *et al.*, 2020).

Durante el embarazo, este escenario de vaginitis puede desencadenar una infección intrauterina ascendente (Figura 1), lo que incrementa los riesgos de complicaciones en el mismo (Wang *et al.*, 2022). En un escenario desfavorable, la infección vaginal puede ascender a la cavidad intrauterina y llegar a la decidua, extenderse al espacio entre el amnios y el corion, llegar a la cavidad amniótica y finalmente alcanzar al feto. Posteriormente, los organismos patógenos que ingresan a la cavidad amniótica son reconocidos por el sistema inmunitario materno y fetal, lo que desencadena la respuesta inflamatoria que conduce al PP,

caracterizada por la exacerbada producción de citocinas proinflamatorias como IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL6 e IL8 (Discacciati *et al.*, 2011). Así mismo, la respuesta inflamatoria secundaria a la infección también incluye al factor activador de plaquetas, prostaglandinas, leucotrienos y oxígeno reactivo (Romero *et al.*, 2006). De manera interesante, el mayor desencadenante asociado a la inducción del PP es la respuesta inflamatoria exacerbada a consecuencia de la infección, y no por la sola presencia de estos microorganismos en la placenta o las membranas corioamnióticas (Zhou *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Infección ascendente cervicovaginal en el embarazo. La infección asciende por el cuello uterino, llegando primero a las membranas, después a la placenta, así como al cordón umbilical, líquido amniótico y eventualmente al feto. Tomado y modificado de Goldenberg *et al.* (2000).

### 1.3.1 *Candida albicans*

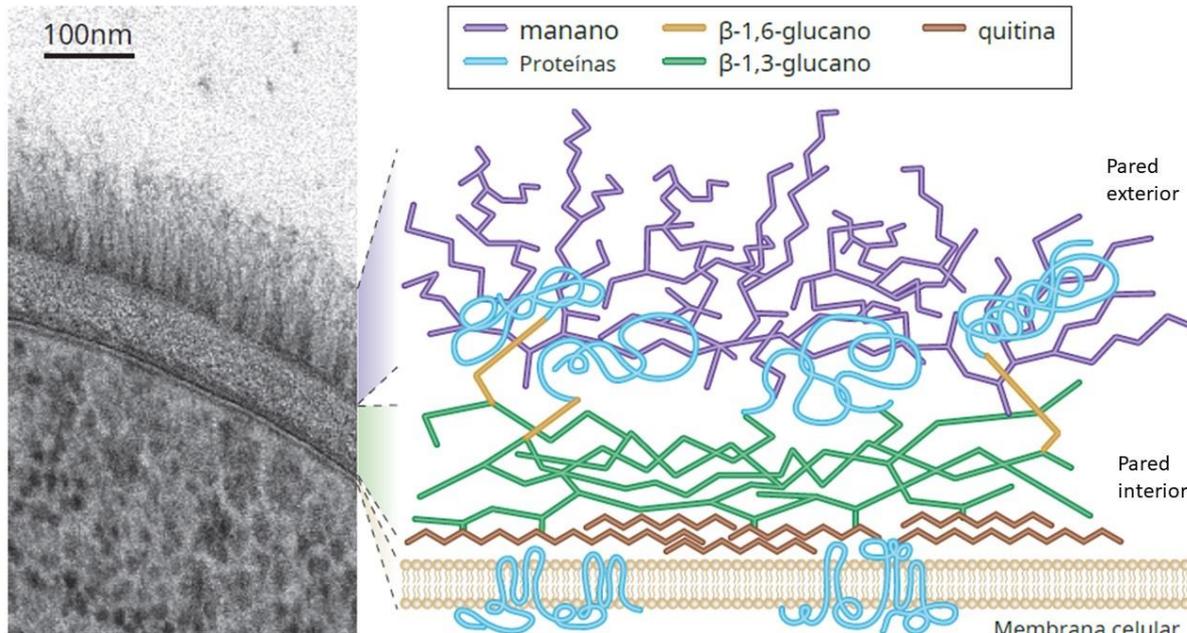
*C. albicans* es un hongo dimórfico, lo que significa que puede pasar de una morfología de levadura a una de hifa según las condiciones en las que esté expuesto. Las principales señales que predisponen el cambio a hifa son: el pH ambiental, incorporación física de *C. albicans* a una matriz, hipoxia y bajos niveles de nitrógeno. Se sugiere que la forma infecciosa es la de hifa, por lo que se necesitaría la transición de levadura a hifa para generar esta fase (Gow *et al.*, 2011; Kashem *et al.*, 2015).

*C. albicans* pertenece al Reino: Fungi, Filo: Ascomycota, Orden: Saccharomycetales, Familia: Saccharomycetaceae, Género: *Candida* y Especie: *C. albicans* (Vienne, 2016). Tiene forma de levadura elíptica de gran tamaño con capacidad de formar hifas. Es un patógeno oportunista que aprovecha la baja de defensas inmunológicas de su hospedero para

favorecer la infección, por lo que el escenario de hiperglucemia es favorecedor para la patogenia de este hongo (Dignani *et al.*, 2009).

En su forma de hifa, presenta mayor adhesión a los tejidos debido a su capacidad de unirse a la hemoglobina como fuente de hierro. La hifa toma el hierro como fuente nutricional con una estrategia de hemólisis, que es favorecida por la liberación de mananos (funcionando como adhesinas a las células epiteliales) que se encuentran en su pared celular. De esta manera ingresa al torrente sanguíneo para su posterior infiltración a los órganos internos (Calderone *et al.*, 2000). Los glucoconjugados parecen ser los receptores de adhesión para *C. albicans*; la adhesión también se ve favorecida por la secreción de enzimas líticas, así como de manoproteínas de la pared celular ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Martin *et al.*, 2020).

La pared celular de *C. albicans* (Figura 2) está compuesta por un 80-90% de carbohidratos y una capa externa de manoproteínas glicosiladas, predominantemente O- y N- ligados a polímeros de manosa (mananos). Estas estructuras son el primer contacto que se tiene con el hospedero. La pared interna contiene polisacáridos esqueléticos de quitina y  $\beta$ -1,3-glucano que confiere fuerza y estructura celular. En su forma de levadura la quitina es alrededor del 2% de su pared celular. En su forma hifal su contenido es de 3 a 5 veces mayor. Por otro lado, en esta forma, el contenido  $\beta$ -1,3-glucano es menor. Estos cambios influyen en la detección inmunitaria propia del hospedero, así como en la respuesta inmunitaria que pueda tener a futuro (Gow *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Microfotografía y representación esquemática de la pared interna y externa de *C. albicans*. La pared externa tiene en su mayoría carbohidratos covalentemente unidos para la formación de glicoproteínas (~ 39%) y  $\beta$ -1,6 glucano. La pared interna contiene una capa esquelética de quitina (~2%) y  $\beta$ -1,3-glucano. Modificada y tomada de Gow *et al.* (2011)

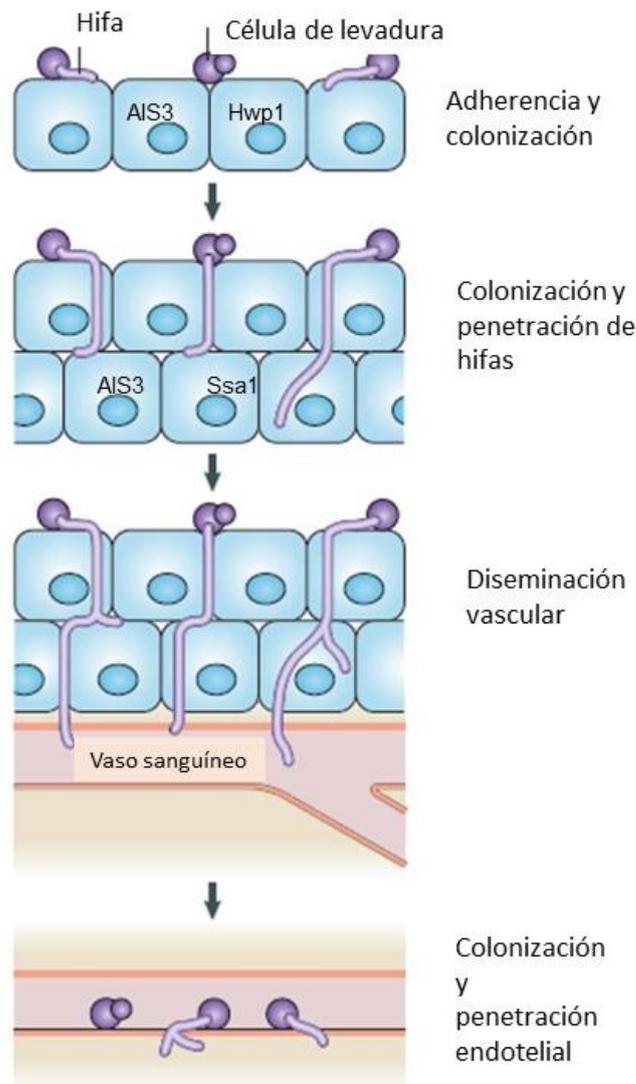
### 1.3.2 Candidiasis

*C. albicans* suele ser parte de la microbiota vaginal, sin embargo, se vuelve una complicación médica (candidiasis) cuando los cambios en las poblaciones de este hongo influyen en la de otros microorganismos no patógenos, generando disbiosis. Esto suele ocurrir al hacer uso indebido de medicamentos antimicrobianos orales o vaginales que frecuentemente destruyen los *Lactobacillus* que forman parte de la microbiota normal (Blomberg *et al.*, 2023). Otros factores importantes son la supresión inmunológica, predisposición genética o la condición de diabetes en el embarazo, debido a las altas concentraciones de glucosa no controladas en las secreciones vaginales, así como los altos valores de estrógenos, sobre todo en el tercer trimestre del embarazo (Martín *et al.*, 2008; Mills, 2017; Nyirjesy & Sobel, 2015). Esta especie, seguida de *C. glabrata* son las más comunes en las infecciones vaginales por candidiasis (He *et al.*, 2022).

El cambio en el microambiente vaginal es lo que permite la colonización de las levaduras de *C. albicans*, tanto en pacientes con DM como con DMG (Zhang *et al.*, 2018). Por ejemplo, se conoce que los estrógenos disminuyen la síntesis de inmunoglobulinas por parte de las células epiteliales vaginales, lo que favorece su proliferación. Por otro lado, la progesterona inhibe la acción de los neutrófilos para atacar a este hongo (Lukic *et al.*, 2017). Esto provoca no sólo cambios en el ambiente vaginal, sino también en los marcadores que expresa *C. albicans* como son sus factores de proliferación, germinación, virulencia y de adherencia a los tejidos vaginales, así como la secreción de fosfolipasas y candidalinas. Finalmente, la presencia de altas concentraciones de glucosa en el embarazo con DMG permite que la levadura pase a su forma más infecciosa, es decir, la de hifa (He *et al.*, 2022; Nyirjesy & Sobel, 2015; Zhang *et al.*, 2018).

Los *Lactobacillus* idealmente crecen en un pH superior a 4.5, mientras que su crecimiento a un pH menor a 4 no es favorable (Mills, 2017). Durante el embarazo, la producción de estrógenos acidifica el pH vaginal, lo que puede alterar la microbiota vaginal, dificultando el crecimiento de los *Lactobacillus* y por lo tanto, se favorece la proliferación de agentes patógenos como *C. albicans*. Además, y tal como ya se ha descrito, el exceso de glucosa en las pacientes con DMG favorece aún más el crecimiento de microorganismos patógenos.

La patogenia vulvovaginal por candidiasis se caracteriza por: 1) adhesión celular mediante las proteínas AIS3 y Hwp1, que actúan como adhesinas; 2) invasión de las células epiteliales mediante las proteínas AIS3 y Ssa1, que actúan como invasinas; 3) formación de biofilms orientado hacia la formación de hifas y secreción de factores de virulencia, lo que genera un ambiente inflamatorio (Figura 3) (Kalia *et al.*, 2020).



**Figura 3.** Invasividad de *C. albicans* en los tejidos. Inicia con la adhesión celular epitelial, seguido de la colonización e invasión por las hifas en el tejido. Posteriormente continúa la infiltración y diseminación vascular en el torrente sanguíneo para finalizar con la colonización de otros tejidos y diseminar la candidiasis a órganos internos. Tomado y modificado de Gow et al. (2011).

En algunos casos, la candidiasis vaginal puede ser asintomática debido a la respuesta protectora del sistema inmune innato de la vagina, lo que evita el desarrollo de inflamación evidente, o bien se desarrolla una respuesta inflamatoria baja (Fidel, 2005). Ante la presencia de infección, la respuesta para contrarrestar parece estar más asociada con el ambiente vaginal que con el microorganismo patógeno (Fidel *et al.*, 2004). Por ejemplo, los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) tienen distintos mecanismos de actividad antifúngica, con lo que generan inflamación en el ambiente. En la candidiasis vaginal, se sugiere que la muerte inherente de la población migratoria de los PMN en el entorno vaginal inhibe su correcto funcionamiento de acción, lo cual ha sido probado en un modelo murino debido a la deficiencia de citocinas que abarcan el eje Th17 (respuestas críticas en los PMN en infecciones por *Candida spp*) (Yano *et al.*, 2018).

El cuadro clínico de la infección por candidiasis incluye picazón, secreción vaginal blanquecina espesa, dolor, ardor e irritación vaginal (He *et al.*, 2022). De manera convencional, los antimicóticos de elección son azol tópico y fluconazol (Tapia *et al.*, 2017).

## 1.4 Inflamación en la DMG

Para llevar a cabo un embarazo a término de manera exitosa, la placenta posee diferentes mecanismos que evitan el rechazo inmunológico por parte de la madre hacia el feto, a la vez que permite responder activamente ante una posible infección. Para generar este ambiente de defensa en la interfase materno-placenta-feto, participan múltiples estirpes celulares como los trofoblastos placentarios, las células deciduales y las células inmunes que se encuentran inmersas en este nicho, como las células asesinas naturales deciduales, células dendríticas deciduales, y los macrófagos deciduales. (Olmos-Ortiz, *et al.*, 2019). Todas estas células regulan la respuesta inmunitaria materna a través de la producción de citocinas, quimiocinas y péptidos con actividad antimicrobiana.

Los embarazos con DMG son considerados de riesgo debido a las complicaciones perinatales asociadas. En este escenario, la placenta está expuesta a un ambiente glucotóxico que genera inflamación, estrés oxidativo, dislipidemia, y niveles alterados de hormonas, factores de crecimiento, citocinas y moléculas de adhesión (Bedell *et al.*, 2021).

La inflamación se produce en respuesta a la presencia o invasión de un organismo patógeno o extraño, o bien, por la presencia de una lesión. Suele ser una respuesta rápida que se caracteriza por presentar vasodilatación, infiltración de neutrófilos, acumulación de macrófagos y linfocitos, y finalmente la resolución de la inflamación (Pantham *et al.*, 2015). También se presenta enrojecimiento, hinchazón, calor, dolor y pérdida de función momentánea. En el caso de la DMG, la inflamación asociada es de tipo crónica debido a la secreción constante de citocinas y quimiocinas por parte del tejido adiposo y la placenta principalmente (Khambule & George, 2019).

La inflamación asociada a la DMG se considera de tipo estéril y crónica, y se le ha categorizado como un estado de meta-inflamación, es decir, de inflamación debida a factores metabólicos y nutricionales como la glucosa. En particular, la placenta experimenta cambios inmunológicos secundarios asociados a la meta-inflamación, como la alteración de las células inmunes en las vellosidades placentarias, e incremento en la expresión de genes asociados a la inflamación y el estrés (como IL1, IL6 e IL8) (Han *et al.*, 2015; Heim *et al.*, 2018; Mrizak *et al.*, 2014; Nguyen-Ngo *et al.*, 2019; Radaelli *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2013).

## 1.5 Placenta humana y su disfunción en la DMG

El desarrollo placentario comienza desde los primeros días de gestación, con la formación del blastocisto. El blastocisto se conforma de una capa interna que dará origen al embrión (masa celular interna); y de una capa externa de células de trofoblasto (trofoectodermo) que dará origen a todas las células trofoblásticas placentarias (Bedell *et al.*, 2021). La adecuada función placentaria requiere la formación de las vellosidades coriónicas (unidad estructural y funcional de la placenta), la capa de sincitiotrofoblasto y la vasculatura (Haram *et al.*, 2020).

La placenta humana es el órgano responsable de la comunicación y metabolismo entre madre y feto (Figura 4). Tiene forma discoide y sus medidas promedio son: 530 g de peso húmedo,

16 cm de diámetro, 2 cm de grosor y 450 cm<sup>3</sup> de volumen (Carrasco-Wong *et al.*, 2020; Saini *et al.*, 2015; Sudha Madhuri & Jyothi, 2017). En el humano, la placentación es de tipo hemocorial, lo que quiere decir que las principales células de la placenta (trofoblastos) se encuentran en contacto directo con la sangre materna. De una forma minimalista, podemos describir la estructura de la placenta en vellosidades coriónicas flotantes y de anclaje, la sangre materna presente en las cámaras intervellas y la vasculatura de las vellosidades (Haram *et al.*, 2020). La vellosidad coriónica es la unidad estructural y funcional de la placenta, y está integrada por una capa externa de sincitiotrofoblastos y múltiples citotrofoblastos en la parte interna. Además, la vellosidad contiene una matriz de fibroblastos (derivados del mesodermo extraembrionario), macrófagos fetales (conocidos como células de Hofbauer) y los capilares fetales formados por células endoteliales (Carrasco-Wong *et al.*, 2020). La remodelación de la vasculatura uterina resulta fundamental en un embarazo exitoso (Maltepe & Fisher, 2015). Esta interfaz vascular-materno-fetal en la placenta es crítica para regular la absorción de nutrientes, el intercambio de gases y la eliminación de desechos.

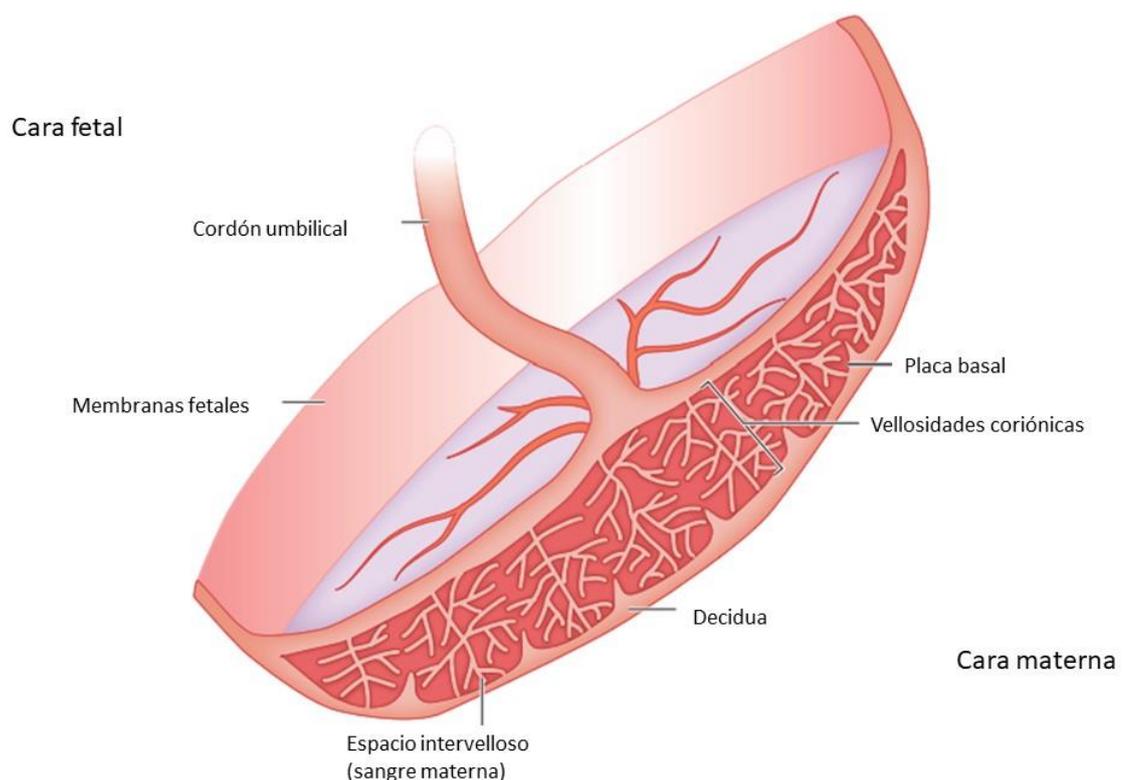


Figura 4. Representación esquemática de la placenta humana. Presenta una cara materna y una cara fetal. Está compuesta por vellosidades coriónicas proyectadas hacia el espacio intervelloso bañado por sangre materna. Los vasos sanguíneos fetales atraviesan el cordón umbilical y llegan a las vellosidades coriónicas, donde se produce el intercambio de gases, nutrientes y desechos. Las vellosidades de anclaje se adhieren a la decidua desde la placa basal y envían ondas de citotrofoblastos invasores para mediar el anclaje de la placenta y establecer el flujo de sangre hacia ella. Tomada y modificada de Maltepe & Fisher, (2015)

La placenta sintetiza múltiples proteínas, hormonas proteicas y esteroides, factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos a lo largo de la gestación

(Blackburn, 2017). Este órgano presenta actividad metabólica, endocrina, inmunológica y de transporte. Precisamente, esta alta actividad metabólica en la placenta demanda un alto consumo de oxígeno y glucosa; incluso, su demanda es equiparable al gasto del cerebro (Blackburn, 2017). En particular, se ha reportado que, del total de glucosa captada por el útero, del 50 al 70% lo consume la placenta (Cruz-Pineda *et al.*, 2022).

La placenta en la DMG, junto con los adipocitos agrandados del tejido adiposo (en el caso de pacientes con obesidad), contribuyen a la inflamación y resistencia a la insulina al secretar citocinas proinflamatorias (Catalano, 2014; Khambule & George, 2019). La placenta genera múltiples adaptaciones a lo largo de su desarrollo, sobre todo cuando se presenta el cuadro clínico de la DMG debido a la hiperglucemia y al ambiente inflamatorio asociados. Las adaptaciones mencionadas son aumento de volumen, peso, grosor y diámetro, aumento en los receptores de estrógenos y leptina, mayor vascularización (aunque deficiente e inmadura), mayores depósitos de glucógeno, mayor proliferación celular, aumento del número de nudos sinciales, necrosis fibrinoide, trombos fibrinoides, inmadurez en las vellosidades coriónicas, edema de las vellosidades, así como mayor área y volumen sincicial para favorecer la absorción de nutrientes (Alonso *et al.*, 2009; Carrasco-Wong *et al.*, 2020; Ehlers *et al.*, 2021; Olmos-Ortiz *et al.*, 2021).

### 1.5.1 Defensa inmunoplacentaria

La placenta es uno de los órganos esenciales para llevar a término un embarazo exitoso. El control inmunológico, como ya se describió, tiene múltiples funciones críticas para el desarrollo del feto y la continuidad del embarazo (Kang *et al.*, 2022). Dentro de estas funciones, en esta sección se describirá la respuesta inmunológica placentaria.

Para censar y detectar la presencia de una posible infección, la placenta expresa una clase de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) denominados receptores tipo toll (TLR). Los TLR receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son los encargados de desencadenar una respuesta inmunitaria innata inflamatoria para combatir dicha infección. La placenta expresa activamente los diez tipos de TLRs, es decir, del TLR-1 al -10 (Nguyen-Ngo *et al.*, 2019; Olmos-Ortiz *et al.*, 2019) con patrones de expresión específicos en el tiempo. Las células T proinflamatorias alteradas, las células T senescentes y las moléculas del punto de control inmunitario están presentes en las placentas con DMG al ser activadas ante una estimulación antigénica (Kang *et al.*, 2022; Pearce, 2010).

La respuesta innata inflamatoria placentaria que se desencadena a consecuencia de la activación de los TLRs incluye la producción de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos. Las citocinas son proteínas de señalización que modulan la respuesta inflamatoria ante la presencia de infección y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o a PAMPs. Entre las citocinas proinflamatorias relevantes en la placenta y durante el embarazo se encuentran la interleucina (IL) 6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). La IL6 se ha asociado con PP al activar el sistema inflamatorio en el fluido cervicovaginal y amniótico en mujeres con DMG (Wei *et al.*, 2010).

La TNF- $\alpha$  e IL6 son citocinas involucradas en la resistencia a la insulina (Carrasco-Wong *et al.*, 2020; Ehlers *et al.*, 2021; Olmos-Ortiz *et al.*, 2021). Así mismo, se ha observado el aumento en la secreción de estas dos citocinas junto con IL1 $\beta$  e IL8 ante la exposición a altas concentraciones de glucosa (25 y 50 mM) en las células del trofoblasto (Olmos-Ortiz *et al.*, 2021). El ambiente proinflamatorio en la placenta humana puede ayudar a explicar la disfunción endotelial periférica en las pacientes con DMG, así como el aumento de la vasculogénesis e inmadurez capilar placentaria (Carrasco-Wong *et al.*, 2020; Ehlers *et al.*, 2021; Olmos-Ortiz *et al.*, 2021). Otras citocinas importantes, pero con actividad antiinflamatoria son la IL10 y la adipocina de tipo adiponectina (Khambule & George, 2019).

Por otra parte, las beta defensinas humanas (HBD) son péptidos antimicrobianos inducidos en respuesta a los estímulos microbianos. La alteración en la concentración y función de las HBDs está involucrada en el PP espontáneo, que a su vez está asociado con cambios cervicales, contractilidad uterina y/o ruptura de membranas; además, se ha reportado que la baja concentración de HBD2 en fluido vaginal cervical aumenta el riesgo de presentar PP (Burriss *et al.*, 2020; Elovitz *et al.*, 2019). Estos péptidos son secretados por la placenta con el fin de combatir la infección, ya que su función principal es la de lisar los microorganismos patógenos (Yarbrough *et al.*, 2015). Las HBDs más importantes, en término de la fisiología de la unidad feto-placentaria, son la HBD1, HBD2, HBD3 y HBD4 (Bai *et al.*, 2015; Cieślik *et al.*, 2021; Jiménez-Escutia *et al.*, 2023; Olmos-Ortiz *et al.*, 2018; Szukiewicz *et al.*, 2016)

## 1.6 Tratamiento farmacológico

De acuerdo con el tratamiento clínico de las pacientes, se pueden categorizar dos tipos de DMG. Aquellas que sobrellevan la condición en el embarazo solamente con dieta y ejercicio, se les clasifica como DMG A1; mientras que en aquellas que no es suficiente la dieta y el ejercicio y se les brinda tratamiento con insulina o algún otro fármaco como la metformina o su combinación, se les clasifica como DMG A2 (Dickens & Thomas, 2019; Mack & MDb, 2017; Olmos-Ortiz *et al.*, 2021).

### 1.6.1 Insulina

La terapia de primera línea farmacológica recomendada es la insulina, ya que es el medicamento que permite controlar la glucosa de manera más rápida, además de que no cruza la barrera placentaria. En la práctica clínica es común iniciar con 0.7 a 1.0 U/kg de peso corporal al día. Los tipos de insulina más frecuentemente utilizados son: análogos de insulina de acción prolongada como detemir y glargina; y análogos de insulina de acción rápida como lispro y aspart. Para las mujeres sin antecedentes de DM se recomienda proteína neutra Hagedorn o detemir (Mack & MDb, 2017).

La insulina es una hormona anabólica con acción en el tejido adiposo, muscular y hepático producida y almacenada en gránulos dentro de las células  $\beta$  pancreáticas de los islotes de Langerhans en el páncreas. El principal estímulo para inducir la secreción pancreática de esta hormona es el aumento de la glucemia en particular en el post-prandio inmediato. Sus principales acciones metabólicas incluyen la incorporación celular de glucosa en tejidos insulino-dependientes como el tejido adiposo y músculo esquelético y el bloqueo de la glucogenólisis en el hígado (Cruz-Pineda *et al.*, 2022).

La insulina favorece el crecimiento y el desarrollo fetal, además de promover el depósito tisular de carbohidratos, lípidos y proteínas. Los efectos de la DMG en el endotelio vascular fetoplacentario se relacionan con la alteración de la expresión y señalización de receptores de insulina, adenosina y adipocinas (Subiabre et al., 2020). El receptor de insulina es una glicoproteína compuesta por dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  unidas a través de puentes disulfuro (Kristensen et al., 1998). El receptor cuenta con las isoformas A y B; la A está predominantemente presente en tejido placentario y fetal, mientras que la B en el hígado, el tejido adiposo y el músculo. La ubicación de éstos cambia a medida que el embarazo avanza: en un inicio, se localizan en la membrana de las microvellosidades del sinciotrofoblasto, en las etapas finales del embarazo se encuentran en el endotelio fetoplacentario y en la labor de parto ambas isoformas se presentan en el endotelio fetoplacentario y en la microvasculatura de la placenta humana (Subiabre et al., 2020).

Múltiples evidencias *in vitro* e *in vivo* han demostrado la actividad antiinflamatoria de la insulina. En un modelo de endotoxemia inducido por lipopolisacáridos (LPS) en ratas macho Sprague Dawley, el tratamiento con insulina disminuyó la cascada proinflamatoria (IL-1, IL-6 y TNF) y aumentó la antiinflamatoria al elevar los niveles séricos de IL-4 e IL-10 (Jeschke et al., 2004). Asimismo, la insulina disminuyó la secreción de la molécula de adhesión intercelular -1 (ICAM), la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y la activación de NF $\kappa$ B en células endoteliales aórticas humanas *in vitro* (Sun et al., 2014). Finalmente, en una línea celular de macrófagos humanos endotoxémicos, la insulina ejerció efectos antiapoptóticos, mejoró la viabilidad celular y redujo la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- e IL-1 $\beta$  (Leffler et al., 2007).

### 1.6.2 Metformina

La segunda línea de acción farmacológica suele incluir a la metformina (Cruz-Pineda et al., 2022). Se trata de una biguanida sintética, su papel para el control de la glucosa es a través de la reducción de la gluconeogénesis en el hígado, además de estimular indirectamente la captación de glucosa en los tejidos periféricos. La dosis diaria puede iniciar en 500 mg hasta los 2500 mg según la tolerancia de cada paciente (Mack & MDb, 2017).

Los mecanismos de la metformina como hipoglucemiante oral y glucoregulador involucra múltiples vías, como la disminución de la glucogenólisis hepática, el incremento de los depósitos de glucosa en el hígado, inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial en el hígado mejorando la sensibilidad a la insulina y la disminución de la absorción intestinal de glucosa (Soto et al., 2008; Rena et al., 2017).

Este hipoglucemiante oral se absorbe rápidamente a través del epitelio intestinal transportándose a través de la vena porta al hígado para su acumulación, aquí será su principal sitio de acción (Sivalingam et al., 2014). Es posible su transporte a través de la membrana mitocondrial mediante transportadores de cationes orgánicos (OCT). La placenta expresa muchas isoformas de OCT, principalmente OCT3 en los trofoblastos fetales. Por esta razón, la metformina puede atravesar la barrera placentaria (Ahmadimoghaddam et al., 2013).

En comparación con el tratamiento con insulina, la metformina se ha asociado con menor aumento de peso materno, menor edad gestacional al momento del parto, menor riesgo de hipertensión gestacional, niveles más bajos de colesterol y triglicéridos así como menor riesgo de hipoglucemia neonatal (Balsells *et al.*, 2015; Bishop *et al.*, 2019; Sivalingam *et al.*, 2014). También se ha visto una reducción de unidades formadoras de colonias (UFC) bacterianas en células epiteliales y macrófagos humanos (Rodríguez-Carlos *et al.*, 2020).

La metformina también ha demostrado tener un efecto antiinflamatorio en múltiples estudios. Por ejemplo, pacientes con DMT2 después de 4 meses de tratamiento con metformina mostraron menor concentración de la proteína C reactiva, un importante marcador de inflamación periférica (Chu *et al.*, 2002). Por otra parte, el tratamiento con metformina redujo la expresión de IL1 $\beta$  durante la exposición prolongada al estímulo proinflamatorio de lipopolisacárido (LPS) en macrófagos primarios derivados de la médula ósea (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021; Postler *et al.*, 2021).

## II. Justificación

La diabetes mellitus gestacional (DMG) es un tipo de diabetes que se define como la intolerancia a la glucosa que comienza o se vuelve detectable por primera vez en el embarazo, llegando a afectar hasta al 25% de mujeres embarazadas. La DMG se relaciona con múltiples eventos adversos maternos y fetales, como parto prematuro, preeclampsia, ruptura prematura de membranas corioamnióticas, macrosomía, hipoglucemia neonatal, infecciones cervicovaginales, entre otras (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021).

Las infecciones cervicovaginales pueden desencadenar una infección intrauterina ascendente, lo que incrementa el riesgo de complicaciones en el embarazo, particularmente PP y RPM. Dentro de las infecciones vaginales fúngicas, *C. albicans* es el principal patógeno con el desarrollo de candidiasis en mujeres con DMG (He *et al.*, 2022). Tiene una prevalencia en más del 50% de los casos, mientras que especies de *Candida* no *albicans* se presentan en aproximadamente un 40% (Gunther *et al.*, 2014). Las alteraciones metabólicas en la DMG como el aumento vaginal de glucógeno y mayor disponibilidad de glucosa como fuente de energía para este hongo aumentan el riesgo de infección por candidiasis en el embarazo (Talapko *et al.*, 2022).

La farmacoterapia convencional indicada en pacientes con DMG es la insulina y la metformina (sección 1.6) (Dickens & Thomas, 2019; Mack & MDb, 2017; Olmos-Ortiz *et al.*, 2021). El tratamiento con ambos hipoglucemiantes en distintos modelos experimentales ha mostrado su eficacia a través de una actividad antiinflamatoria (Jeschke *et al.*, 2004; Chu *et al.*, 2002). No obstante, aún se desconoce su efecto en el contexto de infección en la placenta humana.

Los resultados derivados de esta investigación contribuirán en la comprensión de los eventos asociados a la infección con *C. albicans* en la placenta humana. Se podrá escudriñar si la metformina e insulina tienen un efecto antiinflamatorio que pudiera ayudar a contener el ambiente infeccioso adverso intrauterino asociado a la inflamación. El objetivo es poder mejorar la salud perinatal y limitar las comorbilidades infecciosas en las mujeres con DMG.

## III. Hipótesis

El uso de insulina y metformina disminuirá la respuesta inflamatoria de la placenta ante la infección por *C. albicans* favorecerá la producción de beta defensinas placentarias para combatir esta infección en un modelo *in vitro* de DMG.

## IV. Objetivos

### 4.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto de la insulina y la metformina sobre la respuesta inflamatoria y la defensa innata de la placenta humana infectada con *C. albicans* en un modelo *in vitro* de hiperglucemia que asemeja el ambiente de la DMG.

### 4.2 Objetivos específicos:

- A. Estandarizar las condiciones de infección con *C. albicans* en el cultivo de explantes placentarios
- B. Evaluar la respuesta de la placenta humana en la secreción de las citocinas pro-inflamatorias IL6, IL8 en respuesta a la infección con *C. albicans* en el modelo *in vitro* de DMG.
- C. Cuantificar la producción de las beta-defensinas HBD1, HBD2, HBD3 y HBD4 en respuesta a la infección con *C. albicans* en el modelo *in vitro* de DMG.
- D. Evaluar el efecto de la insulina y la metformina sobre la secreción de IL6, IL8 y producción de HBD1, HBD2, HBD3 y HBD4 en la placenta humana infectada con *C. albicans* en un modelo *in vitro* de DMG.

## V. Metodología

### 5.1 Generalidades del protocolo experimental

La presente tesis se realizó bajo un protocolo experimental correspondiente al área de investigación biomédica básica simulando un modelo de DMG *in vitro* haciendo uso de cultivo primario de explantes placentarios. Esto con el fin de evaluar la respuesta placentaria ante la

infección por *C. albicans* en el escenario de DMG. La respuesta inmune se evaluó mediante la cuantificación de las citocinas IL6 e IL8, y de las beta - defensinas HBD1, HBD2, HBD3 y HBD4 ante diferentes tratamientos experimentales entre los que se evaluó la respuesta con la adición de los fármacos insulina y metformina.

Se trata de un estudio experimental biomédico. Por el contacto con el paciente, es de tipo transversal ya que el único contacto fue durante la cesárea al momento de invitarla a participar en el estudio y solicitar su consentimiento informado bajo una normativa ética (Anexo 1). También se trata de un estudio comparativo de muestras independientes, con proporción 1:1 (tratamientos experimentales: control), a las que, al finalizar la n propuesta, se les evaluó estadísticamente.

## 5.2 Lugar donde se realizó el protocolo

El Instituto Nacional de Perinatología (INPer) Isidro Espinosa de los Reyes se encuentra ubicado en Montes Urales 800, Col. Lomas de Virreyes, Ciudad de México. C.P. 11000. La misión de este Instituto Federal es mejorar la calidad de vida de las mujeres durante su etapa reproductiva y durante el periodo perinatal. El desarrollo de esta tesis se realizó en el laboratorio de Inmunología de la Unidad feto-placentaria perteneciente al departamento de Inmunobiología. En el laboratorio se realiza investigación biomédica básica utilizando tejidos extraembrionarios como membranas coriámnióticas, placenta y el cordón umbilical donados por mujeres cuyos embarazos han sido normoevolutivos, sin complicaciones y concluidos por cesárea. Los tejidos se mantienen *in vitro* bajo tratamientos experimentales que permiten simular condiciones del embarazo tanto en salud como en caso de una infección intrauterina. La intención de emplear estos modelos experimentales es para conocer los mecanismos que ejercen distintos moduladores endocrinos, metabólicos y farmacológicos sobre la respuesta inmune de los tejidos extraembrionarios, y particularmente aquellos mecanismos que se activan durante escenarios infecciosos.

## 5.3 Toma de muestras

La toma de muestras biológicas se realizó en el Hospital Ángeles México, ubicado en Agrarismo 208, colonia Escandón II Sección, delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México. C.P. 11800. El protocolo cuenta con la aprobación en este Hospital para la colecta de la placenta. Posteriormente las muestras se trasladaron en un contenedor especial para el manejo adecuado de muestras biológicas humanas hacia el Instituto Nacional de Perinatología para su procesamiento experimental. La toma de muestras no se realizó directamente en el INPer debido a que las pacientes que son atendidas en este sitio generalmente llegan con complicaciones en su embarazo. Por lo que, de ser tomada la muestra placentaria, ésta presentaría una actividad inflamatoria previa que influiría con los objetivos de este protocolo.

## 5.4 Cálculo del tamaño de muestra

El cálculo de tamaño muestral se realizó en el programa informático PS Power and Sample Size Calculations, versión 3.0 (Dupont & Plummer, 1998) con resultados de secreción de marcadores inflamatorios previos de nuestro grupo de laboratorio (Jiménez-Escutia *et al.*, 2023).

En ese estudio, la secreción de TNF- $\alpha$  en cultivo *in vitro* de tejido placentario mostró distribución no normal, y la dispersión en la condición experimental fue de 153 pg/mL/g de tejido. La diferencia entre las medianas experimental y control fue de 229 pg/mL/g de tejido. Para un estudio experimental con variables continuas (secreción de marcadores inflamatorios), con controles y condiciones experimentales en muestras independientes, se requiere estudiar 7 muestras independientes en total de placenta humana para lograr responder tanto a la hipótesis como a los objetivos marcados (poder 0.8 y probabilidad de error Tipo I de 0.05).

## 5.5 Criterios de inclusión y exclusión

Se recolectó la placenta de aquellas mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión. Los tejidos biológicos se emplearon para generar el modelo experimental *in vivo* de DMG.

### Criterios de inclusión

Las muestras biológicas de un grupo de pacientes con embarazo normoevolutivo a término (37 a 40 semanas de gestación (sdg)) se colectaron de acuerdo a los siguientes criterios. Los criterios de inclusión fueron: Pacientes con edad biológica entre 18 y 38 años, sin enfermedades endocrinas o metabólicas subyacentes, con estudios laboratoriales recientes dentro de parámetros normales, sin consumo de medicamentos diferentes a los propios del embarazo y sin desarrollo de infecciones cervico-vaginales en el último trimestre de gestación, programadas a operación cesárea y sin evidencia clínica de trabajo de parto.

### Criterios de exclusión

Se excluyeron de este estudio a aquellas pacientes que no proporcionaron su consentimiento informado para la toma de las muestras biológicas. Se excluyeron también a aquellas pacientes con alergia a la penicilina o estreptomicina, que presentaron alteraciones reflejadas en los laboratoriales de rutina, con parto eutócico vaginal, embarazo múltiple, infección en el tracto genitourinario durante el último trimestre de gestación o con cualquier enfermedad metabólica o endocrina subyacente.

### Criterios de eliminación

Se eliminaron por completo del proyecto a aquellas mujeres que decidieron voluntariamente terminar su participación en cualquier momento del desarrollo del estudio retirando su consentimiento para el procesamiento de la muestra biológica donada. También, se eliminaron pacientes con datos de hiperglucemia durante la cirugía (> 95 mg/dL en ayuno) o aquellas muestras biológicas cuyo análisis microbiológico indicó positivo.

## 5.6 Consideraciones bioéticas para la recolección y procesamiento de la placenta

El proyecto contó con la autorización de los Comités de Investigación, Bioseguridad y Ética en Investigación del Instituto Nacional de Perinatología (Número de proyecto 2018-1-152). Se incluye la carta de autorización de dicho proyecto (Anexo 2), con extensión de su vigencia hasta el 01 de noviembre de 2023. Además, el proyecto contó con financiamiento del Fondo Ciencia Básica de CONAHCYT (número de proyecto: CB-A1S-27832), vigencia al 30 de octubre de 2023.

## 5.7 Variables del estudio

### 5.7.1 Variables independientes:

- Glucosa añadida al medio de cultivo para los explantes placentarios (10 y 50 mM)
- Tratamiento con insulina (500 nM)
- Tratamiento con metformina (500 nM)

### 5.7.2 Variables dependientes:

- Secreción de citocinas placentarias IL6 y IL8 (escala de medición ng/g de tejido)
- Contenido intracelular de beta-defensinas HBD1, HBD2, HBD3 y HBD4 en el tejido placentario (escala de medición ng/mg proteína)
- Crecimiento de colonias de la cepa clínica de *C. albicans* a una concentración de infección de  $1 \times 10^5$  UFC/mL.

### 5.7.3. Controles experimentales

Como controles positivos que estimulen la respuesta inflamatoria en el cultivo de explantes placentarios, se usaron los siguientes antígenos:

- Tratamiento con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) (500 nM)
- Tratamiento con ácido lipoteicoico de *Staphylococcus aureus* (LTA) (500 nM)

Cabe señalar que estos controles de inducción de respuesta inflamatoria en la placenta humana han sido ampliamente probados por nuestro grupo de laboratorio (Olmos-Ortiz *et al.*, 2019).

## 5.8 Aislamiento y cultivo de explantes placentarios

Después del alumbramiento, se recolectó la placenta de las pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y se transportó en un contenedor estéril de acero inoxidable hacia el laboratorio de Inmunobiología del INPer para su procesamiento. La placenta se lavó exhaustivamente con solución salina tibia (NaCl 0.9%) bajo condiciones de esterilidad en un gabinete de cultivo celular, con el fin de eliminar la mayor cantidad de sangre posible en la placenta. Antes de procesar la placenta, se tomó una muestra de sangre placentaria para evaluar la presencia de anticuerpos IgG/IgM anti-SARS-CoV-2 con el fin de identificar una reciente infección viral COVID-19. De esta forma, nos aseguramos de que las muestras estuvieran libres de este virus para poder evitar contagio y resultados inespecíficos por una respuesta previa inflamatoria. Se procedió a cortar el cotiledón central, tomando en cuenta como el centro el punto donde se encuentra el cordón umbilical, con la finalidad de trabajar con la mayor cantidad de árboles vellosos que pudiéramos encontrar en esta sección.

Con ayuda de material quirúrgico estéril se eliminaron los vasos sanguíneos, coágulos, decidua y membranas corioamnióticas. Los cotiledones limpios se cortaron en segmentos de 3 a 5 mm<sup>2</sup>, y se colocaron provisionalmente en un medio de mantenimiento con glucosa y solución salina con el fin de preservar su integridad.

Finalmente se colocaron de dos a tres explantes por pozo (triplicado de cada tratamiento) con 1.5 mL de medio de cultivo en placas de 24 pozos con su tratamiento correspondiente. El medio base utilizado fue Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) bajo en glucosa (*Low Glucose*) ajustado a la concentración de glucosa según el tratamiento aplicado, suplementado con 10% de suero de ternera neonatal inactivado (STNi), 1 mM de piruvato de sodio y 1% de antibióticos/antimicóticos (penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 g/mL, anfotericina B 25 ng/mL).

Los explantes se mantuvieron en un incubador a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa, renovándose a las 24h, con una exposición total a los tratamientos de 48 h. El cultivo de explantes placentarios es un modelo bien conocido y manejado por el grupo de trabajo del Laboratorio (Olmos-Ortiz *et al.*, 2019; Olmos-Ortiz *et al.*, 2016).

Adicionalmente, se colectaron tres explantes de cada placenta para someterlos a ensayo microbiológico para descartar contaminación subclínica previa o bien contaminación por manipulación de las muestras. El estudio consistió en colocar el explante en un tubo con infusión cerebro corazón (BHI), otro en caldo arginina y otro en caldo urea. La incubación fue a 37°C durante 5 días. El crecimiento después de este tiempo fue reportado (pudiendo incluir microorganismos aerobios, anaerobios facultativos, igualmente *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*). Se descartaron a las muestras que resultaron con contaminación positiva.

## 5.9 Montaje del modelo *in vitro* de DMG

De acuerdo con los criterios de los Grupos de Estudio de la Asociación Internacional de Diabetes y Embarazo (IADPSG) se considera como normoglucemia durante el embarazo la concentración < 92 mg/dL, equivalente a 5.1 mM. El medio DMEM bajo en glucosa utilizado para este modelo *in vitro* (Thermo, 10567) contiene 5 mM de D-Glucosa, una concentración restringida para el cultivo de tejidos extraembrionarios (Kliman *et al.*, 1986), por lo que se adicionó D-glucosa anhidra al medio de cultivo para semejar las concentraciones de 10 mM (fisiológico esperado a una hora post- carga de glucosa en la OGTT) y 50 mM (equivalente a 900 mg/dL). Tanto en la placenta como en otros modelos biológicos se ha trabajado con estas condiciones de hiperglucemia (Abadpour *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2015; Huerta-García *et al.*, 2012; Rice *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2018). Por lo tanto, para el modelo de DMG se incubaron los explantes placentarios durante 48 horas con medio ajustado en glucosa 50 mM. El medio control o testigo consistió en medio ajustado con glucosa 10 mM (Figura 5).

Medios de glucosa utilizados:

Para el pre estímulo según el tratamiento indicado se utilizó:

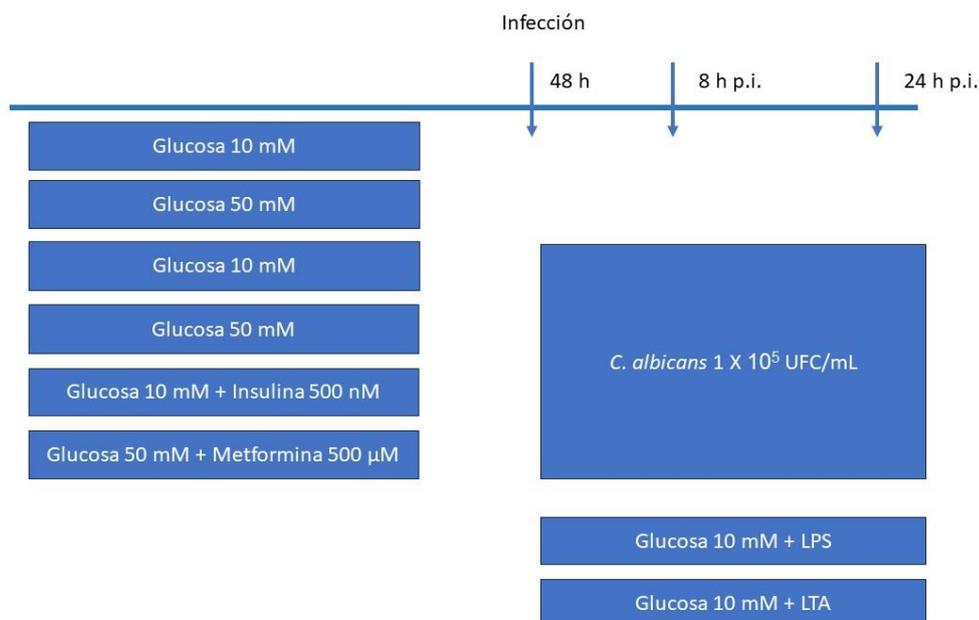
- Medio DMEM adicionado con glucosa 10mM + Antibiótico (antibióticos/antimicóticos) + STNi 10% + Piruvato de sodio al 1%
- Medio DMEM adicionado con glucosa 50mM + Antibiótico (antibióticos/antimicóticos) + STNi 10% + Piruvato de sodio al 1%

El día de la infección se utilizó el siguiente medio, con los tratamientos experimentales deseados:

- Medio DMEM adicionado con glucosa 10mM +hidrolizado de lactoalbúmina (HLA) 0.2% + Piruvato de sodio al 1%

Variables experimentales:

- Insulina 500mM
- Metformina 500  $\mu$ M
- Lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) 500 nM
- Ácido lipoteicoico de *S. aureus* (LTA) 500 nM
- Infección con *C. albicans* ( $1 \times 10^5$  UFC/mL)



**Figura 5.** Tratamientos experimentales para el procesamiento de explantes placentarios.

El LPS y el LTA son componentes de la pared celular de bacterias gram negativas y gram positivas, respectivamente, y en este proyecto se utilizaron como control para comparar con la respuesta inflamatoria placentaria inducida por bacterias que se ha descrito previamente por nuestro grupo de laboratorio (Olmos-Ortiz *et al.*, 2019). Igualmente, la concentración de insulina y metformina corresponde con la utilizada en resultados previos en tejidos placentarios (Jiménez-Escutia *et al.*, 2023). Se decidió infectar a  $1 \times 10^5$  UFC/mL con *C. albicans* de acuerdo con investigaciones previas (Dornelas Figueira *et al.*, 2020; Lagrou *et al.*, 2015; Zaga-Clavellina *et al.*, 2006, 2012).

## 5.10 Cultivo, crecimiento y manipulación de *C. albicans*

Para realizar la infección de los explantes placentarios se utilizó una cepa clínica de *C. albicans* obtenida del Instituto Nacional de Perinatología obtenida a partir del exudado vaginal de una paciente con cervicovaginitis atendida en el Instituto. En los resultados se describirá su caracterización morfológica, microbiológica y molecular.

*C. albicans* se mantuvo en crecimiento exponencial y se realizaron alícuotas de trabajo de 100 µL que se mantuvieron en ultracongelación (-40 °C) hasta su uso experimental. Las alícuotas se realizaron en medio BHI + glicerol al 10% y se contemplaron como alícuotas de un sólo uso para no afectar su viabilidad por ciclos de descongelación.

El día previo a la infección placentaria, se agregó la cepa congelada (aproximadamente 40 µL) en 5 mL de medio BHI tibio y se mantuvo toda la noche a 37 °C sin agitación. El medio

BHI es de uso general y se considera apto para el crecimiento de diferentes organismos, desde bacterias hasta levaduras y hongos filamentosos.

El día de la infección se calculó la concentración de UFC/mL mediante el uso de una ecuación exponencial establecida al inicio del proyecto (ver sección 6.3 Curva de crecimiento de *C. albicans*).

Ecuación 1:

$$UFC/mL = 251,293e^{(3.9327)(x)}$$

Siendo x la absorbancia detectada en un espectrofotómetro a 600 nm.

Se ajustó la concentración de infección a  $1 \times 10^5$  UFC/mL. Una vez finalizados los tiempos de infección a las 8 h y 24 h, se realizaron diluciones seriadas para la siembra en placa con el fin de conocer el crecimiento de colonias obtenido. La siembra se realizó en placas de agar de Luria Bertani (LB) como medio nutritivo. Gracias a su contenido de peptona de caseína y extracto de levadura, es un medio de uso general para el desarrollo óptimo de diferentes organismos; además, contiene en su composición cloruro de sodio, lo que contribuye a un equilibrio osmótico y buen crecimiento de levaduras, ya que las mismas necesitan un medio con contenido de carbohidratos y sales.

La manipulación de la cepa tanto en el medio BHI como en el agar LB se realizó dentro de una campana de bioseguridad nivel 2 en condiciones de esterilidad, uso de guantes de nitrilo y bata de algodón.

## 5.11 Tinción gram para caracterización morfológica de levaduras

Con el fin de identificar la morfología ovalada de la levadura y en gemación de *C. albicans* se realizó tinción de gram. Brevemente, se colocó una gota de *C. albicans* suspendida en medio BHI sobre un portaobjetos, y se extendió la gota con ayuda de una punta de 1000  $\mu$ L. Posteriormente se fijó con calor y se inició la tinción simple modificada de gram con cristal violeta durante 1 minuto, agua destilada para enjuagar y yodo como mordente durante 1 minuto. Finalmente se enjuagó nuevamente con agua destilada y se destiñó con acetona - alcohol a fin de retirar los excedentes de colorante no adheridos a la laminilla.

## 5.12 PCR de punto final para identificación de *C. albicans*

Con la finalidad de caracterizar molecularmente a nuestra cepa de *C. albicans*, se realizó PCR de punto final para corroborar la presencia de una secuencia conocida de DNA en este

hongo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) nos permite detectar y amplificar un gen conservado específico de *C. albicans* con el fin de caracterizar la cepa. En este caso, se eligió amplificar la región 345,243 a 345,388 del cromosoma R; el tamaño del amplicón fue de 145 pb.

El fundamento de la técnica indica que una enzima con actividad en DNA polimerasa cataliza la síntesis de una hebra de DNA complementaria mediante el uso de trifosfatos de desoxinucleótidos individuales (dNTP) y DNA monocatenario (ssDNA); mediante esta reacción, el ssDNA se transforma posteriormente en DNA de doble cadena (dsDNA). Durante este proceso se producen millones de copias de la secuencia genética de interés (Mahanama & Wilson-Davies, 2021). Finalmente, las copias amplificadas se detectan mediante un gel de agarosa para identificar el DNA presente.

El primer paso, que es la extracción del DNA, se puede sintetizar en cuatro pasos: lisis, desproteinización, purificación y precipitación. Un día previo a realizar la extracción, se pone a crecer una alícuota de *C. albicans* en medio BHI a una temperatura de 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifuga a 3,000 rpm durante 10 minutos con la finalidad de obtener el botón celular. Se resuspende el botón en GTD (Guanina, timina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)) y se pasa a un tubo estéril con perlas. Se le dan tres ciclos de vórtex (15 segundos) y enfriamiento en hielo (30 segundos) con la finalidad de desproteinizar; posteriormente, se centrifuga a 3,000 rpm durante 5 minutos y se transfiere a un tubo estéril. Se hace uso de un solvente orgánico de fenol-cloroformo-alcohol para la purificación de la muestra de DNA. El proceso se realiza 2 veces y se centrifuga nuevamente. Se añaden 9 partes de acetato de sodio (3M) por cada porción de muestra (Por ejemplo: 90 µL de acetato de sodio + 10 µL de muestra). Posteriormente, se agrega una proporción del mismo volumen de etanol absoluto a -20°C. Una vez finalizados estos pasos, se deja precipitar toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se cuantificó el contenido de DNA en las muestras midiendo la relación de absorbancia con el índice 260/230 y 260/280. Posteriormente, se amplifica el total de DNA en la muestra mediante el siguiente protocolo en un termociclador: Se realizan 40 ciclos con tres puntos de temperatura (95°C temperatura de desnaturalización, 58°C temperatura de complementariedad y 72°C temperatura de trabajo o de extensión). Con la temperatura alta de 95°C se da la ruptura de puentes de hidrógeno y la obtención de cadenas simples de DNA; a 58°C se unen los cebadores específicos para la secuencia de interés, que permitirán señalar los sitios de inicio de replicación; a los 72°C se extiende el acoplamiento de dNTPs para finalizar a las hebras complementarias de DNA.

Al término del protocolo en el termociclador se cargó la muestra en un gel de agarosa al 1%. La electroforesis se mantuvo durante 30 minutos a voltaje constante de 100 V. El tamaño de los amplicones se corroboró con una escalera de 100 pb. Además, la corrida incluyó un control positivo y un control negativo para *C. albicans*. Como control positivo se utilizó la secuencia genoma de *C. albicans*, disponible del banco del laboratorio de Inmunobioquímica del INPer. El control negativo corresponde a agua bidestilada desionizada estéril, sometida a la electroforesis y marcada con bromuro de etidio.

## 5.13 conteo de unidades formadoras de colonias de *C. albicans*

Como se puede observar en los resultados (sección 6.2), al inicio de este proyecto se estandarizó la concentración de *C. albicans* para los ensayos de infección en la placenta humana. Primero, se probaron concentraciones crecientes de  $10^3$  a  $10^6$  para decidir la concentración ideal y continuar con el desarrollo experimental. Por lo tanto, se decidió trabajar con la concentración  $10^5$ . Cabe agregar que la concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL de orina representa el punto de corte para el diagnóstico de una infección clínica (Echevarría-Zarate *et al.*, 2006).

El conteo se realizó mediante la técnica de goteo en placa haciendo uso de NaCl 0.9% + Tween 80 al 0.05% con diluciones seriadas 1:10. Brevemente, se extendió una microgota de 10  $\mu$ L de cada dilución por triplicado en una placa de agar LB. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C hasta que las colonias fueron visibles para su recuento (24h - 48h). El cálculo de las colonias se realizó con la siguiente ecuación:

Ecuación 2:

$$UFC/ml = \frac{(No.de colonias) (Factor de dilución)}{Volumen del pozo de cultivo (1000 \mu L)}$$

Por lo tanto, el día del conteo se corroboró en cada experimento que se estaba trabajando con la concentración deseada de  $1 \times 10^5$  UFC/mL en el tiempo cero. Posteriormente, se evaluó el crecimiento de colonias a las 8 y 24 h bajo las diferentes condiciones experimentales.

## 5.14 Tinción Grocott para evaluar la presencia de hifas de *C. albicans* en los explantes placentarios cultivados

Al término del tiempo de infección se colocaron algunos explantes en formol. Posteriormente se embebieron en bloques de parafina y se realizó el corte de los tejidos con ayuda de un microtomo. El corte se colocó sobre un portaobjetos y se prosiguió a su desparafinación y fijación.

La infiltración de hifas de *C. albicans* en el tejido placentario se determinó mediante la tinción de Grocott. Las paredes de los hongos son ricas en polisacáridos, por lo que, tras su contacto con el ácido crómico usado en la tinción, estos polisacáridos se convierten en aldehídos, los cuales reducen los iones de plata metenamina a plata metálica. La síntesis de plata metálica en esta reacción confiere a la pared fúngica una coloración entre café y negro, lo que denota la presencia de hifas (Remedios *et al.*, 2021).

Los cortes se observaron al microscopio (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA) equipado con una cámara AxioCam Erc5s con aumento 20X. El procesamiento digital de las imágenes fue realizado con el software (Jena, Alemania) Zen 2.3 (edición azul).

## 5.15 Obtención de extractos proteicos totales y cuantificación de proteínas por Bradford

Con la intención de obtener los lisados proteicos totales, se almacenaron los explantes placentarios en buffer de lisis de proteínas al término de los experimentos. El buffer está compuesto por Tris (hidroximetil) aminometano – ácido Clorhídrico (Tris-HCl) 200 nM, EDTA 0.5 mM, IGEPAL® 1%, deoxicolato de sodio 5%, dodecil sulfato sódico (SDS) 10%, NaCl 1M, fluoruro de sodio (NaF) 1M, inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich, Catálogo: P8340) 0.1% y ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) 200 mM. Los explantes se mantuvieron en ultracongelación a  $-40^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento.

La lisis mecánica de los tejidos se realizó con el equipo politron (Marca OMNI, modelo 125) en frío, manteniendo las muestras en hielo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína total mediante Bradford.

Para ello, se utilizó una placa de cultivo de 96 pozos en la que se cargaron las muestras diluidas 1:5 o 1:8 dependiendo de cuánta proteína concentrada se visualizaba cualitativamente mediante una prueba previa con el reactivo de Bradford. La dilución se realizó con agua bidestilada. Se usó como curva de calibración una ya conocida de albúmina bovina sérica (BSA ajustado a 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00 y 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se usó agua bidestilada como blanco de referencia en la curva patrón a la cual también se le agregó el reactivo de Bradford.

Se colocó en la placa cada punto de referencia y de muestra por duplicado en volumen final de 5  $\mu\text{L}$  y posteriormente, se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford. Finalmente, se realizó la lectura cuantitativa a 595 nm en el espectrofotómetro (Bio-Rad, xMark). Con los datos de concentración de proteína, se realizó el cálculo para tener 350  $\mu\text{g}$  de proteína total en un volumen de 100  $\mu\text{L}$ .

## 5.16 Cuantificación de IL6, IL8 y HBD 1 - 4 por la técnica de ELISA

Se realizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para determinar la secreción de IL6 e IL8. Se recuperaron los medios de cultivos de los tratamientos tanto a las 8 como a las 24 horas de tratamiento. Se utilizó un estuche comercial de ELISA de la marca

PeproTech para cuantificar a IL6 (900-K16). La cuantificación de IL8 se hizo con el kit comercial de ELISA de la marca R&D systems (DY208).

Por otra parte, se analizó la abundancia de HBD 1 – 4 en los sobrenadantes obtenidos de la lisis de los explantes placentarios para determinar su concentración intracelular tanto a las 8 como a las 24 h. La cuantificación se realizó con los siguientes kits comerciales de ELISA de la marca Peprotech: HBD1 (900-K202), HBD2 (900-K172), HBD3 (900-K210) y HBD4 (900-K435). Las especificaciones de cada analito se muestran en la Tabla 1.

Con la finalidad de cuantificar la especificidad de los anticuerpos indicados a las muestras placentarias, se realizaron los correspondientes análisis de ELISA que se basan en un reconocimiento de anticuerpos específicos de las muestras utilizadas contra la región Fc humana de cualquier isotipo (IgG, IgA o IgM). Los anticuerpos anti-Fc están unidos a enzimas como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina (Hernández Ramírez & Cabiedes, 2010). Se da un tiempo de interacción entre el anticuerpo presente en los medios de cultivo recuperados de los tejidos placentarios y los anticuerpos presentes en las placas de ELISA. Se realizan diferentes lavados para eliminar los anticuerpos no adheridos y sobrantes en la placa y se agrega el anticuerpo secundario o de detección durante un tiempo para permitir la interacción. Finalmente, se agrega el sustrato cromogénico específico para la peroxidasa, lo cual hará un viraje de color y la intensidad del mismo dependerá de la cantidad de anticuerpo conjugado con la enzima de acuerdo al antígeno en la muestra de medio que reconoce el anticuerpo adherido a la placa de ELISA. Se realiza una medición cuantitativa en un espectrofotómetro tomando como base una curva patrón con diferentes diluciones en donde van a entrar, o no, cada pozo de muestra colocado en la placa.

Tabla 1. Especificaciones analíticas para los kits de ELISA empleados en el proyecto

Analito	Marca y modelo del kit de ELISA	Curva de referencia de estándar	Concentración de trabajo del Ab captura	Concentración de trabajo del Ab detección	Concentración de trabajo del Ab captura	Reactivo en el que se realizaron las diluciones de anticuerpos y estándar	Dilución de las muestras
IL6	R&D Systems (900-K16)	23.43 - 3000 pg/mL	2 µg/mL	50 ng/mL	200 ng/mL	Buffer bloqueo (PBS 1X + BSA al 1%)	1:100
IL8	R&D Systems (DY208)	23.43 - 3000 pg/mL	4 µg/mL	20 ng/mL	100 ng/mL	Buffer bloqueo (PBS 1X + BSA al 1%)	1:100
HBD1	PEPROTECH (900-K202)	23.43 - 3000 pg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL	1 µg/mL	Reactivo diluyente (BSA al 1% + PBS 1X + Tween 20 al 0.05%)	Ajustado a 350 g de proteína total en un volumen de 550 µL
HBD2	PEPROTECH (900-K172)	23.43 - 3000 pg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL	1 µg/mL	Reactivo diluyente (BSA al 1% + PBS 1X + Tween 20 al 0.05%)	Ajustado a 350 g de proteína total en un volumen de 550 µL
HBD3	PEPROTECH (900-K210)	23.43 - 3000 pg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL	1 µg/mL	Reactivo diluyente (BSA al 1% + PBS 1X + Tween 20 al 0.05%)	Ajustado a 350 g de proteína total en un volumen de 550 µL
HBD4	PEPROTECH (900-K435)	23.43 - 3000 pg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL	1 µg/mL	Reactivo diluyente (BSA al 1% + PBS 1X + Tween 20 al 0.05%)	Ajustado a 350 g de proteína total en un volumen de 550 µL

El paso inicial es sensibilizar la placa de ELISA mediante el anticuerpo primario o de captura para que posteriormente se pueda unir al antígeno de la muestra colocada. Se colocaron 100 µL del anticuerpo diluido en 10.2mL de PBS 1X para obtener la concentración de trabajo deseada. Posteriormente, se colocaron 100 µL en cada pozo de la placa (placa de 96 pozos) y se mantuvo durante toda la noche a una temperatura de 4°C para propiciar una buena adhesión del anticuerpo de captura a la placa.

Al día siguiente, que es el montado de muestras, se inicia con 3 lavados a la placa mediante un lavador de placas automático marca Bio-Rad con la solución wash buffer (PBS 1X + Tween al 20 0.05%) y se procede a bloquear la placa con albúmina (PBS 1X + BSA 1%) durante al menos una hora a temperatura ambiente con una cubierta de aluminio.

La curva patrón o de calibración se realiza mediante 7 diluciones seriadas del estándar incluido en el kit comercial. Se realizaron tres lavados después del tiempo de bloqueo con el fin de eliminar uniones inespecíficas. Se hizo el cargado de muestras y estándar de referencia con 100  $\mu$ L/pozo. Para permitir la adecuada interacción antígeno - anticuerpo, se dejó en incubación con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se colocó el anticuerpo de detección (100  $\mu$ L/pozo). Se puede dejar el mismo en incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, o bien durante toda la noche a 4°C.

Nuevamente se realizaron tres lavados para eliminar uniones inespecíficas en la placa y se incubó durante 30 minutos cubierto de la luz con 100 $\mu$ L por pozo de estreptavidina-peroxidasa de rábano (HRP) ya que es fotosensible. Finalmente, para la reacción colorimétrica se utilizó el sustrato o-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD) de Sigma Aldrich en buffer de fosfato de sodio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) 0.2 M, ácido cítrico 0.1 M, 0.05% peróxido de hidrógeno al 30%, pH 5.0; y se utilizó como solución de paro ácido sulfúrico 2N. Una vez definido el viraje en la colorimetría se leyó cada placa en el espectrofotómetro Bio-rad (Modelo xMark) a una longitud de onda de 492 nm. La curva estándar se ajustó a una regresión logística de 4 parámetros para la determinación de la concentración de analitos en las muestras.

## 5.17 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de secreción de IL6, IL8 y HBD 1-4, se utilizó el programa GraphPad Prism 9.3.0 (GraphPad Software, Inc.). Se evaluó la normalidad de la distribución de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. A continuación, se describen las pruebas de elección, dependiendo de la distribución de las muestras:

- Para datos de distribución no normal se usó la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones múltiples pareadas se hicieron por Dunn.
- Para datos de distribución normal se usó la prueba de ANOVA ordinaria de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples pareadas de Tukey.

Se consideró como diferencia estadística significativa el valor de P inferior a 0.05 ( $P < 0.05$ ).

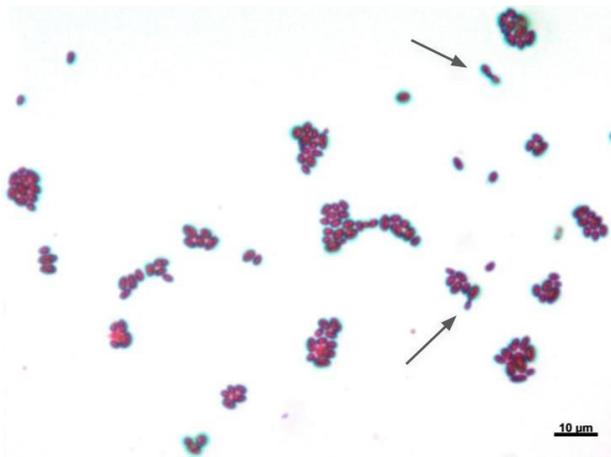
# VI. Resultados

## 6.1 Caracterización de *C. albicans*

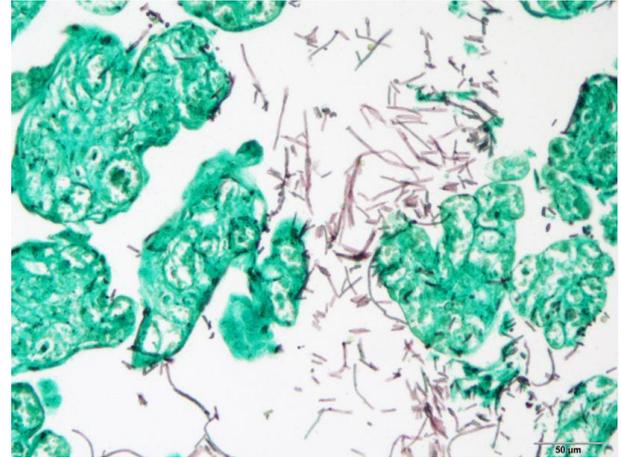
La caracterización morfológica y molecularmente de la cepa del hongo dimórfico *C. albicans* utilizada para este estudio consistió en la realización de tinciones Grocott y modificación de gram e identificación molecular por PCR tiempo final.

En la Figura 6A se puede apreciar la morfología elíptica u ovalada de la levadura, con un tamaño reportado entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  (Dignani *et al.*, 2009). Asimismo, en esta microfotografía se puede apreciar en los sitios señalados con flecha su reproducción asexual por gemación (Bengel, 2010). En la Figura 6B se presenta otra microfotografía de la infección con *C. albicans* en la placenta humana. En este caso, se puede apreciar su forma hifal, asociada con su forma infecciosa. La hifa es una estructura multicelular hiperpolarizada en forma de filamentos con sitio de expansión en su pared celular (Gow *et al.*, 2011; Kashem *et al.*, 2015; Riquelme *et al.*, 2018).

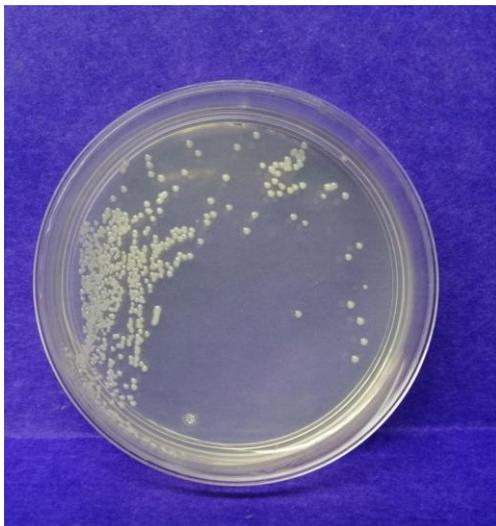
En cuanto a su caracterización macroscópica en la Figura 6C se puede observar que crece en colonias muy pequeñas (de alrededor de 1 mm de diámetro). Las colonias son típicamente blancas, translúcidas por completo, y pueden adquirir un color crema conforme van envejeciendo en el agar. Sus colonias son lisas, suaves, húmedas y de bordes definidos, aunque en algunas ocasiones proyectan filamentos hasta la profundidad del agar dando un aspecto "velloso" (Buschelman *et al.*, 1999; Doñate, 2017; Pfaller, 2015). Finalmente, en la Figura 6D se presenta su caracterización a nivel molecular. El amplicón detectado corresponde con una región conservada del cromosoma R de este hongo. En este gel de agarosa, se muestra el control positivo, la muestra y control negativo de *C. albicans*. Como se puede visualizar, la amplificación del producto en la muestra coincide con el amplicón observado en el genoma control de *C. albicans* (control positivo). Por el contrario, no se observa ninguna banda en el control negativo, lo que descarta la contaminación a lo largo del desarrollo experimental.



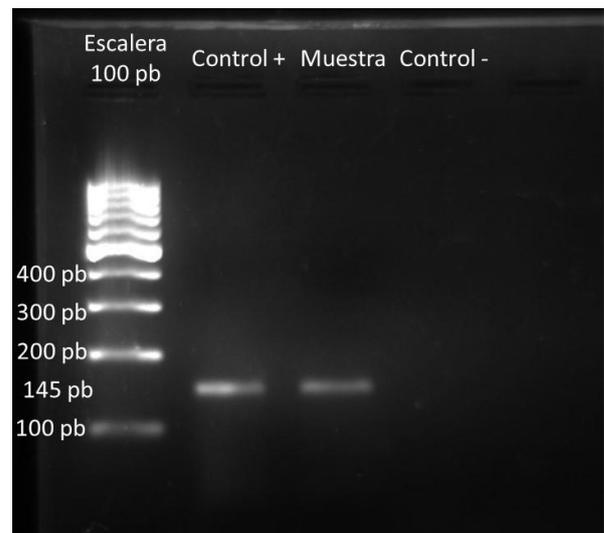
A. Morfología microscópica de levadura



B. Morfología microscópica de hifa



C. Morfología macroscópica de colonias



D. Identificación molecular

**Figura 6.** Caracterización microbiológica y molecular de *C. albicans*. A) Morfología microscópica de levadura de *C. albicans* aumento 20X con tinción de gram. Se visualiza la forma ovalada característica de las levaduras. Se señala con flecha las levaduras en gemación. B) Morfología microscópica de hifa aumento 20X con tinción de Grocott. Se visualiza en coloración café la forma de hifa, descrita como la forma infecciosa. Visualización en explante placentario tratado con Glucosa 10 mM (Condición control) e infectado durante 24h con *C. albicans* ( $1 \times 10^5$  UFC/mL). La escala se muestra en la esquina inferior derecha (50  $\mu$ m). C) Morfología macroscópica de las colonias de *C. albicans* en placa de agar LB. D) Identificación molecular por PCR tiempo final. En la imagen se observan los pesos de la escalera de referencia (Columna 1), el control positivo del banco de genoma de *C. albicans* (Columna 2), la muestra con la cepa de estudio (Columna 3), y el control negativo de agua (Columna 4).

## 6.2 Curva de crecimiento de *C. albicans*

Como parte de la estandarización del modelo de infección con *C. albicans*, se cuantificó la curva de crecimiento de este hongo para conocer la relación de UFC/mL y la turbidez en el medio de cultivo, y por último generar una ecuación predictiva de las colonias de *C. albicans* por turbidimetría.

Se monitoreó el crecimiento de *C. albicans* a lo largo de 10 horas. Para ello se tomó una alícuota cada hora y se leyó en un espectrofotómetro a 600 nm para conocer su absorbancia. Adicionalmente, se sembraron placas de agar LB para conocer el conteo de colonias a cada hora. A continuación, se presentan los resultados obtenidos.

En el gráfico se puede apreciar la línea de tendencia punteada con el crecimiento exponencial de *C. albicans*. En la Figura 7 se observa la absorbancia contra el conteo de UFC/mL que indica una curva lenta de crecimiento de *C. albicans*, coincidiendo con el típico patrón de crecimiento de los hongos. Por ejemplo, a partir de la hora 5 de crecimiento, en que inicia la etapa log, se tiene un conteo de  $9.3 \times 10^5$  UFC/mL, mientras que a las 10 horas de seguimiento el conteo es de  $1.8 \times 10^7$  UFC/mL; es decir, un crecimiento de poco más de un logaritmo en 5 horas. En cambio, la tasa de crecimiento logarítmico observado en las bacterias es mucho más acelerado, pudiendo incrementar un logaritmo en cuestión de un par de horas (Cylke & Banerjee, 2023; Jiménez-Escutia *et al.*, 2023; Salman, 2020). El lento crecimiento de los hongos tiene que ver con su naturaleza eucarionte, en comparación con las bacterias que son procariontes. Durante el tiempo de 10 horas se observó su crecimiento desde la fase de adaptación (lag) en las primeras 4 horas, seguido de la fase exponencial (log) a partir de la hora 5.

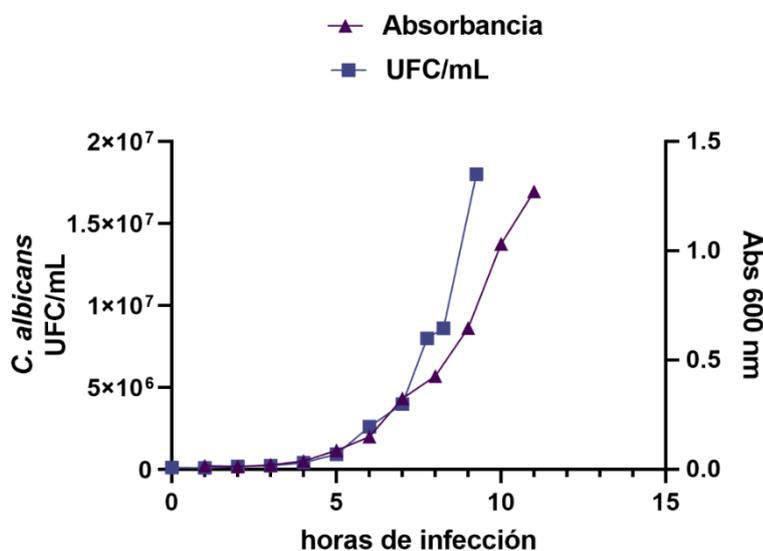


Figura 7. Crecimiento de *C. albicans* A) Curva de crecimiento de UFC/mL de *C. albicans*.

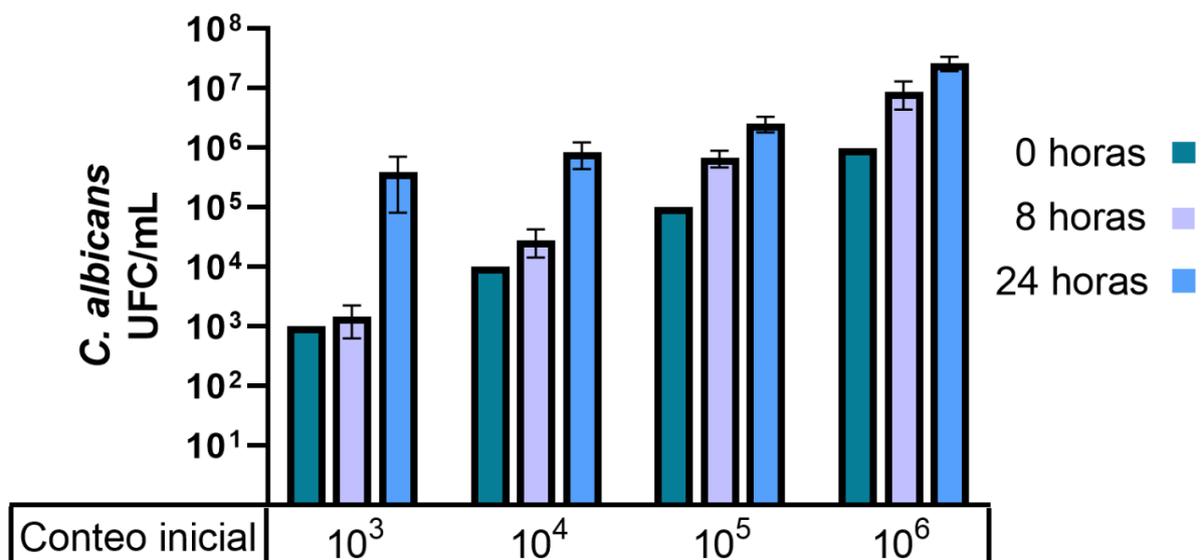
Con estos datos, se obtuvo la curva de tendencia para la absorbancia contra las UFC/mL y se calculó la ecuación predictiva que se utilizó para los siguientes experimentos de infección.

#### Ecuación 1:

$$UFC/mL = 251,293e^{(3.9327)(x)}$$

Siendo "x" la absorbancia leída en el espectrofotómetro a 600 nm.

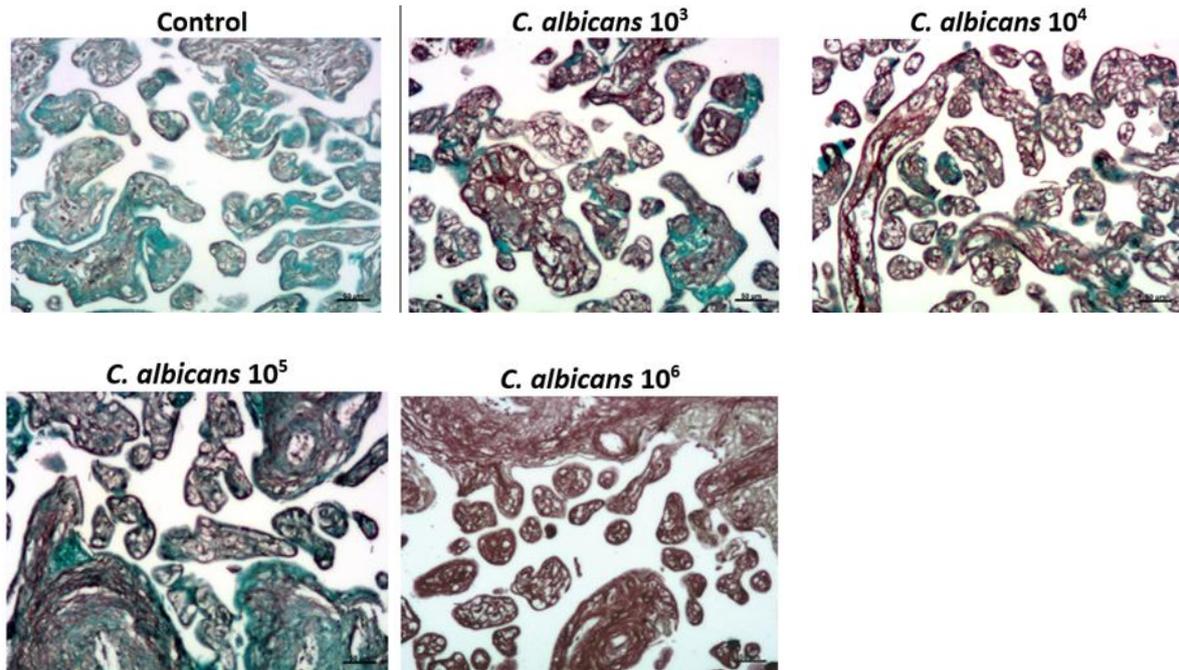
Posteriormente, para conocer la concentración de infección a utilizar en los explantes placentarios, se probó seguir las curvas de crecimiento usando diferentes cargas de inóculo inicial de *C. albicans*. Esto debido a que el crecimiento libre de *C. albicans* no es igual al comportamiento en un modelo de infección, ya que en este caso, entra en juego la capacidad de defensa del tejido placentario. Para ello, se cuantificó el crecimiento con cargas iniciales de infección ajustadas a  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL, y se les dio seguimiento a las 0, 8 y 24 h post-infección (p.i), de acuerdo con lo consultado previamente en la bibliografía (Dornelas *et al.*, 2020; Lagrou *et al.*, 2015; Zaga-Clavellina *et al.*, 2006, 2012). Como se puede apreciar en la Figura 8, al tiempo cero, el conteo de colonias indicó que la carga inicial de infección corresponde efectivamente a  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL. Además, se puede observar que con las concentraciones iniciales de  $10^3$  y  $10^4$ , hay un crecimiento menor de un logaritmo a las 8 h p.i.; mientras que con las concentraciones de  $10^5$  y  $10^6$  se puede observar el crecimiento de un logaritmo a cada tiempo de infección (8 y 24 h). Por lo tanto, las concentraciones de  $10^5$  y  $10^6$  fueron más eficientes en términos de su infectividad, para el montaje de los siguientes experimentos.



**Figura 8.** Crecimiento de *C. albicans* en el medio de cultivo de explantes placentarios infectados con inóculos iniciales a las concentraciones  $10^3$  -  $10^6$  UFC/mL en un tiempo de 8 y 24h post-infección. n = 3 placentas.

Para poder definir si la concentración inicial de infección sería de  $10^5$  o  $10^6$  que fueron las concentraciones con mejor respuesta en el ensayo de crecimiento de colonias, se decidió observar la invasividad de *C. albicans* en el tejido placentario (Figura 9). La tinción de Grocott muestra que conforme se incrementa la concentración del inóculo se puede observar una mayor infiltración del hongo en la vellosidad placentaria. La concentración de  $10^6$  prácticamente satura al tejido, por lo que es demasiado agresiva para el cultivo de explantes placentarios. Por el contrario, la invasividad observada con las concentraciones de  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  es de una magnitud comparable. Por lo tanto, para fines de esta tesis se decidió elegir la concentración inicial de infección de  $10^5$  UFC/mL durante 8 y 24 h p.i. Cabe agregar que esta concentración es equiparable al punto de corte que se utiliza en la práctica clínica para

identificar una infección urinaria causada por bacterias, comúnmente *E. coli* (Echevarría-Zarate *et al.*, 2006; Olmos-Ortiz *et al.*, 2022).



**Figura 9.** Tinción Grocott en explantes placentarios infectados durante 24 h con *C. albicans* ajustada a  $10^3$  a  $10^6$  UFC/mL. La escala en la esquina inferior derecha indica 50  $\mu$ m.

## 6.3 Características clínicas

En la Tabla 2 se muestra la descripción de las características clínicas maternas y fetales, correspondientes a las placentas donadas para este protocolo de investigación. Cabe destacar que todas las placentas incluidas cumplen con los criterios de inclusión y para la obtención de todas se firmó el consentimiento informado. El total de placentas procesadas fue de 7, de acuerdo con el cálculo de tamaño de muestra (sección 5.4).

Tabla 2. Características clínicas maternas y fetales.

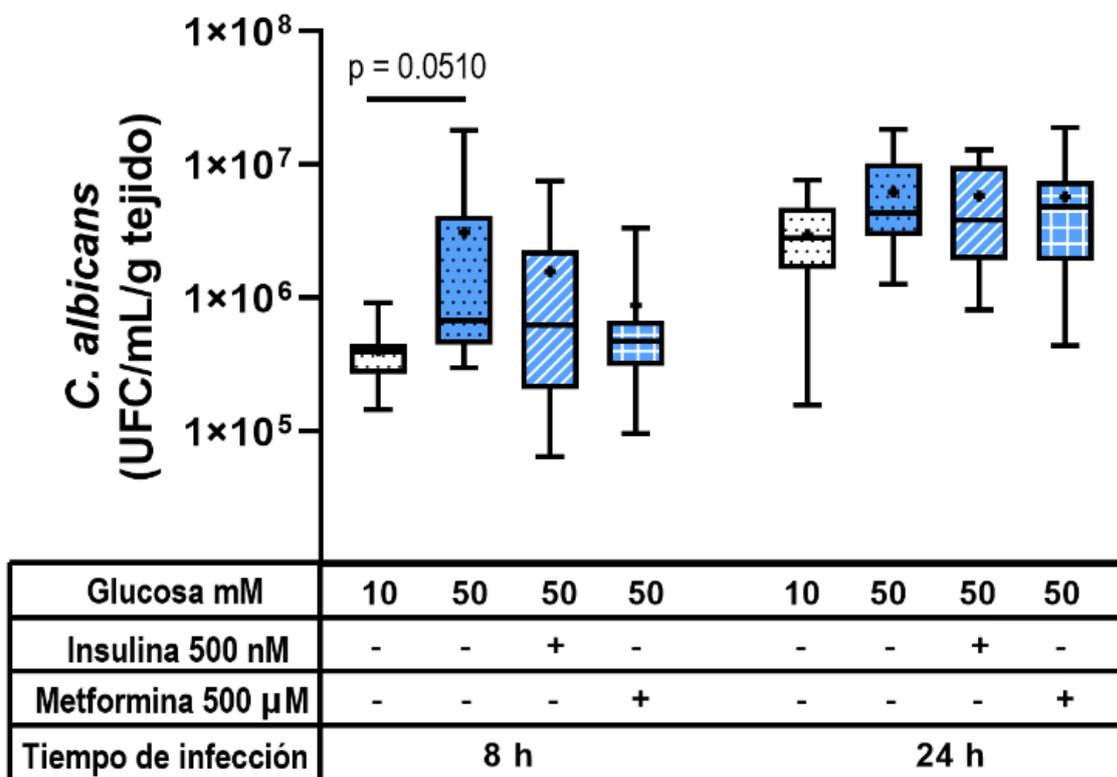
Características maternas		
VARIABLES DEL ESTUDIO	PROMEDIO ± DE	INTERVALO (MIN. - MAX.)
Edad biológica	32 ± 3	27 - 36
IMC pre - gestacional	26.3 ± 2.1	24.2 - 30.4
Número de embarazos	2.1 ± 0.7	1 - 3
Presión sistólica (mmHg)	115.6 ± 11.54	100 - 131
Presión diastólica (mmHg)	76.6 ± 12.1	60 - 90
Ganancia de peso materno (kg)	8.6 ± 4	3 - 15
Características neonatos		
VARIABLES DEL ESTUDIO	PROMEDIO ± DE	INTERVALO (MIN. - MAX.)
APGAR minuto 1	8.7 ± 0.5	8 - 9
APGAR minuto 5	9 ± 0	9
Perímetro cefálico (cm)	34.5 ± 1.3	33 - 35.5
Talla (cm)	48.3 ± 1.5	47 - 50
Peso (kg)	3.2 ± 0.1	3 - 3.3
Sexo	4 hombres, 3 mujeres	57.1% / 42.85%
Otras características		
Peso húmedo de la placenta (gr)	577.4 ± 91.5	493.7 - 685.9

APGAR: acrónimo del sistema de puntuación de los signos físicos del recién nacido (Actividad, Pulso, Mueca, Aspecto y Respiración). IMC: índice de masa corporal. El peso de la placenta fue medido sin membranas fetales y sin cordón umbilical.

## 6.4 Efecto cuantitativo de la capacidad de defensa innata de la placenta humana ante la infección por *C. albicans* y su tratamiento con insulina y metformina

Para evaluar la capacidad de defensa innata de la placenta se utilizó un ensayo cuantitativo (para medir el número de colonias) y un ensayo cualitativo de invasividad intratisular (por tinción Grocott). Primero, se presentan los resultados derivados del ensayo cualitativo de conteo de UFC.

A las 8 horas post infección (h.p.i.), la condición de hiperglucemia tuvo una tendencia hacia lo significativo en el crecimiento de *C. albicans* en comparación con el crecimiento observado en el medio de explantes pretratados con glucosa 10 mM (Figura 10). Sin embargo, después de 24 horas de infección no se encontraron diferencias significativas, lo que podría estar asociado con la internalización de *C. albicans* en el tejido. El tratamiento con insulina o metformina no modificó el conteo de colonias ni a las 8 ni a las 24 h.p.i.



**Figura 10.** Crecimiento de colonias de *C. albicans* en el medio de cultivo de explantes placentarios tratados con glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500 μM). El inóculo inicial fue de  $1 \times 10^5$  UFC/mL. Se mantuvo la infección durante 8 y 24 h.

n = 7 placentas para experimentos independientes en triplicado. Comparación estadística por prueba de Kruskal-Wallis, ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Los datos se presentan en forma de cajas (mediana, rango intercuartil, percentiles 25, 50 y 75) y bigotes (mín-máx).

## 6.5 Efecto cualitativo de la insulina y la metformina sobre la capacidad de defensa innata placentaria ante la infección por *C. albicans*

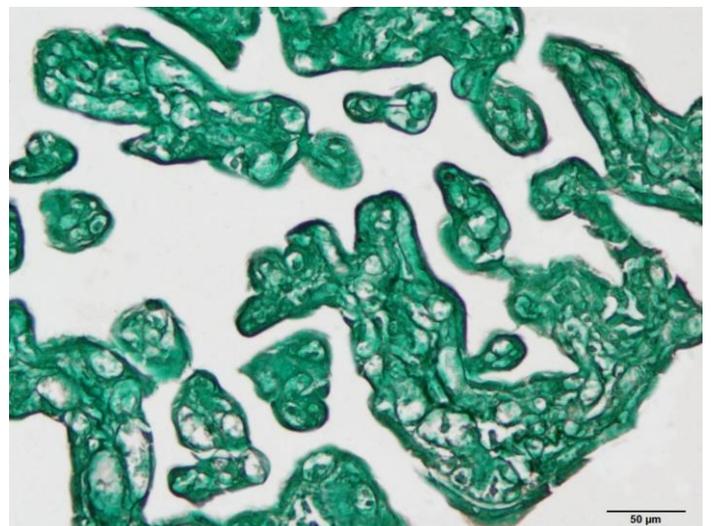
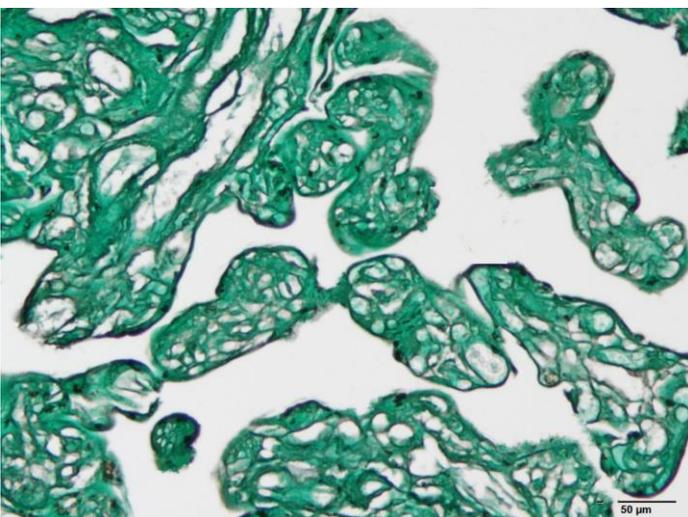
Para observar morfológicamente la fase infecciosa de *C. albicans* en el tejido de explantes placentarios del tercer trimestre, así como la parte cualitativa de la invasividad del mismo en los diferentes tratamientos experimentales, se realizó la tinción de Grocott. En la Figura 11 se muestran los filamentos característicos de la morfología hifal, considerada como la fase infecciosa, en una coloración oscura que contrasta con el tejido placentario en color verde. La capacidad innata placentaria juega un papel fundamental en el control de la invasividad por la infección de *C. albicans*.

A las 8 h.p.i. puede apreciarse de manera cualitativa una tendencia de mayor formación de hifas en los explantes placentarios pretratados con alta glucosa; en contraparte, los explantes pretratados con glucosa 10 mM muestran una menor formación de hifas. A las 8 h.p.i. el tratamiento con metformina fue más efectivo para limitar la invasividad de *C. albicans* en la vellosidad placentaria; ya que con el tratamiento de insulina hay un puntilleo que indica positividad a *C. albicans* en el mesénquima placentario.

Estos mismos efectos se pueden observar de forma mucho más notoria a las 24 h.p.i. Las hifas son más abundantes en los explantes pretratados con glucosa 50 mM que en los explantes pretratados con glucosa 10 mM, lo anterior indica que el hongo tiene condiciones favorables para desarrollar su forma más infecciosa (hifal) ante escenarios de alta glucosa. Por otra parte, puede corroborarse que el pretratamiento con metformina ayudó a disminuir el desarrollo hifal y contener la invasividad de este hongo en la vellosidad placentaria. De manera general, de acuerdo con los resultados obtenidos, se aprecia una mejor respuesta por parte de la metformina en comparación con la insulina.

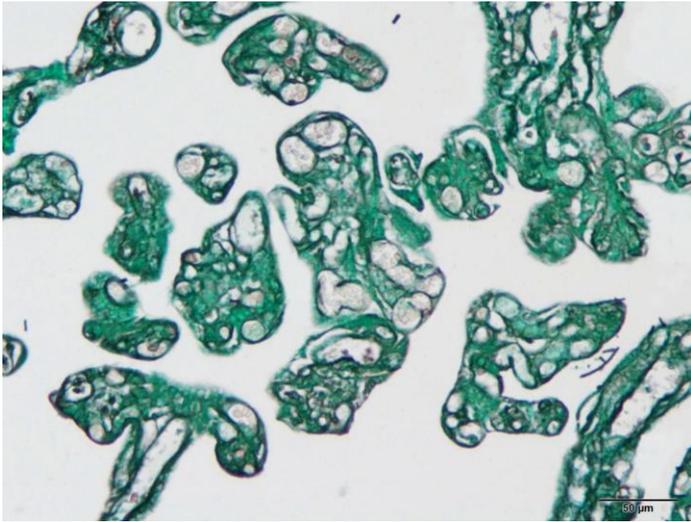
Control negativo Glucosa 10 mM

Control negativo Glucosa 50 mM

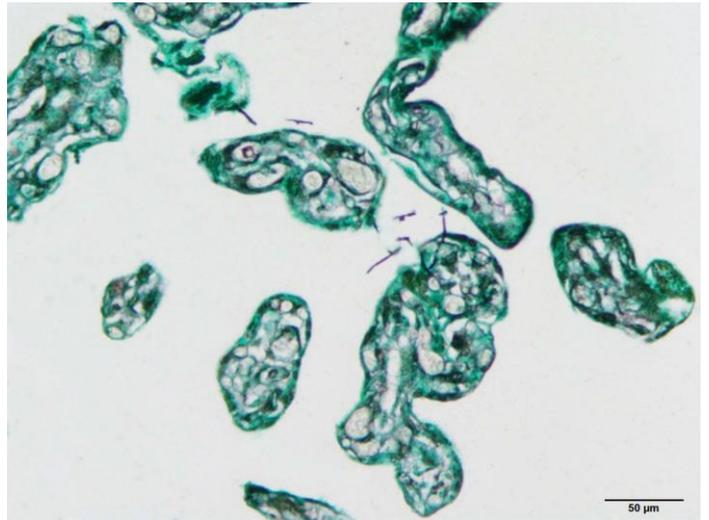


Inicia figura 11

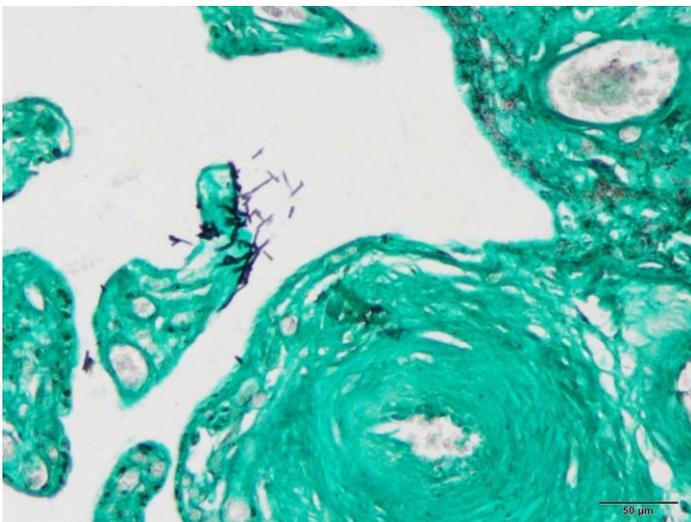
Glucosa 10 mM 8 h



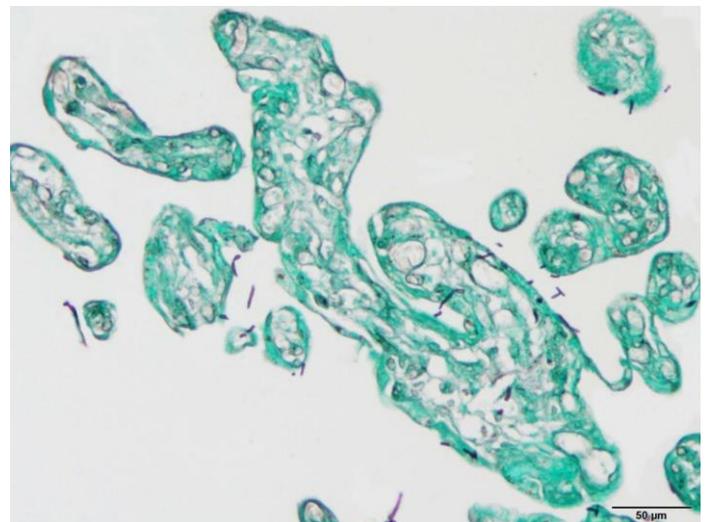
Glucosa 50 mM 8 h



Glucosa 10 mM + Insulina 500 nM 8 h

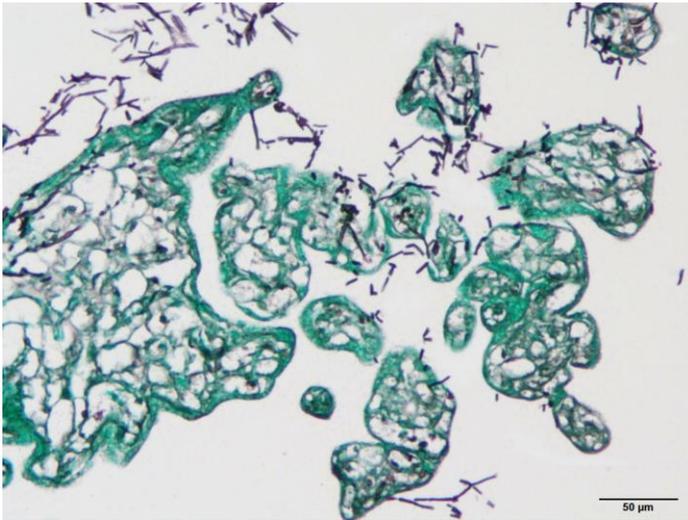


Glucosa 50 mM + Metformina 500 nM 8 h

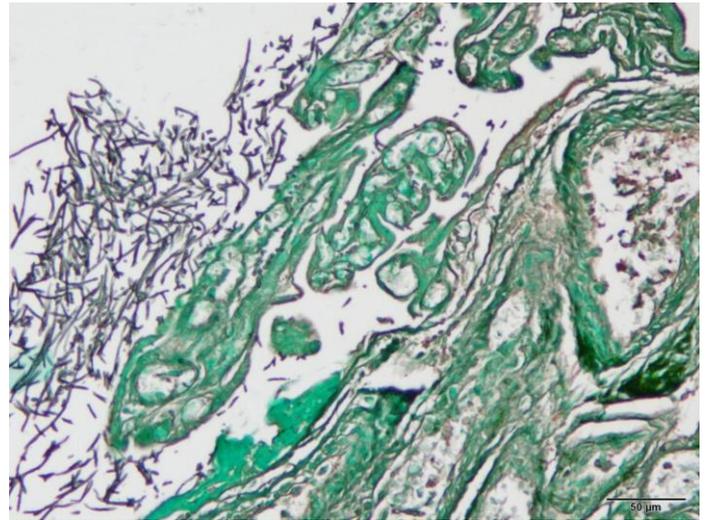


Continua figura 11

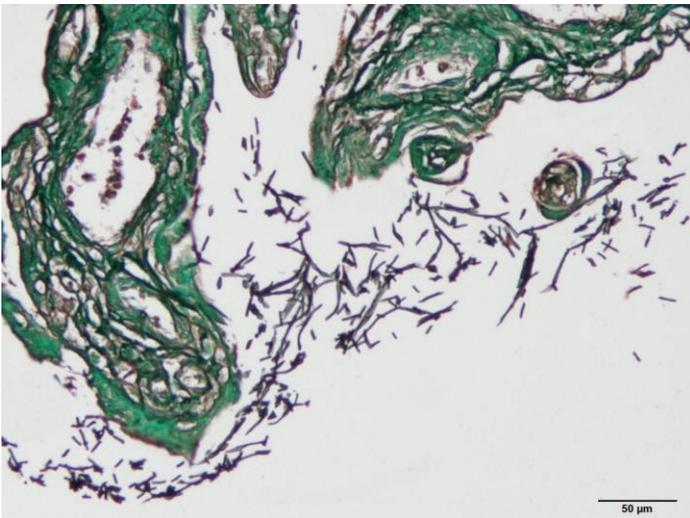
Glucosa 10 mM 24 h



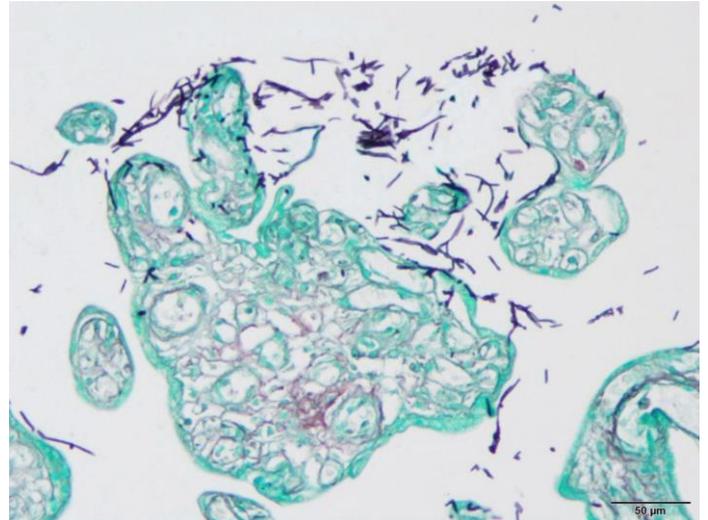
Glucosa 50 mM 24 h



Glucosa 10 mM + Insulina 500 nM 24 h



Glucosa 50 mM + Metformina 500 nM 24 h

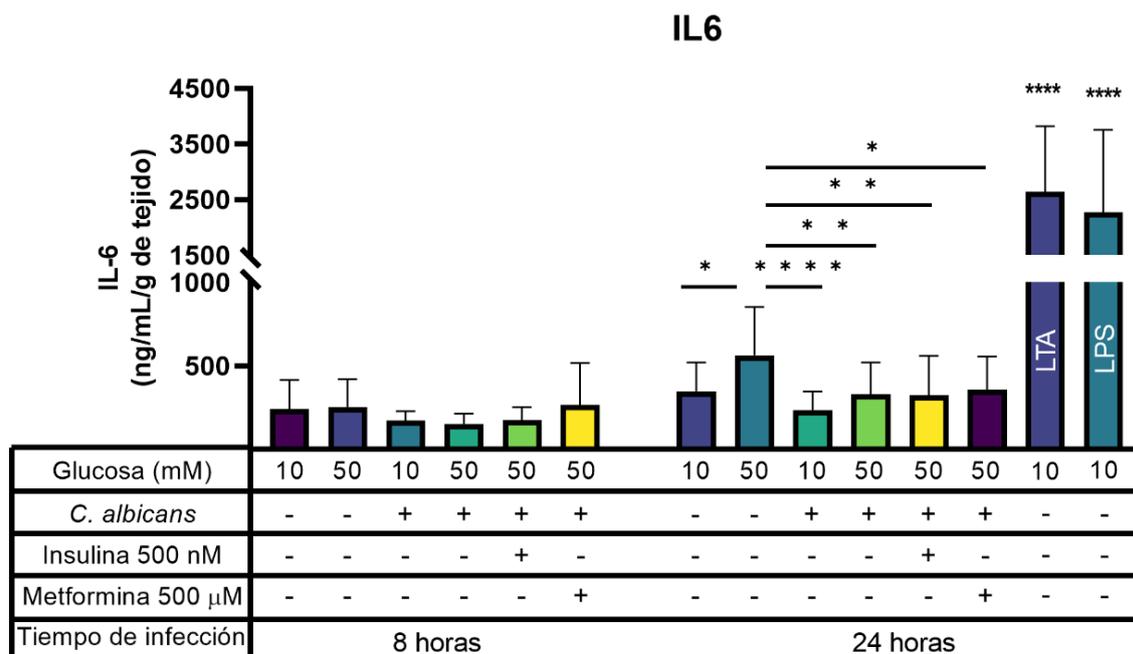


**Figura 11.** Cortes histológicos de vellosidades placentarias infectadas con *C. albicans*. Los explantes placentarios se pretrataron durante 48 horas con glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) o metformina (500 μM). Seguimiento a las 8 y 24 h.p.i. Tinción Grocott. Barra de escala en esquina inferior derecha de 50 μm.

## 6.6 Efecto de la hiperglucemia y el tratamiento con insulina o metformina sobre la secreción de las citocinas proinflamatorias IL6 e IL8 en explantes placentarios infectados con *C. albicans*

Se decidió evaluar la respuesta inflamatoria placentaria ante la infección por *C. albicans*. Cabe señalar que de manera inicial se contempló medir a los marcadores inflamatorios TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ . Sin embargo, estas citocinas estuvieron debajo del límite de detección en los ensayos de ELISA, por lo que la respuesta inflamatoria sólo se pudo reportar con los marcadores IL6 e IL8.

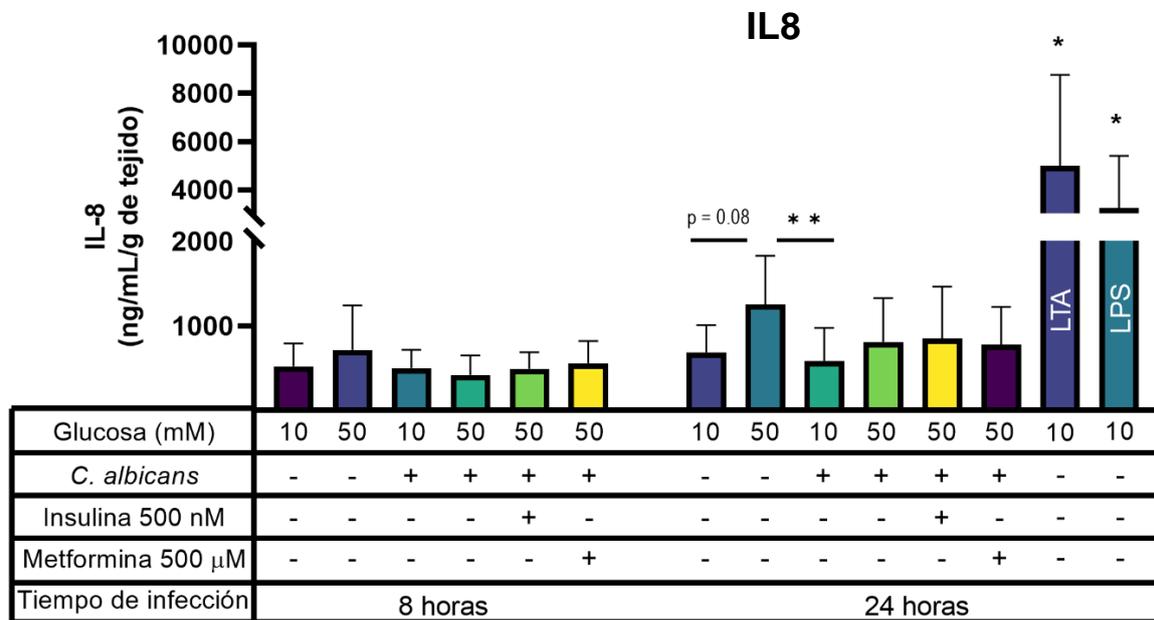
Como se muestra en la Figura 12, sólo se observaron cambios significativos tras 24 h p.i. Particularmente, la hiperglucemia fue un importante inductor de la secreción de IL6. De manera interesante, la infección disminuyó significativamente la secreción de IL6 en comparación con la hiperglucemia. Esta secreción disminuida de IL6 se sostuvo con la infección independientemente de la concentración de glucosa o el tratamiento con insulina o metformina. Adicionalmente, se evaluó la secreción de IL6 en respuesta a dos antígenos bacterianos bien caracterizados por nuestro y otros grupos de (Olmos-Ortiz *et al.*, 2019; Jiménez-Escutia *et al.*, 2023), el LPS y el LTA, que imitan un escenario de infección aguda por bacterias. Ambos antígenos indujeron de manera considerable la secreción de esta citocina, demostrando que la respuesta ante la infección por *C. albicans* es completamente diferente de la que puede observarse ante una infección bacteriana.



**Figura 12.** Secreción de IL6 en explantes placentarios infectados con *C. albicans* ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) en respuesta a la glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500  $\mu$ M)

n = 7 placentas para experimentos independientes en triplicado. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía. Las comparaciones múltiples se hicieron por la prueba post hoc de Tukey debido a la distribución normal de los datos; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*\*P<0.0001. Los datos se presentan como promedio y desviación estándar.

En cuanto a la secreción de la citocina proinflamatoria IL8, ésta mostró un comportamiento idéntico al previamente descrito para IL6. La hiperglucemia indujo casi significativamente ( $P = 0.08$ ) su secreción a las 24 h p.i., mientras que la infección en medio de glucosa 10 mM la disminuyó significativamente (Figura 13). Nuevamente, el tratamiento con LPS y con LTA indujo considerablemente la secreción de IL8.



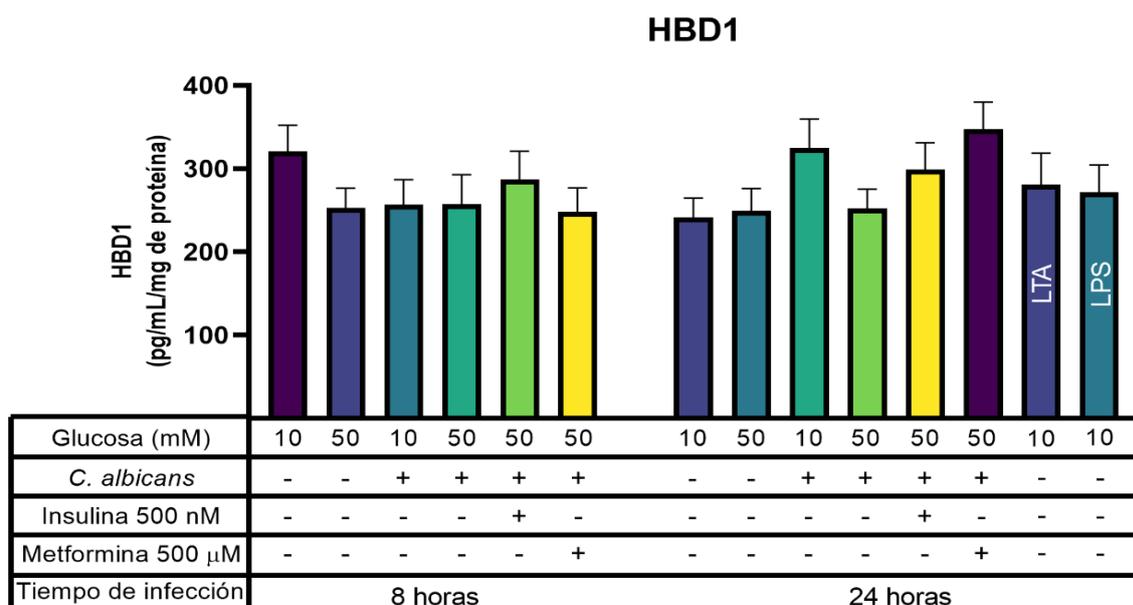
**Figura 13.** Secreción de IL8 en explantes placentarios infectados con *C. albicans* ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) en respuesta a la glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500  $\mu$ M).

$n = 7$  placentas para experimentos independientes en triplicado. Análisis estadístico mediante la ANOVA de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba de Dunn para las comparaciones múltiples.  $P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ . Los datos se presentan como promedio y desviación estándar.

## 6.7 Efecto en la producción de las beta defensinas 1 - 4 en explantes placentarios así como con el tratamiento con insulina y metformina

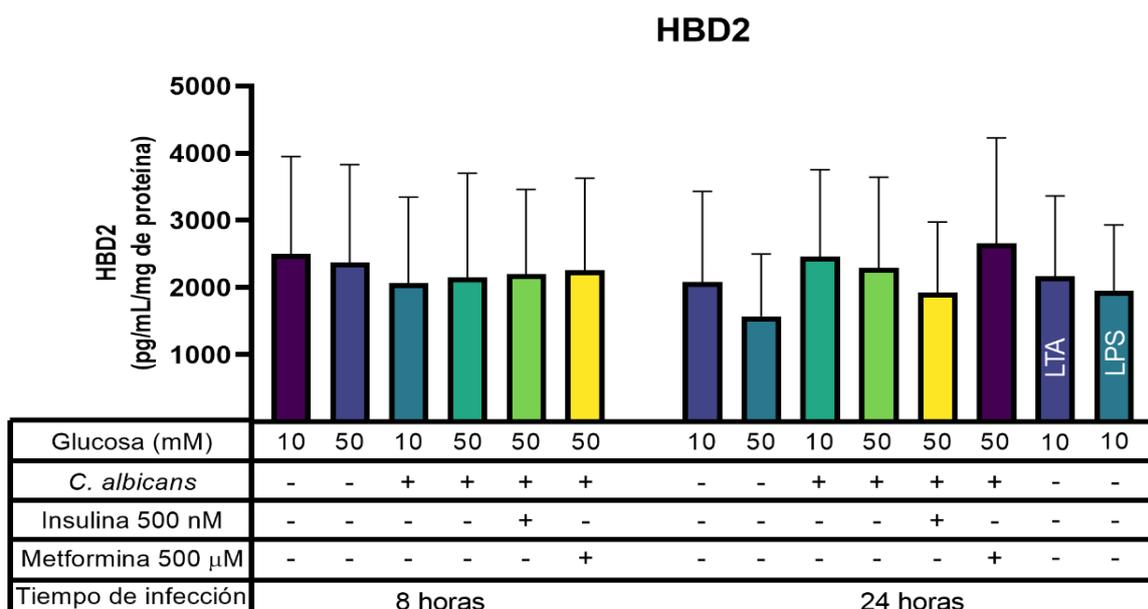
Ya que las beta defensinas son péptidos antimicrobianos que se inducen en respuesta a los estímulos microbianos y son secretados en la placenta, se evaluaron de igual manera ante el escenario de hiperglucemia, debido a que se sabe que su secreción baja ante estas condiciones. Según lo observado en las Figuras 14 - 17, la infección con *C. albicans* indujo de manera significativa la producción de HBD3. Un patrón similar puede observarse con HBD1 y HBD4, aunque no alcanzaron la significancia estadística. De manera interesante, la condición de hiperglucemia + infección, resultó en una menor producción de HBD1, HBD3 y HBD4, aunque sin diferencia estadística.

Además, se visualiza una discreta disminución en la producción de las HBD 1 - 4 en la condición de hiperglucemia. El tratamiento con insulina y metformina no reflejaron un cambio significativo en la producción de las beta defensinas.



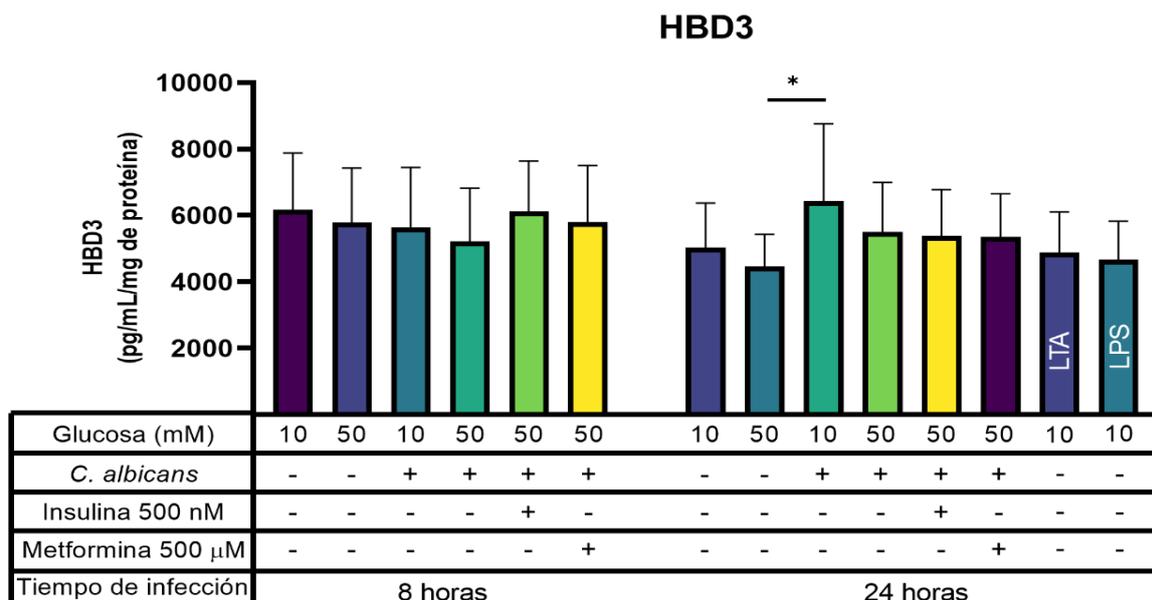
**Figura 14.** Síntesis de HBD1 en explantes placentarios infectados con *C. albicans* ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) en respuesta a la glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500  $\mu$ M)

n = 7 placentas para experimentos independientes en triplicado. Comparación estadística por prueba de Kruskal-Wallis, ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Los datos se presentan como promedio y desviación estándar.



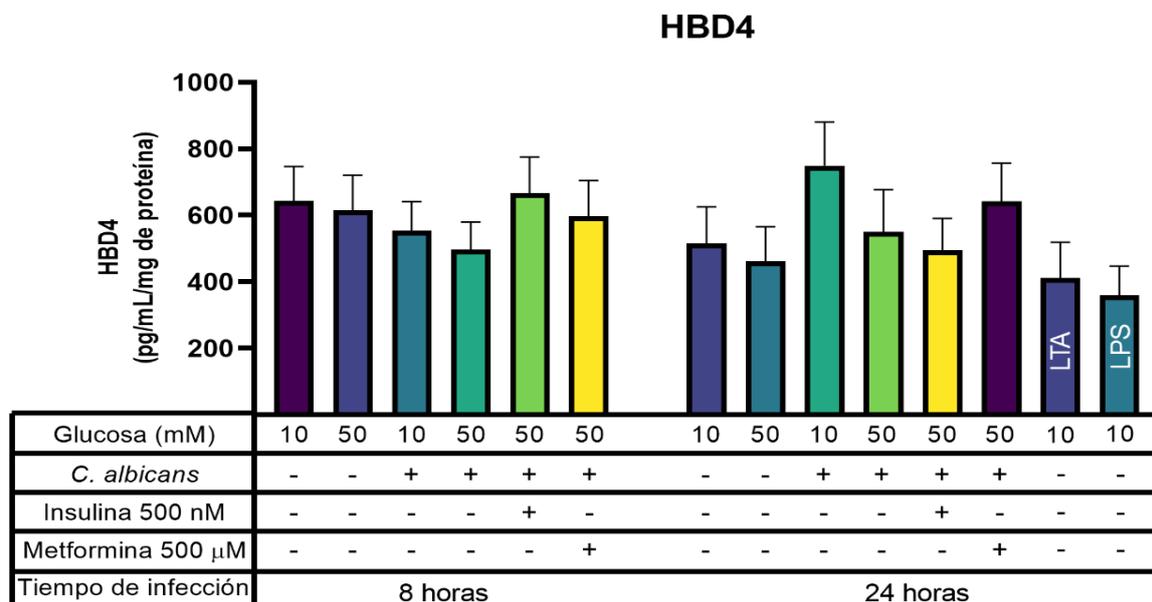
**Figura 15.** Síntesis de HBD2 en explantes placentarios infectados con *C. albicans* ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) en respuesta a la glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500  $\mu$ M).

n = 7 placentas para experimentos independientes en triplicado. Comparación estadística mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey debido a la distribución normal. Los datos se presentan como promedio y desviación estándar.



**Figura 16.** Síntesis de HBD3 en explantes placentarios infectados con *C. albicans* ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) en respuesta a la glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500  $\mu$ M).

n = 7 placentas para experimentos independientes en triplicado. Comparación estadística por prueba de Kruskal-Wallis, ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. \*P < 0.05. Los datos se presentan como promedio y desviación estándar.



**Figura 17.** Síntesis de HBD4 en explantes placentarios infectados con *C. albicans* ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) en respuesta a la glucosa (10 o 50 mM), insulina (500 nM) y metformina (500  $\mu$ M).

n = 7 placentas para experimentos independientes en triplicado. Comparación estadística por prueba de Kruskal-Wallis, ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Los datos se presentan como promedio y desviación estándar.

## VII. Análisis de resultados y discusión

La placenta es uno de los órganos fundamentales para llevar a término un embarazo exitoso a través de la tolerancia inmunológica, así como con la capacidad de respuesta activa ante una posible infección mediante diversos mecanismos (Kang *et al.*, 2022; Olmos-Ortiz *et al.*, 2019). Sin embargo, el escenario por una infección puede ser adverso si se considera una condición de hiperglucemia como la que se genera en la DMG en donde hay una inflamación crónica no controlada (Khambule & George, 2019).

En este sentido, el objetivo principal de esta tesis fue evaluar el efecto de la insulina y la metformina sobre la respuesta inflamatoria y la defensa innata de la placenta humana infectada con *C. albicans* en un modelo *in vitro* de hiperglucemia que semeja el ambiente de la DMG. Para ello, se evaluó de forma cualitativa (tinción Grocott) y cuantitativa (conteo de colonias) la capacidad de la placenta para contener dicha infección. Asimismo, se evaluó la respuesta inflamatoria de la placenta humana a través de la medición de las citocinas inflamatorias IL6 e IL8. De igual manera, se evaluó la defensa inmunológica innata con la producción de los péptidos antimicrobianos HBD 1 – 4.

En primer término, se estandarizaron las condiciones de infección por *C. albicans* en la placenta humana. Para poder definir la mejor concentración de inóculo de *C. albicans*, se comenzó por realizar una revisión bibliográfica. Sin embargo, de acuerdo con múltiples estudios, no hay un consenso sobre la concentración ideal inicial de infección (Dornelas *et al.*, 2020; Lagrou *et al.*, 2015; Zaga-Clavellina *et al.*, 2006, 2012). Por lo tanto, se decidió probar una curva de  $10^3$  a  $10^6$  para evaluar su crecimiento logarítmico y su capacidad de infiltración en el tejido placentario. Al término de los experimentos de estandarización se decidió infectar con  $1 \times 10^5$  UFC/mL de *C. albicans* ya que fue la concentración que mostró un mejor aumento en el crecimiento logarítmico sin llegar a saturar la vellosidad placentaria (como ocurrió con la concentración de  $10^6$ ). Cabe señalar que la concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL, coincide con el punto de corte clínicamente aceptado para el diagnóstico de la infección del tracto urinario por bacterias (Echevarría-Zarate *et al.*, 2006). Cabe aclarar que no siempre la sola presencia de microorganismos en la placenta desata esta respuesta (Zhou *et al.*, 2010).

En segundo término, se estandarizaron las concentraciones de glucosa que ayudaran a representar un reto inflamatorio asociado a la hiperglucemia. En esta tesis se probaron medios condicionados con glucosa 10 mM como glucosa control y glucosa 50 mM como hiperglucemia severa. La elección de estas concentraciones se determinó de acuerdo a experimentos previos realizados en el grupo del laboratorio de Inmunología de la Unidad feto-placentaria perteneciente al departamento de Inmunobioquímica en el INPer (Jiménez-Escutia *et al.*, 2023). En ese artículo se demostró que un estímulo con glucosa 50 mM induce significativamente la síntesis de TNF- $\alpha$ , IL1b e IL6 y la acumulación de glucógeno intravelloso sin comprometer la viabilidad celular. Por otra parte, la concentración de glucosa 10 mM representa la concentración mínima de glucosa presente en los medios indicados para el cultivo de explantes placentarios por ser un tejido con alta demanda de glucosa (Miller *et al.*, 2005).

Finalmente, estas concentraciones de glucosa se encuentran respaldados por otros modelos de tejidos o células de la interfase materno-fetal (Abadpour *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2015;

Huerta-García *et al.*, 2012; Jiménez-Escutia *et al.*, 2023; Olmos-Ortiz *et al.*, 2019; Rice *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2018).

Continuando con el análisis de la defensa placentaria contra la infección por *C. albicans*, se observó que la hiperglucemia propicia una mayor presencia de hifas, lo que coincide con lo reportado en la bibliografía donde se indica que mayores concentraciones de glucosa inducen una transición de levadura a hifa en este hongo (He *et al.*, 2022; Nyirjesy & Sobel, 2015; Zhang *et al.*, 2018). El cambiar de forma de levadura a hifa le confiere una capacidad de escapar del sistema del hospedero, lo que en un escenario clínico le ayudaría a ascender a través de la vagina y el cérvix, e invadir los tejidos hasta llegar a la placenta y eventualmente al feto.

Si bien, la forma de hifa es la más comúnmente reportada como infecciosa (Gow *et al.*, 2011; Kashem *et al.*, 2015), en los cortes histológicos también se puede apreciar un puntillado color negro haciendo referencia posiblemente a la fase de levadura, esencial para la adhesión epitelial inicial y, por lo tanto, necesaria para continuar con la infiltración de los tejidos. De esta manera, se puede decir que ambas formas están presentes en la infección placentaria. En cuanto al efecto del pretratamiento con insulina y con metformina, parece que el segundo fármaco es más efectivo para limitar la formación de hifas y la invasividad intravellosa. De esta forma, se puede sugerir que la metformina tiene la capacidad de fortalecer la defensa innata placentaria en un escenario de hiperglucemia y de infección por *C. albicans*.

Por otra parte, además de la invasividad intratejido, también se evaluó el crecimiento de colonias de *C. albicans* por fuera de la vellosidad placentaria (en el medio de cultivo). Si bien no alcanzó la significancia estadística, se puede apreciar una marcada tendencia de aumento en el conteo de UFC/mL en la condición de hiperglucemia en un tiempo de infección de 8 horas. Este resultado hace evidente el desafío que presentan las mujeres con un cuadro clínico de DMG en las que, además, deben enfrentar el escenario adverso metabólico asociado a la hiperglucemia deben enfrentar, como en este caso, una infección por candidiasis.

A las 24 horas el crecimiento de este hongo sigue en aumento lo que habla de una inmunidad innata placentaria comprometida ante la condición de hiperglucemia. Sin embargo, no hay diferencias entre los distintos tratamientos, lo que indica que la placenta no es eficiente para controlar y limitar el crecimiento de *C. albicans* por fuera del tejido. La insulina y la metformina no modificaron el crecimiento extracelular de este hongo ni a las 8 ni a las 24 h.p.i.

En cuanto a la respuesta inflamatoria, se observó que el tratamiento con hiperglucemia por sí solo indujo una mayor secreción significativa de la citocina IL6, y casi significativa de la citocina IL8, en comparación con la glucosa control de 10 mM. El efecto de la alta glucosa como inductor del perfil inflamatorio se ha demostrado en múltiples modelos, incluido en células de trofoblasto extraveloso del primer trimestre (Han *et al.*, 2015; Heim *et al.*, 2018). Adicionalmente, se contó con los controles de LPS y LTA como estímulos inflamatorios ampliamente usados para promover la respuesta inflamatoria aguda (Flores-Espinosa *et al.*, 2017; Olmos-Ortiz *et al.*, 2019; Zavan *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017). En ambos casos, el aumento de IL6 e IL8 fue mucho mayor que el observado por la alta glucosa. Esto tiene sentido, considerando que el LPS y el LTA son endotoxinas bacterianas que estimulan la cascada de señalización de NFκB y generan un estímulo agudo de manera experimental.

Aunque de menor grado, la inflamación placentaria inducida por la hiperglucemia también conlleva a repercusiones adversas tanto para el embarazo como para el feto, a corto y largo plazo, pudiendo generar DMT2 en un futuro tanto en la madre como en el feto (Khambule & George, 2019; Tchirikov *et al.*, 2018).

Inesperadamente, la infección por *C. albicans* resultó en una menor y significativa síntesis de IL6 e IL8 en comparación con los explantes no infectados. Esta diferencia fue inesperada porque usualmente la infección por agentes bacterianos resulta en un marcado estímulo de la respuesta inflamatoria, caracterizado por una mayor producción de múltiples citocinas como TNF- $\alpha$ , IL6, IL8, IL1b, IFN- $\gamma$  (D'Anna *et al.*, 2021; Patricio *et al.*, 2019; Pearson & Hartland, 2014). Sin embargo, en el caso de la infección por hongos, la respuesta inflamatoria muestra resultados contradictorios. Parece que *C. albicans* puede inducir tanto respuestas pro- como anti-inflamatorias dependiendo del modelo de estudio. Por ejemplo, con la línea celular de macrófagos transformado aislada de la ASCITIS de ratones infectados con el virus de leucemia murina de Abelson coinfección con *Bacillus subtilis* R0179, *C. albicans* aumentó los niveles de citocinas IL6, TNF- $\alpha$ , IL12, TNF- $\alpha$  e IL10 (Weiwei *et al.*, 2021). O en un modelo de candidiasis cutáneo con piel 3D hubo un aumento a las 2h de infección de TNF e IL1b (Kitisin *et al.*, 2020). En el caso particular de la placenta, la respuesta que se observa es de tipo antiinflamatorio, con una menor producción de IL6 e IL8. Es posible que la atenuación del ambiente inflamatorio sea una estrategia de este hongo para permitir su co-existencia con el tejido hospedero durante largos períodos sin activar las señales de alarma inmunológicas (como la producción de citocinas inflamatorias). Para reforzar esta idea, no pudimos detectar la concentración de TNF- $\alpha$  ni de IL1b en el medio de cultivo de los explantes infectados con *Candida*, lo que habla de que no hubo una estimulación detectable. Este comportamiento es totalmente opuesto al observado por la infección con *E. coli* o *Streptococcus agalactiae* en el cultivo de explantes placentarios, de acuerdo con nuestro propio grupo de laboratorio (Rodrigo-Jiménez, *et al.*, 2023).

Adicionalmente, se ha reportado que *C. albicans* desarrolló diferentes mecanismos para poder evadir las respuestas inmunitarias, desde el ya mencionado cambio morfológico, hasta evadir el reconocimiento por los PRR y generar efectos opuestos en forma de hifa y forma de levadura (Richardson & Moyes, 2015). En conjunto, estas evidencias pueden ayudar a explicar la baja respuesta antigénica inflamatoria al estar presente la forma hifal en presencia de infección.

En la madre, las células epiteliales de la vagina representan la primera línea de defensa y de respuesta inmune innata para atacar la candidiasis. Se trata de un comensalismo asintomático no inflamatorio que evita el daño tisular (Lilly *et al.*, 2010; Nomanbhoy *et al.*, 2002; Yano *et al.*, 2018). Al hacer uso de este mecanismo de protección, se evita una respuesta inflamatoria exacerbada y se disminuye el riesgo de posible daño en el desarrollo neurológico del feto (Song *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2018).

Finalmente, en cuanto a la producción de beta defensinas, se observó una tendencia interesante que no llegó a ser estadísticamente significativa. Estos péptidos forman parte de los mecanismos de defensa innata y tienen propiedades microbicidas, por lo que son útiles para limitar los procesos infecciosos (Yarbrough *et al.*, 2015). Se puede apreciar un discreto estímulo en la producción de estos péptidos en respuesta a la infección por *C. albicans*, siendo HBD3 el único péptido que muestra una inducción significativa. Sin embargo, la

hiperglucemia e infección parece mostrar una menor producción de HBDs. Por lo tanto, ante una condición de hiperglucemia, los péptidos encargados de contrarrestar una infección se encuentran disminuidos, comprometiendo la defensa innata del tejido placentario, tal como puede ocurrir en las pacientes con DMG. Este mecanismo ayudaría a explicar, de manera adicional, porqué las pacientes con DMG son más susceptibles al desarrollo de corioamnionitis e infecciones por *C. albicans* y comprometer la inmunidad de la placenta. El tratamiento con insulina y con metformina no fue efectivo para modular la producción de IL6, IL8 ni de las cuatro beta defensinas estudiadas.

Como perspectiva a futuro sería necesario seguir investigando diferentes citocinas, quimiocinas y péptidos no analizados en esta tesis en diferentes condiciones a las utilizadas. Como por ejemplo aumentar el tiempo de infección para dar más tiempo al explante a combatir la infección, diferenciar entre su producción y secreción en el medio, combinar los grupos de tratamiento, hacer una coinfección, etc. Esto nos ayudará a tener una perspectiva más amplia para mejorar la salud perinatal y limitar las comorbilidades infecciosas en las mujeres con DMG.

## VIII. Conclusión

En esta tesis, el modelo de explantes placentarios *in vitro* fungió como herramienta para emular las condiciones de hiperglucemia de la DMG en el embarazo, así como para explorar procesos infecciosos y de respuesta inflamatoria ante estas condiciones. Se muestra como la hiperglucemia aumenta la producción de citocinas inflamatorias y reduce la concentración de beta defensinas. De igual manera se evidencia cómo ante estas condiciones se ve aumentado el crecimiento *C. albicans*. La presencia de la forma de levadura e infiltración de hifas en los tejidos placentarios denota la invasividad de este hongo llegando a colonizar el espacio intervelloso, capilares y eventualmente al feto. También se muestra la complejidad de la infección de *C. albicans* gracias a su capacidad de poder cambiar su morfología ante diversos estímulos como a altas concentraciones de estrógenos y concentraciones elevadas de glucosa características de la DMG. Se obtienen resultados inesperados al generar una secreción a la baja de citocinas pro inflamatorias, contrario a lo reportado comúnmente en las infecciones bacterianas. Esta respuesta puede ser un mecanismo de evasión del sistema inmune del hospedero por parte de este hongo dimórfico. En cuanto al tratamiento farmacológico, el uso de metformina fortaleció la defensa placentaria al limitar la infección en la barrera sinciotrofoblástica, disminuir la diferenciación hifal y evitar la infiltración a capas internas de la placenta.

# IX. Bibliografía

- Abadpour, S., Halvorsen, B., Sahraoui, A., Korsgren, O., Aukrust, P., & Scholz, H. (2018). Interleukin-22 reverses human islet dysfunction and apoptosis triggered by hyperglycemia and LIGHT. *Journal of Molecular Endocrinology*, *60*(3), 171–183.
- Adams Waldorf, K. M., & McAdams, R. M. (2013). Influence of infection during pregnancy on fetal development. *Reproduction*, *146*(5), R151–R162.
- Ahmadimoghaddam, D., Zemankova, L., Nachtigal, P., Dolezelova, E., Neumanova, Z., Cerveny, L., Ceckova, M., Kacerovský, M., Micuda, S., & Staud, F. (2013). 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. *Biology of Reproduction*, *88*(3), 55.
- Akinbiyi, A. A., Watson, R., & Feyi-Waboso, P. (2008). Prevalence of *Candida albicans* and bacterial vaginosis in asymptomatic pregnant women in South Yorkshire, United Kingdom. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *278*(5), 463–466.
- Alonso, A., del Rey, C. G., Navarro, A., Tolivia, J., & González, C. G. (2009). *Effects of gestational diabetes mellitus on proteins implicated in insulin signaling in human placenta*. Taylor & Francis Online. <https://doi.org/10.1080/09513590600921374>
- American Diabetes Association. (2023), *Standards of Care in Diabetes-2023* Abridged for Primary Care Providers. Clin Diabetes. 2022 Winter;41(1):4-31. doi: 10.2337/cd23-as01. Epub 2022 Dec 12. Erratum in: Clin Diabetes. 2023 Spring;41(2):328. PMID: 36714254; PMCID: PMC9845083.
- Bai, X., Tian, T., Wang, P., Yang, X., Wang, Z., & Dong, M. (2015). Potential roles of placental human beta-defensin-3 and apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 3G in prevention of intrauterine transmission of hepatitis B virus. *Journal of Medical Virology*, *87*(3), 375–379.
- Balsells, M., García-Patterson, A., Solà, I., Roqué, M., Gich, I., & Corcoy, R. (2015). Glibenclamide, metformin, and insulin for the treatment of gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ*, *350*, h102.
- Bedell, S., Hutson, J., de Vrijer, B., & Eastabrook, G. (2021). Effects of Maternal Obesity and Gestational Diabetes Mellitus on the Placenta: Current Knowledge and Targets for Therapeutic Interventions. *Current Vascular Pharmacology*, *19*(2), 176–192.
- Bengel, W. (2010). Candidiasis orales. Parte 1: Cuadro clínico, epidemiología y etiología. *Quintessence*, *23*(10), 510–517.
- Bensellam, M., Laybutt, D. R., & Jonas, J.-C. (2012). The molecular mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *364*(1-2), 1–27.
- Bishop, K. C., Harris, B. S., Boyd, B. K., Reiff, E. S., Brown, L., & Kuller, J. A. (2019). Pharmacologic Treatment of Diabetes in Pregnancy. *Obstetrical & Gynecological Survey*, *74*(5), 289–297.
- Blackburn, S. (2017). *Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology - E-Book: A Clinical Perspective*. Elsevier Health Sciences.
- Blomberg, L., Backman, K., Kirjavainen, P. V., Karvonen, A. M., Harju, M., & Keski-Nisula, L. (2023).

- Vulvovaginal yeast infections, gestational diabetes and pregnancy outcome. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 23(1), 70.
- Burris, H. H., Riis, V. M., Schmidt, I., Gerson, K. D., Brown, A., & Elovitz, M. A. (2020). Maternal stress, low cervicovaginal  $\beta$ -defensin, and spontaneous preterm birth. *American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM*, 2(2), 100092.
- Buschelman, B., Jones, R. N., Pfaller, M. A., Koontz, F. P., & Doern, G. V. (1999). Colony morphology of *Candida* spp. as a guide to species identification. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 35(1), 89–91.
- Calderone, R., Suzuki, S., Cannon, R., Cho, T., Boyd, D., Calera, J., Chibana, H., Herman, D., Holmes, A., Jeng, H.-W., Kaminishi, H., Matsumoto, T., Mikami, T., O'Sullivan, J. M., Sudoh, M., Suzuki, M., Nakashima, Y., Tanaka, T., Tompkins, G. R., & Watanabe, T. (2000). *Candida albicans*: adherence, signaling and virulence. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 38(s1), 125–137.
- Carrasco-Wong, I., Moller, A., Giachini, F. R., Lima, V. V., Toledo, F., Stojanova, J., Sobrevia, L., & San Martín, S. (2020). Placental structure in gestational diabetes mellitus. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease*, 1866(2), 165535.
- Catalano, P. M. (2014). Trying to understand gestational diabetes. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 31(3), 273–281.
- Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlogge, A. W., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 138, 271–281.
- Choudhury, A. A., & Devi Rajeswari, V. (2021). Gestational diabetes mellitus - A metabolic and reproductive disorder. En *Biomedicine & Pharmacotherapy* (Vol. 143, p. 112183). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112183>
- Chu, N. V., Kong, A. P. S., Kim, D. D., Armstrong, D., Baxi, S., Deutsch, R., Caulfield, M., Mudaliar, S. R., Reitz, R., Henry, R. R., & Reaven, P. D. (2002). Differential effects of metformin and troglitazone on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 25(3), 542–549.
- Cieślík, M., Bagińska, N., Górski, A., & Jończyk-Matysiak, E. (2021). Human  $\beta$ -Defensin 2 and Its Postulated Role in Modulation of the Immune Response. *Cells*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/cells10112991>
- Cruz-Pineda, W. D., Parra-Rojas, I., Rodríguez-Ruíz, H. A., Illades-Aguilar, B., Matia-García, I., & Garibay-Cerdenares, O. L. (2022). The regulatory role of insulin in energy metabolism and leukocyte functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 111(1), 197–208.
- Cylke, A., & Banerjee, S. (2023). Super-exponential growth and stochastic size dynamics in rod-like bacteria. *Biophysical Journal*, 122(7), 1254–1267.
- Dainelli, L., Prieto-Patron, A., Silva-Zolezzi, I., Sosa-Rubi, S. G., Espino Y Sosa, S., Reyes-Muñoz, E., Lopez-Ridaura, R., & Detzel, P. (2018). Screening and management of gestational diabetes in Mexico: results from a survey of multilocation, multi-health care institution practitioners. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 11, 105–116.
- D'Anna, S. E., Maniscalco, M., Cappello, F., Carone, M., Motta, A., Balbi, B., Ricciardolo, F. L. M.,

- Caramori, G., & Stefano, A. D. (2021). Bacterial and viral infections and related inflammatory responses in chronic obstructive pulmonary disease. *Annals of Medicine*, 53(1), 135–150.
- de Vienne, D. M. (2016, diciembre 22). *Lifemap: Exploring the Entire Tree of Life*. PLOS Biology. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001624>
- Dickens, L. T., & Thomas, C. C. (2019). Updates in Gestational Diabetes Prevalence, Treatment, and Health Policy. *Current Diabetes Reports*, 19(6), 33.
- Dignani, M.-C., Solomkin, J. S., & Anaissie, E. J. (2009). Candida. En E. J. Anaissie, M. R. McGinnis, & M. A. Pfaller (Eds.), *Clinical Mycology* (Vol. 2, pp. 197–229). Churchill Livingstone.
- Discacciati, M. G., Simoes, J. A., Silva, M. G., Marconi, C., Brolazo, E., Costa, M. L., & Cecatti, J. G. (2011). Microbiological characteristics and inflammatory cytokines associated with preterm labor. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 283(3), 501–508.
- Doñate, V. P. (2017). *Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares en especies del género Candida*. <https://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/58702/Tesis%20Doctoral%20Virginia%20Perez%20Do%C3%B1ate.pdf?sequence=1>
- Dornelas Figueira, L. M., Ricomini Filho, A. P., da Silva, W. J., Del BeL Cury, A. A., & Ruiz, K. G. S. (2020). Glucose effect on *Candida albicans* biofilm during tissue invasion. *Archives of Oral Biology*, 117, 104728.
- Dupont, W. D., & Plummer, W. D., Jr. (1998). Power and sample size calculations for studies involving linear regression. *Controlled Clinical Trials*, 19(6), 589–601.
- Echevarría-Zarate, J., Sarmiento Aguilar, E., & Osoreo-Plenge, F. (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta Médica Peruana*, 23(1), 26–31.
- Ehlers, E., Talton, O. O., Schust, D. J., & Schulz, L. C. (2021). Placental structural abnormalities in gestational diabetes and when they develop: A scoping review. *Placenta*, 116, 58–66.
- Elovitz, M. A., Gajer, P., Riis, V., Brown, A. G., Humphrys, M. S., Holm, J. B., & Ravel, J. (2019). Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery. *Nature Communications*, 10(1), 1305.
- EISayed, N. A., Aleppo, G., Aroda, V. R., Bannuru, R. R., Brown, F. M., Bruemmer, D., Collins, B. S., Hilliard, M. E., Isaacs, D., Johnson, E. L., Kahan, S., Khunti, K., Leon, J., Lyons, S. K., Perry, M. L., Prahalad, P., Pratley, R. E., Seley, J. J., Stanton, R. C., ... on behalf of the American Diabetes Association. (2023). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care*, 46(Suppl 1), S19–S40.
- ENSANUT. (2022). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Resultados nacionales. *Frontiers in Nutrition*, 1era ed. 2022, 324.
- Fidel, P. L., Jr. (2005). Immunity in vaginal candidiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 18(2), 107–111.
- Fidel, P. L., Jr, Barousse, M., Espinosa, T., Ficarra, M., Sturtevant, J., Martin, D. H., Quayle, A. J., & Dunlap, K. (2004). An intravaginal live *Candida* challenge in humans leads to new hypotheses for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Infection and Immunity*, 72(5), 2939–2946.
- Flores-Espinosa, P., Preciado-Martínez, E., Mejía-Salvador, A., Sedano-González, G., Bermejo-

- Martínez, L., Parra-Covarruvias, A., Estrada-Gutiérrez, G., Vega-Sánchez, R., Méndez, I., Quesada-Reyna, B., Olmos-Ortiz, A., & Zaga-Clavellina, V. (2017). Selective immuno-modulatory effect of prolactin upon pro-inflammatory response in human fetal membranes. *Journal of Reproductive Immunology*, 123, 58–64.
- Goldenberg, R. L., Hauth, J. C., & Andrews, W. W. (2000). Intrauterine infection and preterm delivery. *The New England Journal of Medicine*, 342(20), 1500–1507.
- Gow, N. A. R., van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J. P., & Netea, M. G. (2011). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(2), 112–122.
- Gunther, L. S. A., Martins, H. P. R., Gimenes, F., Abreu, A. L. P. de, Consolaro, M. E. L., & Svidzinski, T. I. E. (2014). Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. *Sao Paulo Medical Journal = Revista Paulista de Medicina*, 132(2), 116–120.
- Han, C. S., Herrin, M. A., Pitruzzello, M. C., Mulla, M. J., Werner, E. F., Pettker, C. M., Flannery, C. A., & Abrahams, V. M. (2015). Glucose and metformin modulate human first trimester trophoblast function: a model and potential therapy for diabetes-associated uteroplacental insufficiency. *American Journal of Reproductive Immunology*, 73(4), 362–371.
- Haram, K., Mortensen, J. H., Myking, O., Roald, B., Magann, E. F., & Morrison, J. C. (2020). Early development of the human placenta and pregnancy complications. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 33(20), 3538–3545.
- Heim, K. R., Mulla, M. J., Potter, J. A., Han, C. S., Guller, S., & Abrahams, V. M. (2018). Excess glucose induce trophoblast inflammation and limit cell migration through HMGB1 activation of Toll-Like receptor 4. *American Journal of Reproductive Immunology*, 80(5), e13044.
- Hernández, J. A. S., Belén, L. G., Valderrama, K. R., & Zurita, G. M. (2017). Prevalencia de *Candida albicans* y su relación con cambios en el pH vaginal. *Atención Familiar*, 24(1). <https://doi.org/10.22201/facmed.14058871p.2017.1.58242>
- Hernández Ramírez, D. F., & Cabiedes, J. (2010). Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatología Clínica*, 6(3), 173–177.
- He, Y., Tang, R., Deng, J., Cai, T., He, P., Wu, J., & Cao, Y. (2022). Effects of oestrogen on vulvovaginal candidosis. *Mycoses*, 65(1), 4–12.
- Huerta-García, E., Ventura-Gallegos, J. L., Victoriano, M. E. C., Montiel-Dávalos, A., Tinoco-Jaramillo, G., & López-Marure, R. (2012). Dehydroepiandrosterone inhibits the activation and dysfunction of endothelial cells induced by high glucose concentration. *Steroids*, 77(3), 233–240.
- International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas, 10th edn.* Brussels, Belgium: Available at: <https://www.diabetesatlas.org>
- Jeschke, M. G., Klein, D., Bolder, U., & Einspanier, R. (2004). Insulin attenuates the systemic

- inflammatory response in endotoxemic rats. *Endocrinology*, 145(9), 4084–4093.
- Jiménez-Escutia, R., Vargas-Alcantar, D., Flores-Espinosa, P., Helguera-Repetto, A. C., Villavicencio-Carrisoza, O., Mancilla-Herrera, I., Irlés, C., Torres-Ramos, Y. D., Valdespino-Vazquez, M. Y., Velázquez-Sánchez, P., Zamora-Escudero, R., Islas-López, M., Carranco-Salinas, C., Díaz, L., Zaga-Clavellina, V., & Olmos-Ortiz, A. (2023). High glucose promotes inflammation and weakens placental defenses against *E. coli* and *S. agalactiae* infection: Protective role of insulin and metformin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5243.
- Kalia, N., Singh, J., & Kaur, M. (2020). Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 5.
- Kang, Y. E., Yi, H.-S., Yeo, M.-K., Kim, J. T., Park, D., Jung, Y., Kim, O. S., Lee, S. E., Kim, J. M., Joung, K. H., Lee, J. H., Ku, B. J., Lee, M., & Kim, H. J. (2022). Increased Pro-Inflammatory T Cells, Senescent T Cells, and Immune-Check Point Molecules in the Placentas of Patients With Gestational Diabetes Mellitus. *Journal of Korean Medical Science*, 37(48), e338.
- Kashem, S. W., Igyarto, B. Z., Gerami-Nejad, M., Kumamoto, Y., Mohammed, J. A., Jarrett, E., Drummond, R. A., Zurawski, S. M., Zurawski, G., Berman, J., Iwasaki, A., Brown, G. D., & Kaplan, D. H. (2015). *Candida albicans* morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation. *Immunity*, 42(2), 356–366.
- Katra, P., Dereke, J., Nilsson, C., & Hillman, M. (2016). Plasma Levels of the Interleukin-1-Receptor Antagonist Are Lower in Women with Gestational Diabetes Mellitus and Are Particularly Associated with Postpartum Development of Type 2 Diabetes. *PloS one*, 11(5), e0155701.
- Khambule, L., & George, J. A. (2019). The Role of Inflammation in the Development of GDM and the Use of Markers of Inflammation in GDM Screening. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1134, 217–242.
- Kitisin, T., Muangkaew, W., Ampawong, S., & Sukphopetch, P. (2020). Utilization of an in vitro biofabricated 3D skin as a pathological model of cutaneous candidiasis. *The New Microbiologica*, 43(4), 171–179.
- Kliman, H. J., Nestler, J. E., Sermasi, E., Sanger, J. M., & Strauss, J. F., 3rd. (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118(4), 1567–1582.
- Kristensen, C., Wiberg, F. C., Schäffer, L., & Andersen, A. S. (1998). Expression and Characterization of a 70-kDa Fragment of the Insulin Receptor That Binds Insulin: MINIMIZING LIGAND BINDING DOMAIN OF THE INSULIN RECEPTOR \*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(28), 17780–17786.
- Lagrou, K., Maertens, J., Van Even, E., & Denning, D. W. (2015). Burden of serious fungal infections in Belgium. *Mycoses*, 58 Suppl 5, 1–5.
- Leffler, M., Hrach, T., Stuerzl, M., Horch, R. E., Herndon, D. N., & Jeschke, M. G. (2007). Insulin attenuates apoptosis and exerts anti-inflammatory effects in endotoxemic human macrophages. *The Journal of Surgical Research*, 143(2), 398–406.

- Lilly, E. A., Yano, J., & Fidel, P. L., Jr. (2010). Annexin-A1 identified as the oral epithelial cell anti-Candida effector moiety. *Molecular Oral Microbiology*, 25(4), 293–304.
- Lukic, A., Napoli, A., Santino, I., Bianchi, P., Nobili, F., Ciampittiello, G., Nardone, M. R., Santomauro, M., Di Properzio, M., & Caserta, D. (2017). Cervicovaginal bacteria and fungi in pregnant diabetic and non-diabetic women: a multicenter observational cohort study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(10), 2303–2315.
- Mack, L. R., & MD, T. (2017). Gestational Diabetes: Diagnosis, Classification, and Clinical Care. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 44(2), 207–217.
- Mahanama, A., & Wilson-Davies, E. (2021). Insight into PCR testing for surgeons. *Surgery*, 39(11), 759–768.
- Maltepe, E., & Fisher, S. J. (2015). Placenta: the forgotten organ. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31, 523–552.
- Marschalek, J., Farr, A., Kiss, H., Hagmann, M., Göbl, C. S., Trofaier, M.-L., Kueronya, V., & Petricevic, L. (2016). Risk of Vaginal Infections at Early Gestation in Patients with Diabetic Conditions during Pregnancy: A Retrospective Cohort Study. *PLoS One*, 11(5), e0155182.
- Martin, H., Kavanagh, K., & Velasco-Torrijos, T. (2020, junio 22). *Targeting adhesion in fungal pathogen Candida albicans*. Future Science. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0052>
- Martín, R., Soberón, N., Vázquez, F., & Suárez, J. E. (2008). [Vaginal microbiota: composition, protective role, associated pathologies, and therapeutic perspectives]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 26(3), 160–167.
- Metzger, B. E., Gabbe, S. G., Persson, B., Buchanan, T. A., Catalano, P. A., Damm, P., Dyer, A. R., Leiva, A. de, Hod, M., Kitzmiller, J. L., Lowe, L. P., McIntyre, H. D., Oats, J. J. N., Omori, Y., & Schmidt, M. I. (2010). International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*, 33(3), 676–682.
- Miller, R. K., Genbacev, O., Turner, M. A., Aplin, J. D., Caniggia, I., & Huppertz, B. (2005). Human placental explants in culture: approaches and assessments. *Placenta*, 26(6), 439–448.
- Mills, B. B. (2017). Vaginitis: Beyond the Basics. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 44(2), 159–177.
- Mrizak, I., Grissa, O., Henault, B., Fekih, M., Bouslema, A., Boumaiza, I., Zaouali, M., Tabka, Z., & Khan, N. A. (2014). Placental infiltration of inflammatory markers in gestational diabetic women. *General Physiology and Biophysics*, 33(2), 169–176.
- Mucci, M. J., Cuestas, L., Landanburu, M. F., & Mujica, M. T. (2017). Prevalence of *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida africana* in pregnant women suffering from vulvovaginal candidiasis in Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(2), 72–76.
- Nguyen-Ngo, C., Jayabalan, N., Salomon, C., & Lappas, M. (2019). Molecular pathways disrupted by gestational diabetes mellitus. *Journal of Molecular Endocrinology*, 63(3), R51–R72.
- Nomanbhoy, F., Steele, C., Yano, J., & Fidel, P. L., Jr. (2002). Vaginal and oral epithelial cell anti-Candida activity. *Infection and Immunity*, 70(12), 7081–7088.
- Nyirjesy, P., & Sobel, J. D. (2015). Genital Mycotic Infections in Patients With Diabetes. *Postgraduate*

*Medicine*. <https://doi.org/10.3810/pgm.2013.05.2650>

- Olmos-Ortiz, A., Déciga-García, M., Preciado-Martínez, E., Bermejo-Martínez, L., Flores-Espinosa, P., Mancilla-Herrera, I., Irlles, C., Helguera-Repetto, A. C., Quesada-Reyna, B., Goffin, V., Díaz, L., & Zaga-Clavellina, V. (2019). Prolactin decreases LPS-induced inflammatory cytokines by inhibiting TLR-4/NFκB signaling in the human placenta. *Molecular Human Reproduction*, 25(10), 660–667.
- Olmos-Ortiz, A., Flores-Espinosa, P., Díaz, L., Velázquez, P., Ramírez-Isarraraz, C., & Zaga-Clavellina, V. (2021). Immunoendocrine Dysregulation during Gestational Diabetes Mellitus: The Central Role of the Placenta. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158087>
- Olmos-Ortiz, A., Flores-Espinosa, P., Mancilla-Herrera, I., Vega-Sánchez, R., Díaz, L., & Zaga-Clavellina, V. (2019). Innate Immune Cells and Toll-like Receptor–Dependent Responses at the Maternal–Fetal Interface. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3654.
- Olmos-Ortiz, A., García-Quiroz, J., Avila, E., Caldiño-Soto, F., Halhali, A., Larrea, F., & Díaz, L. (2018). Lipopolysaccharide and cAMP modify placental calcitriol biosynthesis reducing antimicrobial peptides gene expression. *American Journal of Reproductive Immunology*, 79(6), e12841.
- Olmos-Ortiz, A., García-Quiroz, J., López-Marure, R., González-Curiel, I., Rivas-Santiago, B., Olivares, A., Avila, E., Barrera, D., Halhali, A., Caldiño, F., Larrea, F., & Díaz, L. (2016). Evidence of sexual dimorphism in placental vitamin D metabolism: Testosterone inhibits calcitriol-dependent cathelicidin expression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 163, 173–182.
- Olmos-Ortiz, A., Hernández-Pérez, M., Flores-Espinosa, P., Sedano, G., Helguera-Repetto, A. C., Villavicencio-Carrisoza, Ó., Valdespino-Vazquez, M. Y., Flores-Pliego, A., Irlles, C., Rivas-Santiago, B., Moreno-Verduzco, E. R., Díaz, L., & Zaga-Clavellina, V. (2022). Compartmentalized Innate Immune Response of Human Fetal Membranes against Choriodecidual Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/ijms23062994>
- Pantham, P., Aye, I. L. M. H., & Powell, T. L. (2015). Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Placenta*, 36(7), 709–715.
- Patricio, P., Paiva, J. A., & Borrego, L. M. (2019). Immune Response in Bacterial and Sepsis. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 9(4), 105–113.
- Pearce, E. L. (2010). Metabolism in T cell activation and differentiation. *Current Opinion in Immunology*, 22(3), 314–320.
- Pearson, J. S., & Hartland, E. L. (2014). The Inflammatory Response during Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection. *Microbiology Spectrum*, 2(4), EHEC – 0012–2013.
- Pfaller, M. A. (2015). Invasive Fungal Infections and Approaches to Their Diagnosis. En *Methods in Microbiology* (Vol. 42, pp. 219–287). Academic Press.
- Postler, T. S., Peng, V., Bhatt, D. M., & Ghosh, S. (2021). Metformin selectively dampens the acute inflammatory response through an AMPK-dependent mechanism. *Scientific Reports*, 11(1), 18721.
- Pradenas, A. M., & Marcelo Pradenas, A. (2014). Infecciones cérvico vaginales y embarazo. En *Revista Médica Clínica Las Condes* (Vol. 25, Número 6, pp. 925–935). [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(14\)70640-6](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(14)70640-6)
- Radaelli, T., Varastehpour, A., Catalano, P., & Hauguel-de Mouzon, S. (2003). Gestational Diabetes

- Induces Placental Genes for Chronic Stress and Inflammatory Pathways. *Diabetes*, 52(12), 2951–2958.
- Remedios, T. R., Ramos, T. M., Ramos, T. M., González, Y. G., & Pérez, A. H. (2021). *Técnica de Grocott y bloque celular para evidenciar presencia de micosis en efusiones pleurales*. Ciencias Básicas Biomédicas en Granma Manzanillo. <https://cibamanz2021.sld.cu/index.php/cibamanz/cibamanz2021/paper/viewFile/289/221>
- Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>
- Rice, G. E., Scholz-Romero, K., Sweeney, E., Peiris, H., Kobayashi, M., Duncombe, G., Mitchell, M. D., & Salomon, C. (2015). The Effect of Glucose on the Release and Bioactivity of Exosomes From First Trimester Trophoblast Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(10), E1280–E1288.
- Richardson, J. P., & Moyes, D. L. (2015). Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. *Virulence*, 6(4), 327–337.
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G. H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., Mouriño-Pérez, R. R., Takeshita, N., & Fischer, R. (2018). Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 82(2). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00068-17>
- Rodríguez-Carlos, A., Valdez-Miramontes, C., Marin-Luevano, P., González-Curiel, I., Enciso-Moreno, J. A., & Rivas-Santiago, B. (2020). Metformin promotes Mycobacterium tuberculosis killing and increases the production of human  $\beta$ -defensins in lung epithelial cells and macrophages. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 22(3), 111–118.
- Romero, R., Espinoza, J., Kusanovic, J. P., Gotsch, F., Hassan, S., Erez, O., Chaiworapongsa, T., & Mazor, M. (2006). The preterm parturition syndrome. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 113 Suppl 3(Suppl 3), 17–42.
- Saini, P., Ph.D. scholar, Department of Anatomy, Sawai Man Singh Medical College, Jaipur, Rajasthan, India., Pankaj, J. P., Jain, A., Agarwal, G. C., 2nd Year resident, Department of Community Medicine, Mahatma Gandhi Medical College, Jaipur, Rajasthan, India., Assistant professor, Department of Community Medicine, Mahatma Gandhi Medical College, Jaipur, Rajasthan, India., & Professor & Head, Department of Anatomy, Pacific Medical College, Udaipur, Rajasthan, India. (2015). Effect of gestational diabetes mellitus on gross morphology of placenta: A comparative study. *International journal of anatomy and research*, 3(1), 889–894.
- Salazar-Petres, E. R., & Sferruzzi-Perri, A. N. (2022). Pregnancy-induced changes in  $\beta$ -cell function: what are the key players? *The Journal of Physiology*, 600(5), 1089–1117.
- Salman, H. (2020). Bacterial Growth: Cell-Cycle Dependent Growth-Rate Homeostasis [Review of *Bacterial Growth: Cell-Cycle Dependent Growth-Rate Homeostasis*]. *Current Biology: CB*, 30(12), R703–R704.
- Sivalingam, V. N., Myers, J., Nicholas, S., Balen, A. H., & Crosbie, E. J. (2014). Metformin in reproductive health, pregnancy and gynaecological cancer: established and emerging indications.

- Human Reproduction Update*, 20(6), 853–868.
- Song, H., Hu, K., Du, X., Zhang, J., & Zhao, S. (2020). Risk factors, changes in serum inflammatory factors, and clinical prevention and control measures for puerperal infection. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(3), e23047.
- Soto, A., Iglesias, M. J., Buño, M., & Bellido, D. (2008). Metformina. *Endocrinología y Nutrición*, 55, 39–52.
- Subiabre, M., Villalobos-Labra, R., Silva, L., Fuentes, G., Toledo, F., & Sobrevia, L. (2020). Role of insulin, adenosine, and adipokine receptors in the foetoplacental vascular dysfunction in gestational diabetes mellitus. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease*, 1866(2), 165370.
- Sudha Madhuri, K. V., & Jyothi, I. V. (2017). A study on placental morphology in gestational diabetes. *Journal of evidence based medicine and healthcare*, 4(2), 71–75.
- Sun, Q., Li, J., & Gao, F. (2014). New insights into insulin: The anti-inflammatory effect and its clinical relevance. *World Journal of Diabetes*, 5(2), 89–96.
- Szukiewicz, D., Alkhalayla, H., Pyzłak, M., Watroba, M., Szewczyk, G., & Wejman, J. (2016). Human beta-defensin 1, 2 and 3 production by amniotic epithelial cells with respect to human papillomavirus (HPV) infection, HPV oncogenic potential and the mode of delivery. *Microbial Pathogenesis*, 97, 154–165.
- Talapko, J., Meštrović, T., & Škrlec, I. (2022). Growing importance of urogenital candidiasis in individuals with diabetes: A narrative review. *World Journal of Diabetes*, 13(10), 809–821.
- Tapia, C. V., Hermosilla, G., Fortes, P., Alburquenque, C., Bucarey, S., Salinas, H., Rodas, P. I., Díaz, M. C., & Magne, F. (2017). Genotyping and Persistence of *Candida albicans* from Pregnant Women with Vulvovaginal Candidiasis. *Mycopathologia*, 182(3-4), 339–347.
- Tchirikov, M., Schlabritz-Loutsevitch, N., Maher, J., Buchmann, J., Naberezhnev, Y., Winarno, A. S., & Seliger, G. (2018). Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome. *Journal of Perinatal Medicine*, 46(5), 465–488.
- Wang, H., Li, N., Chivese, T., Werfalli, M., Sun, H., Yuen, L., Hoegfeldt, C. A., Elise Powe, C., Immanuel, J., Karuranga, S., Divakar, H., Levitt, N., Li, C., Simmons, D., Yang, X., & IDF Diabetes Atlas Committee Hyperglycaemia in Pregnancy Special Interest Group. (2022). IDF Diabetes Atlas: Estimation of Global and Regional Gestational Diabetes Mellitus Prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group's Criteria. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109050.
- Wang, W., Hao, J., & An, R. (2022). Abnormal vaginal flora correlates with pregnancy outcomes: A retrospective study from 737 pregnant women. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 272, 64–68.
- Wani K, S. S., Alnaami AM, A.-M. S., Fouda Ma Turkestani Iz Al-Ajlan, Alshingetti, N. M., & Nm, A. M. S. A. (2020). Early-Pregnancy Metabolic Syndrome and Subsequent Incidence in Gestational Diabetes Mellitus in Arab Women. *Frontiers in Endocrinology*, 11(98). <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00098>

- Wei, S.-Q., Fraser, W., & Luo, Z.-C. (2010). Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women: a systematic review. *Obstetrics and Gynecology*, 116(2 Pt 1), 393–401.
- Yano, J., Peters, B. M., Noverr, M. C., & Fidel, P. L., Jr. (2018). Novel Mechanism behind the Immunopathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis: “Neutrophil Anergy”. *Infection and Immunity*, 86(3). <https://doi.org/10.1128/IAI.00684-17>
- Yarbrough, V. L., Winkle, S., & Herbst-Kralovetz, M. M. (2015). Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. *Human Reproduction Update*, 21(3), 353–377.
- Yu, J., Zhou, Y., Gui, J., Li, A.-Z., Su, X.-L., & Feng, L. (2013). Assessment of the number and function of macrophages in the placenta of gestational diabetes mellitus patients. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban*, 33(5), 725–729.
- Zaga-Clavellina, V., López, G. G., Estrada-Gutierrez, G., Martinez-Flores, A., Maida-Claros, R., Beltran-Montoya, J., & Vadillo-Ortega, F. (2006). Incubation of human chorioamniotic membranes with *Candida albicans* induces differential synthesis and secretion of interleukin-1beta, interleukin-6, prostaglandin E, and 92 kDa type IV collagenase. *Mycoses*, 49(1), 6–13.
- Zaga-Clavellina, V., Ruiz, M., Flores-Espinosa, P., Vega-Sanchez, R., Flores-Pliego, A., Estrada-Gutierrez, G., Sosa-Gonzalez, I., Morales-Méndez, I., & Osorio-Caballero, M. (2012). Tissue-specific human beta-defensins (HBD)-1, HBD-2 and HBD-3 secretion profile from human amniochorionic membranes stimulated with *Candida albicans* in a two-compartment tissue culture system. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 10, 70.
- Zavan, B., De Almeida, E. M., Salles, É. da S. L., do Amarante-Paffaro, A. M., & Paffaro, V. A., Jr. (2016). COX-2 plays a role in angiogenic DBA(+) uNK cell subsets activation and pregnancy protection in LPS-exposed mice. *Placenta*, 44, 34–45.
- Zhang, C., Bao, W., Rong, Y., Yang, H., Bowers, K., Yeung, E., & Kiely, M. (2013). Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 19(4), 376–390.
- Zhang, X., Liao, Q., Wang, F., & Li, D. (2018). Association of gestational diabetes mellitus and abnormal vaginal flora with adverse pregnancy outcomes. *Medicine*, 97(34), e11891.
- Zhao, Y., Pu, D., Sun, Y., Chen, J., Luo, C., Wang, M., Zhou, J., Lv, A., Zhu, S., Liao, Z., Zhao, K., & Xiao, Q. (2018). High glucose-induced defective thrombospondin-1 release from astrocytes via TLR9 activation contributes to the synaptic protein loss. *Experimental Cell Research*, 363(2), 171–178.
- Zhou, J., Miao, H., Li, X., Hu, Y., Sun, H., & Hou, Y. (2017). Curcumin inhibits placental inflammation to ameliorate LPS-induced adverse pregnancy outcomes in mice via upregulation of phosphorylated Akt. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 66(2), 177–185.
- Zhou, X., Brotman, R. M., Gajer, P., Abdo, Z., Schüette, U., Ma, S., Ravel, J., & Forney, L. J. (2010). Recent advances in understanding the microbiology of the female reproductive tract and the causes of premature birth. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2010, 737425.

# ANEXOS

## Anexo 1. Documento de consentimiento informado

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del estudio: **EFEECTO 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](mailto:nut.aolmos@gmail.com)

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de la paciente

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del Testigo 2

## Anexo 2. Aprobación de extensión de tiempo del proyecto de “Evaluación del efecto de la insulina y metformina sobre el perfil inflamatorio y la inmunidad innata de la placenta humana en un modelo *in vitro* de diabetes mellitus gestacional.”

**Fecha de la Solicitud:** 13.Oct.22 - 12:25



Protocolo de investigación

**Proyecto:**

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

**Status del Protocolo al momento de la solicitud:**

Aprobado

**Status de la Solicitud:**

Aceptado

**Fecha de Aceptación de Solicitud:**

11.Nov.22

**Título 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

**Número de Registro de Proyecto:**

2018-1-152

**Tipo de Solicitud:**

Extensión de Tiempo

**Fecha Fin de Suspensión:**

El desarrollo de este proyecto ha podido proseguir con buenas circunstancias, contando con un avance técnico del 90%. Los productos generados hasta ahora incluyen: la titulación de dos alumnos de licenciatura por tesis, la dirección de dos alumnos en su proyecto terminal de licenciatura, la presentación de 3 pósters en dos congresos Nacionales y un artículo de revisión publicado en revista con FI 6.208 (<https://doi.org/10.3390/ijms22158087>). Cabe señalar que en todos estos productos (tesis, posters y artículo) se dio reconocimiento al INPer por el apoyo y el presupuesto otorgado. Además, en este momento se encuentran en proceso dos tesis más de maestría y dos de licenciatura, así como la parte final de redacción del artículo original que se someterá a la brevedad en un volumen especial de la revista International Journal of Molecular Sciences (FI 6.208).

**Motivo:**

Por lo tanto, solicito al Comité de Investigación Institucional una extensión de 12 meses en el proyecto 2018-1-152, exclusivamente para poder finalizar con los últimos experimentos correspondientes con la etapa 3 del proyecto. De esta forma, se pretende poder continuar con la recolección de muestras biológicas para poder concluir con los objetivos específicos "d" y "e" del proyecto, relacionados con la migración y caracterización fenotípica de PBMCs en nuestro modelo de estudio. Cabe señalar que todos los demás objetivos específicos del proyecto (a-c, f-h) ya fueron desarrollados en su totalidad. Por supuesto, en caso de terminar antes del período de un año con estos experimentos finales, yo me comprometo a cerrar el proyecto y presentar el informe técnico final y entregar oportunamente los productos comprometidos.

Protocolo Original Extensión

**Fecha Inicio:** 01.Nov.18

**Fecha Terminación:** 30.Oct.22

**Tiempo de Terminación en Meses :** 47 Meses

Nueva Propuesta Extensión

**Fecha Inicio :** 01.Nov.18

**Nueva Fecha Terminación:** 01.Nov.23

**Adecuaciones:** 12 Meses

**Tiempo nuevo estimado:** 60 Meses

Protocolo Original Presupuesto

**Presupuesto Autorizado:** \$ 555,000.00 MXN

**Presupuesto Ejercido:** \$ 552,865.51 MXN

Atentamente

**Nombre del investigador:** ANDREA GUADALUPE OLMOS ORTIZ

**Vo. Bo. Jefe Superior inmediato:** ADDY CECILIA HELGUERA REPETTO

**Correo de Aviso:** nut.aolmos@gmail.com

DRA. ANDREA GUADALUPE OLMOS ORTIZ  
ICM "C"  
ADSCRITA AL DEPARTAMENTO DE INMUNOBIOQUÍMICA

**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 SOBRE EL PROYECTO: "EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INSULINA Y LA METFORMINA SOBRE EL PERFIL INFLAMATORIO Y LA INMUNIDAD INNATA EN MUJERES CON DIABETES MELLITUS GESTACIONAL" CON NO. DE REG. 2018-1-152

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