



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

---

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**Determinación de los perfiles de expresión de las  
moléculas reguladoras del NF- $\kappa$ B en tejidos  
gestacionales en el desarrollo del embarazo.**

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA  
PRESENTA  
**IBQ. FERNANDO GÓMEZ CHÁVEZ**

DIRECTORA: DRA. SANDRA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
DIRECTOR: DR. MARIO EUGENIO CANCINO DÍAZ

MÉXICO D.F. 2011





# **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**Determinación de los perfiles de expresión de las moléculas reguladoras del NF- $\kappa$ B en tejidos gestacionales en el desarrollo del embarazo.**

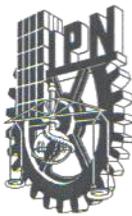
TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA  
PRESENTA

**IBQ. FERNANDO GOMEZ CHAVEZ**

**DIRECTORA: DRA. SANDRA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ**  
**DIRECTOR: DR. MARIO EUGENIO CANCINO DÍAZ**

MÉXICO D.F. 2011

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología Básica del departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, bajo la dirección de la Dra. Sandra Rodríguez Martínez, y del Dr. Mario Eugenio Cancino Díaz. Durante el desarrollo de la tesis el sustentante fue becario CONACyT con registro 230668 y contó también con el apoyo del proyecto SIP-IPN número 20110821.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

SIP-14 BIS

En la Ciudad de México D.F., siendo las 12:00 horas del día 8 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

**Determinación de los perfiles de expresión de las moléculas reguladoras del NF-κB en tejidos gestacionales en el desarrollo del embarazo**

Presentada por el alumno:

**Gómez**

Apellido paterno

**Chávez**

materno

**Fernando**

nombre (s)

Con registro: B091055

aspirante de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA**

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes:

**LA COMISIÓN REVISORA**

Directores de tesis

  
 Dra. Sandra Rodríguez Martínez

  
 Dr. Mario Eugenio Cancino Díaz

  
 Dr. Oscar Rojas Espinosa

  
 Dr. Juan Carlos Cancino Díaz

  
 Dra. Guadalupe del Carmen Estrada Gutiérrez

  
 Dra. Martha Cecilia Moreno Lafont

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
 DR. MANUEL JESÚS PIÑÓN LÓPEZ





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México D.F., el día   8   del mes de  Junio  del año 2011, el(la) que suscribe  **Fernando Gómez Chávez**  alumno(a) del Programa de Maestría en Ciencias en Inmunología con número de registro  **B091055** , adscrito(a) a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de  la Dra. Sandra Rodríguez Martínez  y  el Dr. Mario E. Cancino Díaz  y cede los derechos del trabajo intitulado “**Determinación de los perfiles de expresión de las moléculas reguladoras del NF- $\kappa$ B en tejidos gestacionales en el desarrollo del embarazo**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones de correo:  sandrarodm@yahoo.com.mx  y  mcancinodiaz@yahoo.com.mx  respectivamente. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Dra. Sandra Rodríguez Martínez

Nombre  
Director

Dr. Mario Cancino Díaz

Nombre  
Director

IBQ. Fernando Gómez Chávez

Nombre  
Alumno



# 1 ÍNDICE

1	ÍNDICE .....	i
2	ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
3	ÍNDICE DE TABLAS .....	iv
4	ABREVIATURAS.....	v
5	RESUMEN .....	viii
6	ABSTRACT .....	ix
7	INTRODUCCIÓN .....	1
7.1	El embarazo.....	1
7.2	Implantación .....	1
7.3	Placentación .....	4
7.4	Anatomía de las membranas fetales.....	8
7.5	Inmunidad en el embarazo .....	10
7.5.1	Hipótesis y mecanismos involucrados en la tolerancia materno-fetal .....	10
7.5.2	Resultado del embarazo, fallo o éxito: el paradigma Th-1/Th-2.....	14
7.5.3	Actividad Th-1 durante el embarazo.....	15
7.5.4	Actividad Th-2 durante el embarazo.....	16
7.6	Producción de citocinas en las membranas fetales y su función.....	17
7.6.1	Citocinas producidas en las membranas fetales .....	17
7.6.2	Mecanismos involucrados en la producción de citocinas pro-inflamatorias en células de membranas fetales humanas .....	18
7.6.3	Función de las citocinas pro-inflamatorias en tejidos gestacionales .....	22
7.7	Regulación de la producción de citocinas pro-inflamatorias y el trabajo de parto .....	23
7.8	Componentes de la vía de señalización del NF- $\kappa$ B.....	24
7.8.1	El NF- $\kappa$ B .....	24

7.8.2	Los IκB's .....	25
7.9	Vías de activación del NF-κB .....	28
7.10	Regulación del NF-κB.....	31
7.10.1	IκBs nucleares.....	32
7.11	Activación del NF-κB en asociación con el trabajo de parto .....	39
<b>8</b>	<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>40</b>
<b>9</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>41</b>
<b>10</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
10.1	Objetivo general.....	42
10.2	Objetivos específicos.....	42
<b>11</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
11.1	Manejo de animales.....	43
11.2	Obtención de los cultivos primarios de la membrana corioamniótica.....	43
11.3	Caracterización de los CPMCAr .....	44
11.4	Tratamiento de los CPMCAr con LPS (perfil pro-inflamatorio).....	45
11.5	Tratamiento de los CPMCAr con IL-10 (perfil anti-inflamatorio).....	45
11.6	Obtención de RNA y PCR en tiempo real.....	45
11.7	Análisis estadístico.....	47
<b>12</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
12.1	Caracterización de los CPMCAr .....	48
12.2	EL LPS inhibe la expresión del IκBNS en CPMCAr.....	48
12.3	La IL-10 induce la expresión del IκBNS en CPMCAr estimulados con LPS.....	52
<b>13</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>14</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>15</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>40</b>

## 2 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo embrionario pre-implantación.....	2
Figura 2. Blastocisto.....	3
Figura 3. Esquema del embrión/feto humano contenido en el útero materno..	6
Figura 4. Esquema de los tejidos materno-fetales completamente formados.....	7
Figura 5. Representación esquemática de la membrana fetal a término. ....	8
Figura 6. Miembros de la familia de proteínas: NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B e IKK. ....	27
Figura 7. Tres vías diferentes para el factor de transcripción NF- $\kappa$ B. ....	29
Figura 8. Modelo esquemático de la vía de señalización canónica del NF- $\kappa$ B.....	30
Figura 9. Caracterización de los CPMCAr por inmunohistoquímica.....	49
Figura 10. El LPS inhibe la expresión del I $\kappa$ BNS e induce la expresión de la IL-6 en CPMCAr.....	50
Figura 11. EL LPS inhibe la expresión del I $\kappa$ BNS e induce la expresión de la IL-6 en CPMCAr de una manera dependiente del tiempo de estímulo. ....	51
Figura 12. La IL-10 induce la expresión del I $\kappa$ BNS en CPMCAr estimulados con LPS...	53

### **3 ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Mecanismos de tolerancia en la interface materno-fetal. ....	14
Tabla 2. Producción de diferentes citocinas en las membranas fetales. ....	19
Tabla 3. Sondas y cebadores empleados. ....	47

## 4 ABREVIATURAS

BAFF	Factor de activación de células B
Bcl-3	Molécula de linfoma de células B-3
CBP	Proteína de unión a CREB
CD	Del ingles Cluster of differentiation
CPMCAr	Cultivos Primarios de Membrana Corioamniótica de rata
CPMF	Cultivos primarios de membranas fetales
DAF	Factor de crecimiento tipo insulina
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbeco
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
FasL	Fas Ligando
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
HO	Hemooxigenasa
IFNs	Interferones
IFN- $\gamma$	Interferón $\gamma$
IKK	Complejo inductor del NF $\kappa$ B
IL-10	Interleucina 10
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1- $\beta$
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4

IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
I $\kappa$ Bs	Inhibidores del NF $\kappa$ B
LIF	Factor inhibitorio de leucemia
LPS	Lipopolisacárido
LPS	Lipopolisacárido
LZ	Dominio de tipo cierre de Leucina
MA	Membrana Amniótica
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MCI	Membrana Celular Interna
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MMPs	Metaloproteinasas
MyD 88	Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NBD	Dominios de unión esencial de regulación del NF- $\kappa$ B
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
NLS	Secuencia de localización nuclear
OSM	Oncostatina M
PBEF	Factor de incremento de colonias de células pre B
PEST	Regiones ricas en Prolina
PG's	Prostaglandinas
PGE	Prostaglandina E
PGK	Fosfoglicerato cinasa
PPAR- $\gamma$	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas- $\gamma$

qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
rDC	Células Dendríticas reguladoras
RHD	Dominio de homología con REL
SFB	Suero fetal bovino
SN50	Péptido inhibidor del NF- $\kappa$ B
sTB	Sincicio Trofoblasto
TADs	Dominios de activación transcripcional
TCR	Receptor de células T
TGF-beta	Factor de Crecimiento Transformante-beta
Th	del inglés Helper T cell
Th-1	Perfil pro-inflamatorio
Th-2	Perfil anti-inflamatorio
TLR	Receptores tipo toll
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
Tregs	Células T reguladoras
uNKs	Células Natural Killers uterinas
vCTB	Células de Citotrofoblasto veloso
xvCTB	células del citotrofoblasto extravilico
ZF	Dominio de tipo dedos de zinc

## 5 RESUMEN

El factor transcripcional NF- $\kappa$ B, es un factor nuclear involucrado en el inicio del trabajo de parto al final del embarazo. Debido a esto el NF- $\kappa$ B debe ser un elemento altamente regulado. Durante el embarazo se sugiere que la activación temprana de este factor puede tener un efecto patológico induciendo el término prematuro del embarazo, lo que puede resultar en problemas para la madre e incluso la pérdida del producto. El mecanismo central de regulación del NF- $\kappa$ B depende de inhibidores citoplasmáticos clásicos, los I $\kappa$ Bs. Sin embargo, durante los últimos años, se han identificado I $\kappa$ Bs que actúan regulando al NF- $\kappa$ B en el núcleo posterior a la liberación de este factor transcripcional por parte de los I $\kappa$ Bs citoplasmáticos. La molécula I $\kappa$ BNS, forma parte de estos reguladores no clásicos del NF- $\kappa$ B y se ha establecido que un ambiente anti-inflamatorio promueve la expresión de este regulador. En este trabajo demostramos que en cultivos primarios de membrana corioamniótica de rata (CPMCAr) el RNAm, del regulador I $\kappa$ BNS se expresa basalmente. También encontramos que en CPMCAr estimulados con LPS se inhibe la expresión del regulador I $\kappa$ BNS y paralelamente se induce la expresión de la IL-6 como indicador de la activación del NF- $\kappa$ B. En contraste, en estas mismas células, bajo un ambiente anti-inflamatorio otorgado por la IL-10 y en presencia de LPS, se induce la expresión del I $\kappa$ BNS y se inhibe la expresión de la IL-6. Nuestros resultados sugieren que los reguladores nucleares del NF- $\kappa$ B como el I $\kappa$ BNS pueden estar regulando la producción de citocinas del tipo Th-1 durante el desarrollo del feto, periodo en el que se requiere de un perfil anti-inflamatorio.

## 6 ABSTRACT

The transcription factor NF- $\kappa$ B is a nuclear factor involved in the onset of labor in late pregnancy. Because of this, NF- $\kappa$ B should be a highly regulated molecule. During pregnancy it is suggested that early activation of this transcription factor may produce pathological effects by inducing the premature end of pregnancy, or even the loss of the fetus. Classically, the central mechanism of NF- $\kappa$ B regulation depends on cytoplasmic inhibitors, the I $\kappa$ Bs. However, in recent years, they have been identified new I $\kappa$ Bs that act regulating NF- $\kappa$ B into the nucleus after transcriptional factor release from cytoplasmic I $\kappa$ Bs. I $\kappa$ BNS is one of these non-classical NF- $\kappa$ B regulators and it has been established that an anti-inflammatory environment promotes the expression of this regulator. In this work, using real-time PCR, we show that I $\kappa$ BNS can be expressed by fibroblasts cells from fetal membranes of pregnant female rats used as a study model. We also found that under a pro-inflammatory profile in rat amniochorion primary cultures cells (RACPC) is inhibited the expression of I $\kappa$ BNS regulator, and at the same time the expression of IL-6 is induced as a product of NF- $\kappa$ B activation against LPS challenge. In contrast, under an anti-inflammatory profile mediated by IL-10 and in the presence of LPS, RACPC induced the expression of I $\kappa$ BNS and inhibited the expression of IL-6. These findings suggest that nuclear regulators, such as I $\kappa$ BNS, may be regulating Th-1 type cytokine production during fetal development, period that requires an anti-inflammatory profile.

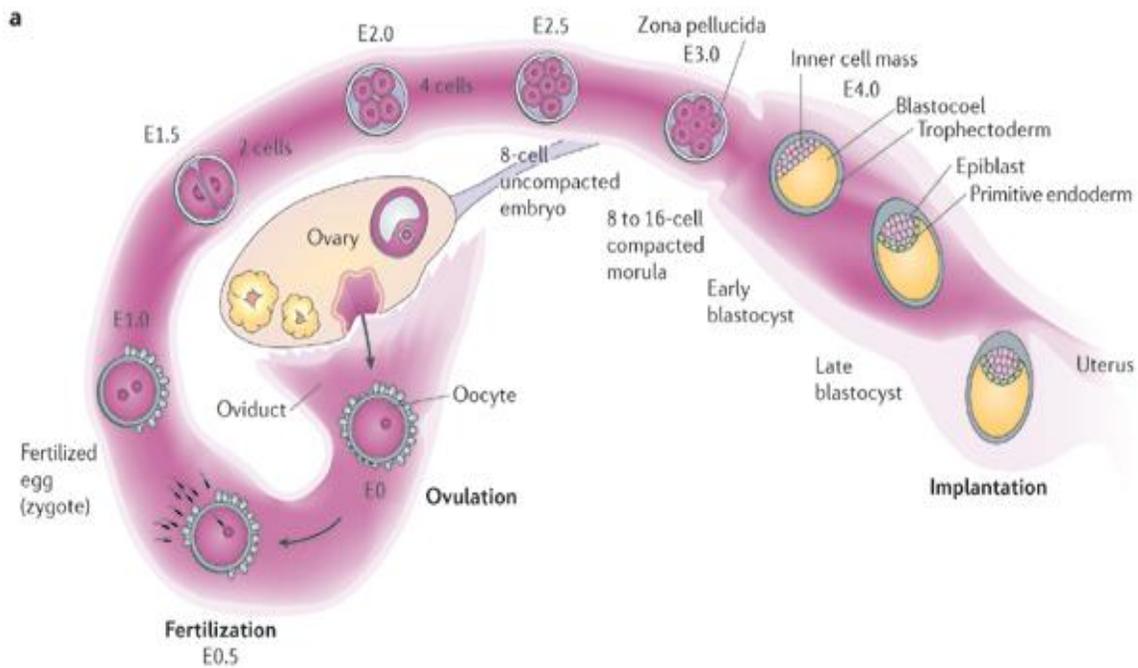
## **7 INTRODUCCIÓN**

### **7.1 El embarazo**

El embarazo se define como el intervalo de tiempo que transcurre desde la implantación del ovocito fertilizado en la pared del útero de la madre hasta el alumbramiento, con una duración normal de 40 semanas en el humano y de 20 días en el ratón<sup>1</sup>.

### **7.2 Implantación**

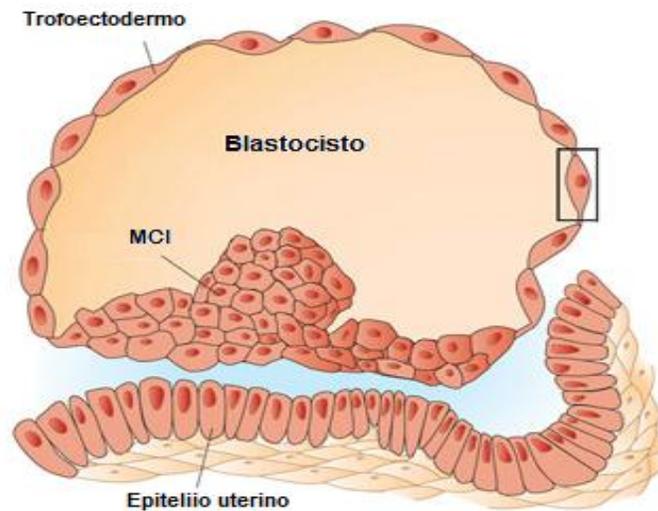
Una vez llevada a cabo la fertilización del óvulo en las trompas de Falopio y en el curso de los siguientes 4 días, el cigoto en desarrollo se desplaza hacia el útero para dar comienzo al proceso de remodelación de éste tejido e iniciar así la implantación. Una vez finalizado el proceso de fertilización en el oviducto, el cigoto formado sufre una serie de divisiones celulares dentro de la zona pelúcida que lo rodea. Esta serie de divisiones mitóticas, denominada clivaje, divide el gran volumen citoplasmático del cigoto en varias células más pequeñas, los blastómeros, para formar una masa de células totipotenciales, la mórula. En algún momento, entre la fase de 8 células y la fase de 16 células, la superficie de la mórula se vuelve más lisa y más esférica. Esto es debido a que las células incrementan el número de uniones estrechas y quedan más compactas, estableciéndose uniones herméticas entre las células externas que sellan el interior de la mórula con respecto al medio exterior. Poco después, los espacios intercelulares internos aumentan de tamaño generando una cavidad central llena de líquido, el blastocelo. En este momento se dice que la mórula se ha transformado en blastocisto <sup>2</sup> (Figura 1).



**Figura 1. Desarrollo embrionario pre-implantación.** Después de la fertilización en el oviducto, el embrión lleva a cabo diferentes rondas de mitosis para finalmente formar una esfera de células llamada mórula. En el estadio de mórula tardío, el embrión se dirige al lumen uterino y se transforma a blastocisto, el cual ahora contiene una cavidad denominada como blastocelo, con dos poblaciones celulares distintas, la masa de células internas y el trofoectodermo (las progenitoras de las células del trofoblasto). Antes de la implantación, el blastocisto escapa de su escudo externo (la zona pelúcida) y se diferencia para producir tipos celulares adicionales, el epiblasto y el endodermo primitivo. En este estadio el trofoectodermo invade al útero para dar inicio al proceso de implantación <sup>3</sup>.

El ovocito fertilizado se encuentra listo para implantarse cuando ha alcanzado al estadio de blastocisto, el primer estadio de diferenciación en el cual es posible detectar células de la masa celular interna (MCI) y una mono-capa de células epiteliales, continua e impermeable, que rodea y recubre al blastocisto y a la MCI llamada trofoectodermo. El embrión propiamente dicho deriva de la MCI que crece y comienza a diferenciarse dando origen a todas las capas celulares embrionarias

(ectodermo, mesodermo y endodermo), mientras que el trofoectodermo da origen a las células del trofoblasto las cuales formaran la placenta, la membrana corioamniótica y a las células mesenquimales que se ubican justo por debajo de las células de trofoblasto (Figura 2) <sup>4</sup>.



**Figura 2. Blastocisto.** El blastocisto se caracteriza por poseer una cavidad (blastocelo) con dos poblaciones celulares, la masa celular interna y el trofoectodermo, el cual es el progenitor de las células del trofoblasto<sup>4</sup>.

Durante la implantación, las células derivadas del feto (trofoblasto) invaden el endometrio materno e inducen el remodelamiento de las arterias espirales endometriales a vasos de baja resistencia no contráctiles. Esta invasión tiene tres consecuencias. La primera, el feto gana acceso directo hacia el flujo de sangre arterial materno. Por esta razón la madre no puede reducir la cantidad de nutrientes que alcanzan la placenta sin reducir el suplemento de nutrientes a su propio tejido. La segunda, el volumen de sangre que alcanza la placenta se torna completamente independiente del control por parte de la vasculatura materna. Y tercero la placenta es

capaz de liberar hormonas, citocinas y otras sustancias directamente a circulación materna <sup>5</sup>.

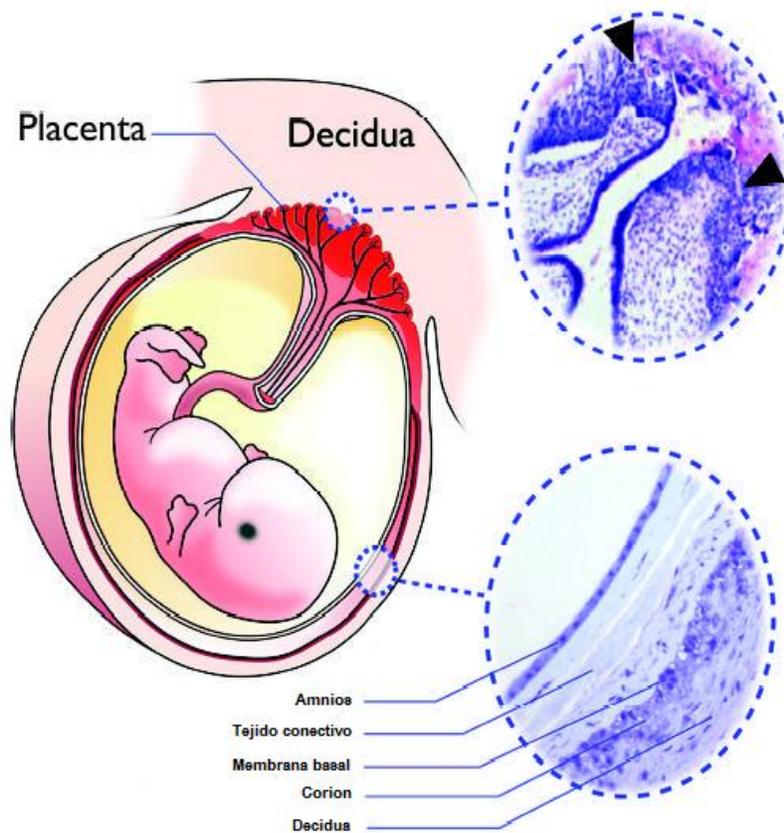
Paralelamente a la implantación, y para proteger a la madre del ataque del trofoblasto invasor que migra hacia las arterias espirales uterinas, las células estromales del endometrio sufren una transformación hacia una densa matriz celular, conocida como decidua <sup>6</sup>. La decidua obstruye el movimiento del trofoblasto mediante la formación de una barrera física a la penetración celular y mediante la producción activa local de un ambiente de citocinas que promueve el ataque del trofoblasto preferentemente a la invasión <sup>7</sup>. En este punto ya se ha dado fin al proceso de implantación y se da comienzo al desarrollo de las membranas fetales, éstas cubrirán y mantendrán aislado al feto de la interacción directa con los tejidos de la madre durante todo el embarazo.

### **7.3 Placentación**

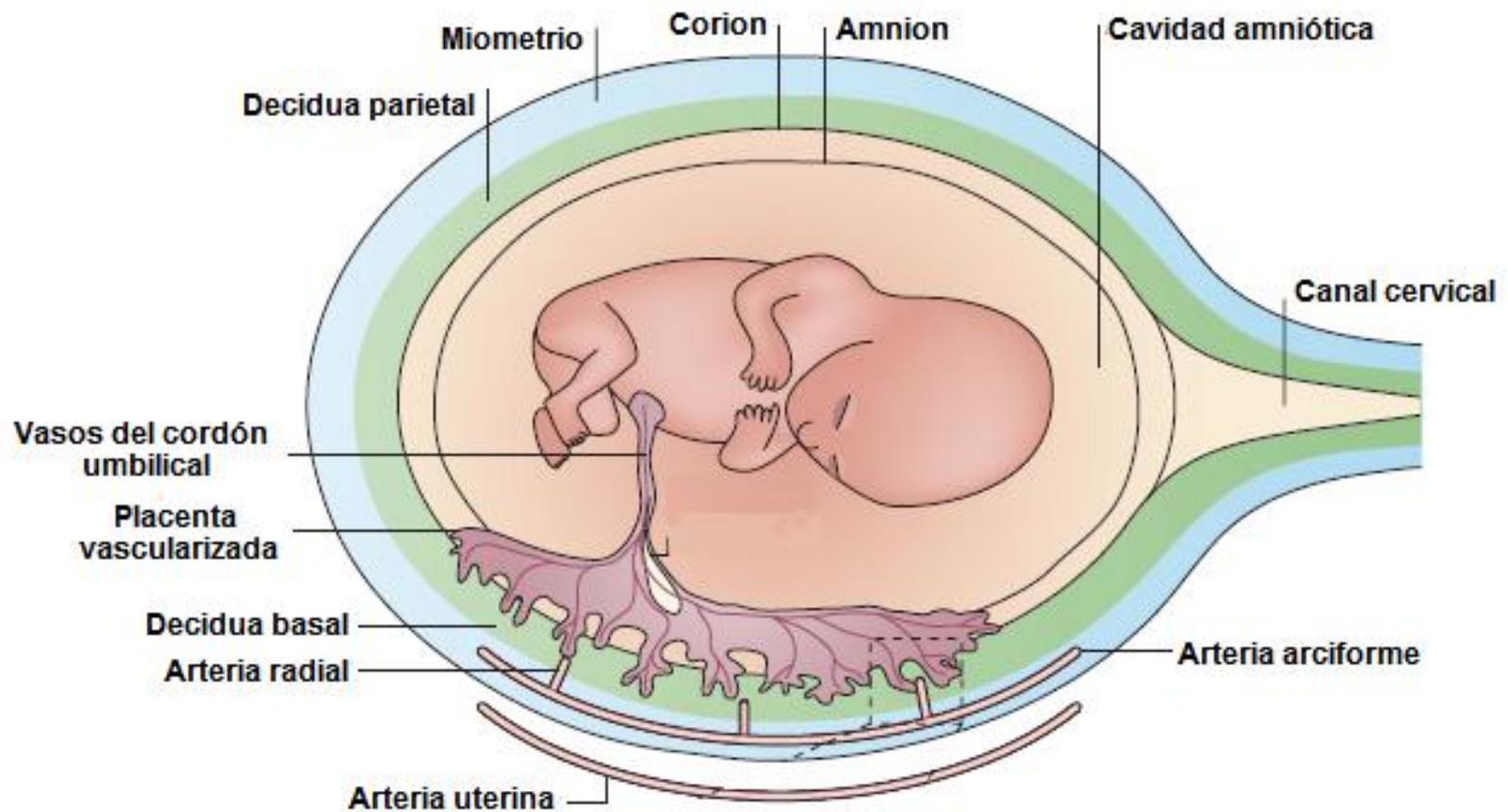
En la cara fetal de la interface materno-fetal, posterior a la implantación, las células del trofoblasto derivadas de la capa más externa del trofoectodermo del blastocisto inician el proceso de placentación el cual dará origen a las capas celulares externas de la placenta que comprenden el amnios y el corion. Estas células rodean y encierran al feto durante el embarazo e interactúan directamente con los elementos del sistema inmune de la madre. Las células del trofoblasto se clasifican de acuerdo a su localización anatómica, al tipo de diferenciación y al papel que toman en la inducción de la tolerancia en el útero durante el embarazo <sup>3</sup>.

El villi de la placenta, alberga dos subpoblaciones: células de citotrofoblasto veloso (vCTB) y de sincicio trofoblasto (sTB). Las vCTB son las células precursoras que surgen con el sincicio cuando el feto en crecimiento requiere extensión de su alojamiento y soporte nutricional para la placenta. El sTB es una mono-capa celular, que produce hormonas críticas para el desarrollo del embarazo, como la progesterona, y es responsable del transporte bidireccional de nutrientes de la madre al feto y de la remoción de los desechos fetales. En el villi, el cual se encuentra constituido por células mesenquimales, se pueden encontrar también macrófagos, llamados células de Hofbauer, fibroblastos y células indiferenciadas, las cuales finalmente se vuelven fuente de células endoteliales para el desarrollo de la vasculatura de la placenta y son generadas a partir de la MCI del embrión. Una tercera subpoblación de células de trofoblasto nombradas como células del citotrofoblasto extravilico (xvCTB) invaden la decidua, son generadas a partir de las células vCTB que proliferan hacia la decidualización. En el proceso del embarazo estas células xvCTB forman el amnios y el corion. La membrana amniótica, comprende una sola capa de células epiteliales principalmente, es un fuerte saco que mantiene al feto suspendido en el fluido amniótico. El amnion se encuentra separado de la membrana coriónica mediante tejido conectivo. El corion permanece en proximidad inmediata a la decidua materna (Figura 3) <sup>4,8</sup>. El desarrollo correcto de la placenta, las membranas fetales y sus componentes (figura 4) así como la interacción entre los tejidos materno-fetales es crucial en el desarrollo del embrión, ya que su diseño como bio-contenedor, permitirá llevar a buen término la gestación del nuevo individuo, fungiendo como canal para su alimentación y filtro de sus desechos. La tolerancia al crecimiento de un

agente extraño dentro del útero de la madre, el cual puede ser considerado como un agente parasitario que utiliza el cuerpo de ésta en beneficio único de su desarrollo, hoy en día representa aún un gran reto para la inmunología, ya que el feto “parasitante” no es rechazado por la madre durante un embarazo normal, como sucede en el transplante de órganos o tejidos alogénicos.



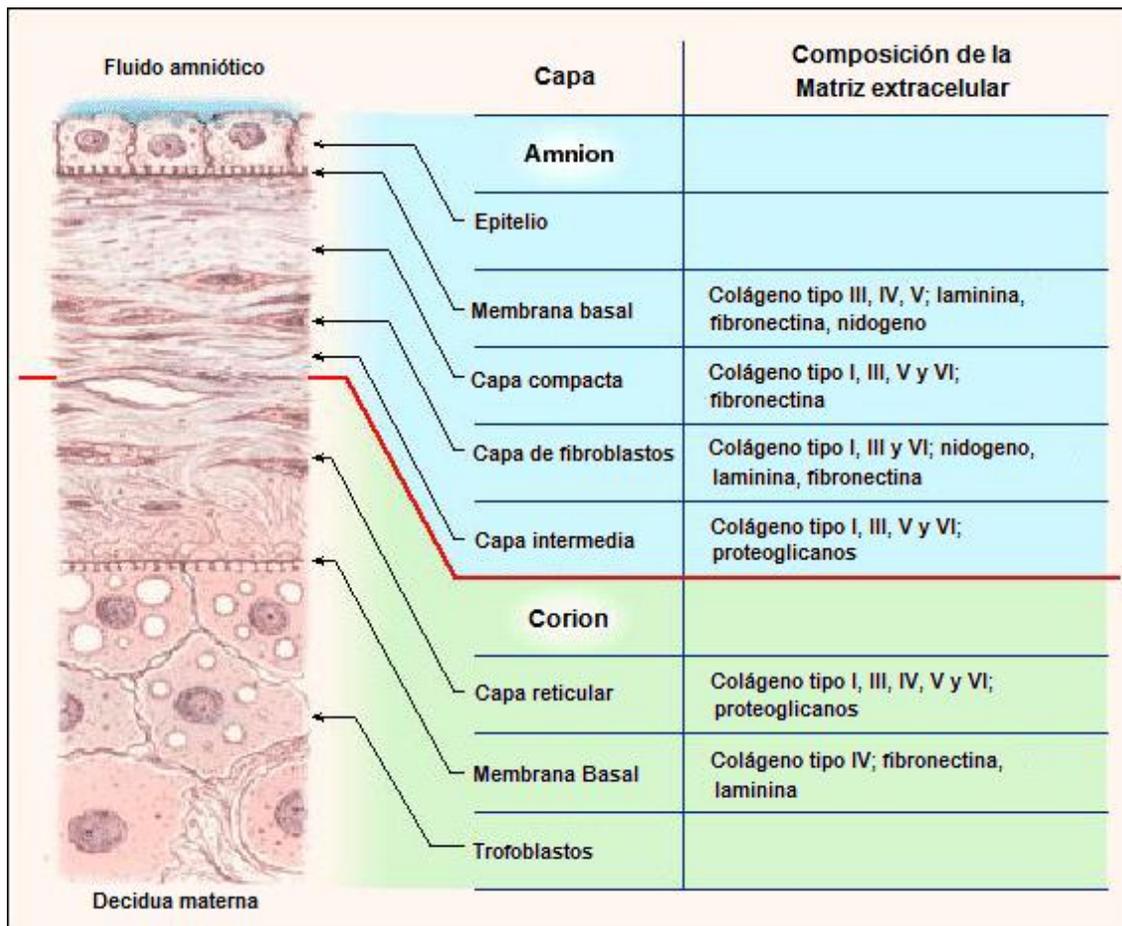
**Figura 3. Esquema del embrión/feto humano contenido en el útero materno.** En el útero el embrión/feto se encuentra completamente rodeado y protegido por un escudo de células de trofoblasto presentes en la placenta y en la membrana corioamniótica (en rojo). Las células vCTB en el villi placentario sirven como progenitoras para la diferenciación de todas las subpoblaciones de células de trofoblasto, incluyendo la capa de sTB, la cual se mantiene continuamente expuesta a la sangre materna y a células xvCTB que migran hacia el endometrio uterino modificado, denominado como decidua (arriba a la derecha). Las células de CTB proliferan y migran hacia la decidua (cabeza de flecha), llevan a cabo el ataque al villi de la madre y facilitan los eventos fisiológicos críticos que se requieren para el desarrollo y buen término del embarazo. Los insertos en la figura son microfotografías de preparaciones de H y E de placenta de cinco semanas de gestación (Arriba a la derecha) y de membrana corioamniótica (abajo a la derecha) al término del embarazo <sup>4</sup>.



**Figura 4. Esquema de los tejidos materno-fetales completamente formados.** En la figura se muestra la distribución de los tejidos materno-fetales post placentación. A pesar de la estrecha interacción entre los tejidos de la madre y el producto, genéticamente diferentes, el embarazo llega a término sin que ocurra rechazo inmunológico <sup>9</sup>.

## 7.4 Anatomía de las membranas fetales

Las membranas fetales se desarrollan a partir del tejido extra embrionario y está constituida de componentes fetales (la placa coriónica y amniótica) y de componentes maternos (la decidua). Los componentes fetales se encargan de separar al feto de la madre.



**Figura 5. Representación esquemática de la membrana fetal a término.** En la figura se pueden observar los componentes de cada una de las capas de la membrana corioamniótica. Modificado de <sup>10,11</sup>.

La membrana amniocoriónica o coriamniótica forma los límites externos del saco que envuelve al feto, mientras que la capa interna del saco la constituye la membrana amniótica (MA). La MA está constituida de una mono-capa epitelial, una delgada membrana basal y de estroma vascular (Figura 5). La MA no contiene nervios ni vasos sanguíneos; debido a esto los nutrientes que requiere son obtenidos directamente por difusión del fluido amniótico y/o de la decidua subyacente. La membrana basal es una de las membranas más delgadas que se pueden encontrar en todos los tejidos humanos. Los nutrientes de los que se provee al feto por la membrana basal a través de los periodos de gestación, ayudan al mantenimiento de la integridad estructural de las membranas. La capa compacta de la matriz adyacente a la membrana basal forma el esqueleto fibroso principal de la AM. Los colágenos de la capa compacta son secretados por células mesenquimales situadas en la capa de fibroblastos. Los colágenos intersticiales (tipos I y III) predominan y forman haces paralelos, los cuales mantienen la integridad mecánica de la MA. Los colágenos tipo V y VI forman conexiones filamentosas entre la colágena intersticial y la membrana basal del epitelio. La capa intermedia o zona esponjosa de la matriz estromal, se sitúa adyacente a la membrana coriónica. Su contenido abundante de proteoglicanos y glicoproteínas produce una apariencia esponjosa en preparaciones histológicas, además de que contiene una red no fibrilar formada predominantemente de colágeno tipo III. La capa esponjosa se encuentra pobremente conectada a la membrana coriónica, lo que permite fácilmente separar a la MA del corion mediante una disección simple <sup>12</sup>.

## **7.5 Inmunidad en el embarazo**

La primera pregunta que surge al reflexionar sobre el embarazo desde el punto de vista inmunológico es ¿por qué el feto sobrevive dentro del útero de la madre a pesar de ser un agente extraño? Desafortunadamente, hoy en día esta incógnita no ha podido ser completamente resuelta; sin embargo, una gran cantidad de avances se han efectuado en el área y hoy es claro que el feto sobrevive como consecuencia de una interacción cooperativa entre el feto y la madre <sup>13</sup>.

### **7.5.1 Hipótesis y mecanismos involucrados en la tolerancia materno-fetal**

Desde que en 1953, el biólogo Británico Peter Brian Medawar (Premio nobel de fisiología y medicina en 1960) por primera vez introdujera a discusión la extraña paradoja que se presentaba en la inmunología del embarazo, en donde bajo condiciones normales el feto no desencadena reacción alguna de las defensas inmunitarias de la madre siendo un cuerpo antigénicamente extraño <sup>14</sup>, se ha generado un vasto campo de investigación en la inmunología de la gestación. Medawar postuló tres teorías para tratar de explicar el fenómeno de tolerancia inmunológica materna:

- La placenta funciona como una barrera física entre los tejidos de la madre y el feto;
- Existe inmadurez antigénica por parte del tejido fetal;
- Existe tolerancia inmunológica por parte de la madre <sup>15</sup>.

De acuerdo con una las teorías de Medawar, las células del trofoblasto en placenta han sido identificadas como una barrera entre la madre y el feto <sup>16</sup>, además se ha establecido que la reacción inmunológica no puede ser inducida ya que este

tejido carece de la expresión de moléculas aloantigénicas pertenecientes al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II altamente polimórficas<sup>17</sup>, pero se ha demostrado la expresión de moléculas del MHC tipo I, preferencialmente de tipo no polimórfico <sup>18,19</sup>.

Actualmente, se ha establecido que existe una interacción dinámica entre la madre y el feto, en la cual elementos inmunológicos como los linfocitos tanto maternos como fetales pueden circular a través de ambos <sup>20,21</sup>.

Para complicar aún más las cosas, se ha demostrado que el producto puede ser rechazado como un alo-injerto removiéndolo de su lugar original y trasplantándolo al tejido muscular o al riñón de la madre en modelos murinos, esto resalta la capacidad del producto de expresar antígenos del MHC paternos y elimina la hipótesis que sugería que los tejidos fetales como la placenta, el corion y el amnios podrían fungir como tejidos inmunoprivilegiados como sí lo hacen la córnea, los ovarios o los testículos <sup>22</sup>.

Otros estudios han propuesto que las células de trofoblasto son capaces de inducir apoptosis en linfocitos tipo Th-1 maternos, mediante la producción del ligando de Fas (FasL) en la interface materno-fetal con el objetivo de proteger al feto de ser rechazado por la madre <sup>23</sup>. Adicionalmente se ha observado que en ratones carentes de FasL funcional, con una mutación asociada a la enfermedad linfoproliferativa generalizada, se encuentran extensos infiltrados de leucocitos y muerte celular en la interface materno-fetal, en comparación con ratones normales <sup>24</sup>.

Recientemente han sido introducidos en el campo de la reproducción diferentes mecanismos novedosos relacionados con protección en el proceso de la gestación; por una parte se encuentra la actividad del complejo de la Hemo-oxigenasa (HO), se ha destacado el papel de las células T reguladoras (Tregs) y la función de la familia de moléculas denominadas como galectinas.

La enzima HO es responsable de la degradación del grupo hemo de la hemoglobulina para la producción de bilirrubina. Diversos estudios proponen que la enzima HO promueve la tolerancia de aloinjertos en el ratón <sup>25,26</sup>. La sub-expresión de las dos isoformas de HO (HO-1 y HO-2) en la interface del producto y la madre en modelos de ratón, llevan a la terminación del embarazo mediada por células Th-1 comparada con ratones preñados normales, lo que ha sugerido que esta enzima presenta un efecto protector en el desarrollo del embarazo murino <sup>27</sup>. Extrapolando estos hallazgos, en humanos se ha reportado unas reducciones significativas de la expresión tanto de HO-1 como de HO-2 en muestras de placenta de pacientes con complicaciones en el embarazo, comparadas con muestras de mujeres con un embarazo normal <sup>28</sup>.

Por otra parte, las células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> inducen privilegio inmune local, permitiendo la aceptación del injerto <sup>29</sup>. En modelos murinos en los que se ha disminuido el número de células reguladoras se ha observado el aumento en la incidencia de abortos comparado con embarazos normales <sup>30,31</sup>; y más aún, durante el proceso de gestación de humanos se han asociado altos niveles de células Treg circulantes con la culminación satisfactoria del embarazo <sup>32</sup>.

Finalmente se ha propuesto otro mecanismo que podría explicar el fenotipo Th-2 predominante durante el desarrollo del feto, en el cual se involucra a las denominadas galectinas, las cuales son proteínas que principalmente reconocen a carbohidratos como ligandos. Se ha demostrado que pueden inducir apoptosis en células de tipo Th-1 debido al patrón de glúcidos que estas células presentan en su membrana, con lo que se favorece la prevalencia de las células Th-2 y Treg<sup>33-38</sup>.

Debido a que todos los mecanismos mencionados anteriormente tienen como efectores finales a las citocinas que se producen, uno de los puntos clave en la investigación relacionada con la gestación se encuentra representado por el papel de las citocinas pro-inflamatorias (Th-1 como TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ ) y las citocinas anti-inflamatorias (Th-2/Th-3, como IL-10 y TGF-beta) en la determinación de un aborto o de un embarazo satisfactorio.

Diferentes estudios suponen que la relación de citocinas Th-1/Th-2 puede no ser necesariamente la explicación global del proceso, pero es una buena simplificación de éste. En el ratón, la producción de citocinas del tipo Th-1 en sitios de localización del injerto, han demostrado ser esenciales para el proceso de implantación, mientras que durante el desarrollo del feto se asocia con una respuesta de inflamación sistémica patológica que puede desencadenar en la pérdida de los productos fetales. En general se acepta que los cambios locales en el balance de los perfiles de citocinas Th-1/Th-2 ocurren durante el embarazo en el útero materno y en la interface fetomaternal, lo que contribuye a la implantación, al desarrollo de la placenta y a la supervivencia fetal.<sup>39</sup>.

En general todos los mecanismos que han evolucionado con el fin de proteger y permitir el desarrollo del feto semialogénico son tanto diversos como complejos y no obstante muchos de ellos se traslapan entre sí. La Tabla 1 enlista los factores específicos para los cuales existe evidencia de que su acción en la protección del feto frente al sistema inmune en el embarazo es crítico para el desarrollo y buen término de éste.

**Tabla 1. Mecanismos de tolerancia en la interface materno-fetal.**

<b>Tipo de protección</b>	<b>Genes/Proteínas</b>	<b>Referencia</b>
Anticuerpos/Complemento	CD46, DAF, CD59	40
Baja proliferación Linfocitaria	Progesterona	41
Supresores de la generación de linfocitos	IL-10, TGF- $\beta$	4
Regulación de genes HLA	HLA-G, HLA-E	42
Prevención de ataque por células T	FasL	43
	TNF	44

### **7.5.2 Resultado del embarazo, fallo o éxito: el paradigma Th-1/Th-2**

Durante el embarazo la fuente de citocinas está representada por las citocinas que son secretadas por el epitelio y estroma decidual (tejidos maternos), el cito y sincicio trofoblasto, las células Natural Killers uterinas (uNKs), el córion y el amnios (tejidos fetales) <sup>45-47</sup>. Se ha sugerido que las citocinas originadas de estos tejidos llevan a cabo la inducción de la tolerancia materna del feto, regula la inmunidad local en

contra de factores infectivos, regula la producción hormonal de la placenta y el remodelamiento de los tejidos durante la invasión del trofoblasto <sup>41,48</sup>.

Un balance apropiado de citocinas en la interface materno-fetal, durante los diferentes estadios de la gestación, se asocian fundamentalmente a la evasión del rechazo del feto <sup>49,50</sup>. En este sentido se ha propuesto que el tipo de respuesta puede ser asociada con el éxito o fallo del embarazo y se ha denominado como el “paradigma Th-1/Th-2”. En este paradigma, se considera que una respuesta tipo Th-2, lleva el embarazo al éxito, mientras que una respuesta Th-1 puede no permitir la supervivencia del feto <sup>48</sup>. Una vez llegado a término el desarrollo del feto, se sugiere un papel positivo en el cambio o “switch” del tipo de respuesta inmunológica, ya que la inyección de citocinas del tipo Th-1 durante el embarazo normal de ratones hembra preñadas llevaba a la culminación del embarazo causando abortos en los ratones, mientras que la producción de IL-10 es baja en ratones propensos al aborto <sup>51</sup>. Así entonces se acepta generalmente que durante el embarazo ocurren cambios locales en el balance de perfiles citocinas Th1/Th-2 tanto en el útero materno como en la interface materno-fetal, lo que contribuye a la implantación, desarrollo de la placenta y supervivencia del feto e inmunidad.

### **7.5.3 Actividad Th-1 durante el embarazo**

Las citocinas Th-1, dañinas durante la gestación, son necesarias en los estadios tempranos y finales del embarazo. Como ya se ha abordado, la implantación por sí misma es totalmente dependiente de la presencia de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , así como del factor inhibitorio de leucemia (LIF), la cual se sobre

expresa en ratones en el día 4 del embarazo justo después de la implantación <sup>52</sup>. Por ejemplo, se ha reportado que el TNF- $\alpha$  es una citocina crucial y que media la inducción de abortos después del estrés o la inyección de sustancia P; además, la prevalencia de esta citocina y en general la de las citosinas pro-inflamatorias elevadas es una característica constante en mujeres con abortos recurrentes <sup>53</sup>. Se ha determinado también que el incremento de IL-6 durante el segundo trimestre de gestación se asocia con la inducción de un embarazo pretérmino <sup>54</sup>. Hoy en día se conoce que la actividad Th-1 es necesaria para la implantación así como para la regulación de la placentación, defensa en contra de infección e incluso del término normal del parto. Sin embargo su aumento durante el desarrollo del feto, puede comprometer el embarazo.

#### **7.5.4 Actividad Th-2 durante el embarazo**

El trofoblasto, las membranas coriónica y amniótica, así como la decidua son la principal fuente de citocinas Th-2 incluyendo al TGF- $\beta$  <sup>55</sup>. El papel de las citocinas Th-2 en el decremento del índice de abortos ya ha sido demostrado anteriormente en placentas de ratonas propensas a abortos, los cuales producen menor cantidad de IL-4 e IL-10 en comparación con placentas de ratonas con embarazos normales. La administración de inhibidores de la actividad de citocinas Th1, como el uso de anticuerpos anti IFN- $\gamma$  o la administración de citocinas Th-2 exógenas (IL-3 ó IL-10), protegen al embrión del rechazo <sup>36</sup>. En el humano se ha demostrado que un decremento en la producción de IL-2 así como de IFN- $\gamma$ , acompañado del incremento en la producción de IL-4 e IL-10 durante el segundo y parte del tercer trimestre son característicos de un embarazo normal, mientras que el incremento de IL-2, IFN- $\gamma$  y la

reducción en la producción de IL-10 puede representar una característica significativa en los embarazos patológicos comparado con los embarazos normales en el estudio<sup>56</sup>. Todos estos datos en conjunto establecen que el perfil de citocinas tipo 2 durante el segundo y parte del tercer trimestre puede asociarse a un embarazo normal, mientras que la carencia de un perfil de citocinas tipo 2 predominante puede ser indicativo de un embarazo patológico.

## **7.6 Producción de citocinas en las membranas fetales y su función**

En los últimos años se ha establecido que las membranas fetales producen una gran variedad de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y sus receptores. Estos estudios han demostrado que en la membrana fetal, citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , regulan la producción de prostaglandinas (PG's) y de metaloproteinasas (MMPs), moléculas que se a postulado tienen una relación estrecha con el inicio del trabajo de parto. Es por esta razón que la producción diferencial de citocinas en la membrana, toma un papel de suma importancia en la regulación de las funciones intrauterinas durante el embarazo, el trabajo de parto y en infecciones intrauterinas.

### **7.6.1 Citocinas producidas en las membranas fetales**

Las membranas fetales humanas en cultivo producen un amplia gama de citosinas, tales como: IL-1 $\beta$ , -2, -4, -6, -8, -10, -11, -15, -18, TNF- $\alpha$ , IFNs  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), activina A, inhibina A, oncostatin M (OSM), factor de incremento de colonias de células pre B (PBEF) y el LIF. En la Tabla 2 se presenta mayor detalle sobre dicha producción.

Se ha demostrado que la producción de citocinas en los cultivos de los tejidos fetales puede ser tanto constitutiva como inducidas, dependiendo del periodo de gestación e incluso si, ya se ha iniciado el trabajo de parto. Las citocinas, los autacoides (prostaglandinas y oxitocina), las hormonas esteroideas (hidrocortisona y progesterona), así como los factores mecánicos pueden inducir la producción de diferentes citocinas en las membranas fetales. La producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , -6, -8, -10, TNF- $\alpha$  e IFNs) puede ser iniciada por factores fisiológicos, físicos, pero también por factores patogénicos como el LPS y el virus de la enfermedad de Newcastle <sup>57</sup>. Paralelamente se han reportado estudios en los que cultivos primarios de membranas fetales (CPMF) son capaces de producir diferentes citocinas. Los cultivos primarios de células de corion y de amnios liberan IL-6 e IL-8 en respuesta a estímulos con IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LPS y éster forbólico del ácido mirístico<sup>58</sup>.

Adicionalmente se ha reportado que existe una producción diferencial de TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , ya que éstas citocinas son producidas en células de cultivos primarios de corion pero no en células de amnios en respuesta a la infección con virus de influenza por ejemplo <sup>59</sup>. Estos estudios sugieren que existe una contribución diferenciada en la producción de citocinas en las membranas fetales.

#### **7.6.2 Mecanismos involucrados en la producción de citocinas pro-inflamatorias en células de membranas fetales humanas**

Hoy en día diferentes estudios se han volcado hacia el desciframiento de los mecanismos que disparan la producción de citocinas en las células de las membranas fetales, ya que la producción de citocinas pro-inflamatorias se asocia con el inicio del trabajo de parto normal y la inducción del nacimiento pre-término <sup>60,61</sup>.

**Tabla 2. Producción de diferentes citocinas en las membranas fetales.**

<b>CITOCINAS</b>	<b>CULTIVO</b>	<b>REGULADORES</b>	<b>PRODUCCIÓN</b>	<b>MUESTRAS</b>	<b>METODOS</b>
IL-1 $\beta$	Amniocorion	LPS, Labor	Inducida	SC, HT	E
	Amnios	Labor	Inducida	HT	E
		-	Negativa	S	IH
	Corion	LPS	Inducida	SC	E
	Coriodecidua	Periodo gestacional	Inducida	TH	E
		LPS	Inducida	TH	WB <sup>a</sup>
	Decidua	-	Positiva	S3, TH	IH, E
LPS		Inducida	SC	E	
IL-2	Amnios	-	Positiva	S	IH
IL-4	Amnios	-	Positiva	S	IH
	Corion	-	Positiva	S	IH
IL-6	Amniocorion	LPS	Inducida	SC	E
	Amnios	LPS	Inducida	SC	B
		-	Negativa	S	IH
	Corion	-	Positiva	S1	IH
	Decidua	LPS	Inducida	SC	B
-		Positiva	S3	IH	
IL-8	Amniocorion	LPS	Inducida	SC	E
	Amnios	-	Negativa	S	IH
		Labor, PGE <sub>2</sub>	Inducida	SC, HT	E, IH
	Corion	Labor, PGE <sub>2</sub>	Inducida	SC, HT	E, IH
	Coriodecidua	Labor	Constitutiva	TH	E
	Decidua	PGE <sub>2</sub>	Inducida	SC, S	E, IH
-		Positiva	S <sup>3</sup>	IH	
IL-10	Amnios	LPS, PGE <sub>2</sub>	Inducida	SC	E
	Corion	PGE <sub>2</sub>	Inducida	SC	E
	Decidua	LPS, PGE	Inducida	SC	E
IL-11	Corion	Placentación	Constitutiva	S <sup>4</sup>	IH

	Decidua	Placentación	Constitutiva	S	IH
IL-15	Amniocorion	LPS	Constitutiva	SC	E
	Amnion	-	Positiva	S	IH
	Corion	-	Positiva	S	IH
	Decidua	-	Negativa	S	IH
IL-18	Amnion	-	Negative	S	IH
	Corion	-	Positive	S	IH
	Decidua	-	Positive	S	IH
TNF- $\alpha$	Amniocorion	LPS, OXT	Inducida	SC	E
	Amnios	LPS	Inducida	SC	B
		-	Positiva	S	IH
	Corion	LPS	Inducido	SC	E
		-	Negativo	S	IH
		-	Positivo	S <sup>2</sup>	IH
Decidua	LPS	Inducida	SC	E, B	
	-	Positiva	S <sup>3</sup>	IH	
IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$	Amnios	NDV	Inducida	SC	B
		LPS	No inducida	SC	B
	Decidua	LPS, NDV	Inducida	SC	B
TGF- $\beta$	Amniocorion	HCS, PRG, OXT	Inducida	SC	E
	Decidua	-	Positiva	S	IH
Activin A	Amnion	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$	Inducida	SC	E
Inhibin A	Coriodecidua	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$	Inducida	SC	E
OSM	Corion	Periodo gestacional	Reducida	SC, S	WB, E, IH
	Decidua	Periodo gestacional	Constitutiva	SC, S	WB, E, IH
PBEF	Amnion	-	Positiva	S	IH
	Corion	-	Positiva	S	IH
	Decidua	-	Positiva	S	IH
LIF	Amnion	LPS, IL-1 $\alpha$ ,	Inducida	HT, SC	B

TNF- $\alpha$				
Coriodecidua	LPS, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$	Inducida	HT, SC	B

**Citocinas:** IL - interleucina; TNF - Factor de necrosis tumoral; TGF - Factor de crecimiento transformante; IFN - interferon; OSM - oncostatin M; PBEF - factor incrementador de colonias de células pre B; LIF - factor inhibidores de leucemia.

**Reguladores:** LPS - lipopolisacárido; PGE<sup>2</sup> - prostaglandina E<sub>2</sub>; NDV - virus de la enfermedad de Newcastle; HCS - hidrocortisona; PRG - progesterona; OXT oxitocina; - sin estimulación.

**Producción:** inducida o reducida, la producción de la citocina fue inducida o reducida por los reguladores listados; positiva o negativa, si la citocina fue detectada en el cultivo no estimulado o si no lo fue; constitutiva, la citocina se produce constitutivamente.

**Muestra:** SC - sobrenadante de cultivo; HT - homogenizado de tejido; S - secciones.

**Secciones:** S<sup>1</sup> - trofoblasto de extravellosidad corionica; S<sup>2</sup> - Leucocitos en el corion; S<sup>3</sup> - células estromales de decidua; S<sup>4</sup> - Vellocidad corionica.

**Métodos:** E - ELISA; B - Bio-ensaayo; WB - western blot; IH - inmunohistoquímica.

**Simbolos:** <sup>a</sup>, se detectaron tanto la isoforma de 17 como la de 31 KDa de la IL-1 $\beta$ .

**Modificado de Uchide 2005** <sup>12</sup>.

La IL-10 muestra una regulación negativa de la expresión del mRNA y la producción de citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$ , IL-8 y TNF- $\alpha$  en tejidos de membrana fetal estimulados con LPS, lo que sugiere que la biosíntesis de estas citocinas pro-inflamatorias en las membranas fetales puede ser controlado por la IL-10 fungiendo como una citocina anti-inflamatoria durante procesos infecciosos <sup>62</sup>.

Los compuestos antioxidantes, anti-inflamatorios y los ligandos del receptor activado por el proliferador de peroxisomas- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) inhiben la producción de IL-1, -6, -8, TNF- $\alpha$  y la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B en tejidos de membrana fetal estimulada<sup>63</sup>. También se ha encontrado que SKF86002, un potente inhibidor de p38, una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), bloquea la secreción de IL-1 $\beta$

en los tejido de membranas fetales estimuladas con LPS, pero no se ve alterada la inducción de la expresión del mensajero de esta citocina, lo que indica que SKF86002 bloquea la secreción de IL-1 $\beta$  a nivel post-transcripcional vía la inhibición de la actividad de la MAPK <sup>10</sup>.

Todos los resultados en conjunto sugieren que PPAR- $\gamma$ , MAPK y el NF- $\kappa$ B, regulan la inducción de la expresión de los genes de las citocinas pro-inflamatorias en las membranas fetales, hacia el inicio del trabajo de parto normal y pretérmino.

### **7.6.3 Función de las citocinas pro-inflamatorias en tejidos gestacionales**

Las citocinas pro-inflamatorias como: IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, estimulan la producción de PGE<sup>2</sup> y MMPs en cultivos primarios de células epiteliales amnióticas, fibroblastos, trofoblasto coriónico y células de decidua, las cuales tienen efecto sobre la contracción del miometrio y la degradación de la colágena en membranas fetales en el inicio del trabajo de término normal y pre término. Así, estas citocinas parecen jugar un papel fundamental en la facilitación del parto <sup>64</sup>. Por otro lado, la producción de citocinas pro-inflamatorias en la membrana fetal puede ser regulada negativamente por citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y Activina A <sup>65,66</sup>. Tomando en cuenta los parámetros anteriores es muy posible que el balance entre los niveles de las citocinas pro- y anti-inflamatorias, en donde se incluye a la IL-10, debe ser un factor determinante para el control de las funciones intrauterinas durante el embarazo, el trabajo de parto normal y en el trabajo de parto inducido en infecciones.

## **7.7 Regulación de la producción de citocinas pro-inflamatorias y el trabajo de parto**

El trabajo de parto es la culminación de la maduración fetal, en donde se lleva a cabo la ruptura de las membranas fetales, la separación placentaria, la maduración y dilatación cervical y se da inicio a las contracciones uterinas coordinadas que, en condiciones normales, llevan al nacimiento del feto. Los mecanismos precisos que controlan el inicio del trabajo de parto en los humanos es aún una de las preguntas no resueltas en la biología de la reproducción.

El entendimiento de este proceso es de gran importancia debido a que se estima que alrededor del 10% de los embarazos presentan complicaciones dadas por un término prematuro y en más del 70% se asocia con la morbilidad y mortalidad neonatal.

Hoy en día es ampliamente aceptado que la inflamación es clave para el inicio del proceso de parto. Diferentes estudios han demostrado la regulación positiva de un amplio panel de genes pro-inflamatorias en las membranas fetales así como en el miometrio en el inicio del trabajo de parto<sup>67,68</sup>. Se ha implicado en este proceso a diferentes citocinas y prostaglandinas. El incremento de la expresión de citocinas pro-inflamatorias tanto en pre-término como en el trabajo de parto normal, eleva los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , que son detectados en el fluido amniótico, así como la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6 en el amnios <sup>69</sup>. Se piensa que estas citocinas pro-inflamatorias contribuyen al inicio del trabajo de parto mediante la estimulación de la producción de IL-8 y de diferentes prostaglandinas. Las prostaglandinas inducen la

contracción uterina y actúan en concordancia con la IL-8 provocando la maduración y remodelación de la membrana fetal <sup>70,71</sup>.

El factor nuclear NF- $\kappa$ B es un factor transcripcional asociado clásicamente con inflamación, que es activado en respuesta a infecciones y a citocinas pro-inflamatorias, las cuales se manifiestan durante el trabajo de parto. Importantemente, muchos genes pro-inflamatorios y genes asociados con el trabajo de parto son regulados por el NF- $\kappa$ B. Por tanto este factor de transcripción puede ser el desencadenador en este proceso.

## **7.8 Componentes de la vía de señalización del NF- $\kappa$ B**

### **7.8.1 El NF- $\kappa$ B**

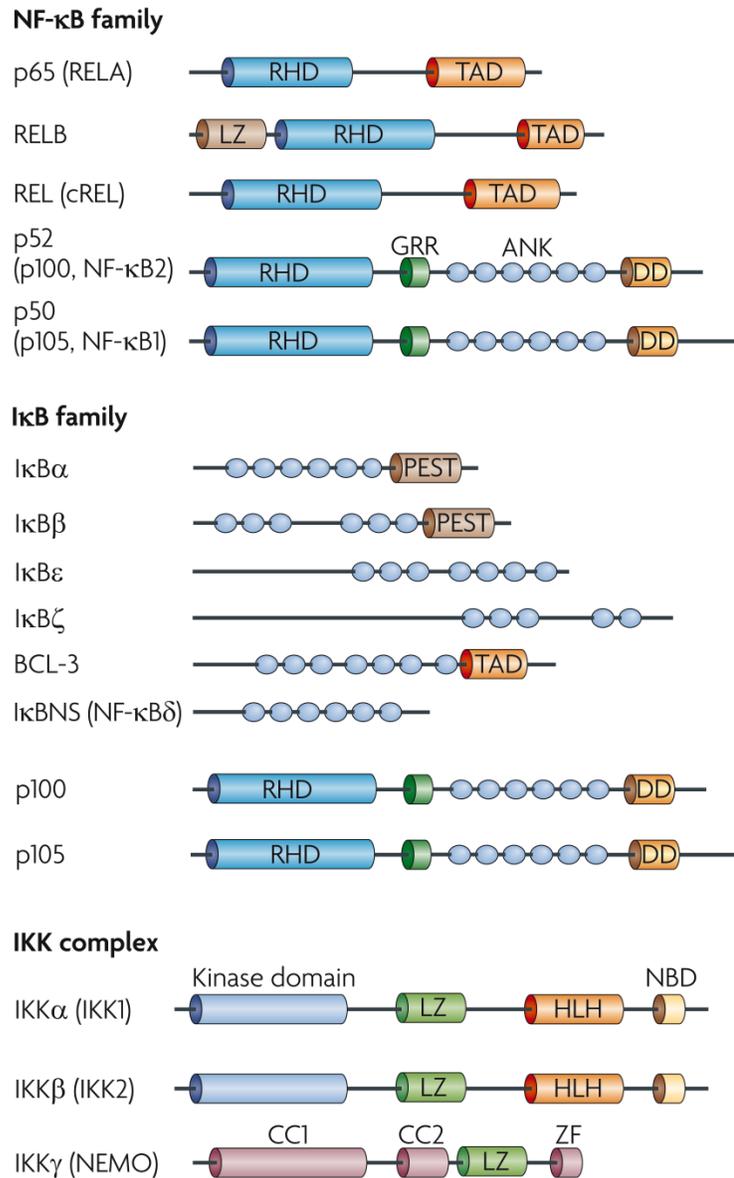
La familia del NF- $\kappa$ B/Rel está compuesta de cinco miembros: el NF- $\kappa$ B1 (p105/p50), NF- $\kappa$ B2 (p100/p52), p65 (Rel A), c-rel y RelB (figura 6). Estas proteínas comparten una estructura conservada en su región N-terminal denominada como dominio de homología con Rel (RHD) <sup>72</sup>. Los RHD median la dimerización, la unión al DNA, la localización nuclear y la interacción con las proteínas inhibidoras del NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) <sup>73</sup>. En la forma activa el NF- $\kappa$ B consta de dímeros heterogéneos de diferentes combinaciones de subunidades: cada miembro de la familia del NF- $\kappa$ B, exceptuando RelB, pueden formar homodímeros así como heterodímeros entre sí <sup>74</sup>. RelB forma heterodímeros con p100, p52 y p50. La diversidad de combinaciones que se pueden formar de los dímeros del NF- $\kappa$ B contribuye con la regulación de distintos paneles de genes por tres razones: debido a que los dímeros individuales contienen diferentes sitios específicos de unión a DNA para una colección de sitios  $\kappa$ B relacionados; debido

a las diferentes interacciones proteína-proteína que los dímeros individuales generan en los promotores blanco; y finalmente, debido al perfil de activación de genes de diferentes dímeros bajo condiciones fisiológicas específicas <sup>75</sup>. Las proteínas p65, c-rel y RelB contienen dominios de activación transcripcional (TADs) en su región C-terminal, los cuales son requeridos para la translocación de las proteínas. Las proteínas p50 y p52 son generadas por procesamiento proteolítico de sus precursores, p105 y p100, respectivamente. Las dos proteínas precursoras p105 y p102 son constitutivamente procesadas mediante un mecanismo cotranscripcional, pero es mucho más eficiente el procesamiento de p105; sin embargo, la mayoría de las células exhiben constitutivamente altos niveles de p50, mientras que los niveles en estado estable de p52 son regularmente más bajos <sup>70,71</sup>. Las subunidades p50 y p52 carecen de TADs por lo tanto los homodímeros de estas proteínas no tienen la capacidad intrínseca para inducir la transcripción. La forma típica de mayor prevalencia del NF- $\kappa$ B es el heterodímero p50/p65 <sup>76</sup>. En la mayoría de las células el NF- $\kappa$ B se presenta como un complejo latente inactivo unido a un I $\kappa$ B en el citoplasma.

### **7.8.2 Los I $\kappa$ B's**

Casi al mismo tiempo que el NF- $\kappa$ B fue descrito, en células inmunológicas se estableció que en el citoplasma se encontraba una actividad latente de unión a DNA por parte del NF- $\kappa$ B de todas las células en reposo y que este NF- $\kappa$ B podía ser activado tratando el lisado celular con desoxicolato, un detergente débil <sup>77</sup>. Esto sugirió que era una interacción no covalente con una molécula inhibidora la responsable de mantener en un estado inactivo al NF- $\kappa$ B. Mediante la purificación de la porción que presentaba la actividad suprimida del NF- $\kappa$ B se lograron aislar a

dichas moléculas denominadas como:  $I\kappa B\alpha$  e  $I\kappa B\beta$  <sup>78,79</sup> y posteriormente se identificó a un tercer inhibidor, llamado  $I\kappa B\epsilon$  <sup>80,81</sup>. Los  $I\kappa B$  se caracterizan por la presencia de múltiples repetidos de ankirina, los cuales median la unión a los RHD del NF- $\kappa B$  para la interacción proteína-proteína <sup>82,83</sup>. Las proteínas precursoras, p105 y p100, también contienen repetidos de ankirina y pueden funcionar como proteínas tipo  $I\kappa B$  (identificadas también como  $I\kappa B\gamma$  e  $I\kappa B\delta$ , respectivamente) <sup>84,85</sup>; incluso, se sugiere que estos 2  $I\kappa B$ s considerados como  $I\kappa B$ s clásicos están fuertemente involucrados en la determinación del índice de formación de nuevos dímeros de NF- $\kappa B$ , vía el procesamiento y ensamblaje de grandes complejos que mantienen actividad tipo  $I\kappa B$  <sup>86</sup>. Estudios de cristalografía y mecánica han revelado que los  $I\kappa B$ , específicamente la proteína  $I\kappa B\alpha$  sobre el dímero p50/p65, actúan enmascarando solamente la secuencia de localización nuclear (NLS) de la subunidad p65, dejando expuesta la NLS de p50 <sup>87</sup>. Esta NLS expuesta, en conjunto con la secuencia de exportación nuclear presentes tanto en  $I\kappa B\alpha$  y p65, resulta en un transporte activo núcleo-citoplasma del complejo  $I\kappa B\alpha$ /p50/p65. Y debido a que el proceso de exportación es más potente que el proceso de importación, la localización de  $I\kappa B\alpha$  unida a NF- $\kappa B$  en un estado estable es preferentemente en el citoplasma. De manera similar,  $I\kappa B\epsilon$  también es transportada activamente entre el núcleo y el citoplasma <sup>88</sup>. En contraste,  $I\kappa B\beta$  carece de secuencia de exportación nuclear (NES) y enmascara ambos NLSs del NF- $\kappa B$ , lo que tiene como consecuencia que  $I\kappa B\beta$  unido a NF- $\kappa B$  permanezca secuestrado en el citoplasma de células no estimuladas <sup>89</sup>.



**Figura 6. Miembros de la familia de proteínas: NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B e IKK.** Las proteínas precursoras p100 y p105 funcionan como I $\kappa$ B's (Inhibidores del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y son miembros de la familia del NF-  $\kappa$ B una vez que son procesados por el proteasoma.

ANK, repetidos de ankirina; BCL-3, Proteína de linfoma de células B 3; CC, doble  $\alpha$  hélice; DD, dominio de muerte; GRR, región rica en licinas; HLH, estructura de hélice-orquilla-helice; IKK, cinasa de I $\kappa$ B's; LZ, cierre de leucina; NBD, dominios de unión esencial de regulación de NF- $\kappa$ B; PEST, regiones ricas en prolina, ácido glutámico, serina y treonina; RHD, dominios de homología con REL; TAD, dominios de trans-activación; ZF, dedos de zinc.

A diferencia de los I $\kappa$ Bs clásicos como el I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$  e I $\kappa$ B $\delta$ , los cuales en general regulan la actividad del NF- $\kappa$ B secuestrándolo en el citoplasma, en los últimos 14 años se han descrito otro tipo de proteínas tipo I $\kappa$ B que al igual que las primeras conservan en su estructura repetidos de ankirina pero que a diferencia de los I $\kappa$ B clásicos estos I $\kappa$ B “novedosos” (llamados I $\kappa$ B nucleares) no están expresados en células no estimuladas, pero son inducidos después de la activación celular de una manera dependiente del tejido.

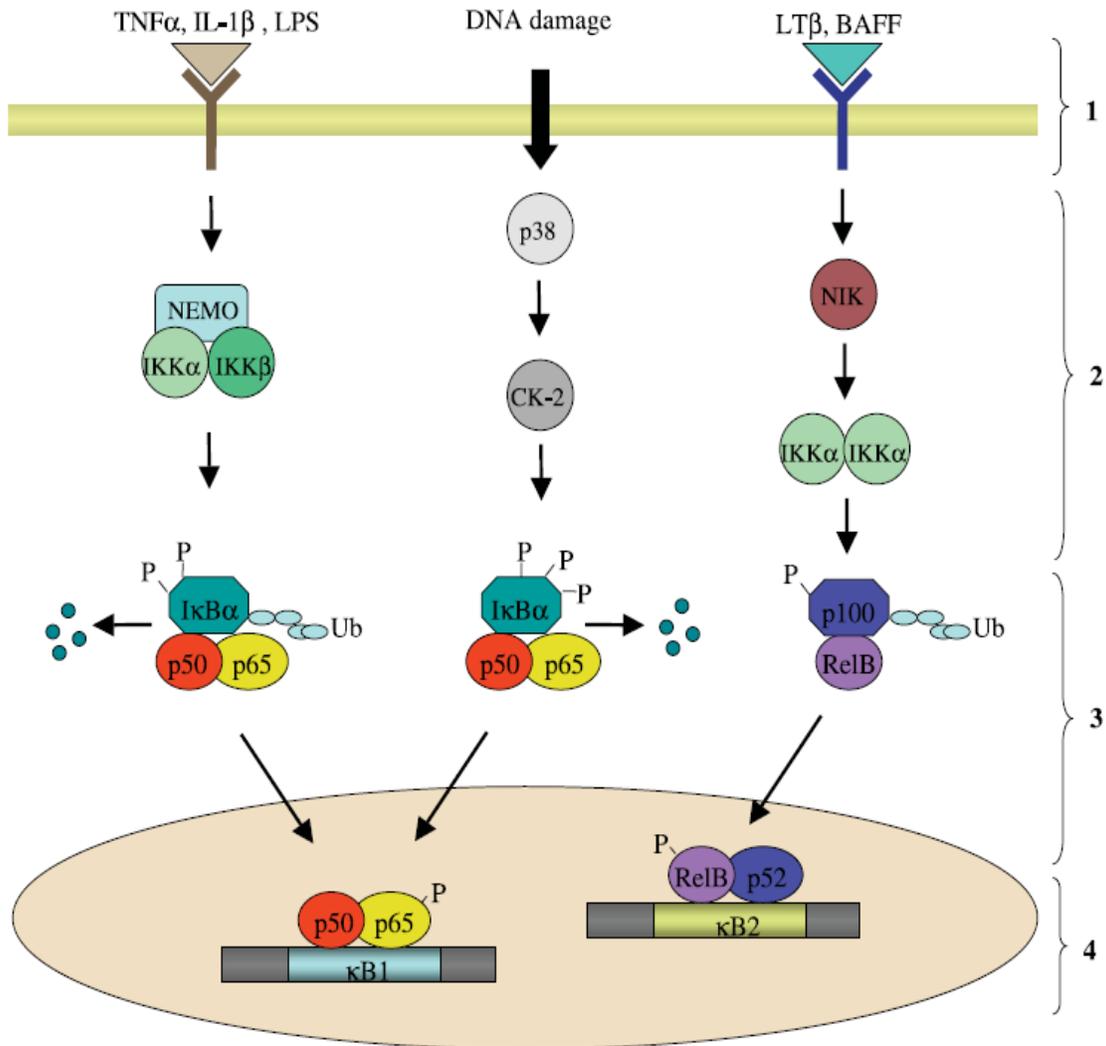
#### **7.8.2.1 El complejo IKK**

El complejo (cinasa de I $\kappa$ B) IKK activado tiene acción sobre los I $\kappa$ Bs fosforilandolos, dando así inicio a la vía de señalización del NF- $\kappa$ B. El complejo consiste de dos subunidades de cinasas homólogas (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) además de una subunidad reguladora (IKK $\gamma$ )<sup>90</sup>.

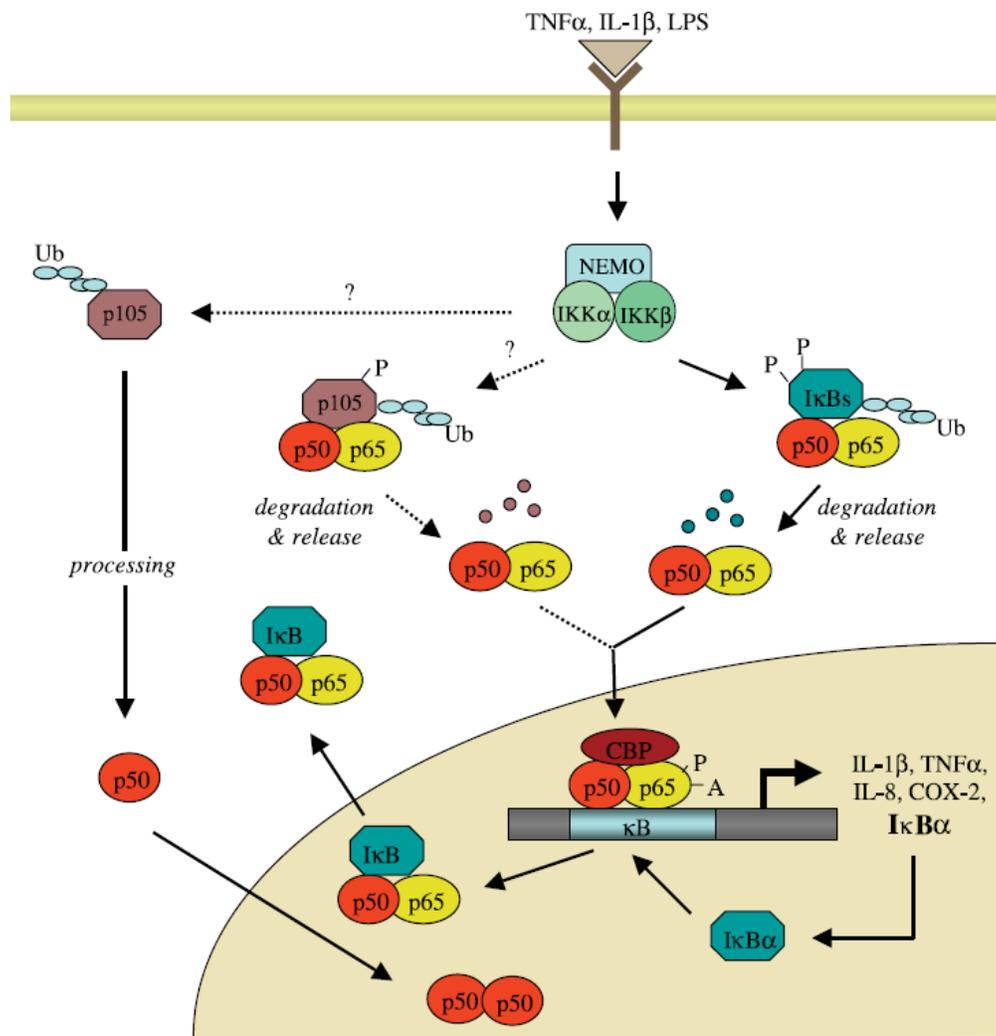
### **7.9 Vías de activación del NF- $\kappa$ B**

Hasta la fecha han sido identificadas tres vías metabólicas de señalización para la activación del NF- $\kappa$ B, cada una de las cuales recaen en la consecuente activación de cinasas, la generación de dímeros de NF- $\kappa$ B que se unen a DNA e incrementa la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B (figura 7)

La vía de señalización denominada como canónica es disparada por el LPS y por citocinas pro-inflamatorias, como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ . Aunque la mayoría de los eventos tempranos después del reconocimiento del receptor por sus ligandos es específica para cada estímulo<sup>91</sup>, todas estas vías convergen en el complejo de las cinasas de I $\kappa$ B (IKK) (figura 8).



**Figura 7. Tres vías diferentes para el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.** La vía de señalización canónica es activada cuando el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  o el LPS se unen a sus respectivos receptores y desencadena la fosforilación de I $\kappa$ B mediada por una cinasa de I $\kappa$ B (IKK). El I $\kappa$ B $\alpha$  es subsecuentemente degradado por el proteasoma para liberar dímeros de p50 y p65. En una vía atípica, el daño al DNA promueve una extensa fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  inducida por la casein cinasa-2 inducidas por p38 (CK-2). La vía no canónica es disparada por linfotoxina  $\beta$  (LT $\beta$ ) o por el factor de activación de células B (BAFF) los cuales desencadena la activación de IKK $\alpha$  mediante una cinasa inducida por NF- $\kappa$ B. la enzima IKK $\alpha$  a su vez fosforila a p100 lo que lleva a su procesamiento proteasomal para generar p52. Los dímeros de RelB/p52 son entonces liberados y traslocados al núcleo para activar distintos genes que son regulados por la vía canónica. 1. Estimulo extracelular 2. Activación de cinasa. 3. Generación y translocación de dímeros activos de NF- $\kappa$ B 4. Unión a DNA y fosforilación de los dímeros de NF- $\kappa$ B así como el reclutamiento de cofactores. P= fosforilación; Ub= Ubiquitinación.



**Figura 8. Modelo esquemático de la vía de señalización canónica del NF- $\kappa$ B.** La estimulación de las células con TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o LPS lleva a la degradación de las proteínas I $\kappa$ B por el complejo IKK. La fosforilación (P) dependiente de IKKs tiene como blanco a la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , lo que induce su posterior ubiquitinación (Ub) y degradación por el proteasoma. Una vez que el I $\kappa$ B $\alpha$  es degradado, p65 fosforilado y las señales de localización nuclear son desmascaradas, el dímero de NF- $\kappa$ B p50/p65 puede ahora translocarse al núcleo y reunir a los elementos de respuesta del NF- $\kappa$ B en el promotor de los genes blanco. La inducción de la degradación de p105 puede ocurrir simultáneamente, lo que produce la liberación de dímeros de NF- $\kappa$ B, los cuales incluyen dímeros p50/65. El precursor p105 puede también tomar parte en respuesta a citocinas para generar un homodímero adicional de p50, el cual puede tomar parte en la unión a DNA o ser desplazado del dímero mediante la transactivación de dímeros. En el núcleo se llevan a cabo más fosforilaciones y acetilaciones (A) de NF- $\kappa$ B, las cuales promueven el reclutamiento de coactivadores. Como un ejemplo la proteína de unión a CREB (CBP) para llevar a cabo la transcripción. El término de la señalización ocurre cuando es sintetizado nuevo I $\kappa$ B $\alpha$  y desplaza al NF- $\kappa$ B unido a DNA y lo exporta de regreso al citoplasma.

El complejo IKK incluye a la proteína reguladora denominada como modulador esencial de NF- $\kappa$ B (NEMO o IKK $\gamma$ ) y las cinasa de IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ .

Una vez activado el complejo IKK, este fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$  en la Ser 32 y en la Ser 36 para después sufrir ubiquitinación por parte de la SCF $^{\beta}$ -TrCP la cual une ubiquitinas en los residuos 21 y 22 de lisina. El I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitinado es degradado subsecuentemente por la subunidad 26S del proteasoma con lo que se lleva a cabo la liberación de dímeros de NF- $\kappa$ B del citoplasma del complejo I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, las cuales dejan expuestos sus NLSs, lo que le permite translocarse al núcleo. La activación de la vía canónica es regulada rápidamente como resultado de un mecanismo de represión post inducción. Debido a la presencia de sitios de unión a NF- $\kappa$ B en el promotor de los genes de I $\kappa$ B $\alpha$ , la activación del NF- $\kappa$ B lleva a una re síntesis rápida del gen de I $\kappa$ B $\alpha$ , el cual se acumula en el núcleo y disocia los complejos de NF- $\kappa$ B unidos a DNA <sup>92</sup>. Este nuevo complejo formado por I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B es entonces exportado hacia el citoplasma, en un proceso mediado por la NES de I $\kappa$ B $\alpha$ , lo cual restablece el NF- $\kappa$ B citoplásmico basal. La degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  mediante las vías canónicas requiere de la subunidad IKK $\beta$  y de NEMO <sup>93</sup>.

### **7.10 Regulación del NF- $\kappa$ B**

Debido a la especificidad y el control temporal de la respuesta, el NF- $\kappa$ B se mantiene bajo una regulación estricta en diferentes puntos de control. Como se ha discutido, diferentes estímulos activan diferentes cinasas, regulado principalmente por la vía de señalización activada quien lleva a la degradación diferencial de un I $\kappa$ B determinado. Se ha demostrado que las proteínas I $\kappa$ Bs presentan distintas preferencias de asociación con dímeros de NF- $\kappa$ B particulares, por ejemplo I $\kappa$ B $\alpha$

predominantemente se une a dímeros de p50/p65, I $\kappa$ B $\epsilon$  se une a dímeros p65/c-rel y p100 se une a RelB. Esta declaración selectiva puede determinar si se activan o se reprimen transcripcionalmente los dímeros de NF- $\kappa$ B que son liberados. Los genes blanco requieren de un miembro específico de la familia del NF- $\kappa$ B para su activación y esto varía de gen a gen <sup>94</sup>. Finalmente la actividad transcripcional de las subunidades del NF- $\kappa$ B por sí mismas son también reguladas por una gran variedad de modificaciones post-transcripcionales, tales como la fosforilación, la acetilación y la ubiquitinación <sup>95</sup>. La regulación de la señalización del NF- $\kappa$ B es compleja y la diferencia entre las estirpes celulares puede depender entonces de qué cinasas y cuales subunidades del NF- $\kappa$ B son expresadas; o como se comentará a continuación de que I $\kappa$ Bs pueden ser expresados. Estos son, por lo tanto los factores que determinan la respuesta celular en las vías dependiente de la activación del NF- $\kappa$ B.

### **7.10.1 I $\kappa$ Bs nucleares**

#### **7.10.1.1 Bcl-3**

La proteína Bcl-3 fue la primera molécula clonada perteneciente a la familia de los I $\kappa$ B, la cual en un principio fue identificada como un oncogen presente en la leucemia linfática crónica <sup>96,97</sup>. En los primeros trabajos se encontró que la proteína Bcl-3 podía actuar como un inhibidor de la actividad de unión del NF- $\kappa$ B, específicamente sobre la subunidad p50, lo que sugería en primera instancia que el Bcl-3 mantenía un papel inhibitorio en la regulación del NF- $\kappa$ B<sup>98,99</sup>. Sin embargo, los estudios posteriores dejaron de manifiesto que el Bcl-3 también tiene la capacidad de actuar como un coactivador transcripcional <sup>100-102</sup>, lo que indica que la proteína Bcl-3 funciona tanto como una proteína transactivadora como un inhibidor tradicional de la

expresión de genes dependientes del NF- $\kappa$ B, específicamente de las subunidades p50 y p52.

Las proteínas p50 y p52 carecen de una región TAD y por tanto son represores, pero al unirse con el Bcl-3, el cual sí presenta una región característica TAD, le otorga al complejo una acción pro activadora de la transcripción. El Bcl-3 es capaz de unirse diferencialmente a los homodímeros p50 o p52; en este punto son las diferentes modificaciones post-transcripcionales a las que es sujeto el Bcl-3 las cuales regulan esta cualidad <sup>103,104</sup>. En este sentido se ha caracterizado que la expresión de la ciclina D1, un gen involucrado en la proliferación celular, además del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), son controlados por la unión del complejo Bcl-3-p52-p52 y el complejo Bcl-3-p50-p50 a sus respectivos promotores <sup>105</sup>. Recientemente se publicó un estudio más amplio sobre los genes blanco del complejo Bcl-3-homodímeros de p50 <sup>106</sup>.

A pesar de lo anterior, como ya ha sido señalado, Bcl-3 puede también funcionar como un inhibidor de la actividad del NF- $\kappa$ B. Bcl-3 estabiliza homodímeros del NF- $\kappa$ B unidos a DNA con función represora lo que previene la unión de dímeros con actividad transcripcional; esto sugiere que el Bcl-3 está involucrado en procesos como la tolerancia al LPS <sup>107</sup>. En este sentido es conocido que el tratamiento con IL-10 disminuye la actividad de unión a DNA del NF- $\kappa$ B y a su vez se induce la expresión del Bcl-3. En macrófagos de lámina propia colónica estimulados con LPS este fenómeno resulta en la deficiencia de la actividad de unión a DNA del NF- $\kappa$ B y reduce la producción de TNF- $\alpha$  pero no la de la interleucina 6 (IL-6). Más aún la deficiencia de

Bcl-3 en macrófagos demostró defectos en la supresión de la producción del TNF- $\alpha$ , lo que indica que el Bcl-3 está involucrado en la supresión de la respuesta inmune innata <sup>108</sup>. Los complejos de Bcl-3-p50-p50 también regulan negativamente la expresión de IL-23, en ratones deficientes de IL-10 se produce en paralelo el incremento de la IL-23 mientras se inhibe la unión del complejo Bcl-3-p50-p50 al promotor IL23p19, lo que permite a los complejos del NF- $\kappa$ B que contienen subunidades p65 inducir la expresión de este gen <sup>109</sup>. Por lo tanto Bcl-3 puede suprimir la respuesta inmunológica apagando la expresión de diferentes genes pro-inflamatorios y en ese contexto, a su vez, inducir la expresión de citocinas anti-inflamatorias.

#### **7.10.1.2 I $\kappa$ B $\zeta$**

El I $\kappa$ B $\zeta$  presenta una mayor homología con Bcl-3 comparada contra los otros I $\kappa$ B's canónicos. El primer reporte sobre esta molécula I $\kappa$ B se presentó en un trabajo que buscaba identificar genes no reportados regulados positivamente frente al reto con LPS. En este trabajo se estableció que el I $\kappa$ B $\zeta$  (MAIL) se posicionaba en el núcleo frente al reto con LPS y que además estimulaba la producción de IL-6 <sup>110</sup>. Posteriormente se determinó que el I $\kappa$ B $\zeta$  también podía ser inducido por la IL-1 y no así por el TNF- $\alpha$ , y al igual que en el primer estudio, que su localización era nuclear. Sin embargo, sus resultados mostraban, en contraposición con los primeros hallazgos, que el I $\kappa$ B $\zeta$  podía ser considerado un nuevo inhibidor nuclear, regulando negativamente al NF- $\kappa$ B asociándose principalmente a la subunidad p50 <sup>111,112</sup>. Entonces, el I $\kappa$ B $\zeta$  puede ser inducido por diferentes estímulos que activan al NF- $\kappa$ B; sin embargo, se encontró posteriormente que la expresión proteica depende de una señalización adicional, la cual estabiliza al mensajero transcrito del I $\kappa$ B $\zeta$ . La

señalización adicional es provista por los receptores tipo Toll (TLR's) o el receptor de IL-1, ambas vías dependientes del gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), lo cual no ocurre con la vía de señalización del TNF <sup>113</sup>. Todos estos resultados resultaban hasta este punto controversiales, debido a que no era completamente claro si el IκBζ funcionaba como un activador o como un represor de la respuesta inmune *in vitro*.

El papel fisiológico del IκBζ fue determinado *in vivo* apoyándose del uso de ratones IκBζ<sup>-/-</sup> los cuales mostraron defectos en la capacidad de sus macrófagos de producir IL-6 en respuesta al reto con todos los ligandos de TLR e IL-1, no así en respuesta al TNF <sup>114</sup>. Al mismo tiempo fue hallado que el IκBζ se une preferencialmente a dímeros de p50 y son precisamente los complejos IκBζ-p50-p50 los co-activadores indispensables para la síntesis de IL-6 <sup>115</sup>. El IκBζ también puede inducir la producción de IFN-γ en células mieloides KG-1 <sup>116</sup>.

A su vez, en los ratones deficientes de IκBζ se observaron cambios patológicos en la conjuntiva, con fuertes infiltrados linfocitarios, similar a lo encontrado en pacientes con el síndrome de Stevens-Johnson <sup>117,118</sup>. Por tanto el IκBζ regula la progresión de la inflamación en la superficie ocular, un sistema considerado inmuno-privilegiado.

Estos mismos ratones limitados en la producción de IκBζ mostraron niveles elevados de IgE en suero y lesiones tipo dermatitis atópica. Mostrando el papel inmunosupresor *in vivo* del IκBζ. En este modelo, cuando los ratones eran estimulados directamente con LPS, se detectó rápidamente un incremento en la concentración de

TNF- $\alpha$  en el suero el cual duraba prolongadamente, lo que indica que el I $\kappa$ B $\zeta$  puede fungir como un regulador negativo en la producción de TNF- $\alpha$  en células diferentes a los macrófagos<sup>119</sup>.

Tal vez la contradicción aparente que se muestra en los estudios *in vivo* e *in vitro*, empleando células o ratones deficientes en la producción de I $\kappa$ B $\zeta$  se debe a que existe una regulación diferencial específica de la célula en la expresión de genes activados por NF- $\kappa$ B orquestada por el I $\kappa$ B $\zeta$ .

#### **7.10.1.3 I $\kappa$ BNS**

El I $\kappa$ BNS es una proteína nuclear que al igual que Bcl-3 e I $\kappa$ B $\zeta$ , presentan en su estructura repetidos de ankirina. I $\kappa$ BNS fue clonado originalmente como un gen que rápidamente es inducido por la estimulación del Receptor de células T (TCR) en timocitos. Por otra parte, se ha establecido que en timocitos activados con PMA/ionomicina la sobre-expresión del I $\kappa$ BNS inhibe la expresión del reportero luciferasa dependiente de la actividad de unión a DNA del NF- $\kappa$ B, lo que sugiere que I $\kappa$ BNS puede fungir como un regulador negativo en respuestas inmunológicas dependientes de NF- $\kappa$ B<sup>120</sup>.

Estudios posteriores demostraron que los ratones I $\kappa$ BNS<sup>-/-</sup> muestran una reducción en la proliferación de las células T dependiente de la activación del TCR, asociado con la reducción en los niveles de IL-2<sup>121</sup>.

Se ha observado también que la expresión de I $\kappa$ BNS es sitio específica, por ejemplo, se ha identificado la expresión de esta molécula en macrófagos de lámina propia colónica (quienes se considera tienen un papel crucial en el mantenimiento de

la homeostasis inmunológica de la mucosa colónica), la cual no es identificada en macrófagos de sangre periférica, sugiriendo que el I $\kappa$ BNS está involucrado en la inmunidad de la mucosa intestinal. Adicionalmente, el I $\kappa$ BNS fue reclutado a los sitios  $\kappa$ B del promotor de la IL-6, pero no al del TNF- $\alpha$ , inhibiendo específicamente la producción de IL-6 y no así la del TNF- $\alpha$  <sup>122</sup>.

También se ha mostrado que el Bcl-3 y el I $\kappa$ BNS son inducidos después de la estimulación con LPS en células dendríticas regulatorias (rDC), las cuales producen altos niveles de IL-10 <sup>123</sup>.

En el laboratorio ya han sido generados ratones deficientes para I $\kappa$ BNS con el propósito de determinar el papel fisiológico de esta molécula, en quienes se demostró la inducción de genes de respuesta secundaria como IL-6 e IL 12p40, contraria a la inhibición en ratones deficientes de I $\kappa$ B $\zeta$  <sup>95</sup>.

Globalmente, I $\kappa$ B $\zeta$  promueve la inducción de genes de respuesta secundaria, mientras que el I $\kappa$ BNS inhibe esta inducción. Esto indica que tanto el I $\kappa$ B $\zeta$  como el I $\kappa$ BNS presentan funciones antagónicas en el contexto de respuesta a TLR's.

Resultados aún más recientes muestran que a diferencia de los macrófagos deficientes de I $\kappa$ BNS, los timocitos deficientes de I $\kappa$ BNS producen menos IL-2 y exhiben problemas en su proliferación al estimularse vía TCR <sup>121</sup>. Este resultado muestra que el I $\kappa$ BNS puede ser un regulador positivo del NF- $\kappa$ B involucrado en la producción de IL-2 en timocitos.

Todos estos resultados sugieren que es preferentemente el tipo celular el que determina el tipo de expresión del IκBNS (al igual que en el IκBζ), estableciendo la función positiva o negativa de las proteínas IκB en la regulación de la expresión de genes dependientes del NF-κB.

#### **7.10.1.4 IκBη**

Se ha identificado una nueva proteína estructuralmente relacionada con IκBα a la que se ha nombrado como IκBη. Este IκB, al igual que el Bcl-3, el IκBζ y el IκBNS no regula la translocación nuclear del NF-κB pero sí regula la transcripción de un cierto panel de genes pro-inflamatorios durante la respuesta inmune innata a través de la unión a DNA del complejo IκBη- NF-κB <sup>124</sup>.

Así pues, globalmente, este factor transcripcional puede ser regulado negativamente por su asociación a los IκBs clásicos (IκBα, IκBβ, IκBε, p100 y p102) así como su asociación a los IκB no clásicos (Bcl-3, IκBζ, IκBNS e IκBη). En este sentido se ha observado que la expresión de los IκBs no clásicos como el Bcl-3 y el IκBNS muestra un patrón tejido-dependiente. Se ha demostrado que la IL-10 puede inducir la expresión de IκBs no clásicos como el IκBNS y Bcl-3 <sup>95 122</sup>. Se ha identificado que el IκBNS interacciona con la molécula p65 del NF-κB en el promotor de la IL-6 y que el Bcl-3 interacciona con la molécula p50 del mismo factor de transcripción en el promotor de TNF-α <sup>125</sup> en otras palabras el IκBNS regula negativamente la producción de IL-6 no así la del TNF-α.

El efecto anti-inflamatorio de la IL-10 sobre la membrana corioamniótica ya ha sido estudiado. Los explantes de tejido de la membrana corioamniótica tratados con

LPS expresan altos niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, así como de las metaloproteinasas 2 y 9, pero la expresión de estas proteínas es reducida de una forma dosis dependiente cuando los explantes son tratados con LPS e IL-10<sup>60,61,64,126</sup>. A la fecha no existe reporte de la participación de ninguno de los I $\kappa$ Bs no clásicos en la regulación de la producción del TNF- $\alpha$  o IL-6 en las células de membrana corioamniótica o en algún tejido gestacional.

### **7.11 Activación del NF- $\kappa$ B en asociación con el trabajo de parto**

En el amnios, la producción de IL-1 $\beta$  basal e inducida por la actividad de NF- $\kappa$ B, está dada por la acción del heterodímero p50/p65, así como de los homodímeros de p50 y p65<sup>127</sup>. También se ha demostrado que la actividad basal de unión a DNA y la actividad transcripcional del NF- $\kappa$ B incrementa en células del amnios una vez iniciado el trabajo de parto normal o espontáneo<sup>128</sup>. Estos hallazgos sugieren que el NF- $\kappa$ B juega un papel clave en el inicio del parto en el amnios.

En modelos murinos se ha establecido un papel crucial para el NF- $\kappa$ B en el inicio del parto. En este modelo se ha establecido que la translocación nuclear de la subunidades p50 y p65 en el útero de ratones gestantes se incrementa en función de la aproximación del término del embarazo. Ratones inyectados intra-amnioticamente con un péptido inhibidor del NF- $\kappa$ B (SN50), mostraron un retardo en el inicio del trabajo de parto, mientras que los ratones controles inyectados con el péptido SN50mut inactivo llegaron a término normal<sup>129</sup>.

## 8 JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los estudios en la inmunología del embarazo se han enfocado al análisis de la participación de la inmunidad adaptativa para conocer cómo es que la madre y el feto regulan su ambiente para favorecer el buen término del embarazo. Se ha descrito que el nicho materno no es un sitio inmuno-privilegiado, ya que el útero es capaz de rechazar implantes alogénicos, al igual que el embrión es rechazado cuando es implantado en tejido materno no uterino, sin embargo el feto es aceptado por la madre durante un embarazo normal. Durante el embarazo se ha establecido que el perfil de citocinas presentes durante la implantación es preferentemente tipo Th1 y cambia a un perfil Th2 para favorecer el desarrollo del feto hasta el inicio del parto donde se revierte de nuevo a un ambiente pro-inflamatorio Th1 el cual se asocia clásicamente con la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B. Esto implica que desde la implantación hasta el inicio del trabajo de parto existe un alto grado de regulación sobre el NF- $\kappa$ B en la producción de citocinas del tipo Th-1. A su vez se ha demostrado que el tejido embrionario es el encargado de inmuno-suprimir localmente los elementos inmunológicos de la madre, dado principalmente por la presencia de IL-10, la cual se ha establecido, puede inducir la expresión de reguladores no clásicos del NF- $\kappa$ B en macrófagos de lámina colónica. Por lo anterior y dado que se ha descrito poco acerca de la inmunidad innata y como es que se regula la producción de citocinas pro-inflamatorias en el embarazo, en este trabajo se pretende estudiar la participación del I $\kappa$ BNS en la regulación del NF- $\kappa$ B en el mantenimiento del ambiente anti-inflamatorio el cual es necesario para el desarrollo del embarazo.

## 9 HIPÓTESIS

La expresión del regulador nuclear del NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ BNS, se inducirá en presencia de un ambiente anti-inflamatorio dado por IL-10 en los cultivos primarios de membrana corioamniótica de rata (CPMCAr).

## **10 OBJETIVOS**

### **10.1 Objetivo general**

Determinar el perfil de expresión de la molécula I $\kappa$ BNS, reguladora del NF- $\kappa$ B, en cultivos primarios de membrana corioamniótica de rata (CPMCAr) bajo un ambiente pro-inflamatorio en presencia de LPS, y en un ambiente anti-inflamatorio en presencia de IL-10.

### **10.2 Objetivos específicos**

- Obtener cultivos primarios de células de la membrana corioamniótica.
- Establecer la estirpe celular de los CPMCAr.
- Retar con LPS los CPMCAr y analizar los perfiles de expresión del I $\kappa$ BNS e IL-6 mediante PCR en tiempo real.
- Determinar el papel de la IL-10 sobre la expresión de I $\kappa$ BNS y de la citocina IL-6 en los CPMCAr en presencia o ausencia de LPS.

## **11 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **11.1 Manejo de animales.**

Para la obtención de los cultivos primarios de membrana corioamniótica CPMCAr se emplearon 3 ratas Wistar hembra (*Rattus norvegicus*) en edad reproductiva. Los animales fueron colocados en cajas estándar a 22°C, bajo un ciclo de luz de 12h por 12h. La ingesta de alimento y de agua se administró *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité ético de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Cada mañana entre las 8:00 y las 9:00 am las se colectaron secreciones vaginales con pipetas de plástico conteniendo 100 µL de solución salina (NaCl 0.9%) insertando la punta dentro de la vagina de la rata. El fluido vaginal se colocó en porta objetos de vidrio y se observó al microscopio invertido de luz visible. Mediante la prevalencia de los diferentes tipos celulares se determinó la fase del ciclo estral, con lo que se determinaba si la rata era más propensa a quedar preñada <sup>130,131</sup>. Si la rata se encontraba en la fase de proestro o estro se procedía a colocar a la hembra con el macho durante 12h por la noche. A la mañana siguiente se llevaba a cabo otro lavado vaginal para determinar la presencia de espermatozoides en el flujo, lo que significaba que había habido cópula y se consideraba como tiempo de 0.5 días post coito (dpc).

### **11.2 Obtención de los cultivos primarios de la membrana corioamniótica.**

Los CPMCAr se obtuvieron a partir del sacrificio de ratas preñadas a los 19 dpc. Las membranas se separaron de la placenta y posteriormente se disgregaron mecánicamente. Se digirieron enzimáticamente empleando 0.6 U de dispasa (Gibco) y 80 U de colagenasa (Gibco) disueltas en DPBS por 1 hora a 37°C en agitación. El

sobrenadante con el tejido disgregado se centrifugó a 1500 rpm por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Las células obtenidas por disgregación enzimática fueron colectadas por centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos y lavadas dos veces con DMEM (Invitrogen). Las células fueron resuspendidas a una concentración de 150 000 a 175 000 células/mL y cultivadas en botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con 5 mL de DMEM con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), 4 mg/L de gentamicina y 50 U de fungizona. Se permitió la adhesión de las células por 24 h y el medio fue cambiado por medio fresco suplementado al 10% de SFB (Gibco) cada 3<sup>er</sup> día.

### **11.3 Caracterización de los CPMCAr**

La caracterización de los CPMCAr se realizó mediante inmunohistoquímica. Los CPMCAr crecidos en placas de 12 pozos a un 90% de confluencia se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 5 min y expuestas a una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% durante 15 min con el propósito de bloquear la actividad de la peroxidasa endógena; posteriormente, los CPMCAr fueron lavados con PBS 1X e incubados durante una hora con albúmina sérica bovina al 3%. Se lavaron nuevamente los CPMCAr y se incubaron durante 1.5 h con un anticuerpo primario monoclonal de ratón  $\alpha$ -vimentina o  $\alpha$ -citoqueratina (Dako). Se lavó de nuevo a los CPMCAr y se incubaron durante 1 h con un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón peroxidado. Finalmente los CPMCAr se lavaron por última vez y se reveló con una solución de diaminobencidina al 0.1% contratiñendo con GIEMSA.

#### **11.4 Tratamiento de los CPMCAr con LPS (perfil pro-inflamatorio).**

Una vez que las células alcanzaron el 90% de confluencia en placas de 6 pozos, se cultivaron por 24 horas en medio DMEM sin suplementos. Pasado este tiempo se colocó el medio de cultivo con LPS (Sigma Aldrich) a 100 ng/mL durante 2, 4, 6 y 8 horas para el ensayo dependiente del tiempo de estímulo, y a 1, 10 o 100 ng/mL durante 4 h para el ensayo dependiente de la dosis de LPS. Al término de las cinéticas se extrajo el RNA y se procedió al análisis de la expresión de los genes de interés ( $I\kappa$ BNS e IL-6) y el gen endógeno (PGK) mediante PCR en tiempo real.

#### **11.5 Tratamiento de los CPMCAr con IL-10 (perfil anti-inflamatorio).**

Al igual que en el caso anterior una vez que las células alcanzaron una confluencia del 90% en placas de 6 pozos, el medio fue removido y cambiado por medio DMEM fresco sin suplemento y se cultivaron por 24 h más. Una vez transcurrido este tiempo se les adicionó a los cultivos medio DMEM fresco sin suplemento para los pozos control o con IL-10 (Invitrogen) a 1, 10, 100 ng/mL. Posteriormente, a las 14 h de estímulo con IL-10 se les adicionó a los cultivos LPS a 100 ng/mL por 4 h más. Al término de la cinética se extrajo el RNA y se procedió al análisis de la expresión de los genes de interés ( $I\kappa$ BNS e IL-6) y el gen endógeno (PGK) mediante PCR en tiempo real.

#### **11.6 Obtención de RNA y PCR en tiempo real.**

Una vez tratados los CPMCAr se llevó a cabo la extracción del RNA total empleando el reactivo de TRizol (Gibco). Para la transcripción reversa, se empleó RNA total (2 $\mu$ g) y 0.5  $\mu$ g de oligo-(dT)<sub>15-18</sub> (Invitrogen) los cuales se desnaturalizaron por

10 min a 70°C y se adiciono a una concentración de 1X buffer, 0.5 mM de DTT, 500 µM de cada uno de los dNTPS y 200U de transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen). La reacción de retrotranscripción se sometió durante 1 h a 41°C y una inactivación final de la enzima por 15 min a 70°C. Una vez obtenido el cDNA correspondiente se realizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) empleando el super mix FastStart TaqMan® Probe Master 1X, 25nM de cada una de las pruebas específicas (Universal Probe Library, Roche) para los genes PGK, IL-6 e IκBNS (Tabla 3), 900 nM del iniciador sentido y 900 nM del iniciador anti sentido y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 20 µL por reacción. Las condiciones óptimas para los tres genes fueron: 2 min a 50°C, 10 min 95°C, 40 ciclos a 95°C 40s, 60°C 45s y 72°C 40s. Para la detección se empleó el equipo Linegene K (BIOER). El análisis de la expresión de los genes se llevó a cabo mediante el método  $\Delta\Delta Ct$ , normalizando con el gen endógeno fosfoglicerato cinasa (PGK) y se reporta como el cambio en la expresión del gen problema (IL-6 o IκBNS) respecto al control sin estímulo (SE) <sup>132</sup>.

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct_{G.I. \text{ CtrSE}} - Ct_{G.E. \text{ CtrSE}}) - (Ct_{G.I. \text{ EST}} - Ct_{G.E. \text{ EST}})]$$

Donde:

Ct = Ciclo en el cual la señal de fluorescencia del aplicado es mayor a la señal de fluorescencia basal (Treshold)

Ct<sub>G.I.CtrSE</sub> = Ct del gen de interes (IL-6 o IκBNS) del control sin estímulo.

Ct<sub>G.E.CtrSE</sub> = Ct del gen endógeno (PGK) del control sin estímulo.

Ct<sub>G.I. EST</sub> = Ct del gen de interes (IL-6 o IκBNS) del estímulo.

Ct<sub>G.E. EST</sub> = Ct del gen endógeno (PGK) del estímulo.

Finalmente:

$$\text{El Cambio en la expresión del gen problema} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

**Tabla 3. Sondas y cebadores empleados.**

Gen	# de prueba		Iniciadores empleados 5'-3'
	Empleada (Roche-UPL)	Secuencia 5'-3'	
PGK	66	ggctgctg	Fwd - ccagataacgaataaccaaagga Rev - gacttggctccattgtcca
IκBNS	20	ccagccag	Fwd - cccttcaggaacagctatgaa Rev - acaacatcagtcccaagaagg
IL-6	82	ctcctctg	Fwd - ggggtaccgggacacttc Rev - aggcaggaagtgagtatgg

### 11.7 Análisis estadístico.

Los datos se expresaron como la media del cambio en la expresión del gen problema respecto al control  $\pm$  la desviación estándar (DS) de tres experimentos independientes, n = 3.

Los resultados fueron analizados utilizando la prueba estadística de ANOVA de análisis de varianza de una cola seguido de una prueba de Tukey en el programa estadístico GraphPad Prism 5.

## **12 RESULTADOS**

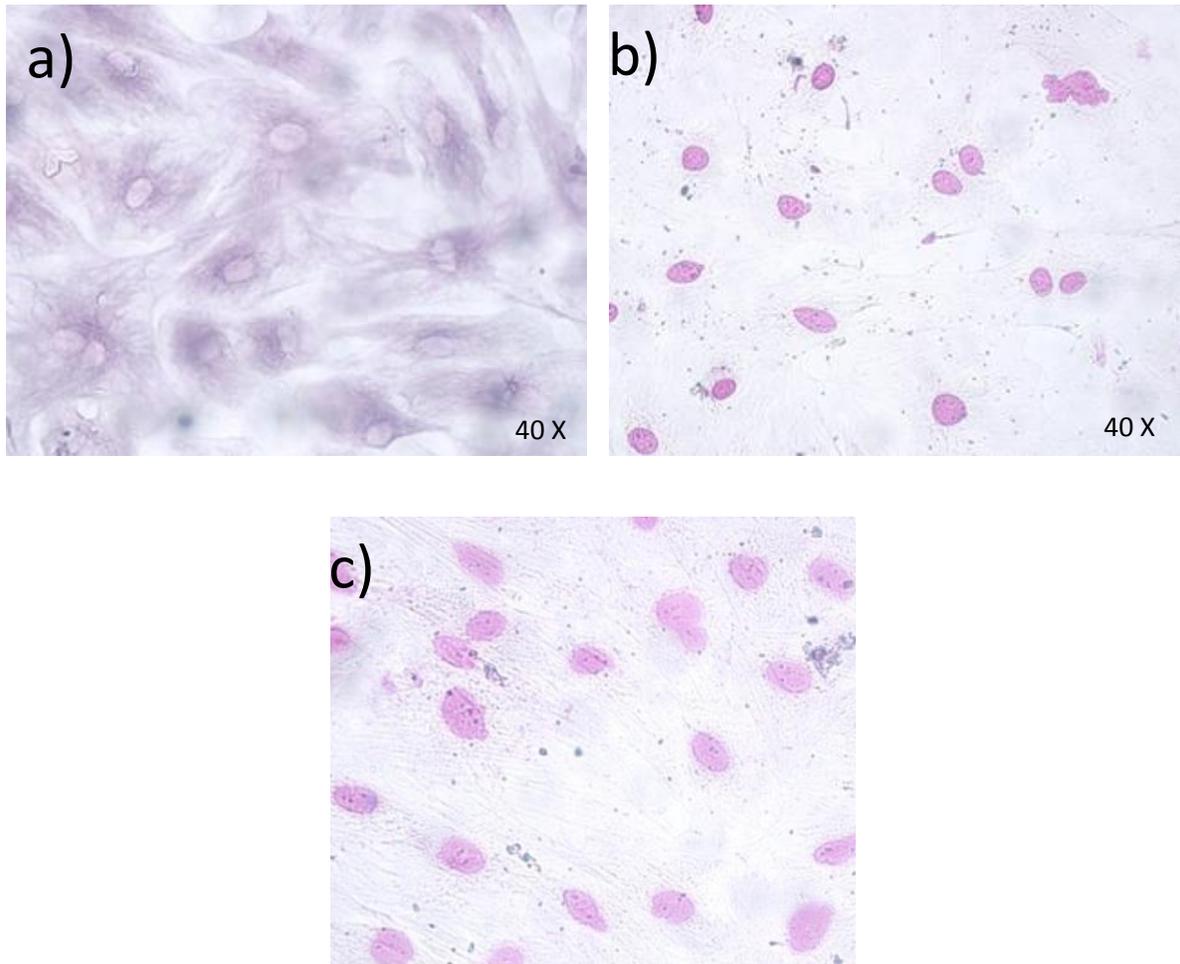
### **12.1 Caracterización de los CPMCAr**

Una vez obtenidos los cultivos primarios de membrana corioamniótica de rata (CPMCAr) a partir de ratas hembra a los 19 dpc, se procedió a identificar el origen troncal de las células obtenidas. La examinación morfológica de las células mostró una forma irregular, alargadas y extendidas. La tinción inmunohistoquímica de las células obtenidas mostró que el 99% de ellas son positivas para vimentina, un marcador de células mesenquimales, y negativas a la tinción para citoqueratina el marcador de células epiteliales. Lo que demuestra que las células de los CPMCAr obtenidas mediante disgregación con dispasa y colagenasa tienen un origen mesenquimal. Para examinar la especificidad de la tinción de las células obtenidas de los CPMCAr respectivamente se trataron con PBS en lugar del anticuerpo primario anti-citoqueratina o anti-vimentina lo cual no mostró tinción evidente (Figura 9).

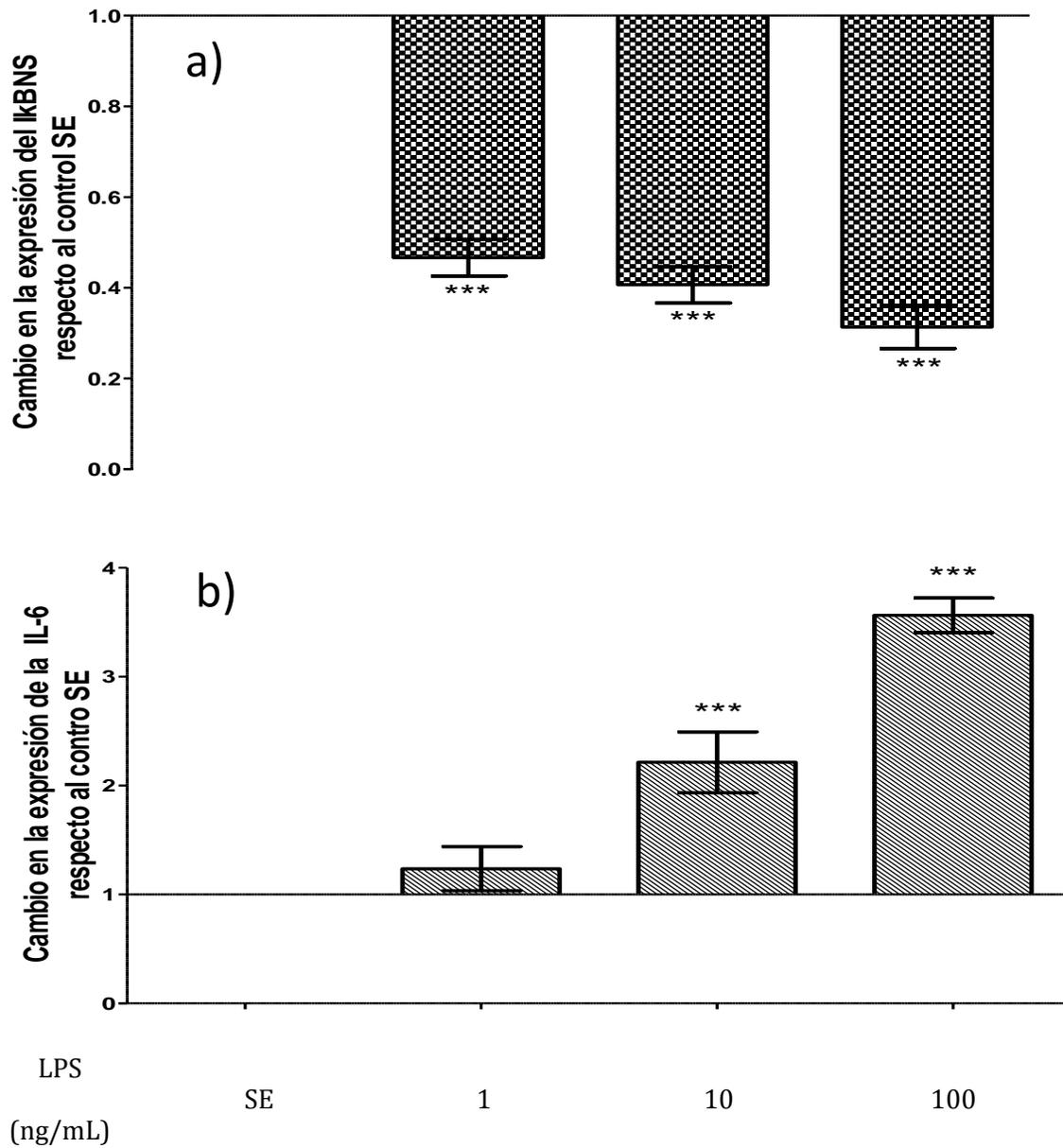
### **12.2 EL LPS inhibe la expresión del $\text{I}\kappa\text{BNS}$ en CPMCAr.**

Para analizar si el LPS induce la expresión del  $\text{I}\kappa\text{BNS}$ , se estimuló a los CPMCAr con diferentes dosis de LPS (1, 10, 100 ng/mL) durante 4 h. El análisis de la expresión de la IL-6 e  $\text{I}\kappa\text{BNS}$  se realizó empleando la técnica de qPCR. La expresión del  $\text{I}\kappa\text{BNS}$ , normalizada contra el gen endógeno PGK, fue inhibida bajo el reto de los CPMCAr con LPS, desde 1 ng/mL comparado con el control sin estímulo (SE) (Figura 10a). En paralelo el reto con LPS de los CPMCAr mostró un incremento en la expresión de IL-6, normalizada contra el gen endógeno PGK, dependiente de la dosis de LPS empleada en comparación con el control SE (Figura 10b). Se puede observar que la concentración de 100 ng/mL de LPS (la mayor dosis probada) se identificó como la

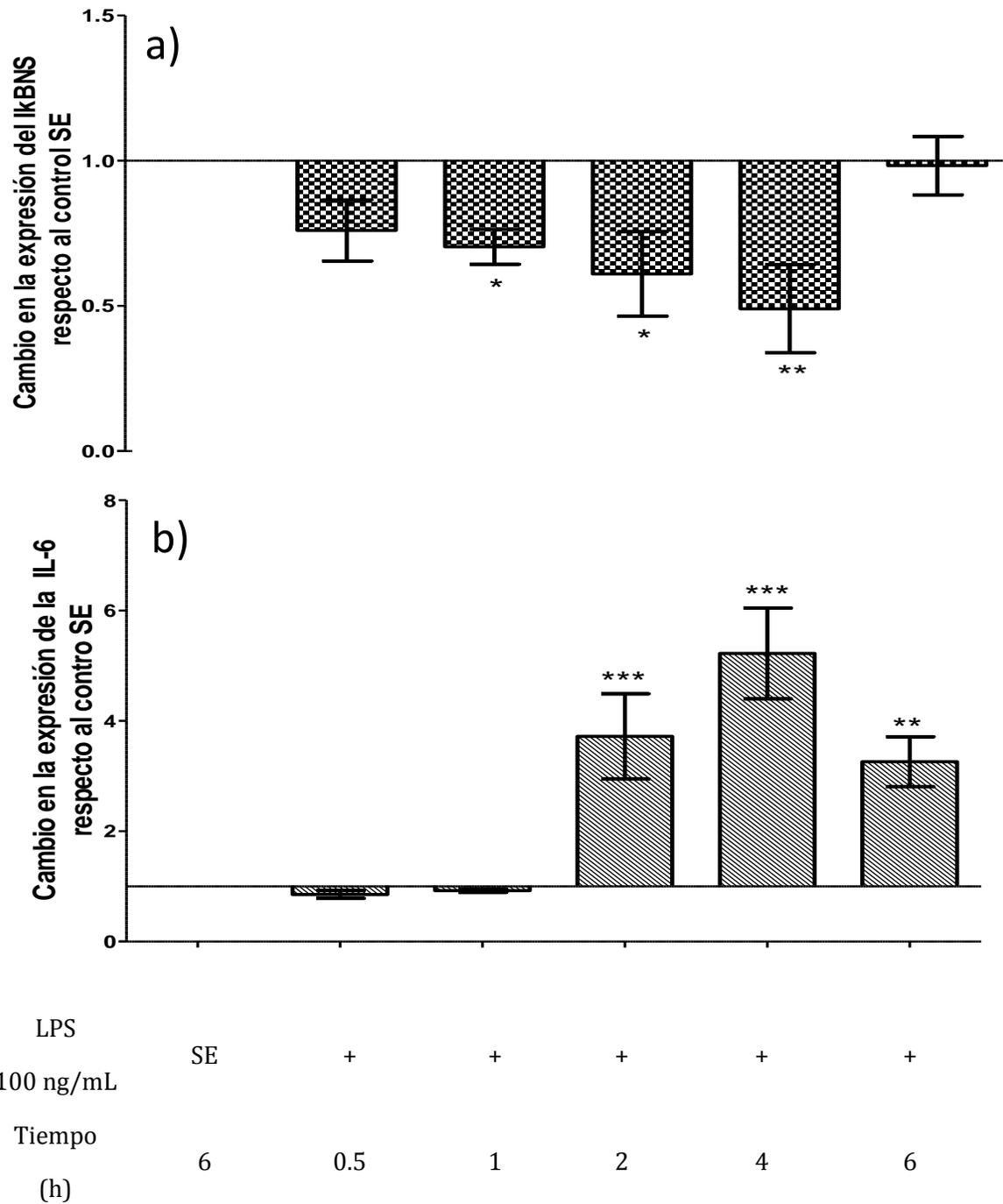
dosis más eficiente en la inducción de la expresión de IL-6 en los CPMCAr, así como la dosis en la que se observó un mayor efecto inhibitorio en la expresión del I $\kappa$ BNS.



**Figura 9. Caracterización de los CPMCAr por inmunohistoquímica.** Las células obtenidas de los CPMCAr fueron sometidos a una tinción por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos anti-vimentina (a) o anti-citoqueratina (b) o solo con PBS en lugar del anticuerpo primario específico (c). En todos los casos las tinciones fueron reveladas con un anticuerpo anti-IgG de ratón peroxidado empleando como sustrato diaminobencidina.



**Figura 10. El LPS inhibe la expresión del IκBNS e induce la expresión de la IL-6 en CPMCAr.** Los CPMCAr fueron estimulados con LPS (1, 10, 100 ng/mL) y se analizó el cambio en la expresión del regulador del NF-κB, IκBNS (a) y el de la citocina IL-6 (b) respecto al control sin estímulo SE. \*\*\* P<0.001, n=3 experimentos independientes.

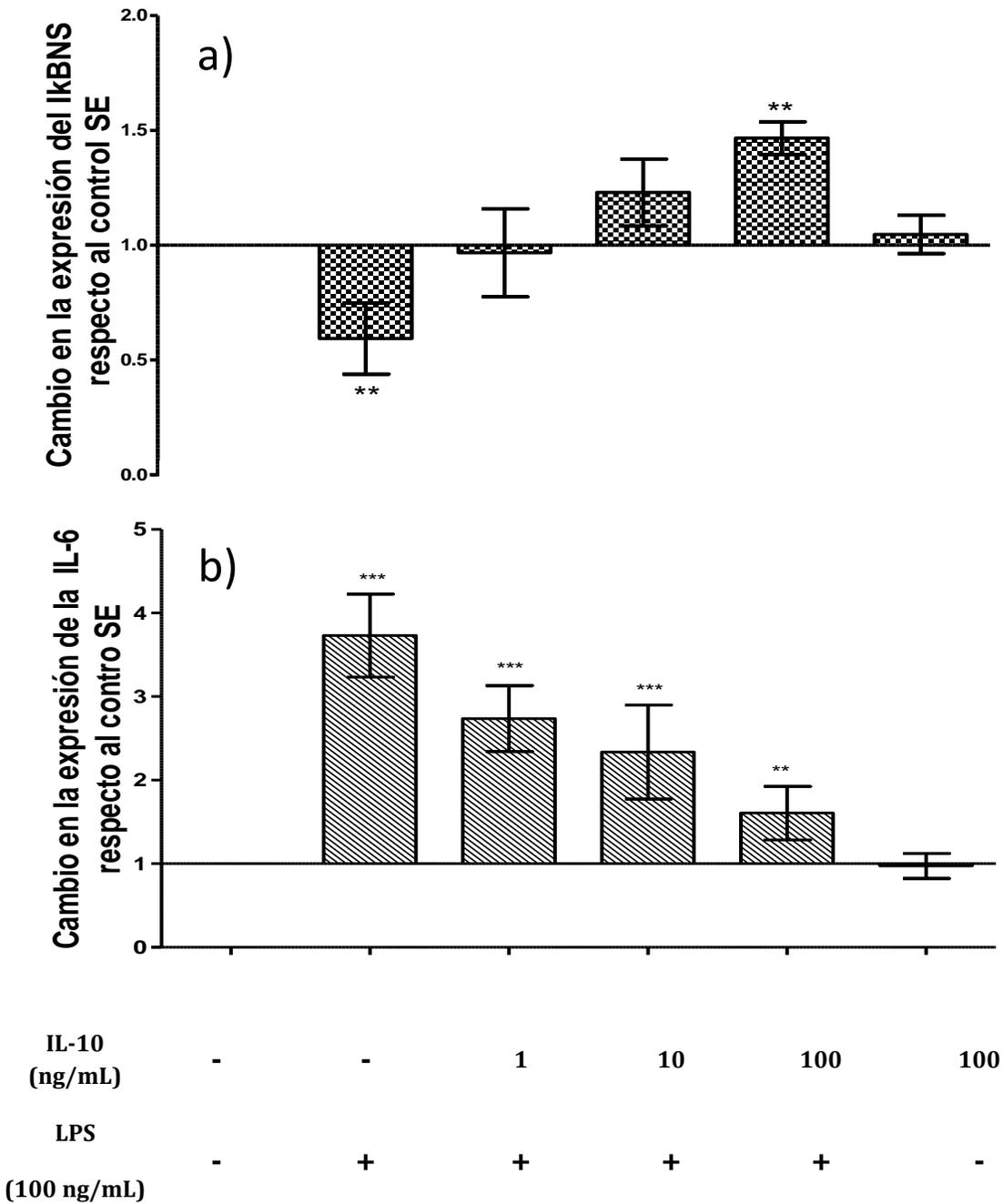


**Figura 11. EL LPS inhibe la expresión del IκBNS e induce la expresión de la IL-6 en CPMCar de una manera dependiente del tiempo de estímulo.** Los CPMCar fueron estimulados con LPS (1, 10, 100 ng/mL) y se analizó la expresión del IκBNS (a) y la citocina IL-6 (b) de la misma manera que en el experimento anterior. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs control (SE), n=3 experimentos independientes.

En paralelo se llevó a cabo la inducción de los CPMCAr con LPS (100 ng/mL) de una manera dependiente del tiempo del estímulo durante 0, 0.5, 1, 2, 4, y 6 h. Este tratamiento indujo la subexpresión del I $\kappa$ BNS en comparación con el control SE, hasta las 4 h, estabilizándose a las 6 h (Figura 11a). La expresión de IL-6 se observó incrementada a partir de las 2 h de tratamiento y tuvo un pico máximo de expresión a las 4h (Figura 11b). En conjunto ambos resultados indican que el LPS en CPMCAr reprime la expresión del I $\kappa$ BNS mientras induce la de la IL-6 de una manera dosis dependiente y tiempo dependiente.

### **12.3 La IL-10 induce la expresión del I $\kappa$ BNS en CPMCAr estimulados con LPS.**

Para probar el efecto de la IL-10 sobre los CPMCAr estimuladas con LPS, las células de los CPMCAr fueron crecidas en presencia de IL-10 (1, 10, 100 ng/mL) durante 14 h y posteriormente retadas con LPS a 100 ng/mL. La IL-10 mostró ser capaz de inducir la expresión del I $\kappa$ BNS únicamente en presencia conjunta con el reto con LPS, siendo la dosis de 100 ng/mL de IL-10 (la mayor dosis probada) la más efectiva en la inducción de la expresión del I $\kappa$ BNS en los CPMCAr (Figura 12a). La IL-10 a su vez tuvo un efecto inhibitor en la expresión de la IL-6 de una manera dosis dependiente (Figura 12b). Sin embargo, la presencia exclusiva en el cultivo de IL-10 al tiempo probado no indujo significativamente la expresión del I $\kappa$ BNS ni la inhibición de la expresión de la IL-6 en comparación con las células de los CPMCAr sin estímulo (SE).



**Figura 12. La IL-10 induce la expresión del IκBNS en CPMCAr estimulados con LPS.**

Los CPMCAr fueron estimulados con IL-10 (1, 10, 100 ng/mL) por 14 h y posteriormente se llevó a cabo el reto con LPS (100ng/mL) por 4 h. Finalmente se analizó el cambio en la expresión del regulador del NF-κB, IκBNS (a) y el de la citocina IL-6 (b) respecto al control sin estímulo SE. Los datos son reportados como la media ± DS del cambio en la expresión de los genes problema respecto al control sin estímulo (SE). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs control (SE), n=3 experimentos independientes.

## 13 DISCUSIÓN

De acuerdo con las estadísticas globales, la primera causa de mortalidad y morbilidad infantil es ocasionado por la inducción del trabajo de parto pretérmino. El inicio del trabajo de parto pretérmino induce un nacimiento prematuro, se le denomina así cuando, en el caso del humano, el producto nace antes de las 37, en lugar de las 40 semanas normales <sup>133</sup>. En porcentajes, el trabajo de parto pre término se traduce en aproximadamente el 6-10% de todos los embarazos a nivel mundial; lo cual ocasiona más del 75% del índice de morbilidad y mortalidad perinatal <sup>134</sup>. En números reales se calcula que anualmente en el mundo nace un estimado de 13 millones de infantes antes de las 37 semanas de gestación <sup>135</sup>, de los cuales 3 millones mueren como resultado de la inducción temprana del trabajo de parto <sup>136</sup>. Todos estos datos indican que se ha alcanzado un incremento del 20% en la incidencia del inicio del trabajo de parto pretérmino desde 1990 <sup>137</sup>. A pesar del progreso que se ha tenido en este campo del conocimiento, la falta de la identificación de los mecanismos que limitan y regulan el disparo del parto ha segregado la prevención el diagnóstico y el tratamiento del trabajo de parto prematuro como tópico de interés en salud pública.

En este trabajo se obtuvieron cultivos primarios de membrana corioamniótica de rata (CPMCAr) debido a que las membranas fetales se consideran uno de los tejidos clave en el desarrollo del embarazo normal así como en la patofisiología infecciosa o no infecciosa asociada al trabajo de parto pretérmino <sup>138,139</sup>. Estos CPMCAr resultaron positivos para vimentina y negativos para citoqueratina lo que indica que estas células tienen un origen mesenquimal lo que implica que se trabajó con fibroblastos de

membrana corioamniótica (Figura 9), dato relevante ya que se ha demostrado que puede existir un comportamiento diferencial frente a distintos estímulos en células de origen mesenquimal (+ vimentina, -citoqueratina) comparado con células de origen epitelial (-vimentina, + citoqueratina) en cultivos primarios de membranas fetales <sup>140</sup>.

Los CPMCAr obtenidos fueron capaces de inducir la expresión de la IL-6 frente al reto con LPS (Figuras 10b y 11b). En este sentido se entiende que las infecciones pueden participar en el disparo del inicio del trabajo de parto pretérmino <sup>141</sup>. La presencia de infecciones intrauterinas y en tejidos embrionarios, así como la liberación de lipopolisacarido (LPS) y otros productos bacterianos se asocian con la elevada concentración de citocinas que pueden ser detectadas en el fluido amniótico de embarazos con infecciones intrauterinas <sup>142,143</sup>. Adicionalmente se ha establecido con anterioridad que la inoculación de LPS vía intrauterina en modelos de rata induce el pre término del embarazo <sup>144</sup>. Nuestros resultados corroboran el hecho de que las células provenientes del corion y el amnios son capaces de sintetizar y liberar mediadores inflamatorios, dentro de los que se encuentran las citocina IL-6 <sup>145-147</sup>. Además, la IL-6 es una de las citocinas más abundantes en el fluido amniótico <sup>148</sup> y uno de los marcadores pro-inflamatorios que se incrementan hacia el inicio del trabajo de parto normal o pretérmino <sup>149,150</sup>.

La clave para resolver el inconveniente que representan los nacimientos pretérmino debe recaer en la obtención de un mejor conocimiento de los procesos involucrados. Diferentes líneas experimentales soportan la hipótesis de que el índice de citocinas Th-1 (inflamatorias) con respecto a las citocinas Th-2 (anti-inflamatorias)

es crítico para el desarrollo normal del feto <sup>33,151</sup>. Al parecer cuando este cambio es anormal o no es correctamente regulado, puede iniciar e intensificar la cascada de producción de citocinas inflamatorias involucradas en el término adverso del embarazo <sup>152</sup>.

El NF- $\kappa$ B es un factor transcripcional canónicamente asociado a la inducción de la expresión de genes inflamatorios <sup>153</sup>. La mayoría de las funciones de este factor transcripcional son completamente dependientes de la activación de los complejos de cinasas citoplasmáticas IKK, lo cual lleva a la degradación de los I $\kappa$ Bs clásicos y como consecuencia se translocan dímeros específicos del NF- $\kappa$ B hacia el núcleo, los cuales en general actúan como factores transcripcionales. Sin embargo a pesar de este bien establecido mecanismo de acción, diferentes publicaciones han demostrado que algunos miembros de esta vía metabólica tienen funciones adicionales en el núcleo como reguladores de la expresión de genes dependientes del NF- $\kappa$ B <sup>154</sup>. En el presente trabajo el reto de los CPMCAr con LPS suprimió la expresión basal del I $\kappa$ BNS, mientras que indujo la expresión de IL-6 (Figuras 10 y 11). El I $\kappa$ BNS es un regulador no convencional del NF- $\kappa$ B, el cual modula negativamente la expresión de genes dependientes del NF- $\kappa$ B y más específicamente la expresión de la IL-6 <sup>122</sup>.

En la vía de señalización del TLR-4, la vía dependiente de TRIF es responsable de la inducción de IFN- $\beta$  y de genes inducidos por IFN a través de IRF-3, mientras la vía dependiente de MyD88 media la inducción de diferentes genes dependientes del NF- $\kappa$ B <sup>155</sup>. Un estudio con ratones carentes de I $\kappa$ B $\zeta$ , otro miembro de la familia de I $\kappa$ Bs nucleares, ha demostrado que los genes dependientes de MyD88 se dividen al menos

en dos tipos; uno inducido tempranamente e independiente de I $\kappa$ B $\zeta$  y un segundo grupo el cual es inducido tardíamente y es dependiente de I $\kappa$ B $\zeta$  <sup>114</sup>. La expresión del gen de la IL-6 es considerado de respuesta tardia. El I $\kappa$ B $\zeta$  regula positivamente a la IL-6 en macrófagos I $\kappa$ BNS<sup>-/-</sup>. Por tanto el I $\kappa$ BNS tiene funciones opuestas al I $\kappa$ B $\zeta$ . En nuestro sistema fuimos capaces de determinar que la expresión del I $\kappa$ BNS es inhibida por el reto con LPS a nivel de mensajero, sin embargo se requiere ampliar el estudio para determinar si el I $\kappa$ B $\zeta$  puede funcionar como co-activador en la inducción de la expresión de la IL-6 en los CPMCAr obtenidos, fenómeno que también logramos observar. Esto implica que para la producción de IL-6 en los CPMCAr se requiere la subexpresión del I $\kappa$ BNS y deja abierta la posibilidad de que en estas mismas células la inducción de la expresión de IL-6 dada por el reto con LPS requiera de la presencia de I $\kappa$ B $\zeta$  como co-activador transcripcional.

La IL-10 fue originalmente descrita como un factor producido por las células T cooperadoras de clase 2, la cual suprimía la producción de las citocinas inflamatorias así como la proliferación de las células cooperadoras de clase 1 <sup>156</sup>. Diferentes reportes han demostrado que la IL-10 puede ser producida por diferentes tejidos gestacionales <sup>47,157,158</sup>.

En modelos de rata la IL-10 se muestra efectiva en la prevención del nacimiento prematuro, la pérdida fetal y bajo peso al nacer, todos consecuencia del disparo temprano del trabajo de parto debido a la inoculación intrauterina de LPS <sup>159,160</sup>.

Continuando en la tónica del paradigma Th1/Th2 y la regulación de la producción de citocinas inflamatorias, durante el desarrollo del embarazo, se ha identificado que el  $\kappa$ B nuclear  $\kappa$ BNS regulador negativo del NF- $\kappa$ B, puede ser inducido por la presencia de la citocina IL-10 en el micro ambiente celular <sup>122</sup>. Algunos trabajos ya han reportado que la IL-10 inhibe la expresión de la IL-6 en células obtenidas a partir de las membranas corioamnióticas estimuladas con LPS <sup>61</sup> y que además este efecto solo se logra ver cuando se estimula a estas células conjuntamente con IL-10 y LPS, lo cual explicaría por qué en nuestros hallazgos no fuimos capaces de identificar la inhibición en la expresión basal de la IL-6 o el aumento de la expresión del  $\kappa$ BNS en los CPMCAr cuando eran estimulados únicamente con IL-10. Sin embargo se encontró que la IL-10 induce la expresión del  $\kappa$ BNS cuando a su vez se reata también con LPS a los CPMCAr (Figura 12). Esto debe implicar que para que se lleve a cabo la inducción en la expresión del regulador  $\kappa$ BNS en estos cultivos primarios, se requiere de algún elemento en la vía de señalización, en nuestro caso probablemente del TLR-4.

Todos los hallazgos presentados en este trabajo enmarcan un panorama novedoso al respecto de los  $\kappa$ Bs no clásicos en los tejidos gestacionales, los cuales muy probablemente rigen el programa de regulación de la producción de citocinas en el embarazo.

Finalmente un reporte reciente sugiere que en un modelo *in vitro* el Bcl-3 (un  $\kappa$ B no clásico) inducido por la IL-10 es capaz de reducir la actividad del  $\kappa$ B $\zeta$  inducida por el LPS, inactivando al factor transcripcional- $\kappa$ B, lo cual merma la capacidad del

I $\kappa$ B $\zeta$  para promover la producción de la IL-6 inducida por el LPS <sup>161</sup>. En analogía con nuestro sistema, es muy probable que en estos CPMCAr el I $\kappa$ B $\zeta$  sea requerido como un co-activador transcripcional en la producción de la IL-6 inducida por el reto con LPS, lo que en paralelo induce la subexpresión del I $\kappa$ BNS (observado en este trabajo). Además, el estímulo de estas células con IL-10 mostro ser capaz de inducir al I $\kappa$ BNS frente al reto con LPS, lo que probablemente sugiere implica la inhibición del I $\kappa$ B $\zeta$ . Sin embargo esto es solo una sugerencia que debe, evidentemente, ser comprobada.

## 14 CONCLUSIONES

En conclusión, los CPMCAr obtenidos en este trabajo a partir de la digestión enzimática con colagenasa y dispasa, muestran un origen mesenquimal, es decir son fibroblastos de membrana corioamniótica. Estas células muestran una represión en la expresión del I $\kappa$ BNS al ser retadas con LPS. Mientras que la estimulación con IL-10 y posterior reto con LPS muestra un efecto inductor sobre la expresión del I $\kappa$ BNS, siendo finalmente la expresión de este regulador no canónico del NF- $\kappa$ B la que probablemente limita la producción de IL-6 ya antes reportada en este tipo de cultivos.

## 15 BIBLIOGRAFÍA

1. Serour, G.I. Ethical guidelines on conscientious objection: FIGO Committee for the Ethical Aspects of Human Reproduction and Women's Health. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* **92**, 333-334 (2006).
2. Alberts, B., Wilson, J.H. & Hunt, T. *Molecular biology of the cell*, (Garland Science, New York, 2008).
3. Wang, H. & Dey, S.K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* **7**, 185-199 (2006).
4. Hunt, J.S. Stranger in a strange land. *Immunol Rev* **213**, 36-47 (2006).
5. Haig, D. Genetic conflicts in human pregnancy. *The Quarterly review of biology* **68**, 495-532 (1993).
6. Kearns, M. & Lala, P.K. Life history of decidual cells: a review. *Am J Reprod Immunol* **3**, 78-82 (1983).
7. Kliman, H.J. Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. *Am J Pathol* **157**, 1759-1768 (2000).
8. Hunt, J.S., Petroff, M.G., McIntire, R.H. & Ober, C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J* **19**, 681-693 (2005).
9. Moffett, A. & Loke, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* **6**, 584-594 (2006).
10. Parry, S. & Strauss, J.F., 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* **338**, 663-670 (1998).
11. Niknejad, H., *et al.* Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater* **15**, 88-99 (2008).
12. Uchide, N., Ohyama, K., Bessho, T. & Toyoda, H. Induction of pro-inflammatory cytokine gene expression and apoptosis in human chorion cells of fetal membranes by influenza virus infection: possible implications for maintenance and interruption of pregnancy during infection. *Med Sci Monit* **11**, RA7-16 (2005).
13. Strominger, J.L. Human decidual lymphocytes and the immunobiology of pregnancy. *J Reprod Immunol* **62**, 17-18 (2004).
14. Billingham, R.E., Brent, L. & Medawar, P.B. Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. *Nature* **172**, 603-606 (1953).
15. Medawar, P.B. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol*, 320-338 (1953).
16. Chaouat, G., Kolb, J.P. & Wegmann, T.G. The murine placenta as an immunological barrier between the mother and the fetus. *Immunol Rev* **75**, 31-60 (1983).
17. Hunt, J.S., Fishback, J.L., Andrews, G.K. & Wood, G.W. Expression of class I HLA genes by trophoblast cells. Analysis by in situ hybridization. *J Immunol* **140**, 1293-1299 (1988).
18. Zuckermann, F.A. & Head, J.R. Expression of MHC antigens on murine trophoblast and their modulation by interferon. *J Immunol* **137**, 846-853 (1986).
19. Chatterjee-Hasrouni, S. & Lala, P.K. MHC antigens on mouse trophoblast cells: paucity of Ia antigens despite the presence of H-2K and D. *J Immunol* **127**, 2070-2073 (1981).

20. Bonney, E.A. & Matzinger, P. The maternal immune system's interaction with circulating fetal cells. *J Immunol* **158**, 40-47 (1997).
21. Piotrowski, P. & Croy, B.A. Maternal cells are widely distributed in murine fetuses in utero. *Biology of Reproduction* **54**, 1103-1110 (1996).
22. Clark, D.A. Controversies in reproductive immunology. *Crit Rev Immunol* **11**, 215-247 (1991).
23. Kauma, S.W., Huff, T.F., Hayes, N. & Nilkaeo, A. Placental Fas Ligand Expression Is a Mechanism for Maternal Immune Tolerance to the Fetus. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 2188-2194 (1999).
24. Hunt, J.S., Vassmer, D., Ferguson, T.A. & Miller, L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol* **158**, 4122-4128 (1997).
25. Soares, M.P., *et al.* Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* **4**, 1073-1077 (1998).
26. Araujo, J.A., *et al.* Systemic rather than local heme oxygenase-1 overexpression improves cardiac allograft outcomes in a new transgenic mouse. *J Immunol* **171**, 1572-1580 (2003).
27. Zenclussen, A.C., *et al.* Heme oxygenase as a therapeutic target in immunological pregnancy complications. *Int Immunopharmacol* **5**, 41-51 (2005).
28. Zenclussen, A.C., *et al.* Heme oxygenases in pregnancy II: HO-2 is downregulated in human pathologic pregnancies. *Am J Reprod Immunol* **50**, 66-76 (2003).
29. Waldmann, H., *et al.* Regulatory T cells in transplantation. *Semin Immunol* **18**, 111-119 (2006).
30. Zenclussen, A.C., *et al.* Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol* **166**, 811-822 (2005).
31. Zenclussen, A.C., *et al.* Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol* **36**, 82-94 (2006).
32. Somerset, D.A., Zheng, Y., Kilby, M.D., Sansom, D.M. & Drayson, M.T. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* **112**, 38-43 (2004).
33. Blois, S.M., *et al.* A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* **13**, 1450-1457 (2007).
34. Toscano, M.A., *et al.* Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* **8**, 825-834 (2007).
35. Rabinovich, G.A. & Toscano, M.A. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol* **9**, 338-352 (2009).
36. Chaouat, G. Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy. *Clin Exp Immunol* **131**, 393-395 (2003).
37. Zenclussen, A.C., *et al.* Questioning the Th1/Th2 paradigm in reproduction: peripheral levels of IL-12 are down-regulated in miscarriage patients. *Am J Reprod Immunol* **48**, 245-251 (2002).
38. Svensson, L., Arvola, M., Sallstrom, M.A., Holmdahl, R. & Mattsson, R. The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol* **51**, 3-7 (2001).
39. Koch, C.A. & Platt, J.L. Natural mechanisms for evading graft rejection: the fetus as an allograft. *Springer Semin Immunopathol* **25**, 95-117 (2003).
40. Ragusa, A., *et al.* Progesterone supplement in pregnancy: an immunologic therapy? *Lupus* **13**, 639-642 (2004).

41. Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L. & Mosmann, T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* **14**, 353-356 (1993).
42. Hiby, S.E., *et al.* Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* **200**, 957-965 (2004).
43. Phillips, T.A., *et al.* TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J Immunol* **162**, 6053-6059 (1999).
44. Mosmann, T.R. & Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* **17**, 138-146 (1996).
45. Guilbert, L., Robertson, S.A. & Wegmann, T.G. The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network. *Immunol Cell Biol* **71 ( Pt 1)**, 49-57 (1993).
46. Robertson, S.A., Seemark, R.F., Guilbert, L.J. & Wegmann, T.G. The role of cytokines in gestation. *Crit Rev Immunol* **14**, 239-292 (1994).
47. Bennett, W.A., *et al.* Cytokine expression by first-trimester human chorionic villi. *Am J Reprod Immunol* **40**, 309-318 (1998).
48. Clark, D.A., Arck, P.C. & Chaouat, G. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol* **41**, 5-22 (1999).
49. Zenclussen, A.C., *et al.* Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the fetomaternal interface. *Cytokine* **24**, 150-160 (2003).
50. Raghupathy, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* **13**, 219-227 (2001).
51. Bhatt, H., Brunet, L.J. & Stewart, C.L. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11408-11412 (1991).
52. Fest, S., *et al.* Stress and substance P but not the substance P-metabolite SP5-11 trigger murine abortion by augmenting TNF-alpha levels at the fetomaternal interface. *Scand J Immunol* **63**, 42-49 (2006).
53. Roth, I., *et al.* Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med* **184**, 539-548 (1996).
54. Katharine, D.W., *et al.* Elevated second-trimester amniotic fluid interleukin-6 levels predict preterm delivery. *American journal of obstetrics and gynecology* **178**, 546-550 (1998).
55. Chaouat, G., *et al.* IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J Immunol* **154**, 4261-4268 (1995).
56. Marzi, M., *et al.* Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clinical & Experimental Immunology* **106**, 127-133 (1996).
57. Keelan, J.A., Sato, T. & Mitchell, M.D. Interleukin (IL)-6 and IL-8 production by human amnion: regulation by cytokines, growth factors, glucocorticoids, phorbol esters, and bacterial lipopolysaccharide. *Biol Reprod* **57**, 1438-1444 (1997).
58. Uchida, N., *et al.* Differential mRNA expression of inflammatory cytokines in cultured human fetal membrane cells responding to influenza virus infection. *Biol Pharm Bull* **25**, 239-243 (2002).
59. Farina, L. & Winkelman, C. A review of the role of proinflammatory cytokines in labor and noninfectious preterm labor. *Biol Res Nurs* **6**, 230-238 (2005).

60. Fortunato, S.J., Menon, R. & Lombardi, S.J. The effect of transforming growth factor and interleukin-10 on interleukin-8 release by human amniochorion may regulate histologic chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* **179**, 794-799 (1998).
61. Fortunato, S.J., Menon, R., Swan, K.F. & Lombardi, S.J. Interleukin-10 inhibition of interleukin-6 in human amniochorionic membrane: transcriptional regulation. *Am J Obstet Gynecol* **175**, 1057-1065 (1996).
62. Sullivan, M.H., Alvi, S.A., Brown, N.L., Elder, M.G. & Bennett, P.R. The effects of a cytokine suppressive anti-inflammatory drug on the output of prostaglandin E(2) and interleukin-1 beta from human fetal membranes. *Mol Hum Reprod* **8**, 281-285 (2002).
63. Lappas, M., Permezel, M., Georgiou, H.M. & Rice, G.E. Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro. *Biol Reprod* **67**, 668-673 (2002).
64. Fortunato, S.J., Menon, R. & Lombardi, S.J. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta inhibit amniochorion tumor necrosis factor-alpha production by contrasting mechanisms of action: therapeutic implications in prematurity. *Am J Obstet Gynecol* **177**, 803-809 (1997).
65. Bethin, K.E., *et al.* Microarray analysis of uterine gene expression in mouse and human pregnancy. *Mol Endocrinol* **17**, 1454-1469 (2003).
66. Marvin, K.W., Keelan, J.A., Eykholt, R.L., Sato, T.A. & Mitchell, M.D. Use of cDNA arrays to generate differential expression profiles for inflammatory genes in human gestational membranes delivered at term and preterm. *Mol Hum Reprod* **8**, 399-408 (2002).
67. Maymon, E., *et al.* The tumor necrosis factor alpha and its soluble receptor profile in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* **181**, 1142-1148 (1999).
68. Romero, R., *et al.* Amniotic fluid interleukin-6 determinations are of diagnostic and prognostic value in preterm labor. *Am J Reprod Immunol* **30**, 167-183 (1993).
69. Olson, D.M. The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **17**, 717-730 (2003).
70. Lin, L., DeMartino, G.N. & Greene, W.C. Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell* **92**, 819-828 (1998).
71. Heusch, M., Lin, L., Geleziunas, R. & Greene, W.C. The generation of nfkb2 p52: mechanism and efficiency. *Oncogene* **18**, 6201-6208 (1999).
72. Gilmore, T.D. NF-kappa B, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell* **62**, 841-843 (1990).
73. Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D. & Miyamoto, S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & Development* **9**, 2723-2735 (1995).
74. Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **25**, 6706-6716 (2006).
75. Gilmore, T.D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684 (2006).
76. Huxford, T., Huang, D.B., Malek, S. & Ghosh, G. The crystal structure of the I kappa Balpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell* **95**, 759-770 (1998).
77. Baeuerle, P.A. & Baltimore, D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell* **53**, 211-217 (1988).
78. Thompson, J.E., Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Ghosh, S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* **80**, 573-582 (1995).

79. Baeuerle, P.A. & Baltimore, D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* **242**, 540-546 (1988).
80. Simeonidis, S., Liang, S., Chen, G. & Thanos, D. Cloning and functional characterization of mouse I kappa B epsilon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14372-14377 (1997).
81. Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R. & Israel, A. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *EMBO J* **16**, 1413-1426 (1997).
82. Inoue, J., *et al.* Direct association of pp40/I kappa B beta with rel/NF-kappa B transcription factors: role of ankyrin repeats in the inhibition of DNA binding activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4333-4337 (1992).
83. Gilmore, T.D. & Morin, P.J. The I kappa B proteins: members of a multifunctional family. *Trends Genet* **9**, 427-433 (1993).
84. Hatada, E.N., *et al.* The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2489-2493 (1992).
85. Rice, N.R., MacKichan, M.L. & Israel, A. The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions. *Cell* **71**, 243-253 (1992).
86. Savinova, O.V., Hoffmann, A. & Ghosh, G. The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes. *Mol Cell* **34**, 591-602 (2009).
87. Huang, T.T. & Miyamoto, S. Postrepression Activation of NF- $\kappa$ B Requires the Amino-Terminal Nuclear Export Signal Specific to I $\kappa$ B $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4737-4747 (2001).
88. Lee, S.-H. & Hannink, M. Characterization of the Nuclear Import and Export Functions of I $\kappa$ B $\epsilon$ . *Journal of Biological Chemistry* **277**, 23358-23366 (2002).
89. Malek, S., Chen, Y., Huxford, T. & Ghosh, G. I $\kappa$ B $\beta$ , but Not I $\kappa$ B $\alpha$ , Functions as a Classical Cytoplasmic Inhibitor of NF- $\kappa$ B Dimers by Masking Both NF- $\kappa$ B Nuclear Localization Sequences in Resting Cells. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 45225-45235 (2001).
90. Hacker, H. & Karin, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* **2006**, re13 (2006).
91. Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G. & Siebenlist, U. Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2532-2536 (1993).
92. Rudolph, D., *et al.* Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev* **14**, 854-862 (2000).
93. Lee, Y., *et al.* The effects of labour and of interleukin 1 beta upon the expression of nuclear factor kappa B related proteins in human amnion. *Mol Hum Reprod* **9**, 213-218 (2003).
94. Schmitz, M.L., Mattioli, I., Buss, H. & Kracht, M. NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem* **5**, 1348-1358 (2004).
95. Kuwata, H., *et al.* I kappa BNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* **24**, 41-51 (2006).
96. Bours, V., Villalobos, J., Burd, P.R., Kelly, K. & Siebenlist, U. Cloning of a mitogen-inducible gene encoding a kappa B DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell-cycle motifs. *Nature* **348**, 76-80 (1990).
97. Ohno, H., Takimoto, G. & McKeithan, T.W. The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* **60**, 991-997 (1990).
98. Wulczyn, F.G., Naumann, M. & Scheidereit, C. Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B. *Nature* **358**, 597-599 (1992).

99. Nolan, G.P., *et al.* The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like molecule that preferentially interacts with NF-kappa B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol* **13**, 3557-3566 (1993).
100. Fujita, T., Nolan, G.P., Liou, H.C., Scott, M.L. & Baltimore, D. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev* **7**, 1354-1363 (1993).
101. Franzoso, G., *et al.* The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. *Nature* **359**, 339-342 (1992).
102. Riemann, M., Endres, R., Liptay, S., Pfeiffer, K. & Schmid, R.M. The IkappaB protein Bcl-3 negatively regulates transcription of the IL-10 gene in macrophages. *J Immunol* **175**, 3560-3568 (2005).
103. Caamano, J.H., Perez, P., Lira, S.A. & Bravo, R. Constitutive expression of Bcl-3 in thymocytes increases the DNA binding of NF-kappaB1 (p50) homodimers in vivo. *Mol Cell Biol* **16**, 1342-1348 (1996).
104. Bundy, D.L. & McKeithan, T.W. Diverse effects of BCL3 phosphorylation on its modulation of NF-kappaB p52 homodimer binding to DNA. *J Biol Chem* **272**, 33132-33139 (1997).
105. Westerheide, S.D., Mayo, M.W., Anest, V., Hanson, J.L. & Baldwin, A.S., Jr. The putative oncoprotein Bcl-3 induces cyclin D1 to stimulate G(1) transition. *Mol Cell Biol* **21**, 8428-8436 (2001).
106. Wu, C.L., Kandarian, S.C. & Jackman, R.W. Identification of genes that elicit disuse muscle atrophy via the transcription factors p50 and Bcl-3. *PLoS One* **6**, e16171 (2011).
107. Carmody, R.J., Ruan, Q., Palmer, S., Hilliard, B. & Chen, Y.H. Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade. *Science* **317**, 675-678 (2007).
108. Kuwata, H., *et al.* IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages. *Blood* **102**, 4123-4129 (2003).
109. Muhlbauer, M., Chilton, P.M., Mitchell, T.C. & Jobin, C. Impaired Bcl3 up-regulation leads to enhanced lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-23P19 gene expression in IL-10(-/-) mice. *J Biol Chem* **283**, 14182-14189 (2008).
110. Kitamura, H., Kanehira, K., Okita, K., Morimatsu, M. & Saito, M. MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS letters* **485**, 53-56 (2000).
111. Yamazaki, S., Muta, T. & Takeshige, K. A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem* **276**, 27657-27662 (2001).
112. Haruta, H., Kato, A. & Todokoro, K. Isolation of a novel interleukin-1-inducible nuclear protein bearing ankyrin-repeat motifs. *J Biol Chem* **276**, 12485-12488 (2001).
113. Yamazaki, S., Muta, T., Matsuo, S. & Takeshige, K. Stimulus-specific induction of a novel nuclear factor-kappaB regulator, IkappaB-zeta, via Toll/Interleukin-1 receptor is mediated by mRNA stabilization. *J Biol Chem* **280**, 1678-1687 (2005).
114. Yamamoto, M., *et al.* Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* **430**, 218-222 (2004).
115. Trinh, D.V., Zhu, N., Farhang, G., Kim, B.J. & Huxford, T. The nuclear I kappaB protein I kappaB zeta specifically binds NF-kappaB p50 homodimers and forms a ternary complex on kappaB DNA. *J Mol Biol* **379**, 122-135 (2008).
116. Raices, R.M., *et al.* A novel role for IkappaBzeta in the regulation of IFNgamma production. *PLoS One* **4**, e6776 (2009).
117. Kawasaki, S., Nishida, K., Sotozono, C., Quantock, A.J. & Kinoshita, S. Conjunctival inflammation in the chronic phase of Stevens-Johnson syndrome. *Br J Ophthalmol* **84**, 1191-1193 (2000).

118. Ueta, M., *et al.* Spontaneous ocular surface inflammation and goblet cell disappearance in I kappa B zeta gene-disrupted mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 579-588 (2005).
119. Shiina, T., *et al.* Targeted disruption of MAIL, a nuclear I kappa B protein, leads to severe atopic dermatitis-like disease. *J Biol Chem* **279**, 55493-55498 (2004).
120. Fiorini, E., *et al.* Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol Cell* **9**, 637-648 (2002).
121. Touma, M., *et al.* Functional role for I kappa BNS in T cell cytokine regulation as revealed by targeted gene disruption. *J Immunol* **179**, 1681-1692 (2007).
122. Hirotsu, T., *et al.* The nuclear I kappa B protein I kappa BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J Immunol* **174**, 3650-3657 (2005).
123. Fujita, S., *et al.* Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response. *Blood* **107**, 3656-3664 (2006).
124. Yamauchi, S., Ito, H. & Miyajima, A. I kappa B $\eta$ , a nuclear I kappa B protein, positively regulates the NF- $\kappa$ B-mediated expression of proinflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 11924-11929 (2010).
125. Wessells, J., *et al.* BCL-3 and NF-kappa B p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages. *J Biol Chem* **279**, 49995-50003 (2004).
126. Fortunato, S.J., Menon, R., Lombardi, S.J. & LaFleur, B. Interleukin-10 inhibition of gelatinases in fetal membranes: therapeutic implications in preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* **98**, 284-288 (2001).
127. Xiao, G., Fong, A. & Sun, S.C. Induction of p100 processing by NF-kappa B-inducing kinase involves docking I kappa B kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **279**, 30099-30105 (2004).
128. Hoffmann, A., Leung, T.H. & Baltimore, D. Genetic analysis of NF-kappa B/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J* **22**, 5530-5539 (2003).
129. Lin, Y.Z., Yao, S.Y., Veach, R.A., Torgerson, T.R. & Hawiger, J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* **270**, 14255-14258 (1995).
130. MANDL, A.M. The Phases of the Oestrous Cycle in the Adult White Rat. *Journal of Experimental Biology* **28**, 576-584 (1951).
131. MARCONDES, F.K., BIANCHI, F.J. & TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology* **62**, 609-614 (2002).
132. Dussault, A.A. & Pouliot, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online* **8**, 1-10 (2006).
133. Policy, C.o.U.P.B.a.A.H.O.B.o.H.S. Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention. in *Washington, DC: The National Academies Press* (2006).
134. Creasy, R.K. Preventing preterm birth. *N Engl J Med* **325**, 727-729 (1991).
135. Simmons, L.E., Rubens, C.E., Darmstadt, G.L. & Gravett, M.G. Preventing preterm birth and neonatal mortality: exploring the epidemiology, causes, and interventions. *Semin Perinatol* **34**, 408-415 (2010).
136. Ahman, E., and Zupan, J. Neonatal and Perinatal Mortality: Country, Regional, and Global Estimates 2004. in *Geneva: World Health Organization* (2007).
137. Heron, M., *et al.* Annual summary of vital statistics: 2007. *Pediatrics* **125**, 4-15 (2010).
138. Gibbs, R.S., Romero, R., Hillier, S.L., Eschenbach, D.A. & Sweet, R.L. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol* **166**, 1515-1528 (1992).

139. Romero, R., Avila, C., Brekus, C.A. & Morotti, R. The role of systemic and intrauterine infection in preterm parturition. *Ann N Y Acad Sci* **622**, 355-375 (1991).
140. Sun, K., *et al.* Glucocorticoids induce cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin H synthase type 2 but not microsomal prostaglandin E synthase (PGES) and cytosolic PGES expression in cultured primary human amnion cells. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5564-5571 (2003).
141. Yoon, B.H., *et al.* Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments. *Am J Obstet Gynecol* **179**, 1254-1260 (1998).
142. Quinn, P.A., Butany, J., Taylor, J. & Hannah, W. Chorioamnionitis: its association with pregnancy outcome and microbial infection. *Am J Obstet Gynecol* **156**, 379-387 (1987).
143. Hillier, S.L., *et al.* The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obstet Gynecol* **81**, 941-948 (1993).
144. Bennett, W.A., *et al.* Intrauterine endotoxin infusion in rat pregnancy induces preterm delivery and increases placental prostaglandin F2alpha metabolite levels. *Am J Obstet Gynecol* **182**, 1496-1501 (2000).
145. Dudley, D.J., Collmer, D., Mitchell, M.D. & Trautman, M.S. Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissues: implications for term and preterm labor. *J Soc Gynecol Investig* **3**, 328-335 (1996).
146. Jongh, R.D., Jorens, P., Student, I. & Heylen, R. The contribution of the immune system to parturition. *Mediators Inflamm* **5**, 173-182 (1996).
147. Petraglia, F., Florio, P., Nappi, C. & Genazzani, A.R. Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocr Rev* **17**, 156-186 (1996).
148. Stallmach, T., *et al.* Cytokine production and visualized effects in the feto-maternal unit. Quantitative and topographic data on cytokines during intrauterine disease. *Lab Invest* **73**, 384-392 (1995).
149. Unal, E.R., Cierny, J.T., Roedner, C., Newman, R. & Goetzl, L. Maternal inflammation in spontaneous term labor. *American journal of obstetrics and gynecology* **204**, 223.e221-223.e225 (2011).
150. Saito, S., Kasahara, T., Kato, Y., Ishihara, Y. & Ichijo, M. Elevation of amniotic fluid interleukin 6 (IL-6), IL-8 and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term and preterm parturition. *Cytokine* **5**, 81-88 (1993).
151. Tangri, S. & Raghupathy, R. Expression of cytokines in placentas of mice undergoing immunologically mediated spontaneous fetal resorptions. *Biol Reprod* **49**, 850-856 (1993).
152. Challis, J.R., *et al.* Inflammation and Pregnancy. *Reproductive Sciences* **16**, 206-215 (2009).
153. Hayden, M.S. & Ghosh, S. NF- $\kappa$ B in immunobiology. *Cell Res* **21**, 223-244 (2011).
154. Espinosa L., B.A., Mulero MC. Alternative nuclear functions for NF-kappaB family members. *Am J Cancer Res* **1**, 446-459 (2011).
155. Beutler, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430**, 257-263 (2004).
156. Fiorentino, D.F., Bond, M.W. & Mosmann, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* **170**, 2081-2095 (1989).
157. Bennett, W.A., *et al.* Expression and production of interleukin-10 by human trophoblast: relationship to pregnancy immunotolerance. *Early Pregnancy* **3**, 190-198 (1997).

158. Bennett, W.A., *et al.* First-trimester human chorionic villi express both immunoregulatory and inflammatory cytokines: a role for interleukin-10 in regulating the cytokine network of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **41**, 70-78 (1999).
159. Terrone, D.A., *et al.* Interleukin-10 administration and bacterial endotoxin-induced preterm birth in a rat model. *Obstet Gynecol* **98**, 476-480 (2001).
160. Rivera, D.L., *et al.* Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. *FASEB J* **12**, 189-197 (1998).
161. Dagvadorj, J., *et al.* Interleukin (IL)-10 attenuates lipopolysaccharide-induced IL-6 production via inhibition of I $\kappa$ B-zeta activity by Bcl-3. *Innate Immun* **15**, 217-224 (2009).