Artículo original
Ginecol Obstet Mex. 2018 marzo;86(3):174-185.

Expresión de microRNAs asociados con corioamnionitis en suero materno

Alba Miriam García-Rodríguez,[1] Carolina Magali Sánchez-González,[2] Mauricio Osorio-Caballero,[3] Néstor Fabián Díaz,[4] Héctor Flores-Herrera[5]

Resumen

OBJETIVO: Determinar el perfil de expresión de los miRNA-21, -106, -126 y -146 y la cuantificación de IL-1β en el suero de pacientes embarazadas sanas, a término, con y sin trabajo de parto activo y en pacientes con evidencias clínicas de corioamnionitis.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio analítico, longitudinal y prolectivo efectuado en pacientes que ingresaron para control, seguimiento obstétrico y terminación del embarazo al Instituto Nacional de Perinatología de la Ciudad de México entre febrero de 2015 y agosto de 2016. Variables de estudio: pacientes embarazadas sanas, a término, con y sin trabajo de parto activo y pacientes con evidencias clínicas de corioamnionitis, edad materna y semanas de gestación. A cada paciente se le tomaron cinco mililitros de sangre periférica para centrifugación y recuperación de suero. La obtención del ARN se efectuó a partir de 500 µL de suero, al que se añadió el mismo volumen del reactivo de TRIzol. El cADN se sintetizó a partir de 3 ng de ARN mediante el ensayo de retrotranscripción. La expresión de los miRNAs se efectuó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos. Los resultados se reportan en media ± desviación estándar y el análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de Mann-Whitney, con una diferencia significativa de $p < 0.05$.

RESULTADOS: Se estudiaron 45 pacientes embarazadas que se dividieron en tres grupos: *1)* pacientes sanas a término, sin trabajo de parto activo (n = 15); *2)* pacientes con trabajo de parto activo (n = 15); y *3)* pacientes con evidencias clínicas de corioamnionitis (n = 15). En las embarazadas sanas, con trabajo de parto activo, el perfil de expresión del miR-126 se incrementó 1.23 veces ($p \leq 0.001$) en tanto que el miR-21 y miR-146 disminuyeron 2.1 ($p \leq 0.001$) y 0.73 veces ($p \leq 0.001$), respectivamente, y la concentración de IL-1β se incrementó 1.8 veces ($p = 0.014$) en relación con las pacientes sanas sin trabajo de parto. El perfil de expresión de estos miRNAs y de IL-1β cambió en las pacientes con evidencias clínicas de corioamnionitis. El miR-126 y miR-146 se incrementaron 1.31 ($p \leq 0.001$) y 1.1 veces ($p = 0.05$); en tanto que el miR-21 disminuyó 1.4 veces ($p \leq 0.05$) y la concentración de la IL-1β se incrementó 2.8 veces ($p = 0.002$) con respecto a las pacientes sin trabajo de parto activo. El miR-106 no mostró diferencias significativas entre los tres grupos de estudio.

CONCLUSIONES: En su conjunto, los resultados de este ensayo sugieren que el perfil de expresión entre miR-21, miR-126 y miR-146 podría considerarse marcador molecular de corioamnionitis. Para que esto pueda tomarse como patrón de referencia deberán emprenderse más ensayos que corroboren este patrón y evalúen su eficacia.

PALABRAS CLAVE: Corioamnionitis; miRNAs; pacientes embarazadas; embarazo; edad gestacional.

[1] Departamento de Biología de la Reproducción Humana.
[2] Residente de segundo año de Biología de la Reproducción.
[3] Departamento de salud sexual y reproductiva.
[4] Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular.
[5] Departamento de Inmunobioquímica.
Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Ciudad de México.

Recibido: noviembre 2017

Aceptado: febrero 2018

Correspondencia
Héctor Flores Herrera
h.flores@inper.gob.mx

Este artículo debe citarse como
García-Rodríguez AM, Sánchez-González CM, Osorio-Caballero M, Díaz NF, Flores-Herrera H. Expresión de microRNAs asociados con corioamnionitis en suero materno. Ginecol Obstet Mex 2018 marzo;86(3):174-185.
DOI: https://doi.org/10.24245/gom.v86i3.1809

Ginecol Obstet Mex. 2018 March;86(3):174-185.

Expression of microRNAs associated with the development of chorioamnionitis in maternal serum.

Alba Miriam García-Rodríguez,[1] Carolina Magali Sánchez-González,[2] Mauricio Osorio-Caballero,[3] Néstor Fabián Díaz,[4] Héctor Flores-Herrera[5]

Abstract

OBJECTIVE: To determine the expression profile of miRNA-21, -106, -126 and -146 and to quantify the secretion of IL-1β in the serum of healthy pregnant patients at term with and without active labor and in patients with clinical evidences of chorioamnionitis.

MATERIALS AND METHODS: Analytical, longitudinal, and prolective study carried out in patients admitted for control, obstetric, and pregnancy resolution into the National Institute of Perinatology in Mexico City between February 2015 and August 2016. Study variables: healthy pregnant patients at term with and without active labor and patients with clinical evidence of chorioamnionitis, maternal and gestational age. Five milliliters of peripheral blood were taken from each patient, which was centrifuged, and the serum recovered. RNA was obtained from 500 µL of serum to which the same volume of TRIzol reagent was added. The cDNA was synthesized with 3 ng of RNA by the reverse transcription assay. The expression of the microRNAs was performed by polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. The results are presented as mean ± standard deviation and statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test with a significant difference of $p<0.05$.

RESULTS: In healthy pregnant patients with active labor, it was observed that the expression profile of miR-126 increased 1.23-fold ($p\leq0.001$); while the miR-21 and miR-146 decreased 2.1- ($pp\leq0.001$) and 0.73-fold ($p\leq0.001$) respectively and the concentration of IL-1β increased 1.8-fold ($p = 0.014$) with respect to the healthy patients without labor. The expression profile of these miRNAs and IL-1β change in patients with clinical evidence of chorioamnionitis. The miR-126 and miR-146 increased 1.31- ($p\leq0.001$) and 1.1-fold ($p = 0.05$); while miR-21 decreased 1.4-fold ($p\leq0.05$) and the concentration of IL-1β increased 2.88-fold ($p = 0.002$) with respect to patients without active labor. The miR-106 did not show significant differences between the three study groups.

CONCLUSIONS: These results suggest that miRNA-21, -126 and -146 could be considered as molecular markers in the development of chorioamnionitis; however, more tests should be carried out to corroborate this pattern and evaluate its efficiency.

KEYWORDS: Chorioamnionitis; miRNAs; Pregnant patients; Pregnancy; Gestational age.

ANTECEDENTES

La corioamnionitis explica 70% de los partos con ruptura prematura de membranas fetales o con trabajo de parto espontáneo y 13% de los nacimientos prematuros.[1,2,3] Los agentes causales de corioamnionitis aislados con mayor frecuencia son bacterias grampositivas (*Gardnerella vaginalis, Mycoplasma hominis*), gramnegativas (*Escherichia coli, Streptococcus agalactiae, Chlamydia trachomatis*) y atípicas (*Ureaplasma urealyticum*).[4-7] El proceso infeccioso activa la respuesta inmunológica innata del tejido epitelial, de macrófagos, monocitos, células NK y neutrófilos.[8,9] El reconocimiento de las bacterias activa la secreción masiva de diversas citocinas quimiotácticas (IL-6 e IL-8) e inflamatorias (IL-1β, y el factor de necrosis tumoral tipo alfa; TNFα), que son las responsables de amplificar la respuesta inmunológica y la activación para la fagocitosis y de los linfocitos T.[8-10] En este escenario de regulación de la respuesta inflamatoria-antinflamatoria se ha demostrado la participación de una clase particular de ARNs no codificantes, denominados microRNA (miRNAs) como moduladores de la respuesta inflamatoria que inhiben los factores encargados de la diferenciación y activación de las células inmunológicas o inhibición de diferentes tipos de ARN mensajeros.[11-13] Si bien se conocen las moléculas inflamatorias y de fase aguda relacionadas con el proceso infeccioso en fase activa,[14] en la actualidad no se cuenta con marcadores de diagnóstico temprano que logren identificar la corioamnionitis durante el embarazo.

El objetivo de este ensayo fue: determinar el perfil de expresión de los miRNA-21, -106, -126 y -146 y la cuantificación de IL-1β en el suero de pacientes embarazadas sanas, a término, con y sin trabajo de parto activo y en pacientes con evidencias clínicas de corioamnionitis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio analítico, longitudinal y prolectivo efectuado en pacientes que ingresaron para control, seguimiento obstétrico y terminación del embarazo al Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes de la Ciudad de México entre febrero de 2015 y agosto de 2016. Variables de estudio: pacientes embarazadas sanas con y sin trabajo de parto, embarazadas con evidencias clínicas de corioamnionitis, edad materna y semanas de embarazo al momento del nacimiento. A cada paciente se le tomaron 5 mL de sangre periférica que se centrifugó a 15,000 rpm; el suero recuperado se transfirió a un tubo Eppendorf estéril para obtener el ARN. El diagnóstico de corioamnionitis se basó en la coexistencia de dos o más de los siguientes signos clínicos: fiebre (temperatura corporal mayor de 38°C), taquicardia materna (más de 100 latidos por minuto), taquicardia fetal (más de160 latidos por minuto), líquido amniótico fétido o purulento, dolor o sensibilidad uterina; leucocitosis (más de 15 000/mm^3), bandemia (más de 6%), concentraciones elevadas de proteína C reactiva (más de 2 mg/dL). Al momento de la obtención de las muestras las pacientes no mostraron evidencias clínicas de otras afecciones asociadas con la respuesta inflamatoria. La confirmación de la corioamnionitis se evaluó por histología de las membranas fetales, cordón umbilical y placenta. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado con base en los lineamientos aprobados por el comité de investigación y ética institucionales vigentes en el proyecto 212250-3210091.

Obtención del ARN

El ARN total de cada muestra se extrajo con el reactivo de TRIzol (InvitroGen; Carlsbad, CA) siguiendo las especificaciones de la casa comercial y de acuerdo como lo reportaron Montenegro y su grupo.[15] A partir de 500 µL de

plasma se adicionó el mismo volumen de TRIzol. La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó por espacio de 15 minutos a 30°C. Enseguida, a cada muestra se le añadieron 100 µL de cloroformo y la mezcla se agitó durante 15 segundos y se incubó 3 minutos a 30°C. Al término, las muestras se centrifugaron a 4,000 rpm durante 15 minutos; la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó 1 µL de isopropanol. Las muestras se incubaron durante 1 hora a -20°C. Al término de ese tiempo se centrifugaron a 4,000 rpm durante 30 minutos. Al *pellet* se le agregó 1 mL de etanol al 100% y se agitó vigorosamente durante 15 segundos y de nuevo se centrifugó a 4,000 rpm durante 15 minutos. El procedimiento se repitió una vez más con etanol al 75%. El ARN se evaporó durante toda la noche a temperatura ambiente. El ARN se hidrató con 20 µL de dietilpirocarbonato y, posteriormente, se cuantificó por espectrofotometría mediante la relación de absorbancia 260-280.

Síntesis del cDNA mediante el ensayo de retrotranscripción

Para la obtención del cDNA se utilizó el equipo Access RT-PCR System (RT-PCR: cat A1250. Promega, Madison WI, USA) de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial. En tubos Eppendorf independientes se agregaron 2.5 µL (3 ng) del RNA de cada muestra y se añadieron 5 µL de amrtiguador AMV-Tfi (5X), 1 µL dNTP [10 mM], 2 µL MgSO4 [50 mM], 10 µL de agua libre de RNAsas, 1 µL de AMV RT y 1 µL [20 pmol] de cada iniciador específico (**Cuadro 1**). La síntesis del cDNA se realizó durante 45 minutos a temperatura de 45°C. Por último, la reacción se inactivó a 70°C. El cDNA obtenido se almacenó a 4°C.

Expresión de los miRNAs mediante PCR

Las condiciones de PCR se realizaron mediante lo previamente reportado por García-Gudiño y su grupo.[16] A partir del cDNA obtenido se amplificaron los cuatro miRNAs mediante el ensayo de PCR a punto final. Para la amplificación de dichas secuencias se adicionaron 5 µL (5X) de amortiguador AMV-Tfi, 1 µL dNTP [10 mM], 2 µL MgCl2 [50 mM], 1 µL de Tfi, 1 µL [20 pmol] de iniciador específico de PCR para cada miRNAs (**Cuadro 2**) y 1 µL (2 unidades/mL) de Taq polimerasa, ajustando la reacción a 25 µL con agua libre de RNAsas para PCR. Como control interno de expresión de los miRNAs se utilizaron: tejido neural de rata (miR-21 y -106), células leucémicas (miR-126) y tejido cardiaco de rata (miR-146). Una porción de cada tejido se maceró con TRIzol y centrifugó a 12 000 rpm durante 10 minutos. La extracción y cuantificación del RNA se efectuó mediante el procedimiento antes descrito.

Los tubos de PCR se amplificaron en el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf; Hamburg, Germany) con las siguientes condiciones: 94°C para una elongación inicial durante un minuto y 40 ciclos (94°C durante 30 segundos, alineamiento 56, 58, y 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos) y una elongación final de 72°C por espacio de 10

Cuadro 1. Secuencia específica de los microRNA para la retrotranscripción

microRNA	Secuencia (5´a 3´)
21	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAACT
106	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCCATC
126	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTTACGC
146	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAGCC

Cuadro 2. Secuencia específica de los miRNAs para la amplificación por PCR.

miR	Secuencia 5´a 3´	Tamaño (pb)
21	CCGGCCGATCGAATAG	71
106	CCGGCCGTTTTCACG	70
126	GCCGAGCATGGCTCTC	72
146	GTGCAGGGTCCGAGGT	74

minutos. Los amplificados se colocaron en geles de agarosa al 4% a voltaje constante durante 40 minutos y las bandas se visualizaron con luz ultravioleta y las imágenes se capturaron con el sistema fotodocumentador (Gel Doc 2000. Bio-Rad, USA). El nivel de expresión de las bandas se determinó mediante la densidad óptica y el programa ImageJ (NIH; USA).

Cuantificación de IL-1β

Para determinar la concentración de IL-1 (Duoset DY201, R&D Systems) en el plasma se utilizó el ensayo inmunoenzimático tipo emparedado (ELISA), de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial y con nuestro reporte previo.[17] Para la curva estándar se incluyeron siete puntos con un rango de 250 a 3.90 pg/mL. Se determinó la densidad óptica a una longitud de 450 nm.

Análisis estadístico

Para las diferencias entre las variables maternas se usó el análisis t Student seguido de la prueba de Mann-Whitney. El análisis estadístico se efectuó mediante el programa SigmaStat (versión 3.0 Jandel Co, USA). Los valores se presentan con media ± desviación estándar y una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Se estudiaron 45 pacientes embarazadas que se dividieron en tres grupos: *1)* pacientes sanas a término, sin trabajo de parto activo (n = 15); *2)* pacientes con trabajo de parto activo (n = 15); y *3)* pacientes con evidencias clínicas de corioamnionitis (n = 15). Las características maternas se muestran en el **Cuadro 3**. La edad materna media de las pacientes sin trabajo de parto fue de 30.0 ± 6.5 y no se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo de sin trabajo de parto y corioamnionitis ($p = 0.6$; **Cuadro 3**). La edad gestacional media al momento del nacimiento en el grupo de neonatos de madres con corioamnionitis fue de 27.9 ± 5.7 semanas, cifras con valor estadísticamente significativo con respecto al grupo sin y con trabajo de parto ($p < 0.001$; **Cuadro 3**).

Evidencias histológicas de las pacientes con corioamnionitis

La **Figura 1** muestra las características morfológicas de las membranas fetales, cordón umbilical y de la placenta de pacientes con corioamnionitis (**Figuras 1A-C**) y de pacientes con trabajo de parto (**Figuras 1D-F**). En las muestras de las pacientes con corioamnionitis se observó el desprendimiento de la región del amnios y de la coriodecidua y el incremento en el infiltrado celular en las membranas fetales (**Figura 1A**), cordón umbilical (**Figura 1B**) y en la placenta (**Figura 1C**) con respecto al grupo con trabajo de parto (**Figuras 1D-F**).

Cuadro 3. Características generales de la población de estudio

	Pacientes sin corioamnionitis (n=30)		Pacientes con corioamnionitis (n=15)
	STP (n=15)	CTP (n=15)	
Edad materna (años)	30 ± 6.5	27.3 ± 8.4	28.4 ± 8.1
Edad gestacional (semanas)	36.1 ± 4.5	37.9 ± 2.7	27.9 ± 5.7

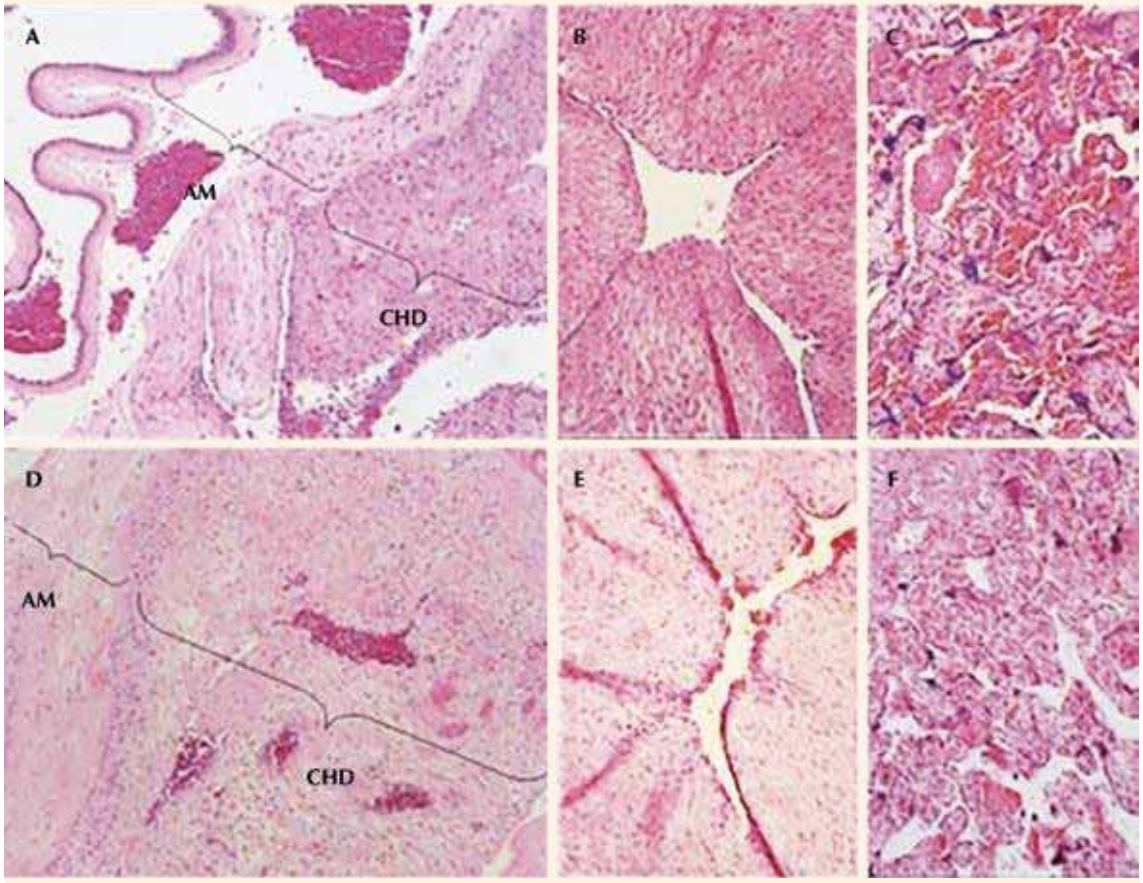


Figura 1. Corte histológico de corioamnionitis en diferentes tejidos gestacionales. Membranas fetales (A; 10X), cordón umbilical (B; 20X) y placenta (C; 20X) de pacientes con evidencias clínicas de corioamnionitis. Membranas fetales (D; 10X), cordón umbilical (E; 20X) y placenta (F; 20X) de pacientes sanas sin trabajo de parto. Epitelio amniótico (AM), y coriodecidua (CHD). La imagen es representativa de 6 cortes de muestras independientes.

Estandarización de las condiciones de RT-PCR

La **Figura 2** muestra los amplificados de los miRNAs en cada una de las temperaturas de alineamiento; 58°C fue la temperatura óptima para los miR-21, -126 y -146; en tanto que para el microRNA-106 fue de 60°C. El peso molecular para cada uno de los miRNAs fue de 71, 70, 72 y 74 pares de bases (pb), respectivamente, y corresponde con el estimado por el análisis bioinformático. Estas condiciones de temperatura de amplificación se usaron para evaluar la expresión de los miRNAs de los tres grupos de estudio y en cada caso se incluyó como control positivo el cADN correspondiente.

Perfil de expresión de los miRNAs de los tres grupos de pacientes

Para evaluar el cambio en la expresión de los cuatro miRNAs de las pacientes con corioamnionitis se tomó como medida de referencia la identificada en el grupo de pacientes sin trabajo de parto porque no hay incremento las concen-

traciones de IL-1β. En todos los casos los geles de expresión mostraron bandas por arriba de las esperadas y representaron la forma inmadura de los miRNAs. **Figura 2**

La **Figura 3** muestra la disminución significativa en la expresión del miR-21 en el grupo de pacientes con trabajo de parto y en el de corioamnionitis. La banda de expresión que corresponde al miRNA (71 pb) se cuantificó por densidad óptica (**Figura 3B**). En las pacientes con trabajo de parto la expresión del miR-21 disminuyó dos veces con respecto al grupo sin trabajo de parto ($p \leq 0.001$, **Figura 3B**). La expresión del miR-21 en las pacientes con corioamnionitis disminuyó significativamente 1.3 veces con respecto al grupo sin trabajo de parto ($p < 0.05$; **Figura 3B**).

La **Figura 4** muestra el perfil de expresión del miR-106 en las pacientes con trabajo de parto y de corioamnionitis. La banda de expresión que corresponde al miRNA (70 pb) se cuantificó por densidad óptica (**Figura 4B**). El perfil de expresión del miR-106 en las pacientes con trabajo de parto y con corioamnionitis aumentó 1.1 y 1.07 veces, respectivamente; sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo sin trabajo de parto ($p = 0.6$; **Figura 4B**).

La **Figura 5** muestra el perfil de expresión del miR-126 en las pacientes con trabajo de parto y de corioamnionitis. La banda de expresión que corresponde a este miRNA (72 pb) se cuantificó por densidad óptica (**Figura 5B**). El perfil de ex-

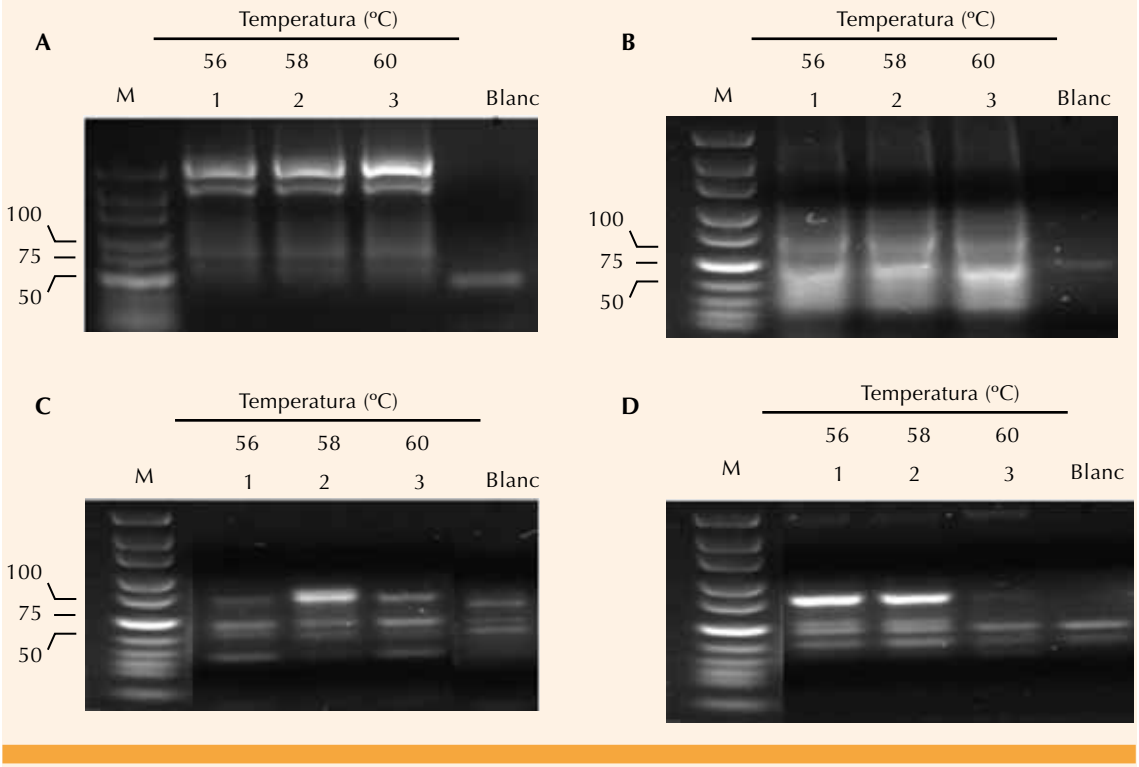


Figura 2. Expresión de PCR de los miRNAs a diferentes intervalos de temperatura. miR-21 (71 pb; A), miR-106 (70 pb, B), miR-126 (72 pb; C) y miR-146 (74 pb; D). Marcador de talla molecular (M, Low Range DNA; ThermoScientific), pares de bases (pb).

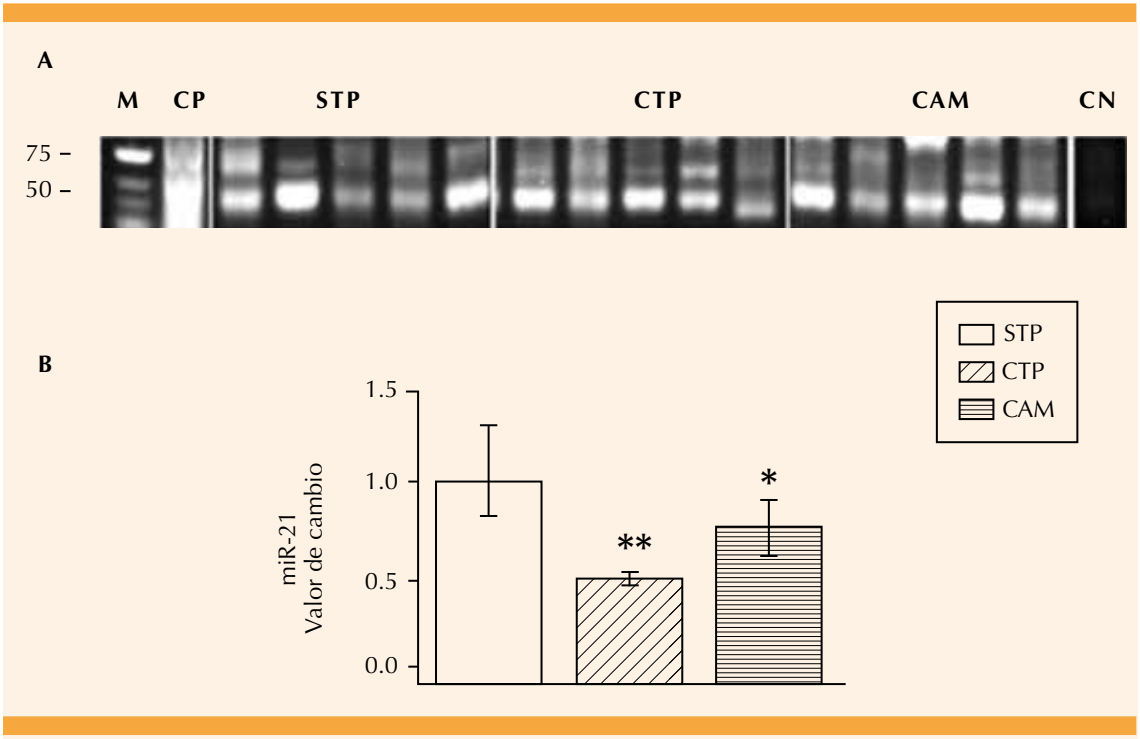


Figura 3. Expresión diferencial entre el grupo de pacientes sin trabajo de parto (STP), con trabajo de parto (CTP) y de corioamnionitis (corioamnionitis; A), marcador de talla molecular (M, Low Range DNA), pares de bases (pb), control positivo (CP; tejido neural de rata) y negativo (CN; sin cDNA). El valor de la banda de expresión se determinó mediante la densidad óptica y se ajustó con respecto al valor del grupo de STP. Diferencia estadísticamente significativa entre STP vs CTP (**p ≤0.001) y STP vs corioamnionitis (* p ≤0.05).

presión del miR-126 aumentó significativamente 1.2 y 1.3 veces, respectivamente, en el grupo con trabajo de parto y en el grupo corioamnionitis con respecto al grupo sin trabajo de parto (p ≤0.001; **Figura 5B**).

La **Figura 6** muestra el perfil de expresión del miR-146 en las pacientes con trabajo de parto y de corioamnionitis. La banda de expresión que corresponde a este miRNA (74 pb) se cuantificó por densidad óptica (**Figura 6B**). El perfil de expresión del miR-146 disminuyó para el grupo con trabajo de parto (p ≤ 0.001) y aumentó significativamente en las pacientes con corioamnionitis (p = 0.05).

Cuantificación de IL-1β

La **Figura 7** muestra la secreción de IL-1β en los tres grupos de estudio. Las pacientes con trabajo de parto y de corioamnionitis incrementaron, significativamente, 1.8 (p = 0.014) y 2.8 veces (p = 0.002), respectivamente, la secreción de IL-1β con respecto a las pacientes sin trabajo de parto (6.16 ± 2.6).

DISCUSIÓN

Los hallazgos de este estudio muestran que la corioamnionitis origina: *1)* disminución del miR-21; *2)* incremento en la expresión del miR-

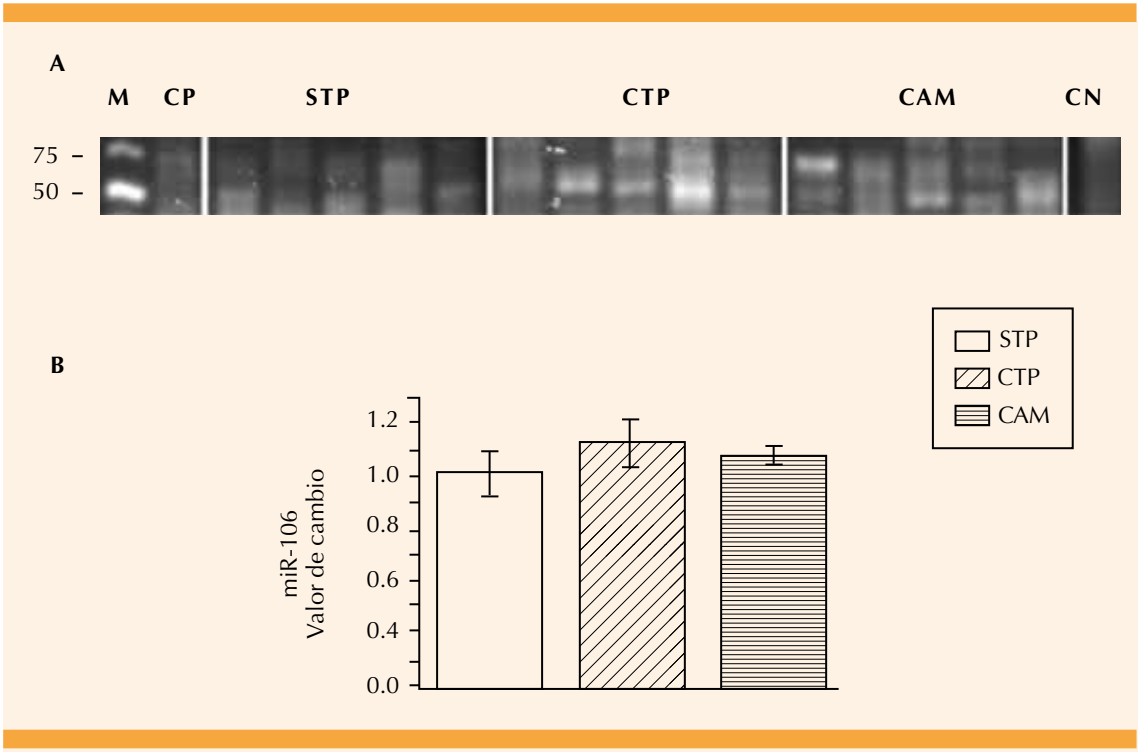


Figura 4. Expresión del miR-106. Se muestra la expresión diferencial entre el grupo de pacientes sin trabajo de parto (STP), con trabajo de parto (CTP) y de corioamnionitis (corioamnionitis; A), marcador de talla molecular (M, Low Range DNA), pares de bases (pb), control positivo (CP; tejido neural de rata) y negativo (CN; sin cDNA). El valor de la banda de expresión se determinó mediante la densidad óptica y se ajustó con respecto al valor del grupo de STP. Diferencia estadísticamente significativa p =0.06.

126 y -146; y *3)* aumento de la secreción de la IL-1β. Este hallazgo es consistente con otros estudios que han reportado la detección de los cuatro miRNAs en suero y que se han asociado con la respuesta inflamatoria en diferentes enfermedades.[15-17]

Perry y colaboradores demostraron, en condiciones *in vitro,* que al estimular durante tres horas a las células alveolares tipo II con IL-1β (1 ng/mL) se incrementa significativamente la expresión del miR-146.[21] Nuestros resultados indican que la corioamnionitis activa la respuesta inflamatoria mediada por la IL-1β y aumenta la expresión del miR-126 y -146 (**Figura 6**); sin embargo, en las pacientes con trabajo de parto activo la concentración de IL-1β es menor y solo se incrementa la expresión del miR-126. En las pacientes con trabajo de parto activo la IL-1β reduce la expresión del miR-21 pero no así en las pacientes con evidencias de corioamnionitis (**Figura 3**). Es probable que las proteínas implicadas en la regulación entre estos miRNAs y la respuesta inflamatoria estén modificadas en las pacientes de corioamnionitis, lo que deberá de demostrarse en condiciones *in vitro.*

Nuestros datos sugieren que las variaciones en el perfil de expresión entre el miR-21 y el miR-126, y miR-146 podrían considerarse marcadores moleculares de corioamnionitis; sin embargo, deben llevarse a cabo más ensayos que corroboren

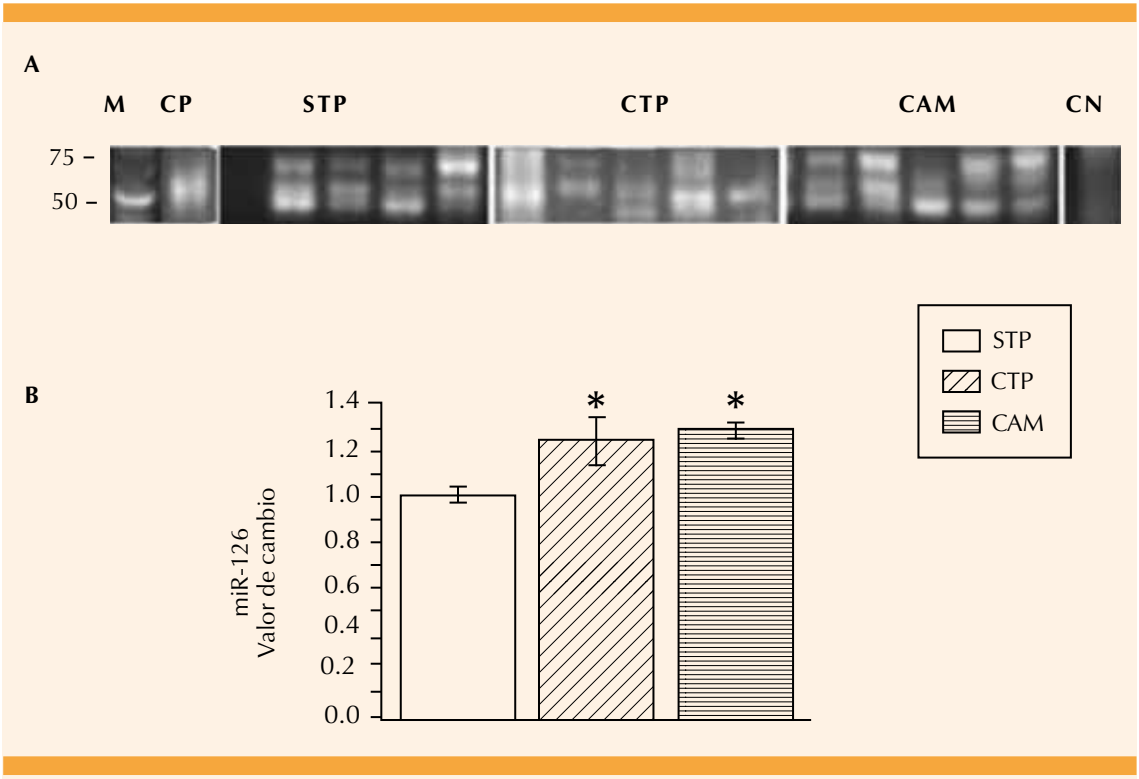


Figura 5. Expresión del microRNA-126 y la diferencial entre el grupo de pacientes sin trabajo de parto (STP), con trabajo de parto (CTP) y de corioamnionitis (corioamnionitis; A), marcador de talla molecular (M, Low Range DNA), control positivo (CP; tejido neural de rata) y negativo (CN; sin cDNA). El valor de la banda de expresión se determinó mediante la densidad óptica y se ajustó con respecto al valor del grupo de STP. Diferencia estadísticamente significativa entre STP vs CTP (* p ≤0.001) y STP vs corioamnionitis (* p ≤0.001).

este patrón y evalúen su eficiencia. Esto puede contribuir a disminuir los efectos adversos en el desarrollo neurológico de los recién nacidos de madres con infección intrauterina.[19, 20]

Nuestros resultados demuestran que en pacientes con evidencias clínicas de corioamnionitis en quienes se incrementó la concentración de IL-1β el aumento significativo en la expresión del microRNA-126 y el -146 con respecto a las pacientes sin trabajo de parto. Perry y colaboradores encontraron una reducción importante en la expresión del microRNA-146 inducida por el aumento en la IL-1β.[18] La respuesta inflamatoria reduce la expresión del microRNA-21; sin embargo, al compararse con respecto al grupo con trabajo de parto se observa un incremento (**Figura 3B**). El microRNA-106 no cambia con respecto al proceso infeccioso.

Nuestros datos sugieren que el aumento en la expresión de los microRNA-126 y 146 y la disminución del microRNA-21 pueden utilizarse como marcadores de referencia en respuesta a un proceso infeccioso.

CONCLUSIÓN

En su conjunto, los resultados de este ensayo sugieren que el perfil de expresión entre miR-

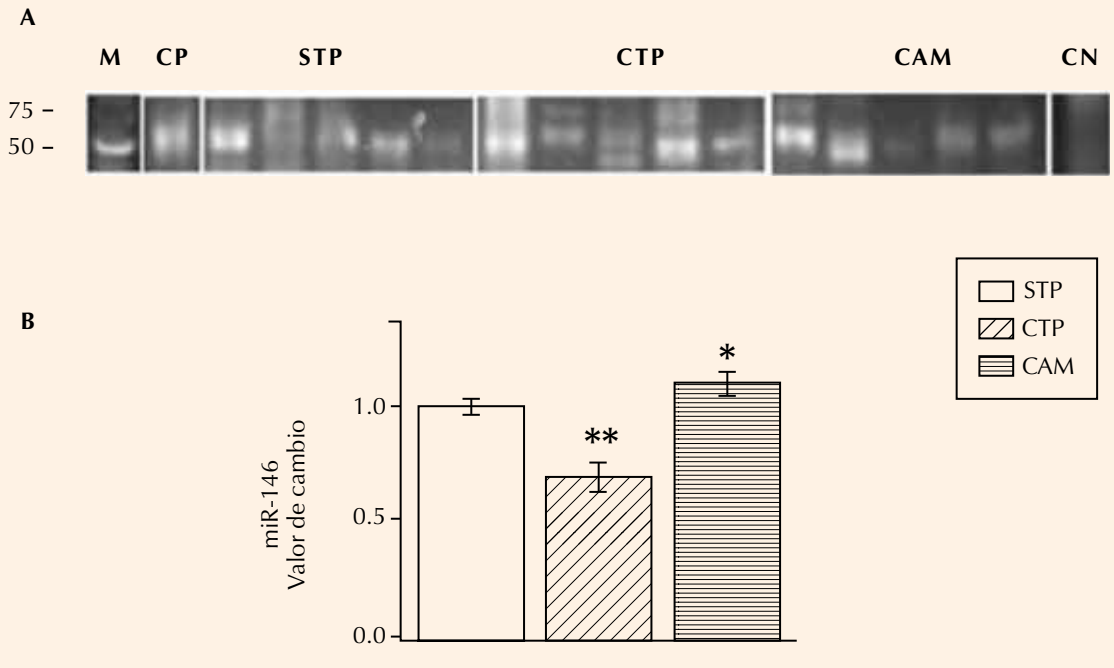


Figura 6. Expresión del miRNA-146. Expresión diferencial entre el grupo de pacientes con y sin trabajo de parto (CTP, STP) y de corioamnionitis (corioamnionitis; A), marcador de talla molecular (M, Low Range DNA), control positivo (CP; tejido neural de rata) y negativo (CN; sin cDNA). El valor de la banda de expresión se determinó mediante la densidad óptica y se ajustó con respecto al valor del grupo de STP. Diferencia estadísticamente significativa entre STP vs CTP (** p ≤0.001) y STP vs corioamnionitis (* p=0.05).

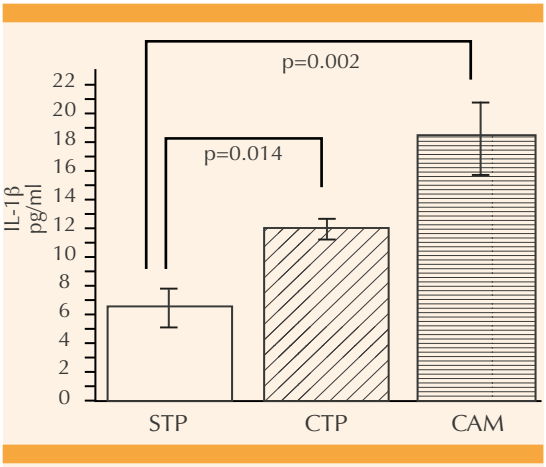


Figura 7. Concentración de IL-1β en el suero materno. Pacientes embarazadas sanas sin trabajo de parto (STP), con trabajo de parto (CTP), y con evidencias clínicas de corioamnionitis (CAM). Los datos se muestran con media ± desviación estándar.

21, miR-126 y miR-146 podría considerarse marcador molecular de corioamnionitis. Para que esto pueda tomarse como patrón de referencia deberán emprenderse más ensayos que corroboren este patrón y evalúen su eficacia.

Agradecimientos

Este estudio se desarrolló con el apoyo federal otorgado al Instituto Nacional de Perinatología Isidro Epinosa de los Reyes, Ciudad de México (212250-3210091 asignado a HFH).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Hecht JL, Onderdonk A, Delaney M, Allred EN, Kliman HJ, Zambrano E, et al. Characterization of chorioamnionitis in 2nd-trimester C-section placentas and correlation with microorganism recovery from subamniotic tissues. Pediatr Dev Pathol. 2008; 11(1): 15-22.
2. Prince AL, Ma J, Kannan PS, Alvarez M, Gisslen T, Harris RA, et al. The placental membrane microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis. Am J Obstet Gynecol. 2016; 214(5): 627 e1-627 e16.
3. Rouse DJ, Landon M, Leveno KJ, Leindecker S, Varner MW, Caritis SN, et al. The Maternal-Fetal Medicine Units cesarean registry: chorioamnionitis at term and its duration-relationship to outcomes. Am J Obstet Gynecol. 2004; 191(1): 211-6.
4. Dars S, Malik S, Samreen I, Kazi RA. Maternal morbidity and perinatal outcome in preterm premature rupture of membranes before 37 weeks gestation. Pak J Mes Sci. 2014; 30(3): 626-9.
5. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. PloS one. 2008; 3(8): e3056.
6. Freitas AC, Chaban B, Bocking A, Rocco M, Yang S, Hill JE et al. The vaginal microbiome of pregnant women is less rich and diverse, with lower prevalence of Mollicutes, compared to non-pregnant women. Sci Rep. 2017; 7(1): 9212.
7. Parry S, Strauss JF 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. N Engl J Med. 1998; 338(10): 663-70.
8. Denson LA, McDonald SA, Das A, Schendel DE, Skogstrand K, Hougaard DM et al. Early Elevation in Interleukin-6 is Associated with Reduced Growth in Extremely Low Birth Weight Infants. Am J Perinatol. 2017; 34(3): 240-247.
9. Splichal I, Trebichavsky I. Cytokines and other important inflammatory mediators in gestation and bacterial intraamniotic infections. Folia Microbiol. 2001; 46(4): 345-51.
10. Sato BL, Collier ES, Vermudez SA, Junker AD, Kendal-Wright CE. Human amnion mesenchymal cells are pro-inflammatory when activated by the Toll-like receptor 2/6 ligand, macrophage-activating lipoprotein-2. Placenta. 2016; 44: 69-79.
11. Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. Expert Opin Biol Ther. 2009; 9(6): 703-711.
12. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. Nat Rev Immunol. 2010; 10(2): 111-22.
13. Oglesby IK, McElvaney NG, Greene CM. MicroRNAs in inflammatory lung disease-- master regulators or target practice? Respir Res. 2010; 11: 148.
14. Behnia F, Taylor BD, Woodson M, Kacerovsky M, Hawkins H, Fortunato SJ et al. Chorioamniotic membrane senescence: a signal for parturition? Am J Obstet Gynecol. 2015; 213(3): 359 e1-16.
15. Montenegro D, Romero R, Pineles BL, Tarca L, Kim YM, Draghici S, Kusanovic JP, et al. Differential expression of microRNAs with progression of gestational and inflammation in the human choriamniotic membranes. Am J Obstet Gynecol 2007;197(3):289
16. García-Gudiño I, Yllescas-Medrano E, Maida-Claros R, Soriano.Becerril D, Díaz NF, García-López G, et al. Microbiological comparison of blood culture and amplification of 16S rDNA methods in combination with DGGE for detection of neonatal sepsis in blood samples. Eur J Pediatr 2018; 177(1):85-93.
17. Osorio-Caballero M, Perdigón-Palacio C, García-López G, Flores-Herrera O, Olvera-Sanchez S, Morales-Méndez I, et al. Escherichia coli-induced temporal and differential secretion ofheat-shock protein 70 and interleukin-1β by human fetal membranes in a two-compartament culture system. Placenta 2015;36(3):262-269.
18. Bounds KR, Chiasson VL, Pan LJ, Gupta S, Chatterjee P. MicroRNAs: New Players in the Pathobiology of Preeclampsia. Front Cardiovasc Med. 2017; 4: 60.
19. Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK, Willoughby D, Chidambaram K, Williams MA. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 2011; 204(2): 178 e12-21.
20. Hromadnikova I, Kotlabova K, Ivankova K, Krofta L. Expression profile of C19MC microRNAs in placental tissue of patients with preterm prelabor rupture of membranes and spontaneous preterm birth. Mol Med Rep. 2017; 16(4): 3849-3862.
21. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta- induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. J Immunol. 2008; 180(8): 5689-98.
22. Huleihel M, Golan H, Hallak M. Intrauterine infection/inflammation during pregnancy and offspring brain damages: possible mechanisms involved. Reprod Biol Endocrinol. 2004; 2: 17-24.
23. Miyazaki K, Furuhashi M, Matsuo K, Minami K, Yoshida K, Kuno N et al. Impact of subclinical chorioamnionitis on maternal and neonatal outcomes. Acta Obstet Gynecol Scand. 2007; 86(2): 191-7.