

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO INFLAMOSOMA DURANTE EL  
PERIODO DE IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA EN RATÓN**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**REALIZA:**

**LICENCIADA EN BIOMEDICINA CONCEPCIÓN GAMBOA SÁNCHEZ**

**Casa abierta al tiempo**

**COMITÉ TUTORAL:**

**CO- DIRECTOR EXTERNO: Dra. SANDRA RODRIGUEZ MARTINEZ.**

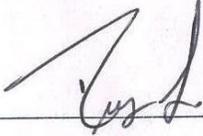
**LABORATORIO DE INMUNIDAD INNATA, ENCB- IPN**

**CO- DIRECTOR INTERNO: Dra. LEONOR RODRIGUEZ CRUZ. CBS, UAM-I**

**ASESOR: Dr. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ. CBS, UAM-I**

DIRECTORES DE TESIS:

Co- director Interno: Dra. Leonor Rodríguez Cruz. UAM-I.

  
\_\_\_\_\_

Co- director externo: Dra. Sandra Rodríguez Martínez. ENCP-IPN.

  
\_\_\_\_\_

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr. Edmundo Bonilla González. UAM-I.

  
\_\_\_\_\_

Dr. Rubén Darío Martínez Pérez. UAM-I.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramirez. UAM-I.

  
\_\_\_\_\_

Dr. Mario Eugenio Cancino Díaz. ENCB- IPN.

  
\_\_\_\_\_

**El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT (PNPC), registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.**

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología la beca otorgada para estudios de Maestría con el número de registro:293779.**

## AGRADECIMIENTOS

Han pasado muchas cosas en mi vida desde que terminé la licenciatura así que me gustaría empezar por ahí:

Gracias por haberme permitido realizar mi sueño de estudiar en el Distrito Federal. Gracias por el apoyo de mis padres para realizar este sueño, porque vi su dolor al irme, y su sacrificio económico para que no me faltara nada y por seguir en contacto. Honro su esfuerzo y los honro como padres y seres humanos. Los amo.

Gracias por regalarme una estancia en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados. Gracias por permitirme conocer a cada uno de los miembros del grupo Agua Viva Caracoles, quienes al día de hoy siguen siendo mi segunda familia. Gracias por los hombres y mujeres de ese grupo, que siguen dando tiempo, dinero y esfuerzo por compartir su experiencia, fortaleza y esperanza conmigo, en especial por Guillermo J., Miguel M., Elia L. y Rubén M. Gracias por haberme hecho abrir los ojos ante la realidad de este país, lo que me impulsó a estudiar la maestría en Biología Experimental.

Gracias por permitirme conocer la Universidad Autónoma Metropolitana, donde he conocido a gente con calidad humana. Gracias por mis amigos Tita, Ivis, Memo, Tonatiuh y Nemi. Gracias por permitirme realizar mi proyecto en el Instituto Politécnico Nacional. Gracias por haber puesto en mi camino a la Dra. Sandra Rodríguez Martínez, mujer que se ha ganado mi admiración por su pasión por la ciencia. Gracias por haberme permitido estar en el laboratorio de Inmunidad Innata y por los amigos que gané, ya que Edith, Azael, Isaí, Fany, Ernesto, Sofía y Paola fueron mis apoyos, mis confidentes y mi mejor compañía en esos días. Muy especialmente gracias por la ayuda brindada por Edith en este proyecto.

Gracias por haberme dado tantos regalos: a Luis Manuel Alvizo Godinez, un esposo noble, responsable y amoroso; la oportunidad de ser madre de Ángel Miguel Alvizo Gamboa, mi hijo hermoso que me llena de orgullo y me contagia de su asombro por la vida; y por haberme dado la oportunidad de continuar en mi grupo.

Gracias Dios por todos estos años de vida, al final eres tu quien merece todos mis agradecimientos, porque fuiste tú quien me trajo, quien quitó todos los obstáculos de mi camino, mi compañero de lágrimas y triunfos, mi confidente, quien mejor conoce mi corazón, quien me cuidó, quien me ha salvado y me ha regalado la oportunidad de vivir estas cosas, hoy no solo termino la maestría, termina una etapa de mi vida y comienzo una nueva aventura que a ratos me atemoriza, pero que puedo ver con esperanza porque hoy sé que tienes un plan maravilloso para mí, por tanto gracias por las alegrías, las tristezas, los momentos de miedo, de desilusión, los retos, los triunfos y por la vida. Bendice la vida de cada una de las personas que hicieron posible esta tesis.

## ÍNDICE

Abreviaturas	Pag. 7
Resumen	Pag. 12
Abstract	Pag. 13
Marco teórico	Pag. 14
Papel de la IL-1 $\beta$ en la gestación	Pag. 17
Procesamiento de la IL-1 $\beta$	Pag. 19
Antecedentes	Pag. 23
Justificación	Pag. 26
Hipótesis	Pag. 26
Objetivos	Pag. 26
Diseño experimental	Pag. 27
Materiales y métodos	Pag. 29
Resultados	Pag. 33
Discusión	Pag. 47
Conclusiones	Pag. 61
Perspectivas	Pag. 61
Bibliografía	Pag. 62

## ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS

Figura 1	Pag. 14
Figura 2	Pag. 14

Figura 3	Pag. 15
Figura 4	Pag. 19
Figura 5	Pag. 20
Figura 6	Pag. 21
Figura 7	Pag. 22
Figura 8	Pag. 23
Figura 9	Pag. 24
Figura 10	Pag. 25
Figura 11	Pag. 33
Figura 12	Pag. 35
Figura 13	Pag. 58
Figura 14	Pag. 59
Figura 15	Pag. 60
Gráfica 1	Pag. 37
Gráfica 2	Pag. 40
Gráfica 3	Pag. 42
Gráfica 4	Pag. 44
Gráfica 5	Pag. 46
Tabla 1	Pag. 29

## ABREVIATURAS

Actb	Actina beta
Aim2	Ausente en melanoma 2
Bcl2	Linfoma de células B- 2
Bcl2l1	Tipo Bcl2- 1
Birc2	Baculoviral que contiene repeticiones IAP- 2
Birc3	Baculoviral que contiene repeticiones IAP- 3
Card	Dominio de reclutamiento de caspasas
Card6	Miembro 6 del Dominio de reclutamiento de caspasas
Casp1	Caspasa 1
Casp12	Caspasa 12
Casp8	Caspasa 8
Ccl12	Ligando 12 de quimiocina
Ccl5	Ligando 5 de quimiocina
Ccl7	Ligando 7 de quimiocina
Cd40lg	Ligando de CD40
cDNA	DNA complementario
Cflar	Regulador de apoptosis tipo FADD y Caspasa 8
Chuk	Cinasa ubicua con hélice- asa- hélice conservada
Ciita	Transactivador clase II

Cox-2	Ciclooxigenasa 2
Ctsb	Cathepsina B
Cxcl1	Ligando 1 de quimiocina
Cxcl3	Ligando 3 de quimiocina
DTT	Ditiotreitol
Fadd	Dominio de muerte asociado a la via Fas
Gapdh	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
Gusb	Glucuronidasa beta
Hprt	Hipoxantina guanina phosphoribosil transferasa
Hsp90aa1	Proteína de shock térmico 90 alfa, clase A, miembro 1
Hsp90ab1	Proteína de shock térmico 90 alfa, clase B, miembro 1
Hsp90b1	Proteína de shock térmico 90 beta, miembro 1
Ifnb1	Interferón beta 1
Ifng	Interferón gamma
IGFBP-1	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1
Ikbkb	Inhibidor de kappaB beta cinasa
Ikbkg	Inhibidor de kappaB gamma cinasa
Il12a	Interleucina 12A
Il12b	Interleucina 12B
Il18	Interleucina 18
Il1b	Interleucina 1 beta

Il33	Interleucina 33
Il4	Interleucina 4
Il5	Interleucina 5
Il6	Interleucina 6
Irak1	Cinasa 1 asociada al receptor de interleucina 1
Irf1	Factor 1 regulador de interferón
Irf2	Factor 2 regulador de interferón
Irf3	Factor 3 regulador de interferón
Map3k7	Proteincinasa de cinasa de cinasa activada por mitógeno 7
Tab1	Cinasa 1 activada por TGF-beta/ Proteína 1 de unión a MAP3K7
Tab2	Cinasa 1 activada por TGF-beta /Proteína 2 de unión a MAP3K7
Mapk1	Proteín- cinasa activada por mitógeno 1
Mapk11	Proteín- cinasa activada por mitógeno 11
Mapk12	Proteín- cinasa activada por mitógeno 12
Mapk13	Proteín- cinasa activada por mitógeno 13
Mapk3	Proteín- cinasa activada por mitógeno 3
Mapk8	Proteín- cinasa activada por mitógeno 8
Mapk9	Proteín- cinasa activada por mitógeno 9
Mefv	Fiebre mediterránea
MMP-3	Metaloproteasa 3
Myd88	Gen 88 de respuesta primaria a la diferenciación mieloide

Naip1	Proteína 1 de inhibición de apoptosis. Familia NLR.
Naip5	Proteína 5 de inhibición de apoptosis. Familia NLR.
Nfkb1	Factor nuclear de cadena polipeptídica ligera Kappa amplificador de genes en células B- 1, p105
Nfkbia	Inhibidor alfa del factor nuclear de cadena polipeptídica ligera Kappa amplificador de genes en células B
Nfkbib	Inhibidor beta del factor nuclear de cadena polipeptídica ligera Kappa amplificador de genes en células B
Nlrc4	Proteína 4 de la familia NLR que contiene dominio CARD
Nlrc5	Proteína 5 de la familia NLR que contiene dominio CARD
Nlrp12	Proteína 12 de la familia NLR que contiene dominio pirina
Nlrp1a	Proteína 1a de la familia NLR que contiene dominio pirina
Nlrp3	Proteína 3 de la familia NLR que contiene dominio pirina
Nlrp4b	Proteína 4b de la familia NLR que contiene dominio pirina
Nlrp4e	Proteína 4e de la familia NLR que contiene dominio pirina
Nlrp5	Proteína 5 de la familia NLR que contiene dominio pirina
Nlrp6	Proteína 6 de la familia NLR que contiene dominio pirina
Nlrp9b	Proteína 9b de la familia NLR que contiene dominio pirina
Nlrx1	Miembro X1 de la familia NLR
Nod2	Dominio de unión a nucleótidos que contiene dominio 2 de oligomerización
P2rx7	Receptor purinérgico P2X, canal iónico de unión a ligando 7
Panx1	Panexina 1

Pea15a	Fosfoproteína 15a enriquecida en astrocitos
PBS	Buffer fosfato salino
PGE2	Prostaglandina E2
PGRA	Receptor de progesterona A
PGRB	Receptor de progesterona B
Pstpip1	Proteína 1 interactuante con prolina- serina- treonina fosfatasa
Ptgs2	Endoperóxido de prostaglandina sintasa 2
Pycard	Dominio que contiene PYD y CARD
PYD	Dominio de pirina
Stk30	Serina/treonina cinasa 30
Rela	Oncogen homólogo A de reticuloendoteliosis viral V- rel
Ripk2	Receptor (TNFRSF)-interactuante serina-treonina cinasa 2
Sugt1	SGT1, alelo de SKP1 supresor de G2
Tirap	Proteína adaptadora que contiene dominios de receptor tipo toll de interleucina 1
Tnf	Factor de necrosis tumoral
Tnfsf11	Miembro 11 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral
Tnfsf14	Miembro 14 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral
Tnfsf4	Miembro 4 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral
Traf6	Factor 6 asociado al receptor de TNF
Txnip	Proteína interactuante con tiorredoxina
uNK	NK uterinas

## RESUMEN

La primera etapa del embarazo humano y la preñez murina se caracteriza por ser pro- inflamatoria, durante ésta se da una comunicación entre el embrión y el útero mediante señales moleculares, que pueden determinar el rechazo o la aceptación del embrión por el endometrio uterino. Una de las primeras señales que el embrión envía al útero es la proteína interleucina 1 beta en el endometrio para activar la producción de moléculas que favorezcan la implantación.

Durante la implantación se lleva a cabo un proceso inflamatorio en el cual la interleucina 1 beta juega un papel importante, ya que promueve el cambio de fenotipo de las células estromales del endometrio, así como la infiltración de células inmunes en el sitio de implantación. Sin embargo, para que esto pueda suceder, la interleucina 1 beta debe ser primero procesada por un complejo multiprotéico conocido como el inflammasoma. Este complejo consta de un receptor, que se unirá a la caspasa 1 por medio de un intermediario con el propósito de activar a la enzima caspasa 1 y escindir a la IL-1B.

Para que se lleve a cabo la formación de este complejo, es necesario que se activen y/o repriman moléculas involucradas en su expresión, realización y represión, moléculas que hasta éste momento no han sido identificadas; el objetivo de este trabajo fue analizar los niveles de expresión de las moléculas involucradas en la formación del complejo inflamasoma mediante PCR en tiempo real de los días 4.5 pc, 7.5 pc y 10.5 pc, utilizando como control la etapa de diestro del ciclo estral. Los resultados de éste análisis mostraron que existe una expresión diferencial de las moléculas involucradas en la formación del complejo inflamasoma, y da indicios de formación de los inflamasomas de pirina, NBlrp3 y Aim2, así como la participación de otros NLRs durante la implantación.

## ABSTRACT

The first stage of human and mouse pregnancy is characterized by been pro- inflammatory, during this communication between the mbryo and the uterus molecular signals are vigen, which can determine the acceptance or rejecton of the embryo by the endometrium of the uterus. One of the first signals sent by the embryo to the uterus is interleukin 1 beta protein, which is detected by the interleukin- 1 beta receptor in the endometrium to activáte the production of molecules that favor implantation.

During the implantation is performed an inflammatory process in which interleukin- 1 beta plays an important role, since it promotes the phenotype change of endomertrial stromal cells as long as infiltration of the immune cells at the site of implantation. However for this to happen, interleukin-1 beta must first be processed by a multiprotein complex known as the inflammasome. This complex consists of a receptor, which will join the caspase 1 via an intermediary for the purpose of activating the enzyme caspase 1 in order to cleave IL-1B.

To carry out the formation of this complex, it's necessary to activáte and/ or repress molecules involved in its expression, signaling and repression, molecules that until this momento have not been identified; the aim of this work was to analyze the expression levels of molecules involved in the formation of the inflammasome complex by real- time PCR in days 4.5 pc, 7.5 pc and 10.5 pc, using as control the diestrus stage of the estrous cycle. The results of this analysis showed that there is a differential expression of molecules involved in the formation of the pyrin inflammasome, the Nlrp3 inflammasome, and the AIM2 inflammasome as well as the involvement of other NLRs during implantation.

## MARCO TEÓRICO

El embarazo es un proceso fisiológico que tiene como finalidad la creación de un nuevo ser, que comprende desde el momento de la implantación hasta el parto. Inmunológicamente se encuentra caracterizado por 3 etapas en las que las citocinas juegan un papel muy importante: la primera es pro- inflamatoria en la que existe secreción y acción en la interface materno- fetal de las citocinas tipo Th2: IL-4, IL-5 e IL-10, la segunda es no inflamatoria, en la que existe expresión de las citocinas tipo Th1 como IFN $\gamma$  e IL-2 y la tercera es también pro- inflamatoria (Paulesu *et al.*, 2008; Figura 1). Es bien sabido que la primera etapa, correspondiente al periodo organogenético, es la más crítica del embarazo ya que en ésta se da el inicio del reconocimiento inmunológico del embrión, y dependiendo de la capacidad de regulación de la respuesta se definirá el éxito o fracaso del embarazo.



**Figura 1. Etapas inmunológicas del embarazo.** Esquema que muestra el perfil de citocinas que prevalece en cada uno de los trimestres del desarrollo embrionario (Mor *et al.*, 2008).

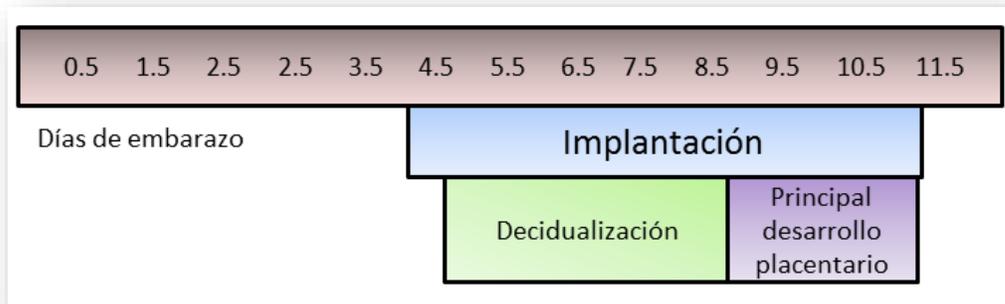
La implantación puede ser definida como “el proceso por el cual el embrión se adhiere al endometrio, invade el estroma decidualizado y alcanza la microvasculatura materna” (Castro-Rendón *et al.*, 2006). La implantación se desarrolla en 3 periodos (figura 2):

**Aposición**: el blastocisto se posiciona con el trofotodermo de frente al epitelio uterino. En el útero se produce un edema del estroma, e interdigitalización de las microvellosidades del epitelio luminal.

**Adhesión**: es realizada mediante moléculas de adhesión como integrinas, selectinas y componentes de la matriz extracelular, para permitir la adherencia del blastocisto. (Wang y Dey, 2006).

**Invasión**: el trofoblasto invade el epitelio luminal y la matriz basal permitiendo la migración al estroma y matriz extracelular de la lámina propia del endometrio (Geisert *et al.*, 2012).

El modelo de estudio *in vivo* por excelencia para analizar el proceso de implantación es el murino, debido a su duración de la gestación, a la facilidad de apareamiento entre cepas y al tipo de placentación, que al igual que en el ser humano es hemocorial, en la cual el corion penetra el endotelio materno entrando en contacto directo con la circulación materna (Paulesu *et al.*, 2008). En este modelo el proceso de implantación comienza a los 4.5 días post-coito, y termina en el día 10.5, durante el cual la deciduización alcanza el día 8.5, en el cual comienza el desarrollo de la placenta (Figura 3; Barañao *et al.*, 2010).



**Figura 3. Primeros 11.5 días de la gestación del modelo murino.** Se muestran los días en los que se presentan los cambios del endometrio durante la implantación (Herington y Bany, 2009).

En el ciclo ovulatorio de los roedores el cuerpo lúteo no es completamente funcional hasta que la secreción post-coital de prolactina, lo estimula para dar lugar a la secreción de progesterona (P4) durante 12-13 días, evitando así una nueva ovulación (anestro). En el día 4.5 los niveles de estradiol (E2) aumentan, y esto dispara el cambio en el endometrio “pre-receptivo” al estado “receptivo”, para aceptar un blastocisto saludable y maduro, esto durará por un lapso de 24 horas, después del cual entrará en un estado refractario (Geisert et al., 2012).

La apertura de la ventana de implantación está regulada por estrógeno y progesterona, que controlan los cambios uterinos para el momento de la implantación. La progesterona es el ligando para dos receptores: PGRA y PGRB (Receptores de Prostaglandina A y B), donde PGRA es esencial para la implantación. La invasión del trofoblasto al epitelio luminal uterino es precedida por la secreción por parte del embrión de estradiol para señalar el establecimiento del embarazo. El E2 actúa a través del receptor epitelial de estrógeno tipo 1, y estimula la liberación de secreciones uterinas y cambios en el epitelio luminal y glandular necesarios para la adherencia del trofoblasto, tales como alteración en la expresión de integrinas (Geisert et al., 2012).

Posterior a la fecundación, en el embrión se produce un mecanismo de espaciamiento y posicionamiento. En el día 5, debido al aumento en la secreción de estradiol, la célula epitelial pierde su polaridad y en su superficie se forman pinopodos para hacer contacto con el embrión.

Durante la peri-implantación, el blastocisto se expande y colapsa rítmicamente emanando su contenido de citocinas, éstas promueven cambios en el útero, en un proceso que se conoce como decidualización, en el cual los fibroblastos del sitio de implantación se diferencian en células secretoras de interleucinas y quimiocinas (decidua), que atraen células inmunes especializadas, como las células asesinas naturales uterinas, células T y células presentadoras de antígeno (principalmente macrófagos, y células dendríticas (Dekel *et al.*, 2010), para participar en el proceso de implantación realizando funciones específicas. Las células T, son cruciales en la tolerancia del embrión y la invasión del trofoblasto,

promoviendo la apoptosis del mismo y estimulando a otras células inmunes como macrófagos deciduales e inhibiendo la citotoxicidad de las células uNK.

Las células uNK muestran un fenotipo diferente a las células NK de sangre periférica, siendo más cito tóxicas; su número aumenta hasta un 70% del total de los leucocitos uterinos durante el embarazo, y se han visto involucradas en la remodelación de las arterias espirales en la formación de la placenta.

Después de la implantación del blastocisto, las células dendríticas son reclutadas al sitio de implantación, y son importantes para la inducción de inmunotolerancia materna, además de ser encargadas de regular la angiogénesis en la decidua. Los macrófagos deciduales pueden clasificarse como M1 o pro inflamatorios, y M2, o reguladores de la inflamación; el balance de ambas poblaciones es importante para la inmunotolerancia materna, remodelación tisular y angiogénesis (Yoshinaga., 2010; Lee et al., 2011).

## FUNCIONES DE LA INTERLEUCINA 1 BETA EN EL EMBARAZO

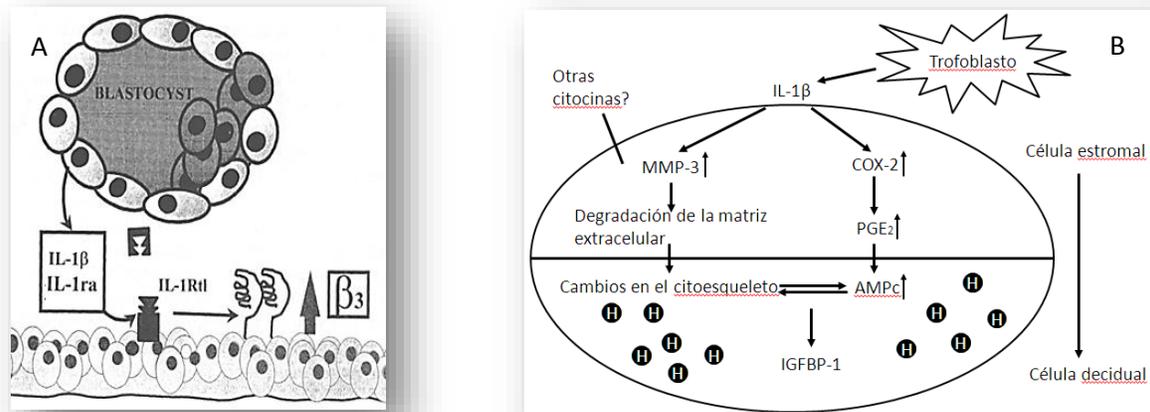
Cada una de las citocinas secretadas en la interfase materno- fetal tienen una función central durante la implantación, en particular la familia IL-1 producida principalmente por macrófagos y células dendríticas, por su papel primordial en la inflamación. Esta familia consta de dos agonistas: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; tiene 2 receptores conocidos como receptores IL-1 tipo I (IL-1R tI) y tipo II, así como un antagonista (IL-1Ra) y una proteína accesoria (IL-1RAcP). De los dos receptores, sólo IL-1R tI transduce la señal en respuesta a IL-1; su región intracitoplásmica muestra fuertes similitudes de secuencia con la región correspondiente de los receptores tipo toll (TLRs) identificados en mamíferos y otros vertebrados, por lo que este dominio se conoce como TIR (Toll- IL-1R). IL-1R tI se encuentra en baja concentración sobre casi todas las superficies celulares, mientras que IL-1R tII se expresa sobre los

leucocitos de la sangre y actúa como un competidor con el primero (Paulesu et al., 2008).

En humanos, la expresión de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1R tI está documentada en el endometrio en el transcurso del ciclo menstrual. IL-1 $\beta$  e IL-1R tI tienen máximos niveles durante la fase lútea y el periodo de implantación. En el sitio de implantación, ha sido detectada IL-1 $\beta$  particularmente en el trofoblasto veloso y extra veloso, así como en las células deciduales maternas (Paulesu et al., 2008).

Aunque ambos agonistas, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , han sido mostrados en tejidos reproductivos de diferentes especies animales, el papel de IL-1 $\beta$  está más claramente establecido que el de IL-1 $\alpha$  (figura 4). En ratones se ha detectado RNAm de IL-1 $\beta$  en células endometriales endoteliales en incremento desde el día 3, alcanzando su pico máximo entre los días 4 y 5 (Figura 4A; McMaster et al., 1993).

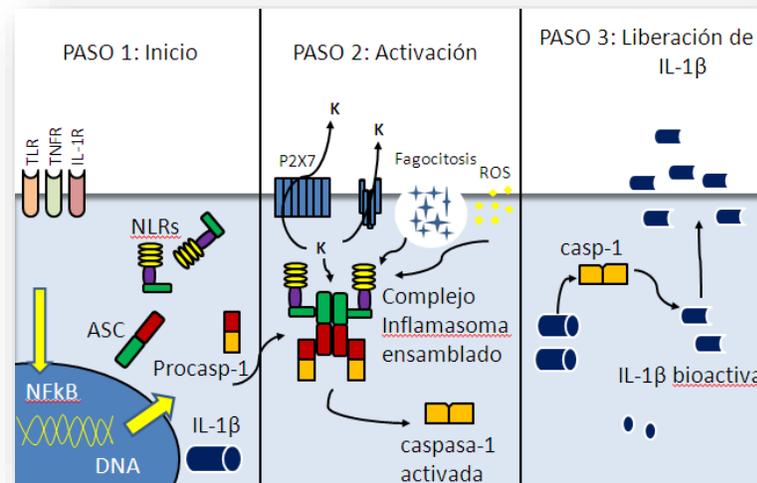
Existe un sinergismo entre la Gonadotropina Corionica humana, IL-1 $\beta$  y progesterona en la producción de cambios requeridos para la decidualización de células estromales (Paulesu et al., 2008). IL-1 $\beta$  induce la expresión de ciclo oxigenasa- 2 y la síntesis de prostaglandina E2, y en la presencia de hormonas esteroideas también induce la expresión de la proteína de unión al factor de crecimiento de la insulina 1(IGFBP-1) en fibroblastos estromales de humano, así como de pro MMP- 3 en fibroblastos estromales de mandril. Así, IL-1 aumenta los niveles de MMP-3, la cual en turno degrada la matriz extracelular, afectando la estructura del citoesqueleto (Figura 4B; Fazleabas et al., 2004). Se ha demostrado que la integrina  $\beta$ 3 está expresada sobre la superficie de las células epiteliales endometriales y está sobre regulada por la producción de IL-1 $\beta$  por parte del embrión, lo cual favorece la adherencia e implantación (Krüssel et al., 2003).



**Figura 4. IL-1 $\beta$  en la comunicación materno- embrionaria. A.** El blastocisto secreta IL-1 $\beta$  hacia el útero. La unión IL-1 $\beta$  con su receptor en el endometrio favorece la síntesis de factores de adherencia para el embrión (figura tomada de McMaster et al., 1993). **B.** La IL-1 $\beta$  favorece la decidualización de las células estromales induciendo la expresión de metaloproteasas y prostaglandinas, lo que promueve la degradación de la matriz extracelular y rearrreglos en el citoesqueleto, así como la síntesis de IGFBP-1, que promueve el cambio de fenotipo de la célula (Fazleabas *et al.*, 2004).

## PROCESAMIENTO DE INTERLEUCINA 1 BETA

La producción y secreción de IL-1 $\beta$  típicamente requiere de dos eventos separados: el primero es el reconocimiento de una señal externa, que estimula la producción de IL-1 $\beta$  y la maquinaria para su maduración. La segunda señal, que puede darse de manera interna en respuesta a la primera señal, tiene como objetivo activar la maquinaria de maduración de IL-1 $\beta$  mediante el procesamiento proteolítico por acción de las caspasas para generar la forma activa de la citocina, la cual no puede ser secretada hasta ser procesada. Al conjunto de proteínas que actúan para este fin se le conoce como complejo inflammasoma (Johnson *et al.*, 2007).



**Figura 5. Procesamiento de la IL-1 $\beta$ .** Paso1: un estímulo inicial activa la vía NFκB para la síntesis de las formas precursoras del complejo inflammasoma y de la proteína IL-1  $\beta$ . Paso 2: un segundo estímulo formará el complejo activando la caspasa 1. Paso 3: la enzima caspasa 1 activa la IL-1 $\beta$ , para posteriormente ser secretada (Johnson et al., 2007).

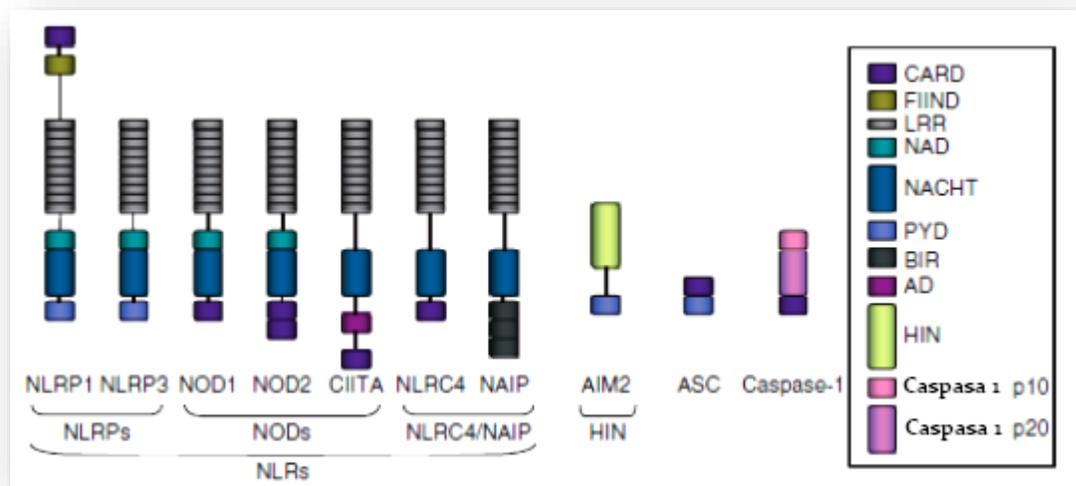
Los inflammasomas son complejos multiprotéicos intracelulares que median la activación de caspasa 1. La composición molecular de éstos, está dada por los receptores intracelulares llamados tipo NOD o NLRs (Receptores tipo NOD) (Benko *et al.*, 2008, Stutz *et al.*, 2009, Lamkanfi, 2011).

Los NLRs han sido identificados con base en su homología con las proteínas R en plantas, la cual es una gran familia involucrada en la resistencia a patógenos. Estos tienen una región C- terminal rica en leucina, un dominio central de oligomerización y una región N- terminal efectora que incluye el dominio pirina (PYD), dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) y la repetición de la proteína inhibidora de apoptosis del baculovirus (BIR) (Figura 5. Benko *et al.*, 2008; Tschopp y Schroder, 2010).

Los NLRs pueden ser ampliamente divididos en 2 grandes subfamilias: la familia NALP que comprende los 14 NALPs que contienen PYD, los cuales son llamados NLRP1-14. La segunda, conocida como subfamilia NOD/IPAF, incluye

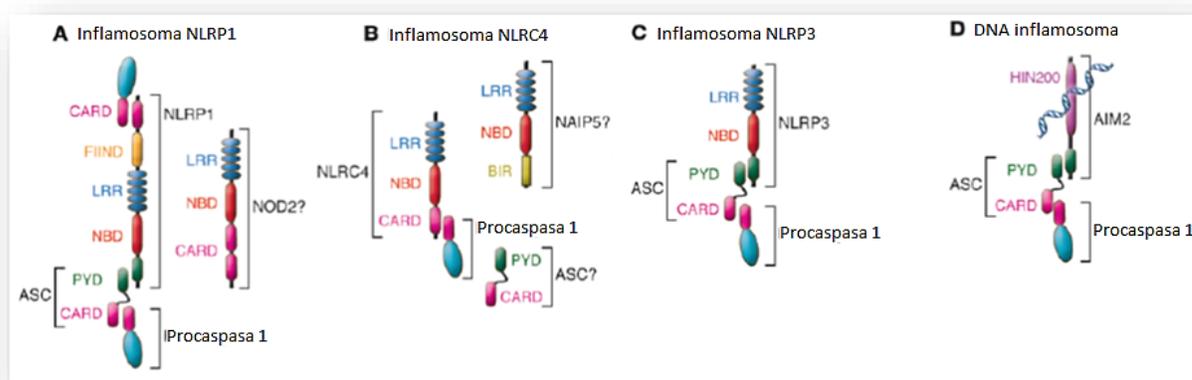
los 4 NODs- NOD1 (CARD4), NOD2 (CARD15), NLRC3 (NOD3), NLRC5 (NOD4) y NLRX1 (NOD9)- junto con CIITA (NLRA) y NLRC4 (también conocido como IPAF), los cuales únicamente tienen el dominio N- terminal CARD común a la mayoría de los NODs (Vasseur *et al.*, 2012).

Al igual que IL-1 $\beta$ , los NLRs involucrados en su maduración se encuentran presentes en el citoplasma de forma inactiva, hasta que un segundo estímulo induce cambios conformacionales que exponen su dominio de oligomerización, reclutando a proteínas adaptadoras mediante interacciones homotípicas entre sus dominios PYD, una de éstas se conoce como ASC (speck protein with CARD), que se compone de un dominio N- terminal PYD y un dominio C- terminal CARD; a través de éste último, ASC interactúa con el dominio CARD de la pro-caspasa 1, el brazo efector del complejo inflammasoma, que al hacer contacto con ASC será procesada a su forma activa: la enzima caspasa 1. Esta enzima escindirá pro-IL-1 $\beta$  a su forma madura, IL-1 $\beta$ . Sólo hasta su maduración la IL-1 $\beta$  puede ser secretada, sin embargo se ha reportado que en ausencia de este segundo estímulo, pequeñas cantidades de IL-1 $\beta$  son liberadas, aunque de manera muy lenta (Eder, 2009).



**Figura 6. Representación esquemática de los elementos del inflammasoma.** En el recuadro de la derecha se muestra el significado de las figuras y colores de los componentes de éstas proteínas (Guarda y So, 2010).

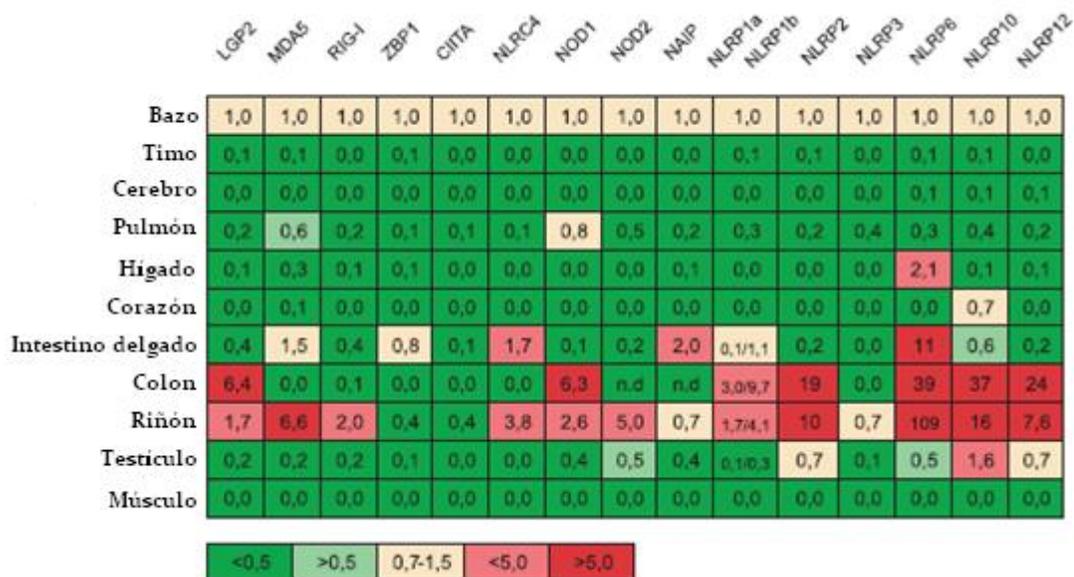
No todos los inflammasomas requieren a la proteína intermediaria ASC; NLRP1 y NLRC4 contienen CARD por sí mismos, y por tanto son capaces de reclutar directamente a la caspasa 1 (Guarda y So, 2010). De los NLRs existentes, sólo se han descrito 4 complejos inflammasoma en los cuales participan: NLRP1, ASC y caspasa 1 para formar el inflammasoma NALP1; NLRC4, NAIP1, NAIP 5 y caspasa 1 para formar el inflammasoma NLRC4; NLRP3, ASC y caspasa 1 para formar el inflammasoma NALP3; y AIM2, ASC y procaspasa 1 para formar el inflammasoma AIM2 (figura 7).



**Figura 7. Representación esquemática de los tipos de inflammasoma.** A) el complejo inflammasoma NLRP1, también conocido como NALP1, B) inflammasoma NLRC4, también llamado IPAF, C) inflammasoma NLRP3, también conocido como criopirina. E) Inflammasoma de DNA, conocido como AIM2 (Stutz et al., 2009).

## ANTECEDENTES

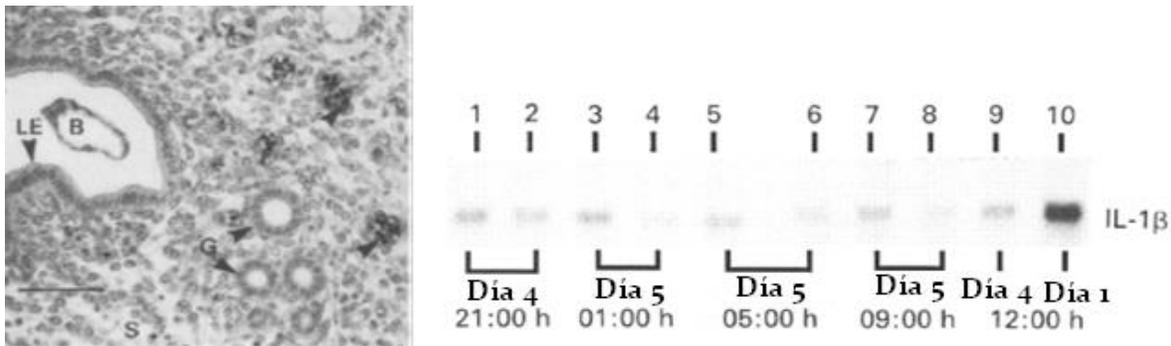
La presencia de receptores tipo NOD no se ha observado exclusivamente durante eventos inflamatorios, se ha reportado expresión basal de los genes que codifican para las proteínas NLR en los tejidos. Lech *et al.* (2010), investigaron los niveles de transcrito de los NLRs en distintos tejidos, tanto en humano como en ratón en ausencia de un estímulo infeccioso, encontrando que estos receptores intracelulares se expresan en diversos tejidos, y que puede estarse transcribiendo más de uno al mismo tiempo, como se muestra en la figura 8. A pesar de no existir un estímulo infeccioso, los órganos donde se observó mayor nivel de transcrito de los NLRs estudiados, fueron el intestino delgado, el colon y el riñón, mismos que se encuentran en contacto constante con los patógenos, es decir, el primer estímulo, sin embargo los componentes del inflamasoma se encuentran inactivos, esperando una señal de daño para activarse. Esto aseguraría una respuesta rápida de parte del hospedero.



**Figura 8. Niveles de expresión de los NLRs en diferentes tejidos murinos.** Niveles de expresión normalizados a 1.0 (bazo), en color verde se muestran los niveles por debajo de 1.0, mientras que en tonos rojos, los que están por arriba de 1.0 (Lech *et al.*, 2010)

Se han observado niveles significativos de expresión de IL-1 $\beta$  durante el ciclo estral de ratones hembra ICR de 8 a 10 semanas de edad, así como del receptor para IL-1 $\beta$  en el epitelio uterino (Lee *et al.*, 2005).

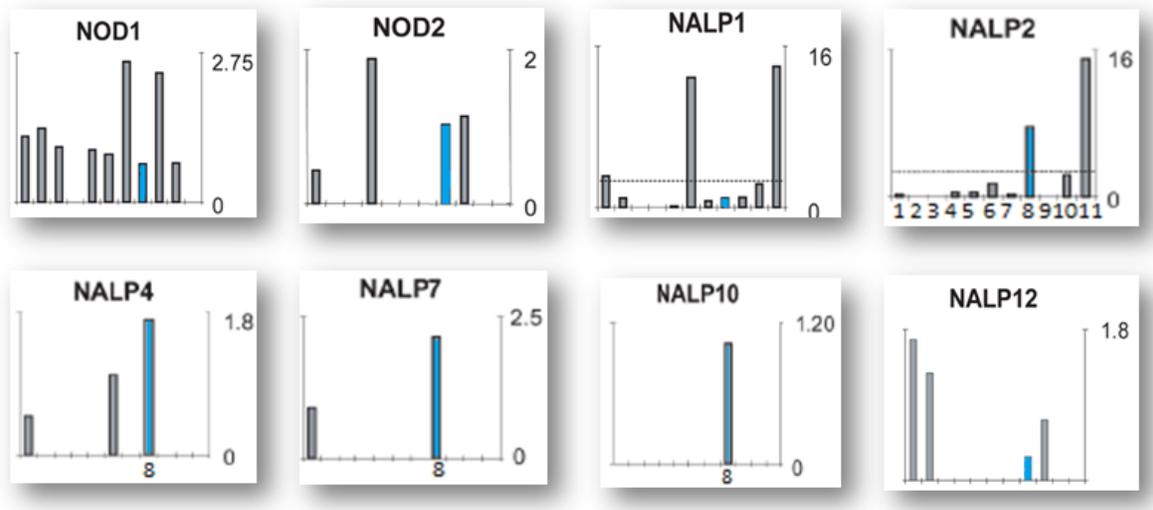
En la gestación murina, investigaciones iniciales mostraron la presencia de la proteína IL-1 $\beta$  únicamente durante el día 4.5 de gestación, sin embargo ensayos de Northern blot mostraron que en el día 5.5, aún existe transcripción de proIL-1 $\beta$  (Figura 9; McMaster *et al.*, 1993).



**Figura 9. Izquierda. Localización inmunohistoquímica de IL-1 $\beta$  intrauterina durante la implantación.** Los depósitos oscuros indican existencia de IL-1 $\beta$ . LE: epitelio luminal, B: blastocito, G: glándula, S: estroma endometrial. **Derecha. Análisis de northern blot del RNAm de IL-1 $\beta$ .** El RNA fue tomado de los sitios de implantación (1, 3, 5 y 7) y periimplantación (2, 4, 6, 8) en el endometrio en los primeros días de la implantación (McMaster *et al.*, 1993).

Estudios posteriores mostraron que el embrión pre implantación es capaz de sintetizar IL-1 $\beta$ , aunque ésta no es secretada al medio hasta el momento de hacer contacto con el lecho uterino.

Los primeros estudios en evidenciar la existencia de NLRs durante la preñez, se han realizado en placenta de ratas hembra infectadas y en grupos de embarazos a término (figura 10), donde se muestra que este tejido expresa constitutivamente NALP1, pero puede expresar NALP3 e IPAF de una manera inducible (Yin *et al.*, 2009). Sin embargo aún no se conoce qué papel podrían estar jugando estos NLRs al momento del parto, además, el hallazgo de éstas proteínas en un tejido no indica precisamente que se esté llevando a cabo un proceso inflamatorio.



**Figura 10. Expresión de NLRs en diferentes órganos.** En el eje de las X se muestran los diferentes tejidos que fueron analizados: 1) sangre, 2) médula ósea, 3) Vascular, 4) Corazón, 5) Cerebro, 6) Nódulo linfático, 7) Páncreas, 8) Placenta, 9) Bazo, 10) Timo, 11) Traquea; se resalta en azul la expresión de NLRs en la placenta.(Yin *et al.*, 2009).

Zhang *et al.* (2008) mostraron que distintos NLRs participan en la formación del blastocisto humano en diferentes estadios. Estudios *in-silico* mostraron también la presencia de NLRs en ratón, donde se observó que en el genoma del ratón existen repeticiones de ciertos NLRs expresados en humano, así como el hecho de que NLRP8 y 13 en humanos no tenían su equivalente en el ratón (Tian *et al.*, 2009). Por otro lado Abrahams (2011) fue el primero en evidenciar que en el primer trimestre del embarazo humano, las células del trofoblasto expresan los componentes del inflammasoma: Nalp1, Nalp3, ASC y caspasa-1, sin embargo no se conoce cuál complejo inflammasoma, o cuales NLRs podrían estar expresados en el proceso de implantación.

## **JUSTIFICACIÓN**

- Se ha descrito la presencia de diferentes miembros del complejo inflamasoma en diferentes estadios de la gestación en humanos, rata y cerdo, sin embargo no se conoce con precisión su participación durante la implantación embrionaria.
- En el presente trabajo se analizó en tejidos materno-fetales de ratón la expresión de moléculas participantes en la formación del complejo inflamasoma así como de las moléculas de la cascada de señalización inducidas por su activación.

## **PREGUNTA**

- ¿Los componentes del complejo inflamasoma se encuentra expresados durante la implantación embrionaria en el ratón?

## **HIPÓTESIS**

- Durante el período de implantación se encuentran expresados los componentes del complejo inflamasoma

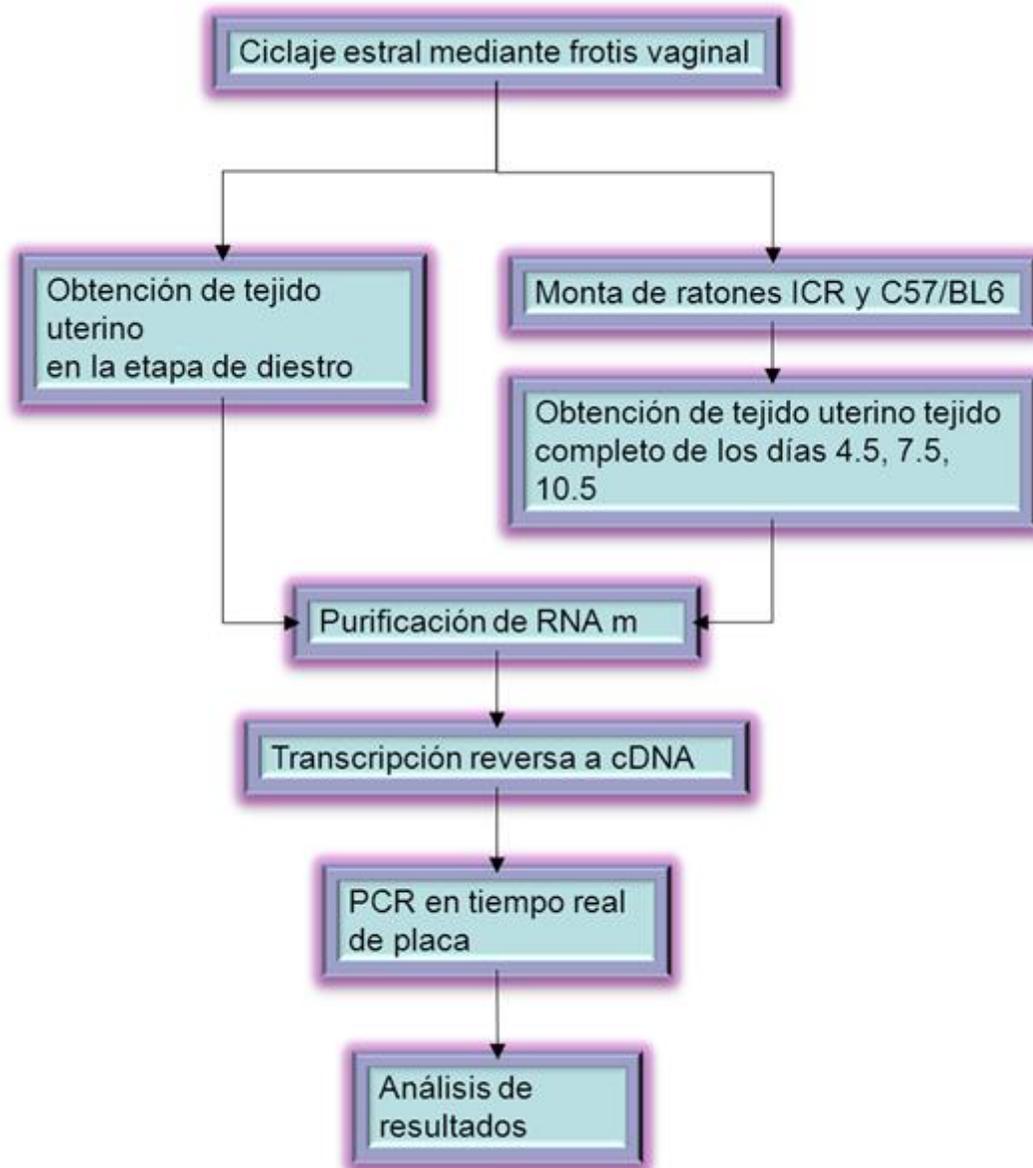
## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la expresión de los componentes complejo inflamasoma en distintas etapas de la implantación

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Analizar el perfil de expresión de RNAm de los componentes del complejo inflammasoma durante la implantación.
- Analizar el perfil de expresión de RNAm de moléculas que participen en la regulación del complejo inflammasoma.
- Analizar el perfil de expresión de RNAm de moléculas involucradas en la señalización río abajo del complejo inflammasoma.

## DISEÑO EXPERIMENTAL



## MATERIALES Y MÉTODOS

En la tabla 1 se muestran las cepas murinas utilizadas en este estudio:

Tabla 1:

CEPA	CARACTERÍSTICA
C57BL/6	Cepa singénica
ICR	Cepa abierta

### Determinación del ciclo estral de los ratones hembra e inducción de la preñez

Se realizaron frotis vaginales de los ratones hembra durante el ciclo estral para determinar en qué etapa se encuentran receptivas al macho, con el objetivo de asegurar su reproducción y mantener un control de los días de preñez. Para esto se tomaron 10ul de PBS 1x con una micropipeta y se introdujeron en la vagina del ratón hembra cuidando de no estimularlo en el proceso, inmediatamente después se extrajo el líquido junto con las células dentro de éste, para ponerlo en un portaobjeto y observarlo directamente al microscopio. Los ratones hembra que se encontraban en la etapa de estro fueron puestos a monta con los machos. Al siguiente día se evaluó el éxito de la preñez mediante observación de un tapón mucoso en la vagina, contando ese día como el día 0.5 de la preñez.

## **Localización del sitio de implantación y obtención de muestras**

Se tomó el tejido uterino junto con el fetal de los ratones hembra ICR preñados en los días post-coito 4.5, 7.5 y 10.5. Se utilizó tejido uterino de ratones hembra ICR sin preñar en el estadio estral de diestro como control. Para cada caso se trabajó con una n de 5 ratones hembra.

## **Aislamiento de RNAm**

Se realizó la purificación del RNAm de las muestras control y problema en los diferentes tiempos utilizando el reactivo Trizol (GIBCO). Brevemente, se añadió 1ml de Trizol a la muestra criogenizada para homogenizar en mortero, posteriormente se añadieron 200ul de cloroformo y se agitó la mezcla manualmente, se centrifugó a 12000 x g 15 minutos a 4 °C, se removió la fase acuosa para pasarla a otro tubo, al cual se le añadieron 500ul de isopropanol y se incubó por 10 minutos, después se centrifugó a 12000 x g 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 75% para después centrifugar a 7500 x g 5 minutos a 4 °C, se dejó secar la pastilla y se añadieron 50ul de agua inyectable.

## **RT-PCR**

Se hizo la síntesis de cDNA a partir de 3 ug de RNA total de las muestras y los controles utilizando la enzima transcriptasa inversa M-MLV RT de Invitrogen y siguiendo el protocolo propuesto por la hoja técnica para esta enzima. En un tubo Eppendorf para PCR se añadieron 1ul de oligo dT, 5ug de RNA, 1ul de dNTPs 10mM y agua destilada estéril y libre de pirógenos. Se calentó la mezcla a 65°C

por 5 minutos y se colocó inmediatamente en hielo, después se agregaron 4ul de buffer First- Strand 5X y 2ul de DTT 0.1M, para mezclar e incubar a 37°C 2 min. Se añadió 1ul de la enzima y se incubó por 50 minutos a 37°C. La reacción fue inactivada calentándola a 70°C por 15 minutos.

## Arreglos de PCR del complejo inflamasoma

El cDNA resultante del RT-PCR se diluyó 1:5 en agua libre de nucleasas y se preparó la reacción para la PCR utilizando el reactivo 2 X Super array RT2QPCR Master Mix, que contiene la enzima high-performance HotStart DNA Taq polimerasa, nucleótidos y el fluoróforo, del volumen total se tomaron 25ul para añadirlos a cada pozo de la placa y se metió la placa en el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, a las siguientes temperaturas: 95°C 10 minutos, 95°C 15 segundos, 30 ciclos de 60°C 1 minuto. Los datos obtenidos por el sistema se utilizaron para posterior análisis. La placa contiene los siguientes genes:

### Inflamasomas:

**AIM2:** *Aim2, Casp1, Pycard (Asc).*

**IPAF:** *Casp1, Naip1, Naip5, Nlrc4 (Ipadf), Pycard (Asc).*

**NLRP1:** *Casp1, Nlrp1a.*

**NLRP3:** *Casp1, Nlrp3, Pycard (Asc).*

### Genes involucrados en la regulación negativa del complejo

**inflammasoma:** *Bcl2, Bcl2l1, Cd40lg, Ctsb, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Hsp90b1, Mefv, Pstpip1, Sugt1, Tnf, Tnfsf11, Tnfsf14, Tnfsf4.*

### Genes involucrados en la señalización río abajo del complejo

**inflammasoma:** *Ifng, Il12a, Il12b, Il18, Il1b, Il33, Irak1, Irf1, Myd88, P2rx7, Panx1, Ptgs2, Stk30, Ripk2, Txnip.*

**NLRs:** *Ciita, Naip1, Naip5, Nlrc4, Nlrc5, Nlrp1a, Nlrp12, Nlrp3, Nlrp4b, Nlrp4e,*

*Nlrp5, Nlrp6, Nlrp9b, Nlr1, Nod2.*

**Genes involucrados en la señalización río debajo de los NLR:** *Birc2, Birc3, Card6, Casp8, Ccl12, Ccl5, Ccl7, Cflar, Chuk, Cxcl3, Cxcl1, Fadd, Ifnb1, Ikbkb, Ikbkg, Il6, Irf1, Irf2, Irf3, Map3k7, Tab1, Tab2, Mapk1, Mapk11, Mapk12, Mapk13, Mapk3, Mapk8, Mapk9, Nfkb1, Nfkb1a, Nfkbib, Pea15a, Rela, Ripk2, Sugt1, Tirap, Tnf, Traf6, Xiap, Casp1, Casp12.*

## RESULTADOS

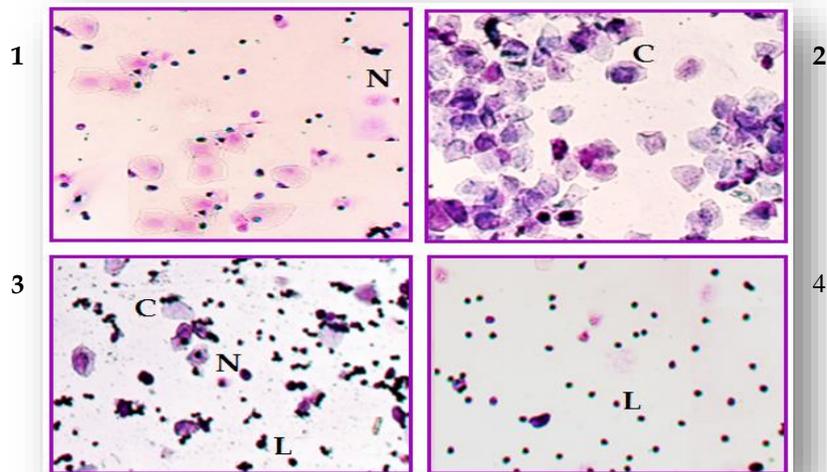
Mediante el análisis por frotis vaginal se identificaron las etapas del ciclo estral en el ratón hembra ICR que se describen a continuación:

**Proestro:** correspondió al día de pre- ovulación y en el microscopio fueron observadas células epiteliales nucleadas (Figura 11-1).

**Estro:** en esta etapa, la hembra se encontró receptiva al macho; las células del frotis vaginal fueron de tipo epiteliales escamosas cornificadas, sin núcleo observable (Figura 11-2)

**Metaestro:** el frotis vaginal mostró una mezcla en los tipos celulares, predominantemente leucocitos (Figura 11-3)

**Diestro:** En esta etapa, el frotis mostró predominantemente la población de leucocitos (Figura 11- 4).



**Figura 11. Citología del ciclo estral del ratón hembra:** 1.Proestro, 2. Estro, 3. Metaestro, 4. Diestro. C: células cornificadas, N: células nucleadas, L: leucocitos (10X, tinción violeta de genciana).

A partir del conocimiento del ciclo estral de los ratones hembra, se procedió a la monta con los machos C57/BL6 y obtención de muestras de los días correspondientes para estudios de arreglos RT- PCR en placa. Mediante análisis

matemáticos aplicados a los Cts de los genes, se obtuvieron los valores de expresión utilizando los genes endógenos *Gd3ph*, *Gapdh*, *Actb*, *Gusb* y *B2m* para obtener la expresión génica normalizada ( $2^{(-\Delta Ct)}$ ) de los genes de cada uno de los tiempos, éstos datos fueron posteriormente divididos por la expresión génica normalizada de la muestra control para obtener datos de cambio de expresión o “fold change”. Posteriormente se obtuvieron los datos de regulación en la expresión génica o “fold regulation” utilizando como valores de sobre-regulación, los valores positivos del análisis de “fold change”, y como valores de sub-regulación, el inverso de los valores negativos obtenidos del análisis “fold change”. El programa RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis arrojó datos mostrando con números negativos aquellos genes que mostraron una sub expresión y con números positivos los que muestran un sobre-expresión en comparación con el grupo control, correspondiente a hembras no embarazadas y en diestro. Los datos se agruparon en: componentes del complejo inflammasoma, proteínas involucradas en la regulación negativa, proteínas de señalización río abajo del complejo inflammasoma y proteínas de señalización río debajo de los NLRs (Figura 12).



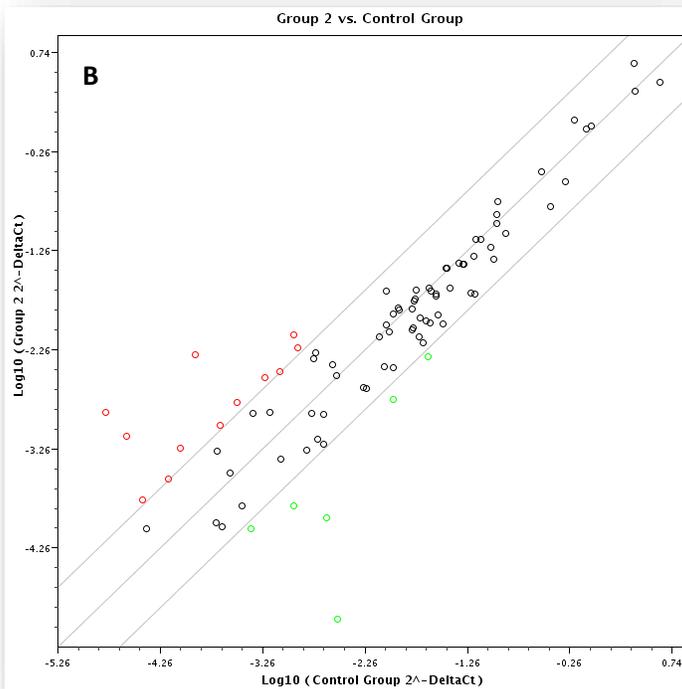
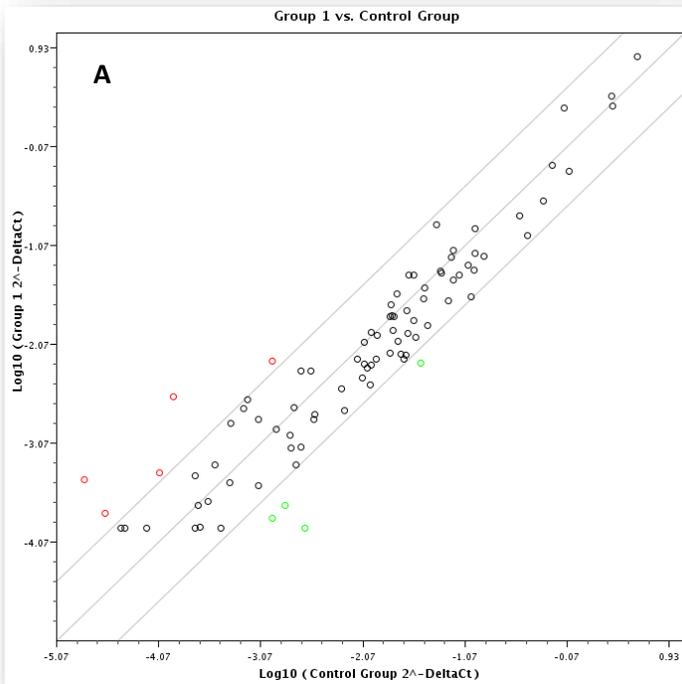
que tuvieron una mayor expresión comparada con el control mientras los que se encuentran por debajo de ella, los que tuvieron una menor expresión representados por puntos verdes.

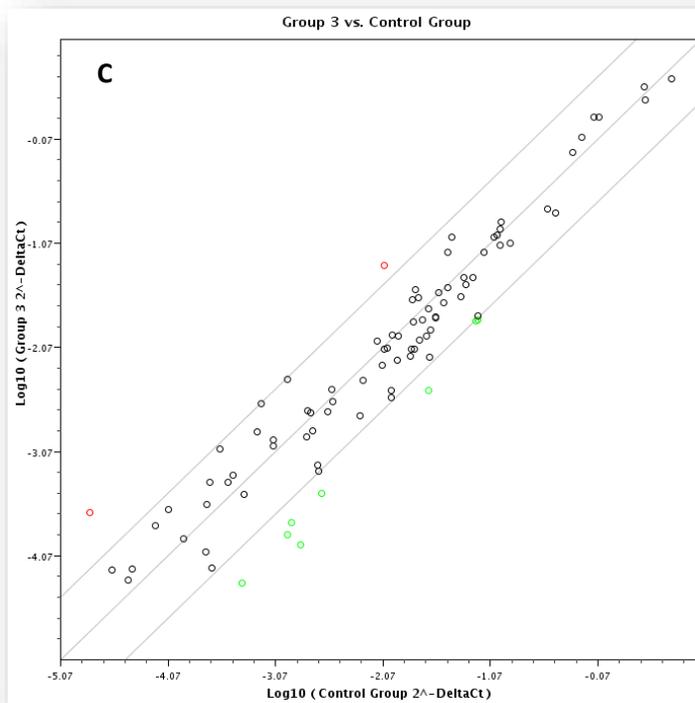
La figura 13 A muestra el diagrama scatter plot, comparando los perfiles de expresión del grupo 4.5l contra el control. Los genes con un perfil de expresión significativamente mayor al grupo control son los genes codificados para los NLRs *Ciita* y *Nlrp4e*, *Ifnb1*, *Il12b*; aquellos con un bajo perfil de expresión son *Mapk8*, *Naip1*, *Nlrp5* y *Nlrp6*, y la proteína pirina codificada por *Mefv*.

Al comparar el grupo 7.5 contra el control se observa una mayor cantidad de genes sobre- expresados como de sub- expresados. Los genes que codifican para los NLRs *Ciita*, *Nlrp4b*, *Nlrp4e*, *Nlrp9b* y *Nod2*, así como la quimiocina *Cxcl3*, las citocinas *Ifnb1*, *Il12b*, *Il6*, y *Tnfsf11* y *Mefv*, que mostraron sobre- expresión, mientras que el regulador negativo *Card6*, las proteínas de señalización *Irf4*, *Myd88*, y *P2rx7*, así como los NLRs *Naip1* y *Nlrp5* fueron sub- expresados (Figura 13 B).

Al realizar la misma comparación con el día 10.5 los resultados fueron los siguientes: *Nlrp4e* y *Pstpip1* fueron sobre expresados; *Bcl2*, *Casp12*, *Irf4*, *Naip1*, *Nlrp5*, *Nlrp6*, *P2rx7* y *Tnfsf11* fueron sub- expresados (Figura 13 C).

Lo anterior muestra que el perfil de expresión en el periodo de implantación, el tiempo en el que se observan los mayores niveles de RNAm comparados con el control, es el día 7.5, para después disminuir en el día 10.5.





**Figura 13. Scatter plot de los tiempos de implantación vs el control.** Los diagramas muestran los genes de los distintos tiempos comparados con el control, en verde aquellos que fueron sub expresados y en rojo los sobre expresados. **A.** Comparación del día 4.5 con diestro. **B.** Comparación del día 7.5 con diestro. **C.** Comparación del día 10.5 con diestro.

Aquellos genes que mostraron una mayor expresión con respecto al control son mostrados en un gráfico de barras. En cada una de las gráficas se toman como significativos aquellos valores que se encuentran por arriba de 1 y por debajo de -1. Las gráficas de barras fueron agrupadas en componentes del complejo inflamasoma, proteínas involucradas en la regulación negativa, Proteínas de señalización río abajo del complejo inflamasoma y Proteínas de señalización río debajo de los NLRs:

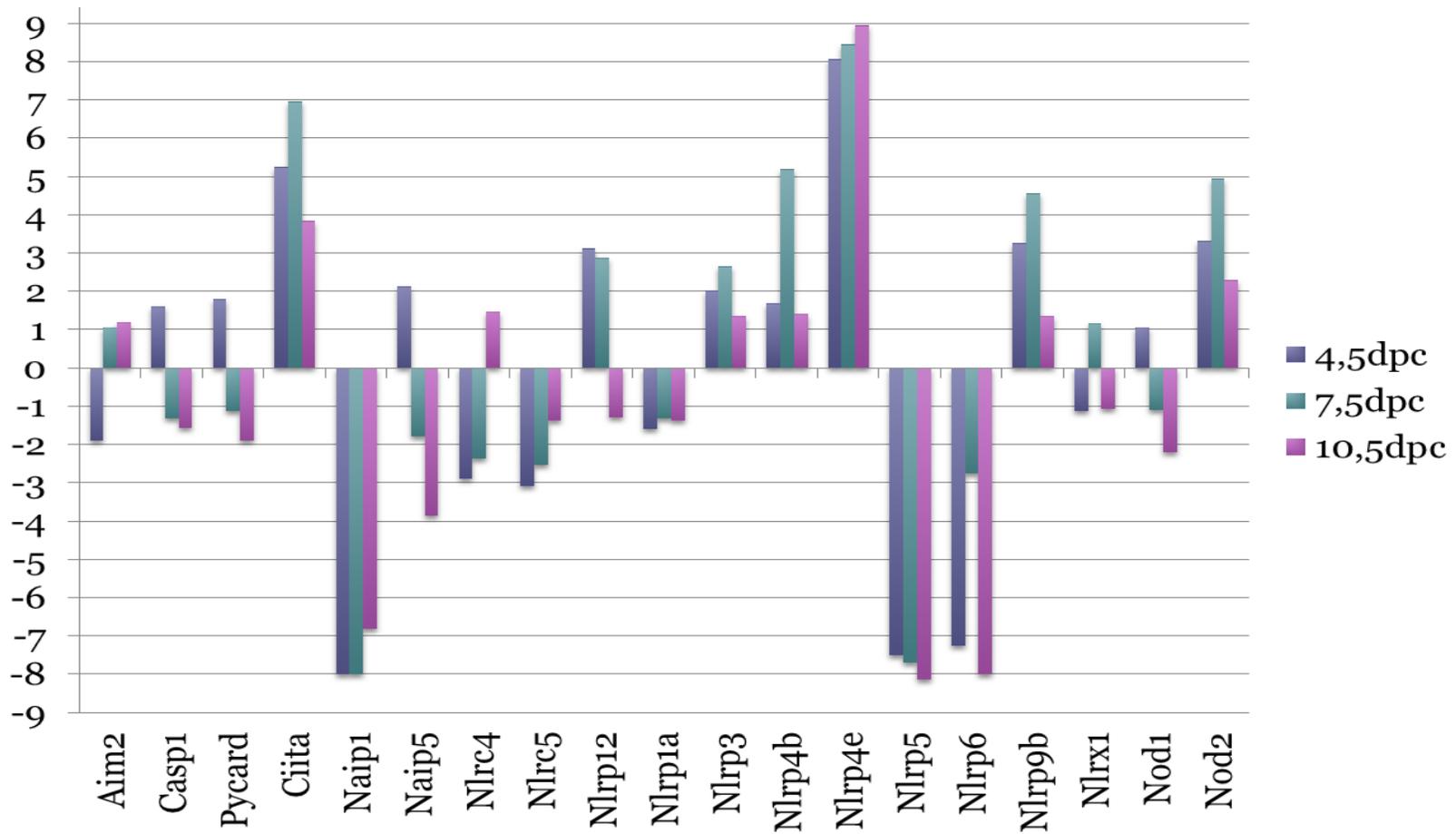
**Análisis de la expresión de miembros del complejo inflamasoma:** lo primero que se observa en la figura 14 es que existe expresión diferencial de los componentes del complejo inflamasoma con respecto al control, estas diferencias

se observan cuando menos en uno de los 3 tiempos en cada caso; los NLRs que muestran mayor expresión en los 3 tiempos son *Ciita* y *Nlrp4e*, seguidos de *Nod2*, *Nlrp3* *Nlrp4e* y *Nlrp9b*, mientras que aquellos NLRs que tuvieron una menor expresión en los 3 tiempos comparados con el control son *Naip1*, *Nlrp5* y *Nlrp6*, seguidos por *Nlrc5* y *Nlrp1a*.

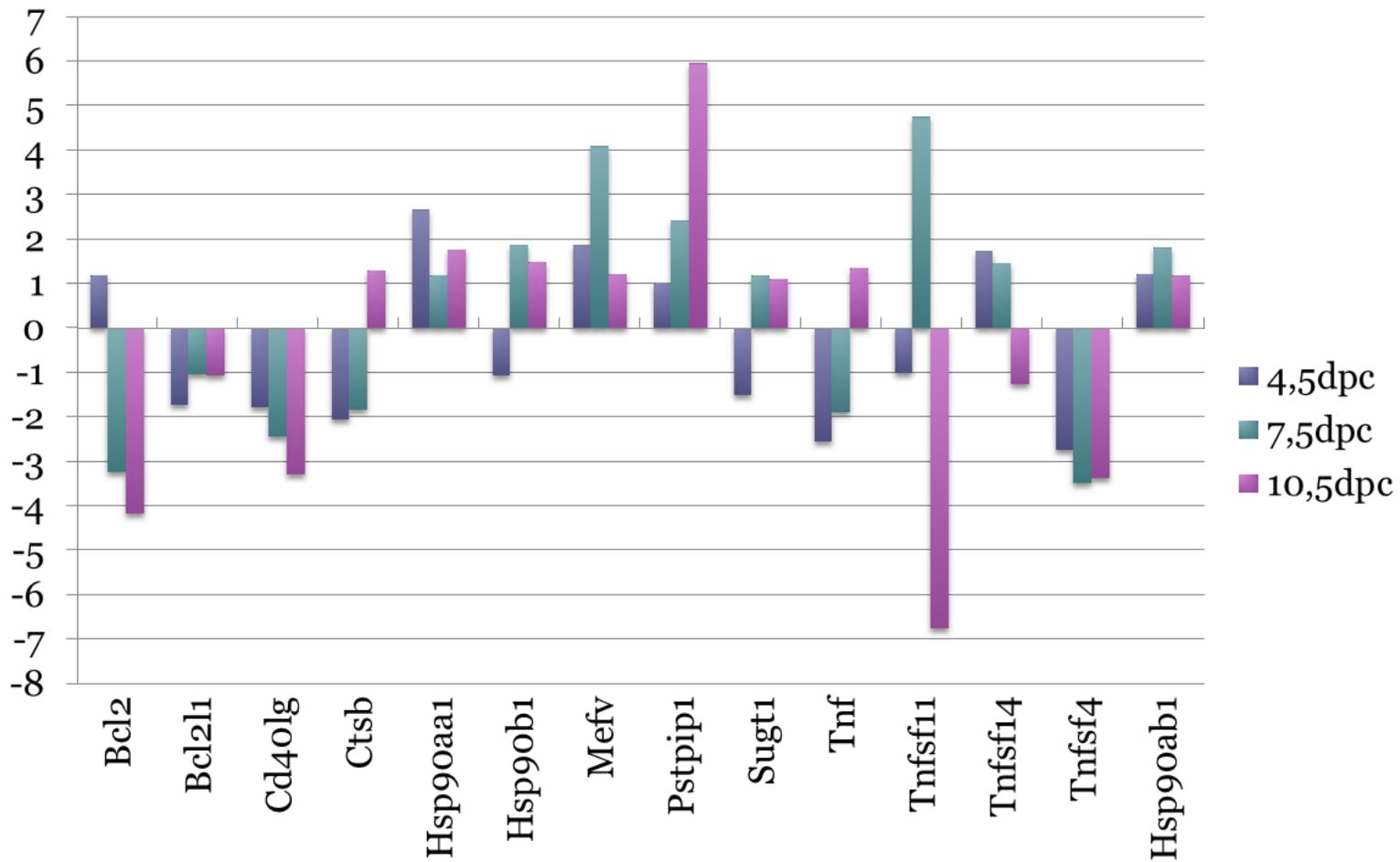
**Análisis de la expresión de las proteínas involucradas en la regulación negativa:** en la figura 15 se muestran aquellos genes que codifican para proteínas involucradas en la regulación negativa del complejo inflammasoma; aquellas que mostraron una expresión significativa durante los 3 tiempos en este estudio son: *Hsp90aa1*, *Hsp90ab1*, *Mefv* y *Pstpip1*, mientras que aquellas que mostraron sub-expresión significativa en los 3 tiempos son: *Bcl2l1*, *Cd40lg* y *Tnfsf4*; de igual manera, las demás proteínas de éste grupo no son requeridas en todos los tiempos estudiados durante la implantación: *Bcl2* únicamente tiene una sobre-expresión significativa en el día 4.5, para después ser regulado, *Ctsb* permanece reprimido hasta el día 10.5, al igual que *Tnf*; *Hsp90b1* y *Sugt1* son expresadas a partir del día 7.5 al 10.5, por último *Tnfsf14* es expresada en los días 4.5 y 7.5.

**Análisis de la expresión de las proteínas de señalización río abajo del complejo inflammasoma:** en la figura 16 se muestran las proteínas relacionadas río abajo con el complejo inflammasoma o con su activación, de éstas, las que muestran sobre- expresión significativa en los 3 tiempos son: *IL-12a*, *IL-12b* e *IL-1b*, mientras que *Ptgs2*, muestra expresión los días 7.5 y 10.5, e *Irak 1* se sobre-expresa únicamente en el día 7.5, los demás genes muestran sub- expresión con respecto al control: *Ifng*, *IL-18*, *IL-33*, *Irf1*, *Myd88*, *P2rx7*, *Stk30* y *Txnip* se encuentran regulados durante la implantación.

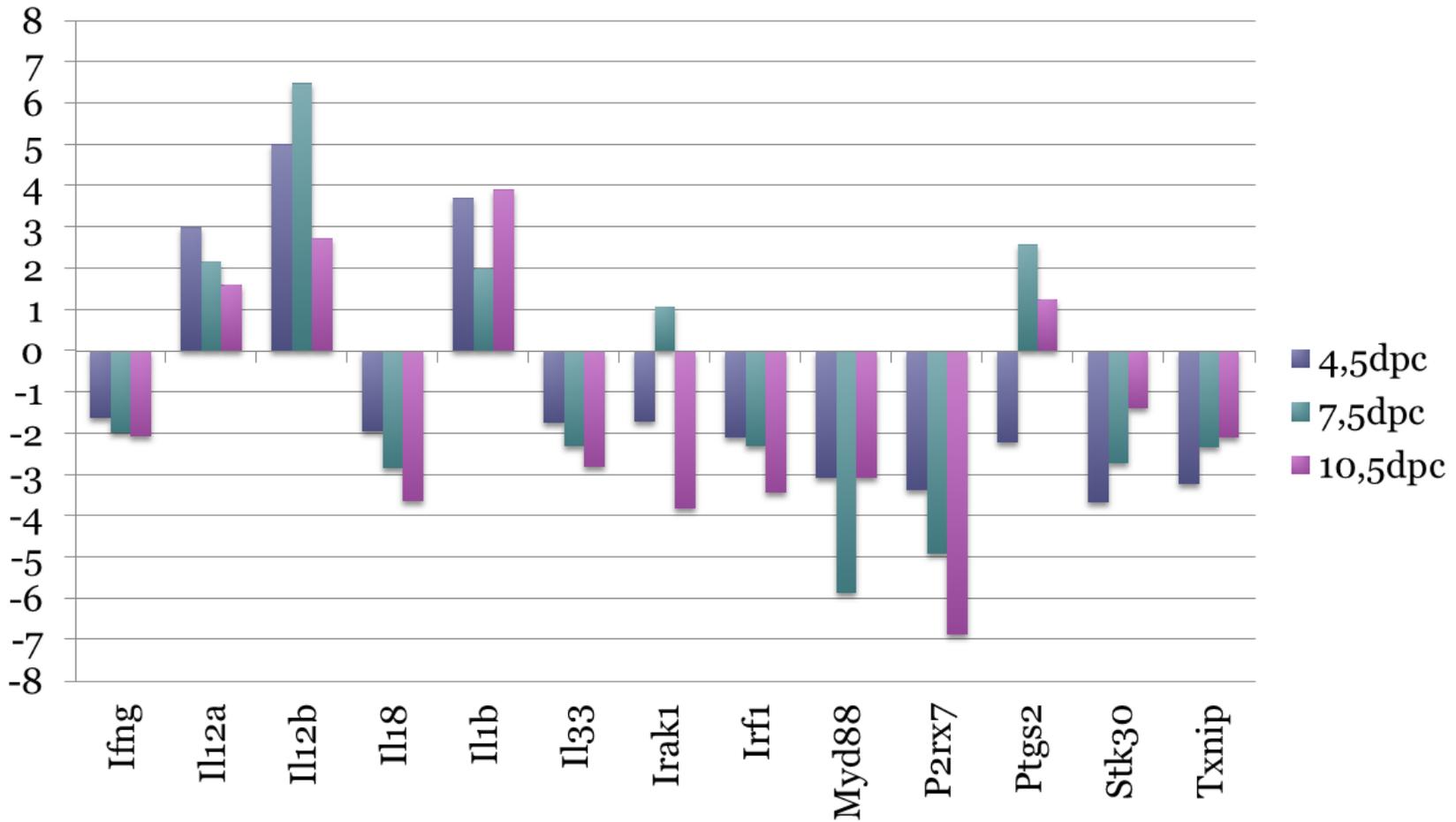
**Análisis de la expresión de las proteínas de señalización río debajo de los NLRs:** debido a que, en la activación del complejo inflamasoma se requieren 2 señales, fueron divididas las proteínas de señalización involucradas en la señal 1 y la señal 2, en la figura 17 se muestran agrupadas aquellas expresadas o reprimida durante la señal 1 de expresión de los NLR; es en éste grupo donde mayores niveles de sobre expresión o sub expresión se observan, como es el caso de *Card6*, cuya sub expresión se da en los 3 tiempos, sin embargo en el día 7.5 la expresión baja hasta aproximadamente -280, mientras que *Ifnb1*, que es la proteína que mayor expresión mostró en los días 4.5 y 7.5, llega a niveles de 21 a 40 respectivamente. Aquellas que muestran sobre expresión en los 3 tiempos son: *Cxcl3* y *Nfkbib*; *Ccl7* se sobre expresa en los días 4.5 y 10.5, mientras que *Cxcl1*, *Il6* y *Tab2* se expresan en los días 7.5 y 10.5; *Casp8* se expresa en el día 4.5, *Fadd* en el día 7.5; *Map3k7*, *Pea15a* y *Tnf* se expresan únicamente en el día 10.5. Aquellos que muestran una subexpresión en los 3 tiempos son: *Birc3*, *Cflar*, *Ikbkb*, *Irf1*, *Irf3*, *Mapk8*, *Tirap*, *Traf6* y *Xiap*.



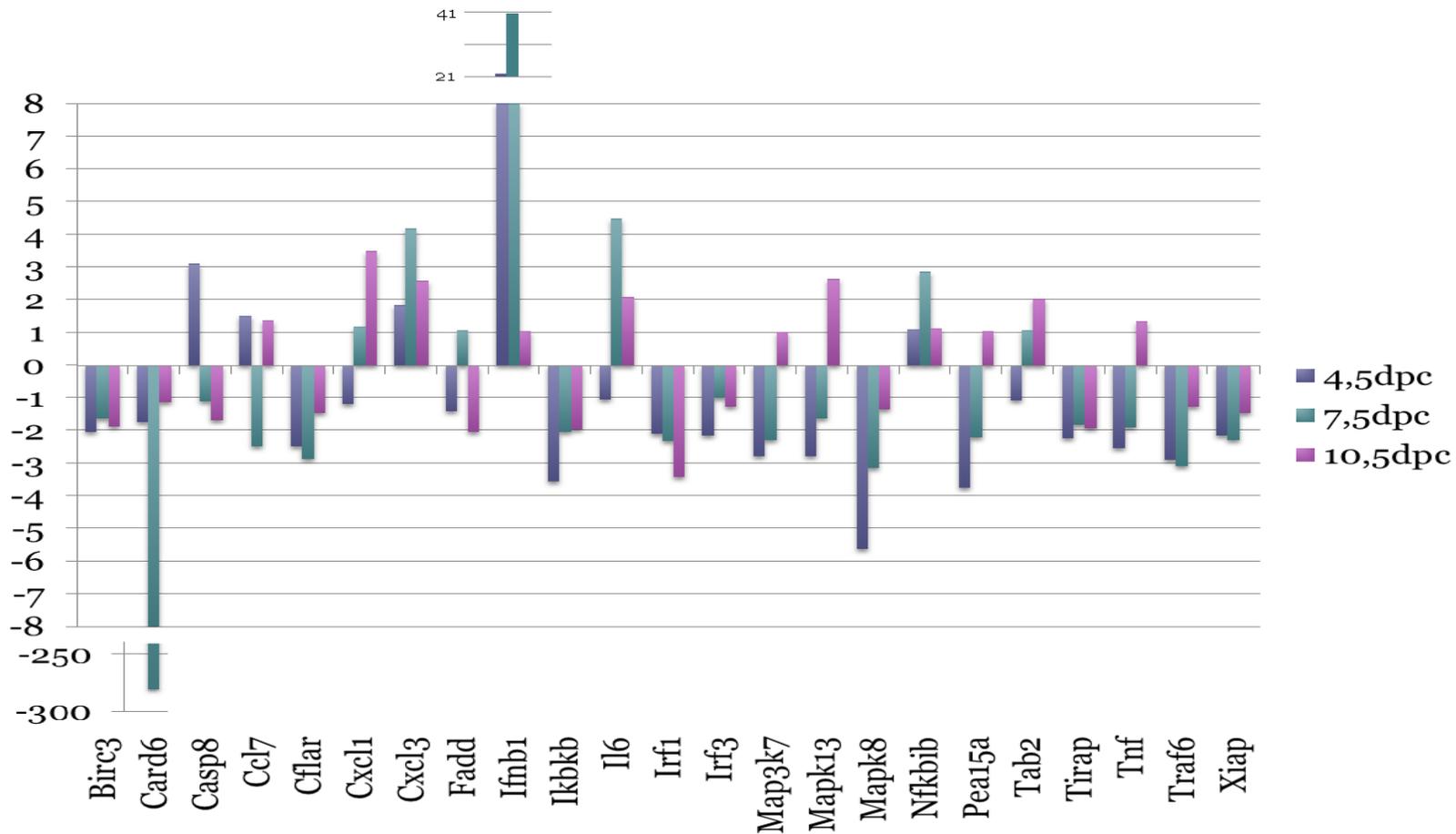
**Figura 14. Componentes del inflammasoma.** La gráfica muestra los NLRs analizados en el estudio, así como los componentes del complejo inflammasoma, aquellos valores por arriba o por debajo de 1 y -1 se consideran significativos, los colores correspondientes a los tiempos se muestran del lado derecho.



**Figura 15. Proteínas involucradas en la regulación negativa** La gráfica muestra las proteínas involucradas en la regulación negativa del complejo inflammasoma analizados en el estudio, aquellos valores por arriba o por debajo de 1 y -1 se consideran significativos, los colores correspondientes a los tiempos son: azul para el tiempo 4.5, verde para el tiempo 7.5 y rosa para el tiempo 10.5.



**Figura 16. Proteínas de señalización río abajo del complejo inflammasoma.** La gráfica muestra las proteínas participantes en la señalización río abajo del complejo inflammasoma analizados en el estudio, aquellos valores por arriba o por debajo de 1 y -1 se consideran significativos, los colores correspondientes a los tiempos son: azul para el tiempo 4.5, verde para el tiempo 7.5 y rosa para el tiempo 10.5.



**Figura 17. Proteínas de señalización río debajo de los NLRs.** La gráfica muestra las proteínas participantes en la señalización río debajo de los NLRs analizados en el estudio, aquellos valores por arriba o por debajo de 1 y -1 se consideran significativos, los colores correspondientes a los tiempos son: azul para el tiempo 4.5, verde para el tiempo 7.5 y rosa para el tiempo 10.5.

## DISCUSIÓN

Se ha reportado que los receptores NLR sensan señales del medio ambiente o del interior de la célula para activar maquinarias moleculares involucradas en apoptosis, ciclo celular e inflamación. Debido al antecedente inflamatorio mostrado durante el embarazo, particularmente en la implantación, el enfoque de este estudio fue primordialmente inflamatorio. El análisis de los perfiles de expresión de los genes involucrados con los componentes del complejo inflamasoma mostraron un panorama general de lo que podría estar sucediendo en cada uno de los tiempos estudiados en la implantación, para que suceda o no la formación de alguno, o varios de los complejos inflamasoma descritos hasta la fecha.

Los antecedentes dan un indicio de que el complejo inflamasoma podría estar presente en el procesamiento de IL-1 $\beta$ , al hallarse esta proteína en tejido uterino durante el ciclo estral y a partir de la implantación hasta el final del embarazo, en la interfase materno- fetal. Otros estudios muestran que esta proteína también es sintetizada por el ovocito en el periodo pre implantación. Paulesu *et al* (2008) menciona que “particularmente IL-1 $\beta$  es uno de los factores parácrinos modulando la comunicación entre el embrión humano pre- implantación e implantación y el útero materno”, y hace la hipótesis de que ésta proteína podría estarse produciendo en el útero de manera basal, y al recibir las señales del embrión, se dispararía su expresión dando como resultado el fenotipo mostrado por las células estromales, lo que favorece la implantación.

En el embrión murino pre- implantación también se han hallado NLRs, lo que, junto con el antecedente de expresión de IL-1 $\beta$  de parte de este, podría indicar que el complejo inflamasoma estuviera participando en el procesamiento de IL-1 $\beta$  en el embrión pre- implantación, sin embargo aún no existe un estudio que muestre la expresión y actividad del complejo inflamasoma en esta condición.

Debido a que la etapa de Diestro es el término del ciclo estral, y antecedentes de Lee *et al* (2005) muestran que es en ésta etapa cuando se da la expresión más baja de IL-1 $\beta$ , se decidió utilizar este tiempo como control en este estudio.

Al realizar los análisis de los perfiles de expresión génica en diferentes tiempos, comparándolos con Diestro, sí se observan diferencias con respecto al control, y es particularmente en el tiempo 7.5 donde mayores diferencias hay, al compararlo con los tiempos 4.5 y 10.5, lo cual entra en conjunción con lo descrito por Yoshinaga (2010), ya que es en éste tiempo en el que se da la invasión del blastocisto y la fagocitosis de las células epiteliales por el trofoblasto.

Con base en los datos obtenidos de los análisis, los antecedentes de éste estudio y la literatura, se puede obtener un panorama general de las proteínas y vías involucradas en la síntesis y regulación del complejo inflamasoma en los diferentes tiempos de implantación. Debido a que en este estudio se está considerando la participación de dos integrantes: el embrión y el útero materno, este análisis comenzará con el primero.

En cada uno de los tiempos estudiados, los NLRs expresados son *Nlrp3*, *Nlrp4b*, *Blrp4e*, *Nlrp9*, *Naip5* y *Nlrp12*; de éstos últimos únicamente NLRP12 y NLRP3 son reportados como componentes de inflamasomas, mientras que NLRP4e, NLRP4b y NLRP9b han sido descritos en estudios anteriores, como específicos de embriones murinos pre implantación (Zhang *et al.*, 2008), en donde se han reportado como partícipes del proceso de maduración y segmentación del ovocito más allá del estadio de 2 células (falta referencia), por lo que se deduce que en éste modelo podrían ser parte del embrión en implantación. En este estudio se muestran expresados en los 3 tiempos, sin embargo hasta el momento no se ha reportado su posible importancia fisiológica durante el embarazo.

Las proteínas que son procesadas por el complejo inflamasoma son IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33: IL-18 se sintetiza de manera inactiva como un precursor de 23 KDa, caspasa 1 la escinde a su forma madura de 18KDa, proteína que es secretada de manera dependiente de ATP vía el receptor P2x7. Ésta proteína puede aumentar

la citotoxicidad de las células NK, aumentando su producción de IFN $\gamma$ , e induciendo quimiotaxis de monocitos. (Volin y Koch., 2011). IL-33, no tiene un sitio de corte típico para caspasa 1, como lo tienen IL-18 e IL-1 $\beta$ , es bioactiva incluso sin corte por caspasa y es liberado por células necróticas (Nakae *et al.*, 2013). Ambas citocinas se encuentran sub- expresadas en todos los tiempos, mientras que IL-1 $\beta$  se encuentra sobre- expresada de manera significativa en los 3 tiempos; esto indica que únicamente estarán expresados aquellos NLRs que formen inflamomas que escindan pro- IL-1 $\beta$  a su forma madura.

Según lo reportado por Paulesu *et al* (2004), es en las células estromales del endometrio murino donde se da el reclutamiento de células inmunes en el proceso de decidualización. Con base en esta información se deduce que el resto de genes expresados se ubican en esta área. Debido a la expresión de proIL-1 $\beta$  encontrada tanto en la literatura (De los Santos *et al.*, 1996), como en los resultados de éste estudio, y el antecedente de la posible ubicación de los NLRs en el embrión, por eliminación se deduce que el inflamoma que podría estar expresado, y probablemente activo en el útero durante todo el proceso de implantación, sería el inflamoma NLRP3, el cual está conformado por el receptor NLRP3, el intermediario ASC y la enzima caspasa 1. Éste inflamoma es activado por diversos estímulos como pueden ser: ligandos TLR y/o ATP, mediados por eflujo de potasio intracelular, liberación de las reservas de Ca intracelular y por actividad de proteincinasas, así como cristales de urato monosódico y especies reactivas de oxígeno intracelular (Ogura *et al.*, 2006). Los resultados encontrados en este modelo concuerdan con Abrahams (2011), que reporta el inflamoma NLRP3 activo en células de trofoblasto de primer trimestre de embarazo.

Aunque no tiene las características comunes de un NLR, Aim2 también forma un complejo inflamoma, sin embargo ésta proteína no es un NLR, a diferencia de la estructura proteica de ésta familia, Aim2 contiene un dominio HIN200 y un dominio pirina que recluta ASC y activa caspasa 1 ante estímulos principalmente de dsDNA citosólico (Miao *et al.*, 2011). En este modelo, *Aim2* tiene expresión

significativa a partir del día 7.5, que es cuando el trofoblasto está fagocitando células del estroma uterino, también se da la fusión de células embrionarias y maternas, así como el reconocimiento de embrión, por lo que es posible que éste inflamasoma se pudiera estar activando por el reconocimiento de DNA embrionario, por un mecanismo aún desconocido.

La proteína Pirina codificada por el gen *Mefv*, y *Pstpip1* fueron tomados como reguladores negativos por la empresa Qiagen, sin embargo al investigar en la literatura la función de estas proteínas, se encontró que la proteína pirina interactúa con el intermediario ASC, formando el inflamasoma de pirina, mientras que *Pstpip1*, proteína relacionada con el citoesqueleto, y pirina formaban trímeros e interactuaban entre sí, además, mutaciones en *Pstpip1* aumentaba la formación de éste inflamasoma, por lo que se pensó que *Pstpip1* inhibía la formación del inflamasoma de pirina, al interactuar con ésta e inhibir su unión a ASC. Posteriormente se especuló que PSTPIP1 no inhibía, sino que activaba a pirina para la formación de este complejo, pero se encontró que pirina no es secuestrada de su interacción con ASC por interacción de PSTPIP1, y no requiere PSTPIP1 para interactuar con ASC, en realidad ésta proteína se une a ASC para formar el inflamasoma de Pirina, y recluta a *Pstpip1* al complejo (Waite *et al.*, 2009), sin embargo hasta este momento no se han reportado las condiciones fisiológicas que activen éste inflamasoma, o la razón para el reclutamiento de *Pstpip1*, de hecho, la formación de éste inflamasoma, se ha reportado exclusivamente en fibroblastos, donde se reporta la expresión de *Pstpip1*, relacionada con rearrreglos en el citoesqueleto. Durante el proceso de implantación se da conjuntamente, la decidualización de las células estromales, en las cuales se da, junto con el cambio en el fenotipo, rearrreglos en su citoesqueleto, que les da la forma redondeada. Dado que en las gráficas se observa la expresión de *Pstpip1* y *Mefv* durante los 3 tiempos, se deduce que ambas proteínas pueden estar expresadas en las células deciduales, y que podrían estar formando complejo inflamasoma.

Los NLRs NOD1 y NOD2 se homodimerizan y mediante sus dominios CARD reclutan a la proteína RIPK2, conduce a la activación de la vía NFKB. Ambas

proteínas se han visto expresadas en placentas humanas el primer trimestre de embarazo en el citotofoblasto y sincitiotrofoblasto (Abrahams, 2011), sin embargo en este estudio únicamente Nod2 se encuentra expresado durante la implantación, mientras que Nod1 sólo se expresa en el día 4.5. La señalización celular dependiente tanto de nod1 como de Nod2, requiere de las proteínquinas RIPK2 y TAK1 para activar la vía NFκB. Otra proteína que interactúa con éstas es Sugt1 (Sgt1), que actúa como regulador positivo de la activación de Nod1 en epitelios. Se ha reportado que Sugt1 y la proteína Hsp90 forman un complejo con Nod1 y Nod2; ambas proteínas (Hsp90 y Sugt1) son encargadas de mantener la concentración de éstos NLRs constante en la célula (da Silva Correia *et al.*, 2007); lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, donde inicialmente Nod1 y Nod2 son sintetizados (en el día 4.5), pero en el día 7.5 Nod1 es regulado, poniendo en marcha la síntesis de Hsp90 y Sugt1, los cuales actúan como chaperonas de Nod1 principalmente y probablemente de Nod2 .

Ciita es el NLR que posee una expresión significativa en los 3 tiempos; a pesar de que este NLR no forma complejo inflammasoma, su importancia durante la implantación consiste en que es un factor de transcripción que regula de manera negativa la expresión del MHC tipo II, lo cual se da durante toda la implantación y parte del embarazo; así, Sgt1 participa en la expresión del MHC tipo I, que se encuentra expresado en el embarazo (Inostroza- Nieves *et al.*, 2012).

NLRP12 es un NLR que se expresa en neutrófilos y células dendríticas, forma complejo inflammasoma junto con ASC y caspasa 1 ante el estímulo de *Yersinia pestis*; por sí solo posee un efecto inhibitorio sobre la vía no canónica de activación de NFκB. Se ha reportado que potencia la migración de células dendríticas hacia nodos linfáticos (Arthur *et al.*, 2010), por lo que en este modelo, se especula que NLRP12, que se encuentra significativamente expresada durante los 3 tiempos estudiados, podría estar regulando la vía no canónica de NFκB, así como la migración de células dendríticas hacia la decidua.

CARD6 es una proteína que interactúa con el citoesqueleto, su expresión es fuertemente inducida por IFNβ. Ésta proteína aumenta la activación de NFκB

mediada por interacción con Nod1, Ripk2 y NLRP1 (Dufner *et al.*, 2008). En este modelo sin embargo, existe una considerable expresión de IFN $\beta$  en los 3 tiempos, mientras que Card6 está subexpresada; al parecer la expresión de ambas moléculas es inversamente proporcional, principalmente en el día 7.5; al estar subexpresada esta proteína no puede interactuar con Nod1 y Ripk2, por ende la vía NF $\kappa$ B no se amplifica, sino que se mantiene regulada; al mismo tiempo, se observa que Nlrp1a, otra proteína con la que interactúa Card6, se encuentra subregulada. Se ha reportado en la literatura que la proteína encargada de ésta regulación es Bcl-2 (Denes *et al.*, 2012), la cual se expresa en el día 4.5. Este modelo también muestra la expresión de Nlrp1 en los días 7.5 y 10.5, que a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) amplifica la vía de señalización de NF $\kappa$ B y de las MAPK (Tattoli *et al.*, 2008), esto muestra que en este modelo, la expresión de los componentes del complejo inflamasoma está regulada a través de las vías NF $\kappa$ B y MAPK, y da la noción de que en este modelo pudieran existir especies reactivas de oxígeno.

Según Tschopp y Schroder (2010) la generación de ROS es frecuentemente acompañada por un eflujo de potasio, lo cual actúa como retroalimentación a la producción de especies reactivas de oxígeno, esto ocurre cuando las partículas fagocitadas por el sincitiotrofoblasto son demasiado grandes para ser eficientemente eliminadas, causando la producción de ROS en su paso hacia lisosomas, donde podrían llegar a causar la ruptura del organelo. Carta *et al.* (2009) mencionan que ante un estímulo (por PAMPs), la célula podría pasar por dos etapas: la primera, en la que la célula entraría en estrés oxidativo, y la segunda, en la que se da una respuesta antioxidante. Los TLRs y NOD2 serían los encargados de la producción de NOX (NADPH oxidasa), que es potencialmente el principal productor de ROS, En la segunda etapa, proteínas como TRX reducirían el estrés oxidativo intracelular.

La proteína TXNIP inhibe la actividad reductasa de TRX, formando un enlace disulfuro entre el sitio activo de TRX y TXNIP. El incremento en los complejos TXNIP-TRX resultará en proteínas más oxidadas sobre exposición al estrés

oxidativo, por lo que su disociación puede indicar una disminución del mismo. Cuando TXNIP se disocia de TRX, se promueve la interacción de la primera con NLRP3, lo cual promueve la formación del inflamasoma y la producción de IL-1 $\beta$  (Spindel *et al.*, 2012). En este modelo, en ninguno de los 3 tiempos se observa un nivel considerable de RNAm de TXNIP, por lo que se infiere que esta proteína no está siendo necesitada para la regulación de TRX; si existiera estrés oxidativo en las células uterinas, principalmente en el día 7.5, TRX estaría estabilizando las ROS, al disociarse con TXNIP, el cual se estaría uniendo a NLRP3 para formar el complejo inflamasoma.

BCL-2 y BCL-X<sub>L</sub> han sido reportados como reguladores negativos del inflamasoma NLRP1; Ambas proteínas interactúan con NLRP1, bloqueando su capacidad de unión de ATP y su oligomerización (Denes *et al.*, 2012; Michels *et al.*, 2013). En este estudio, Bcl-X<sub>L</sub> se encuentra bajo regulado en los 3 tiempos, mientras que Bcl2 está expresado únicamente en el día 4.5, sin embargo la regulación negativa ejercida por Bcl2 se da a nivel post- traduccional, lo que no explica la sub- expresión de Nlrp1, por lo que se necesita investigar otros posibles reguladores negativos para este NLRP.

IRF3 es activado por receptores de dsRNA citosólicos (RIG-1 like receptors o RLRs) ante la infección por un virus (Tarassishin *et al.*, 2011). A falta del estímulo apropiado, el gen IRF 3 se encuentra sub- expresado en este modelo.

IFN $\gamma$  activación es precedida por señalización de IFN tipo 1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) e involucra interacciones con células dendríticas. En ratones, IFN tipo 1 son expresados desde el estadio de 2 células, y en el trofotodermo pre implantación del blastocisto. A mitad del embarazo IFN $\gamma$  es detectado en las células gigantes del trofoblasto. IFNGR1 e IFN .IFN $\gamma$  endometrial fue detectada en muestras de ratones normales en el día de gestación 6.5, y se observó un aumento de 4-6 veces para el día 10, luego declinó. En ratones, IFN $\gamma$  promueve fagocitosis por células del trofoblasto como un mecanismo para adquisición fetal de hierro y otros sustratos nutricionales, previos a desarrollo placentar. Células del trofoblasto de ratón son resistentes a apoptosis activada por IFN $\gamma$ . ni las células de trofoblasto de

humano ni de ratón expresan MHC tipo II. Esto es atribuido al silenciamiento de la expresión de *ciita*, el regulador maestro de la transcripción constitutiva e inducible por IFN $\gamma$  de MHC II (Murphy *et al.*, 2009). Los IFN tipo 1 inhiben la producción de IL-1 por 2 distintos mecanismos: 1) Señalización IFN tipo 1 en el mecanismo dependiente del factor de transcripción STAT1, reprimió la actividad de los inflammasomas NLRP1 y NLRP3, inhibiendo la producción de IL-1 $\beta$ . Ésta señalización indujo la expresión de IL-10 de una manera dependiente de STAT1; la producción de IL-10 autocrina a través de la activación del factor de transcripción STAT3 redujo la abundancia de proIL-1 $\alpha$  y proIL-1 $\beta$  (Choubey y Moudgil, 2011)

Caspasa 12 es inducida por la citocina proinflamatoria IFN $\gamma$  en fibroblastos murinos y no ocurre con IFN $\alpha$  o  $\beta$ . Su procesamiento ocurre durante la apoptosis inducida por el estrés del RE (Lamkanfi *et al.*, 2004)

CD40LG cuando es presentado a los macrófagos, funciona en conjunto con la señalización de IFN $\gamma$  para sobre regular la síntesis de CD40 y TNFR y su reclutamiento a la superficie celular. (Jeffries y Sawalha, 2011), En este modelo, la proteína no se encuentra expresada en ningún tiempo, por lo que relacionado con la expresión de TNF, indica que el receptor se encuentra expresado y localizado en la superficie celular.

Tnf $\alpha$  se ha reportado sobreexpresado en el utero murino pre y peri implantación, mientras que su expresión es limitada durante el embarazo; TNF $\alpha$  no es requerido para la implantación normal (Chaouat *et al.*, 2007). Cuando un miembro de la superfamilia TNF se une a un receptor, induce el reclutamiento de 2 ubiquitin ligasas, TRAF2 y cIAP1, y la unión de una molécula adaptadora, TRADD, lo que lleva a la activación de la vía extrínseca de la apoptosis, en la cual se sintetiza pro-caspasa 8, la cual es activada por el complejo DISC (Bao y Shi, 2007). Caspasa 8 puede cortar proIL-1 $\beta$  en el mismo sitio que caspasa 1 en respuesta a la estimulación por TLR, o posterior al tratamiento de macrófagos con LPS (Denes *et al.*, 2012). En este estudio, miembros de la super familia TNF se encuentran expresados a partir del día 4.5 al día 7.5 (Tnfsf14), en el día 7.5 (TNFSF11) y en el

día 10.5 (*Tnf*), mientras que la proteína caspasa 8 es producida en el día 4.5, probablemente por estímulo de TNFSF14, mientras que Fadd exclusivamente en el día 7.5. Lo anterior concuerda con lo observado en los antecedentes, donde en el día 4.5 existe apoptosis por parte del útero murino, mientras que en el día 7.5 ésta debe ser regulada por Fadd.

La síntesis de Xiap está controlada a niveles transcripcional y traduccional, mientras que cIAP1 y cIAP2 están reguladas por factores de transcripción inducibles por estrés. XIAP es el único IAP capaz de inhibir directamente caspasas (Phillipps y Hurst, 2012). cIAP1 y cIAP2 son reclutadas al TNFR por interacciones con TRAF-1 y 2, los cuales se unen directamente a TNFR. Se ha mostrado que cIAP puede contribuir a la inhibición de caspasas 3 y 7 pero no caspasa 1 (Yi y Ming, 2000), por el contrario, éstas proteínas potencian la formación del complejo inflammasoma mediante poliubiquitinación de caspasa 1 (Labbé *et al.*, 2011). XIAP podría modular la transcripción dependiente del supresor de NFκB (Galbán y Duckett, 2010). cIAP1 y cIAP2 modulan la señalización del receptor de muerte por interacción con los TRAFs en TNFR. XIAP contiene 3 dominios BIR (baculovirus internal repeat). BIR1 facilita la unión de XIAP a TAB1, mediando la activación de NFκB. En contraste, los dominios BIR2/BIR3 median la unión de XIAP a proteínas que tienen un motivo de unión a IAP, incluyendo caspasas activas (Kaufmann *et al.*, 2012).

En este estudio se observa que existe una sub expresión de IL-1R y MyD88 de esta misma manera es reclutado IRAK1 por medio de sus dominios TIR, este se une a TRAF6, el cual interactúa con TAK1 y eventualmente forma un complejo macromolecular con TAB1 y TAB2. Esto lleva a la activación de TAK1, la cual en turno activa las vías de NFκB y MAPK (Gottipati *et al.*, 2008)

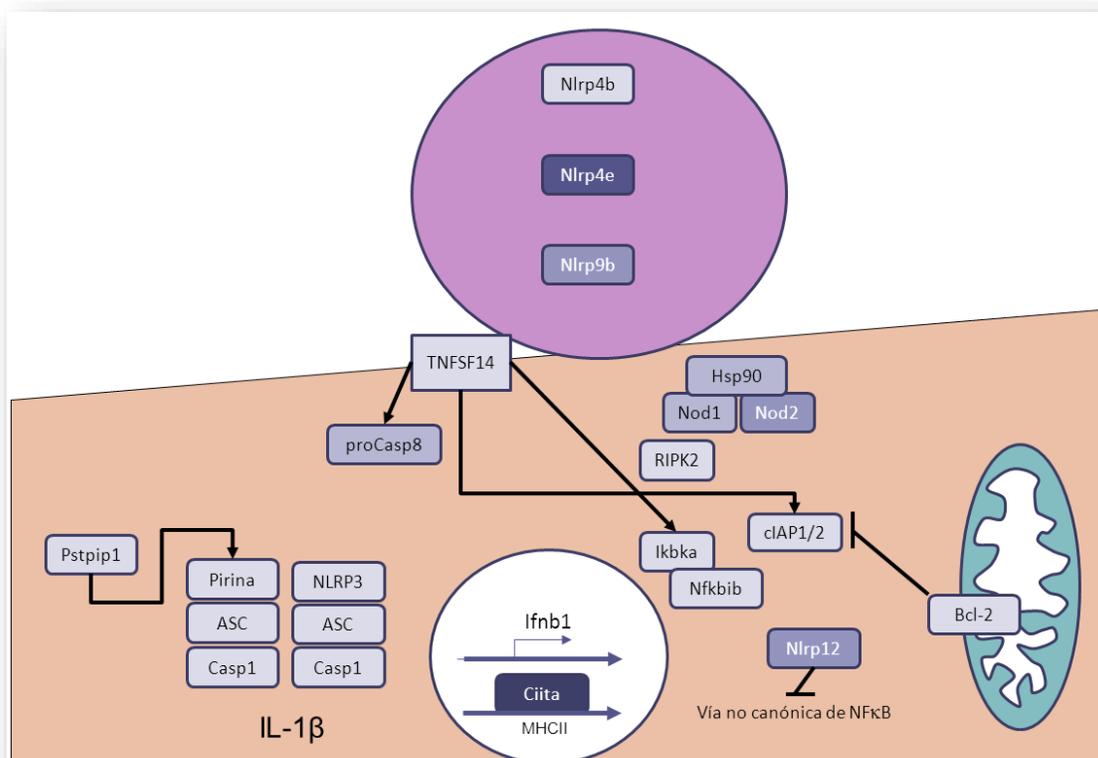
NFκB es regulado a través de la activación del receptor por una variedad de estímulos como LPS, estrés oxidativo, exposición a la radiación y citocinas específicas, particularmente IL1β y TNFα. La activación del receptor para IL1β y TNFα estimula la vía clásica para la fosforilación de dos serinas en IκB por IκB cinasa compuesta de 2 unidades catalíticas, Iκkα e Iκkβ y la subunidad reguladora

Ikk $\gamma$  (Geisert *et al.*, 2012). TAB2 es una proteína adaptadora que une señales de TGF $\beta$ R y TRAF hacia TAK1. TAK1 es un miembro río arriba de la superfamilia MAPK que sirve como integrador pivote de señales unidas a membrana producidas por TGF $\beta$  IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF y RANKL (Liu *et al.*, 2009) NEMO puede regular la comunicación entre diferentes vías, como aquellas inducidas por NF $\kappa$ B, MAPK y apoptosis, esto es, en células dendríticas de humano (Ma *et al.*, 2011) NF $\kappa$ BIA o I $\kappa$  $\alpha$ - Activación de NF $\kappa$ B ocurre vía degradación de I $\kappa$  $\alpha$ , un proceso que es iniciado por su fosforilación por el complejo cinasa I $\kappa$ B. Subsecuentemente, el dímero NF $\kappa$ B entra al núcleo y regula la transcripción de numerosos genes blanco, incluyendo I $\kappa$  $\alpha$ , estableciendo un asa de retroalimentación negativa. En embriones de ratón, la activación de NF $\kappa$ B es crucial para permitir el desarrollo más allá del estadio de 2 células. NF $\kappa$ BIA RNAm se acumula, no es traducido en el ovocito en crecimiento y es almacenado hasta la remisión de la meiosis (Paciolla *et al.*, 2011) El complejo IKK consiste en 2 cinasas catalíticamente activas, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , y una proteína reguladora de andamiaje: IKK $\gamma$  (NEMO). IKK $\beta$  suprime la secreción de IL-1 $\beta$ . Señalización por CD40 activa las vías canónica y no canónica de NF $\kappa$ B (Hayden y Ghosh, 2011). La baja regulación de Bcl-2 atenúa la activación de NF $\kappa$ B porque la degradación mediada por Bcl-2 del inhibidor citoplásmico I $\kappa$ B $\alpha$  es esencial para la activación de NF $\kappa$ B. (Sasi *et al.*, 2009).

Con base en el anterior análisis, se puede tener un panorama general de lo que puede estar sucediendo en cada uno de los tiempos de este estudio:

En el día 4.5 se dan las primeras interacciones entre el embrión y el útero murino. De parte de ambos se da una comunicación basada en señales moleculares como TNF $\alpha$ , IL-1B, etc. En este estudio, NLRP4b, 4e y 9b forman parte del embrión, probablemente asistiendo en su desarrollo, mientras que éste podría estar secretando al medio TNFSF14, cuyo receptor activa la vía canónica de NF $\kappa$ B para sintetizar las moléculas que participarán durante la implantación. Nod1 y Nod2 se unen a Hsp90 para activar a RIPK2, que servirá como co- activador junto con TNFSF14; cIAP1/2 se verá regulada negativamente por acción de Bcl-2. El NLR Ciita actúa como represor del MHC- II, mientras que NLRP12 inhibe la activación

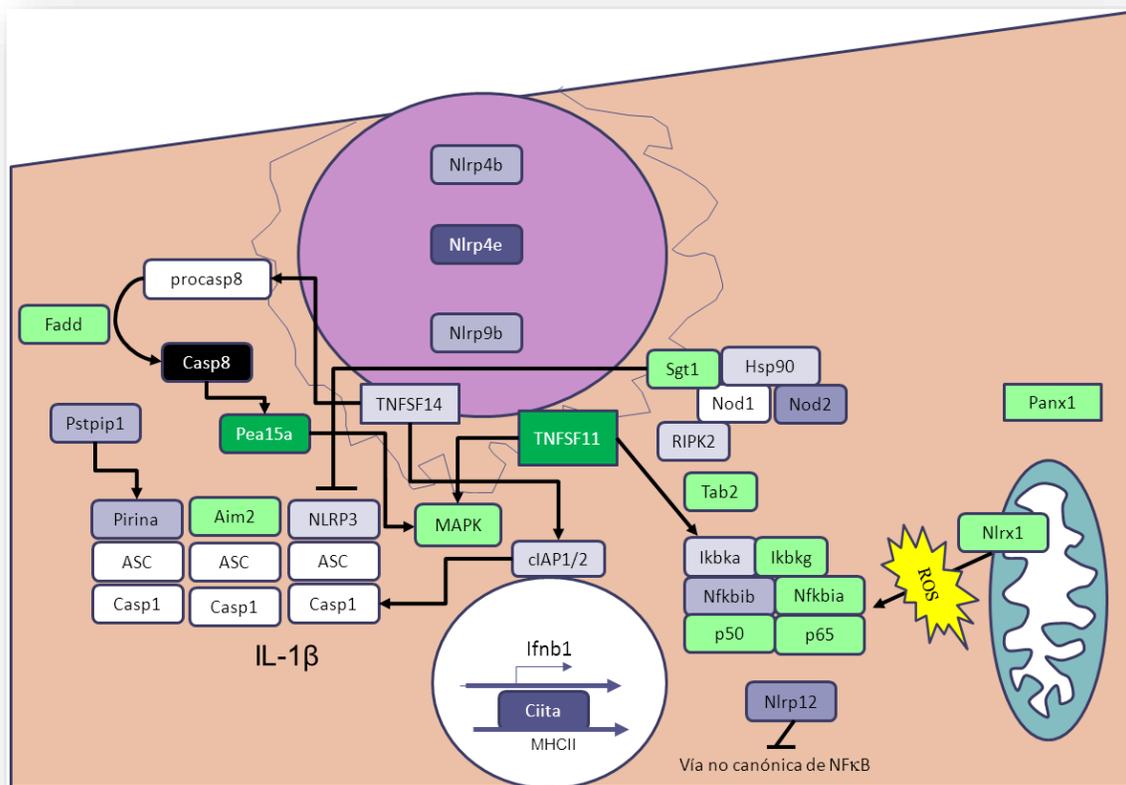
de la vía canónica de NFκB. Los inflammasomas formados durante éste tiempo son el inflammasoma NLRP3 y el inflammasoma de pirina, activado por Pstpip1. En este tiempo es probable que exista producción de ROS por parte de las células estromales, debido a los cambios en su fenotipo, lo cual podría actuar como segunda señal para la formación de estos inflammasomas.



**Figura 18. Panorama inflamatorio en el día 4.5 de implantación en el ratón hembra.** El esquema muestra las proteínas participantes en la señalización río debajo de los NLRs analizados en el estudio, aquellos valores por arriba o por debajo de 1 y -1 se consideran significativos, los colores correspondientes a los tiempos son: azul para el tiempo 4.5, verde para el tiempo 7.5 y rosa para el tiempo 10.5; las diferentes tonalidades simbolizan el grado de expresión: mayor expresión equivale a una tonalidad más oscura mientras que menor expresión, a una tonalidad más clara.

En el día 7.5 se da la principal interacción del embrión con el útero, el trofoblasto fagocita células uterinas y se da el reconocimiento del embrión por el útero materno. En este tiempo se da la expresión de Fadd, que mediante la formación

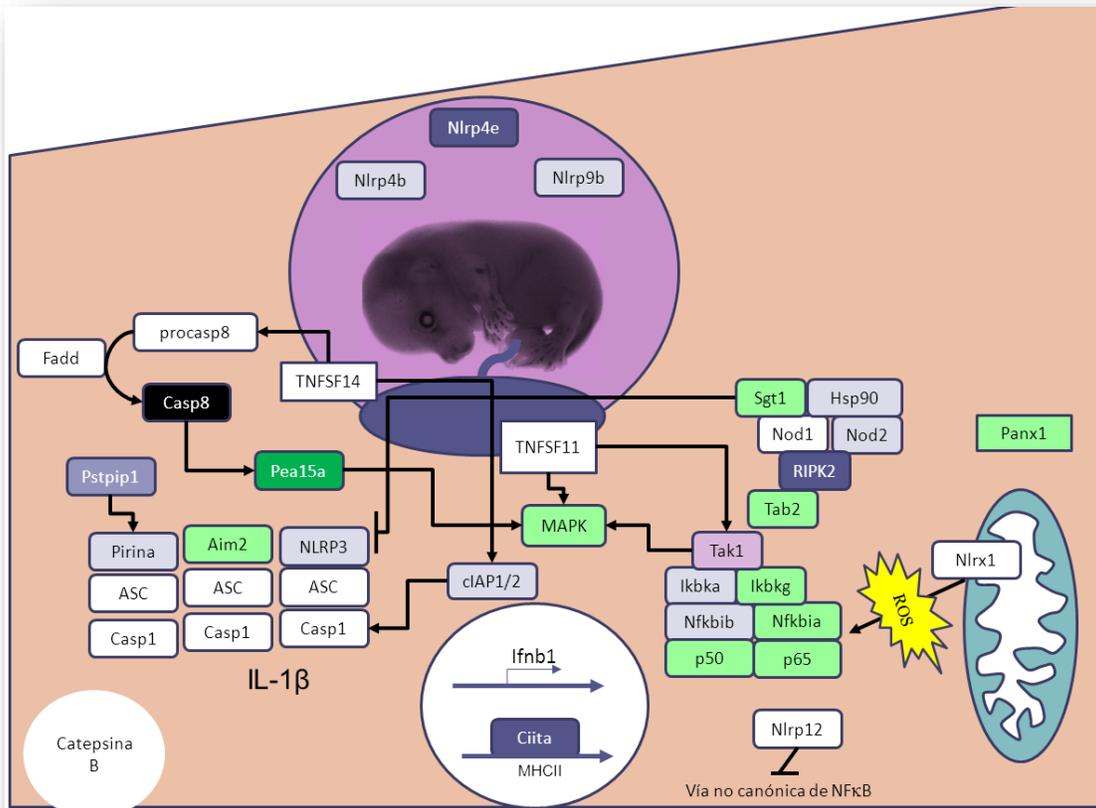
del complejo DISC, procesa pro-caspasa 8 a su forma activa caspasa 8, también se da la expresión de Pea15a, que podría interactuar con la vía de las MAPK. Como ya no existe expresión de Bcl-2, c-IAP1/2 poliubiquitina a caspasa 1, potenciando la unión a NLRs, y con esto a la formación de inflammasomas. TNFSF11 promueve la activación de la vía de las MAPK y NFκB. La proteína ASC continúa siendo expresada, por lo que se cree que nuevos inflammasomas podrían estarse formando, lo cual es sustentado por la expresión de Aim2, que junto con ASC forman el inflammasoma Aim2. Panexina 1, aumenta su expresión, probablemente por efecto de las ROS producidas por Nlr1, y con esto promueve un flujo de potasio hacia el exterior de la célula, actuando como segunda señal para la formación del inflammasoma Nlrp3 (Tschopp y Schroder, 2010).



**Figura 19. Panorama inflamatorio en el día 7.5 de implantación en el ratón hembra.** El esquema muestra las proteínas participantes en la señalización río debajo de los NLRs analizados en el estudio, aquellos valores por arriba o por debajo de 1 y -1 se consideran significativos, los

colores correspondientes a los tiempos son: azul para el tiempo 4.5, verde para el tiempo 7.5 y rosa para el tiempo 10.5; las diferentes tonalidades simbolizan el grado de expresión: mayor expresión equivale a una tonalidad más oscura mientras que menor expresión, a una tonalidad más clara.

En el día 10.5 se da la placentación embrionaria, hasta este momento el embrión poseía una pseudoplacenta conocida como saco de yolk, que alimentaba y protegía al feto del exterior, sin embargo en este tiempo la circulación fetal entra en contacto con la circulación materna; aquí, aparte de las ya sintetizadas, se añaden dos nuevas al bagaje inflamatorio, que podrían dar lugar a la síntesis de nuevas proteínas y regulación de otras, entre ellas, las involucradas con el complejo inflamasoma: Sgt1, se une a Hsp90 y activan a Nod2, éste complejo actúa como regulador negativo de la formación de inflamasomas interactuando con los NLRs, de manera que éstos no se degraden, pero tampoco interactúen con ASC o caspasa 1; Tak1 es sintetizada, activando simultáneamente las vías NFκB y junto con Pea15a la vía de las MAPK; al mismo tiempo se sintetiza la proteína Catepsina B, que servirá para expulsar hacia el exterior de la célula, lo cual se sustenta con el reporte de la presencia de caspasa 1 en el líquido amniótico de mujeres embarazadas.



**Figura 19. Panorama inflamatorio en el día 10.5 de implantación en el ratón hembra.** El esquema muestra las proteínas participantes en la señalización río debajo de los NLRs analizados en el estudio, aquellos valores por arriba o por debajo de 1 y -1 se consideran significativos, los colores correspondientes a los tiempos son: azul para el tiempo 4.5, verde para el tiempo 7.5 y rosa para el tiempo 10.5; las diferentes tonalidades simbolizan el grado de expresión: mayor expresión equivale a una tonalidad más oscura mientras que menor expresión, a una tonalidad más clara.

## **CONCLUSIONES**

- Existe una estrecha regulación tanto de la inflamación como de la síntesis de los complejos inflamasoma durante la implantación.
- Los datos obtenidos dan indicio de formación de los inflamasomas NLRP3, Aim2 y Pirina.
- La expresión de los genes del complejo inflamasoma está regulada por la vía canónica de NFκB.

## **PERSPECTIVAS**

- Validar los genes aquí reportados mediante análisis por Western Blot
- Diferenciar los NLRs expresados en el embrión y en el tejido uterino mediante inmunohistoquímica
- Analizar la actividad del o los complejos inflamasoma en distintas etapas de la implantación

## BIBLIOGRAFÍA

Abrahams V. M., (2011) *The Role of the Nod- Like Receptor Family in Trophoblast Innate Immune Responses*. Journal of Reproductive Immunology; 88: 112-117

Arthur J. C., Lich J. D., Ye Z., Allen I. C., Gris D., Wilson J. E., Schneider M., Roney K. E., O`connor B. P., Moore C. B., Morrison A., Sutterwala F. S., Bertin J., Koller B. H., Liu Z. y Ting Y. P. (2010) *Cutting Edge: NLRP12 Controls Dendritic and Myeloid Cell Migration to Affect Contact Hypersensitivity*. The Journal of Immunology 185: 4515- 4519

Bao Q. y Shi Y. (2007) *Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases*. Cell Death and Differentiation. 14, 56-65

Benko S., Philpott D. J., Girardin S. E. (2008) *The Microbial and Danger Signals that Activate Nod- like Receptors*. Cytokine; 43: 368-373

Caligioni C.,(2009). *Assessing Reproductive Status/Stages in Mice*. Current Protocols in Neuroscience.

Carta S., Castellani P., Delfino L., Tassi S., Vené R. y Rubartelli A. (2009) *DAMPS and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes*. Journal of Leukocyte Biology. Vol. 86

Castro-Rendón W.A., Castro Álvarez J. F., Guzmán- Martínez C. y Bueno-Sánchez J.C. (2006). *Blastocyst- endometrium interaction: intertwining a*

*cytokine network*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 39:1373- 1385.

Chaouat G., Dubanchet S., Ledeé N. (2007) *Cytokines: Important for implantation?* J. Assist Reprod Genet. 24:491-505

Choubey D. y Moudgil K.D. (2011) *Interferons in Autoimmune and Inflammatory Diseases: Regulation and Roles*. Journal of Interferon and Cytokine Research, 31(12) 857-862

Da Silva Correia J., Miranda Y., Leonard N. y Ulevitch R. (2007) *SGT1 is essential for Nod1 activation*. PNAS 4(16): 6764- 6749

De los Santos M. J., Mercader A., Frances A. et al. (1996) *Role of Endometrial Factors in Regulating Secretion of Components of the Immunoreactive Human Embryonic Interleukin-1 System During Embryonic Development*. Biology of Reproduction; 54: 563-574

Dekel N., Gnainsky Y, Granot I. et al. (2010) *Inflammation and Implantation*. American Journal of Reproductive Immunology; 63 (1): 17-21

Denes A., Lopez- Castejon G. y Brough D. (2012) *Caspase 1: is IL-1 just the tip of the ICEberg?*. Cell Death and Disease 3, e338

Dufner A., Duncan G., Wakeham A., Elford A., Dall H., Ohashi P. y Mak T. (2008) *CARD6 is interferon Inducible but not Involved in Nucleotide- Binding Oligomerization Domain Protein Signaling Leading to NF-kB Activation*. Molecular and Cellular Biology Vol. 8 No. 5. 1541-1552

Galbán A. y Duckett C. S. (2010). *XIAP as a Ubiquitin Ligase in Cellular Signaling*. Cell Death Differ; 17(1): 54-60

Geisert R., Fazleabas A., Lucy M. et al. (2012) *Interaction of the conceptus and endometrium to establish pregnancy in mammals: role of interleukin 1B*. Cell Tissue Res. 10: 1356-1366

Gottipati S., Rao N. L. y Fung- Leung W-P. (2008) *IRAK1: A critical signaling mediator of innate immunity*. Cellular Signalling 20: 269- 276.

Gramlich S., Fratta S., Rebellato E. et al.(2008).*Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene (IL-1Ra) Polymorphism is a Predictive Factor of Clinical Pregnancy After IVF*. Human Reproduction; 23(5): 1200-1206

Guarda G. y So. A. (2010) *Regulation of Inflammasome Activity*. Immunology. 329-336

Guzeloglu K. O., Kayisli U. A., Taylor H. S. (2009) *The Role of Growth Factors and Cytokines During Implantation: Endocrine and Paracrine Interactions*. Seminar of Reproduction in Medicine; 7(1): 62-79

Hayden M.S. y Ghosh S. (2011) *NFkB in immunobiology*. Cell Research 21:223-244

Herington J. L. y Bany B. M. (2009) *Do Molecular Signals from the Conceptus Influence Endometrium Decidualization in Rodents?* Experimental Zoology in Molecular Developmental Evolution. 233-237

Huang H. Y., Wen Y., Kruessel J. S. et al. (2001) *Interleukin (IL)-1B regulation of IL-1B and IL-1 receptor antagonist expression in cultured human endometrial stromal cells*. The journal of clinical endocrinology & metabolism. 86(3):1387-1393.

Inostroza- Nieves Y., Venkatraman P. y Zavala- Ruiz Z. (2012) *Role of Sug1, a 19S proteasome ATPase, in the transcription of MHC I and the atypical MHC II molecules, HLA-DM and HLA-DO*. Immunol Lett 147(0) 67-74.

Jeffries M. A. y Sawalha A. H. (2011) *Epigenetics in systemic lupus erythematosus: leading the way for specific therapeutic agents*. Int J Clin Rheumtol; 6 (4): 423-439

Johnston J. B., Rahman M. M., Mcfaden G(2007) *Strategies that Modulate Inflammasomes- insights from Host-Pathogen Interactions*. Seminar of Immunopathology; 29: 261-274

Kaufmann T., Strasser A. y Jost P.J. (2012) *REVIEW: Fas death receptor signaling: roles of Bid and Xiap*. Cell death and Differentiation, 19: 42- 50

Kummer J. A., Broekhuizen R., Everett H. et al. (2007) *Inflammasome components NALP1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response*. Journal of Histochemistry & cytochemistry. 55(5):443-452.

Labbé K., McIntire C. R., Dorion K., Leblanc P. M. y Saleh M. (2011) *Cellular Inhibitors of Apoptosis Proteins clAP1 and clAP2 Are Required for Efficient Caspase-1 Activation by the Inflammasome*. Immunity 35, 897-907.

Lamkanfi M., Kalai M. y Vandenabeele P. (2004) *Caspase- 12: an overview*. Cell Death and Differentiation 11, 365- 368

Lamkanfi M. (2011) *REVIEW. Emerging Inflammasome Effector Mechanisms*. Nature Reviews Immunology, 11:1108-1119

Lee D., Yanagimoto U. Y., Xuan X., Igarashi I., Fujisaki K., Sugimoto C., Toyoda Y. y Suzuki H. (2005) *Expression Patterns of the implantation-associated Genes in the Uterus during the Estrous Cycle in Mice*. Journal of Reproduction and Development Vol. 51, No. 6 787-798.

Lee J.Y., Lee M., Lee S. K. (2011) *Role of endometrial immune cells in implantation*. Clin Exp Reprod Med 38(3); 119-125.

Liu Q., Caldwell J. B. y Molkenin J. D. (2009) *Novel interaction between the TAK1-TAB1-TAB2 and the RCAN1- calcineurin regulatoru pathways defines a signaling nodal control point*. Nat Cell Biol; 11 (2):154-161

Ma C.A., Wang H-Y., Temmerman S., Zhao Y., Wu L., Hornung R. L., Wara D. y Jain A. (2011) *Dendritic cells from humans with hypomorphic mutations in NEMO have impaired Mitogen- activated protein kinase activity*. Hum Mutat. 2011; 32(3):318-324

Mcmaster M. T., Dey S. K. y Andrews G. K. (1993) *Association of Monocytes and Neutrophils with Early Events of Blastocyst Implantation in Mice*. Journal of Reproduction and Fertility; 99:561-569

Michels J., Kepp O., Senovilla L., Lissa D., Castedo M., Kroemer G. y Galluzzi L. (2013) *REVIEW: Functions of BCL-xL at the interface between Cell Death and Metabolism*. International Journal of Cell Biology Vol. 2013

Mor (2008) *Inflammation and Pregnancy. The Role of Toll- like Receptors in Trophoblast- Immune Interaction*. Annals of New York Academy of Sciences1127:121-128.

Murphy S. P., Tayade C., Ashkar A.A. Hatta K., Zhang J. y Croy A. (2009) *Interferon Gamma in Successful Pregnancies*. *Biology of Reproduction* 80, 848-859

Nakae S., Morita H., Ohno T., Arae K., Matsumoto K. y Saito H. (2013) *Role of Interleukin-33 in Innate- Type Immune Cells in Allergy*. *Allergology International* 62:13-20

Ogura Y., Sutterwala F. S. y Flavell A. A. (2006) *The inflammasome: First Line of the Immune Response to Cell Stress*. *Cell* 125, 659-662

Paciolla M., Boni R., Fusco F., Pescatore A., Poeta L., Ursini M.V., Lioi M.B. y Miano M.G. (2011) *Nuclear factor- kappa- B- inhibitor alpha (NFKBIA) is a developmental marker of NF-kB/p65 activation during in vitro oocyte maturation and early embryogenesis*. *Human Reproduction*, 26(5). 1191- 1201

Paulesu L., Jantra S., Ietta F., Brizzi R. y Bigliardi E.(2008). *Interleukin- 1 in reproductive strategies*. *Evolution and development* 10:6, 778- 788

Phillips H. R. y Hurst P. R. (2012) *XIAP: a potential determinant of ovarian follicular fate*. *Reproduction* 144; 165-176

Sasi N., Hwang M., Jaboin J., Csiki I. y Lu B. (2009) *Regulated cell death pathways: New twists in modulation of BCL2 family function*. *Mol Cancer Ther*; 8(6): 1421-1429

Spindel O. N., World C. y Berk B. C. (2012) *Thioredoxin Interacting Protein: Redox Dependent and Independent Regulatory Mechanisms*. *Antioxidants and Redox Signaling*. 16(6) 587-596

Stutz A., Golenbock D. T. y Latz E. (2009) *Inflammasomes: Too Big to Miss*. Journal of Clinical Investigation; 119: 3502-3511

Tarassishin L., Suh H-S. y Lee S. C. (2011). *Interferon regulatory factor 3 plays an anti- inflammatory role in microglia by activating the PI3K/Akt pathway*. Journal of Neuroinflammation, 8:187

Tattoli I., Carneiro L. A. Jéhanno M., Magalhanes J.G., Shu Y., Philpott D.J., Arnoult D. y Girardin S. E.,(2008) *NLRX1 is a mitochondrial NOL- like receptor that amplifies NFkB and JN pathways by inducing reactive oxygen species production*. EMBO reports Vol. 9, No. 3

Tschoop J. y Schroder K. (2010), *NLRP3 Inflammasome activation: The convergence of Multiple Signaling Pathways on ROS Production?* Nature Reviews Immunology, Vol. 10

Vadillo O.F., Beltrán M. J., Zaga C (2004). V., *Infección Intrauterina y Nacimiento Pretérmino*. Revista de Investigación Clínica, 56 (1): 93-102

Vasseur E., Boniotto M., Patin E., Laval G., Quach H., Manry J., Crouau-Roy B. y Quintana-Murci L. (2012)

Vázquez R. S., Bouchan V. P., González J. J, M. A. et al. (2011) *Mecanismos De Tolerancia Inmunológica En El Embarazo*. Perinatología y Reproducción humana, 25 (1): 39-45

Volin M.V. y Koch A.E. (2011) *Interleukin- 18: A Mediator of Inflammation and Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis*. Journal of Interferon and Cytokine Research 31(10) 745- 750

Waite A. L., Schaner P., Richards N., Balci- Peynircioglu B., Masters S.L., Brydges S.D., Fox M., Hong A., Yilmaz E., Kastner D.L., Reinherz E.L. y

Gumucio D. (2009) *Pyrin Modulates the Intracellular Distribution of PSTPIP1*. PLoS one 4(7) e6147

Wang y Dey (2006) *Roadmap to Embryo Implantation: Clues from mouse models*.

Warning J. C., Mccracken S. A. y Morris J. M. (2011) *A Balancing act: Mechanisms by Which the Fetus Avoids Rejection by the Maternal Immune System*. *Reproduction*, 141: 715-724

Weiss G., Goldsmith L. T., Taylor R. N., Bellet D., et al. (2009) *Inflammation in Reproductive Disorders*. *Reproductive Science*; 16(2): 216- 229

Yi L. Y. y Ming L. X. (2000) *REVIEW: The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities*. *Cell Research*, 10, 169-177

Yin Y., Yan Y., Jiang X. et al. (2009) *Inflammasomes are Differentially Expressed in Cardiovascular and Other Tissues*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*; 22(2): 311-322.

Yoshinaga K. (2010) *Research on Blastocyst Implantation Essential Factors (BIEFs)*. *American Journal of Reproductive Immunology* 63, 413-424

Zhang P., Dixon M., Zucchelli M., Hembiliki F., Levkov L. et al. (2008) *Expression Analysis of the NLRP Gene Family Suggest a Role in Human Preimplantation Development*. *PLoS ONE* 3(7).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

### ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00127  
Matricula: 2113801373

ANALISIS DE LA EXPRESION DEL COMPLEJO INFLAMASOMA DURANTE EL PERIODO DE IMPLANTACION EMBRIONARIA EN RATON.

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 4 del mes de febrero del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ
- DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMIREZ
- DR. MARIO EUGENIO CANCINO DIAZ
- DR. RUBEN DARIO DE JESUS MARTINEZ PEREZ



CONCEPCION GAMBOA SANCHEZ  
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

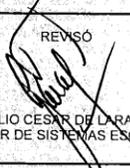
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: CONCEPCION GAMBOA SANCHEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE



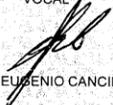
DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOCAL



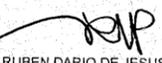
DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMIREZ

VOCAL



DR. MARIO EUGENIO CANCINO DIAZ

SECRETARIO



DR. RUBEN DARIO DE JESUS MARTINEZ PEREZ

El suscrito Secretario General de la Universidad Autónoma Metropolitana, certifica que los datos asentados en la fotocopia de este documento referentes a los estudios que ampara, son idénticos en su contenido y términos a los mismos que esta Institución incluyó en el original, de acuerdo a la información existente en los archivos correspondientes.

Se extiende la presente para los efectos legales a que haya lugar en México, Distrito Federal a los catorce días del mes de abril de dos mil quince.

*Manjarrez*  
M. en C. Q. NORBERTO MANJARREZ ÁLVAREZ  
SECRETARIO GENERAL

