



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL POR INVESTIGACIÓN**

**Evaluación de IL-1R1 e IL 12-B en muestras de parto pretérmino  
por la técnica de qPCR.**

**QUE PRESENTA:**

**Olivares Yañez Charlotte**

**Matrícula:**

**2202042100**

**Asesora interna**

**Dra. María del Carmen Monroy Dosta (28906)**

**Asesora externa**

**Dra. Noemí Meraz Cruz (5627331)**

**Ciudad de México**

**mayo, 2024**

## Resumen

El parto pretérmino (PP) ocurre antes de las 37 semanas de gestación y representa un problema de salud pública causante de la mortalidad y morbilidad infantil. A pesar de que existe evidencia de que el factor genético es un factor de riesgo, no se han identificado polimorfismos genéticos asociados en nuestra población. El objetivo de este trabajo fue la evaluación de dos polimorfismos presentes en los genes de IL-1R1 e IL-12B (un SNP por cada gen) en mujeres que tuvieron desenlace de PP al final de su gestación. **Metodología:** Se creó un banco de DNA a partir de muestras de saliva de mujeres con desenlace término y pretérmino, La concentración e integridad del DNA fue validado con el uso del nanodrop y electroforesis, respectivamente. Posteriormente se realizó la técnica de qPCR a cada una de las muestras. Las diferencias en la distribución de los genotipos y frecuencias alélicas se compararon entre los grupos, utilizando la prueba de chi cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ), mientras que la fuerza de asociación se midió con la prueba de odds ratio (OR). **Resultados:** Se colectaron 210 muestras, 57 de mujeres con desenlace pretérmino y 153 con desenlace a término de las cuales no hubo diferencias significativas en edad materna, peso pregestacional e índice de masa corporal, pero si en las semanas de gestación. Se evaluó la presencia del SNP rs3771202 (IL1R1) y rs13688439 (IL12B) mediante qPCR, se logró identificar genotipos y alelos menores asociados significativamente con el NPT y con mayor riesgo.

**Conclusión:** Los resultados obtenidos en este estudio, son los primeros en identificar SNPs de genes maternos que incrementan la susceptibilidad para el desarrollo del NPT en nuestra población. Si bien su hallazgo no evita la patología, ayudará en el futuro a crear herramientas útiles para predecir en la mujer gestante el riesgo del desenlace pretérmino.

### Palabras clave:

citocina, IL-1R1, IL-12B, parto pretérmino, qPCR

## **ÍNDICE**

<b>Introducción</b>	<b>4</b>
<b>Ubicación geográfica</b>	<b>6</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>6</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>6</b>
<b>Metodología</b>	<b>6</b>
Colecta de muestras	6
Extracción y purificación de DNAg	7
Cuantificación y calidad del DNAg	7
Electroforesis	7
Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real	8
Evaluación estadística	8
<b>Resultados y discusión</b>	<b>9</b>
Grupos de estudio.	9
Frecuencia genotípica	9
<b>Conclusión</b>	<b>11</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>12</b>

## Introducción

El parto pretérmino (PP) es el desenlace que ocurre antes de las 37 semanas de gestación o menos de 259 días contados a partir de la fecha de la última menstruación y una de las principales causas de muerte en el periodo neonatal (Khandre *et al.* 2022). El porcentaje de PP reportados mundialmente es de 11% (Lorain *et al.*, 2023). En México, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) reportó que la incidencia del PP varía del 2.8 hasta 16.6% (López-García *et al.*, 2018).

Es considerado como el principal riesgo pediátrico y es causante de provocar alteraciones fisiológicas como problemas de audición y visión, así como dificultades cardíacas y respiratorias (CEVECE, 2019). No se conoce un factor de riesgo específico para esta patología, esto hace que se le considere como una etiopatogenia de origen multifactorial (Huertas, 2018). Dentro de los factores de riesgo para esta patología se encuentran la ruptura prematura de membranas, ausencia de control prenatal, los altos niveles de catecolaminas en la orina materna, infecciones vaginales, preeclampsia, respuesta inflamatoria, así como el factor genético (Jiang, *et al.*, 2018).

Los estudios familiares, la detección de genes susceptibles a enfermedades y la disparidad racial han respaldado el concepto de que el PP tiene una predisposición genética. Se estima que los factores genéticos maternos y fetales combinados contribuyen con un 30% o más del riesgo de la patología. Actualmente existe interés en identificar variantes genéticas que influyen en la respuesta inflamatoria de los tejidos reproductivos que podrían conducir a un PP. (Strauss *et al.*, 2018).

Durante el embarazo, se llevan a cabo una serie de cambios fisiológicos en el sistema inmunitario, capaces de crear un mecanismo de tolerancia materno fetal, permitiendo que el embrión se desarrolle en el útero. Las células de la inmunidad innata a lo largo del embarazo son capaces de producir citocinas reguladas por el sistema inmunológico (Pandey, 2017).

Las citocinas son glicoproteínas o polipéptidos hidrosolubles que son sintetizados y liberados por diferentes tipos de células del organismo en respuesta a diferentes

estímulos (Turra, 2023). El equilibrio entre las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias es crucial para la implantación del feto. Las citocinas son específicas para cada respuesta, células T auxiliares tipo 1 (Th1) son responsables de la inflamación, mientras que células T auxiliares tipo 2 (Th2) son encargadas de la vía antiinflamatoria, jugando un papel importante en la reducción de la inflamación (Villalón *et al.*, 2021 y Pandey *et al.* 2017).

Dentro de las citocinas existen distintos grupos, Proinflamatorias: factor de necrosis tumoral, TNF $\alpha$ , IL-10, -2, -6, -7, -8, -12, -17, -18, quimiocinas. Antiinflamatorias Interferones (INF), IL-1Ra, -4, -9, -10, -11, -13. Las citocinas son las encargadas de la interacción entre los leucocitos. La desregulación de sus niveles está relacionada con enfermedades prenatales, incluyendo el PP, la preeclampsia y las complicaciones neonatales cerebrales (Villalón *et al.*, 2021 y Pereyra, 2019).

El PP es una vía compleja y se han reportado polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con genes inflamatorios (Chawla, 2018), las IL están fuertemente asociadas en la interfase materno fetal, se estima que una producción excesiva o anormal del tipo proinflamatorio en membranas fetales es nociva para el desenlace del embarazo (Pereyra, 2019).

El presente trabajo tuvo como interés el estudio del SNP rs 3771202 de *IL-1R1*, el cual es esencial en el proceso de implantación, debido a que su ausencia impide la implantación, así como el retraso del crecimiento intrauterino (Mora-Palazuelos *et al.*, 2022). Por su parte Wang *et al.*, (2016) menciona que la presencia del SNP rs 13688439 de *IL-12B* de manera excesiva puede provocar una reacción citotóxica y posiblemente abortiva al promover la activación de células NK.

Con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), se hizo la búsqueda y evaluación de la presencia de los SNPs mencionados para *IL-1R1* e *IL-12B* en muestras de saliva de mujeres que presentaron PP al final de su gestación. Es probable que con los resultados de estudios como este, se puedan visualizar factores de riesgo genético en el desenlace pretérmino y así ayudar en el futuro al pronóstico del riesgo de presentar dicha patología en la mujer gestante.

## Ubicación geográfica

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de la Unidad de Vinculación Científica, de la Facultad de Medicina, UNAM en el instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), el cual se localiza en Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, 14610 Ciudad de México (Figura 1).



Figura SEQ Figura \\* ARABIC 1. Instituto Nacional de Medicina Genómica, INMEGEN

## Objetivo General

Evaluar la presencia de *IL-1R1* e *IL 12 B* en muestras de DNA obtenidas de saliva de mujeres con desenlace pretérmino y término al final de su gestación.

## Objetivos específicos

1. Realizar un Banco de DNAg de muestras provenientes de mujeres con desenlace de PP y Término.
2. Estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para la evaluación de los SNPs en los genes citados.
3. Evaluar la presencia de SNPs para *IL-1R1* e *IL 12B* en muestras de saliva de mujeres cuyo desenlace haya sido pretérmino o término al final de su gestación.

## Metodología

### Colecta de muestras

Para el desarrollo de este estudio se creó un banco de DNAg con 57 muestras de mujeres que tuvieron desenlace pretérmino al final de su gestación y 153 muestras de mujeres con desenlace a término. Para la realización de este banco, se obtuvo primeramente una muestra de 4 ml de saliva (Figura 2), con el kit de colecta OrageneDNA (DNA Genotek Inc., Ottawa, ON, Canadá), previa autorización mediante la firma de la Carta de Consentimiento Informado.

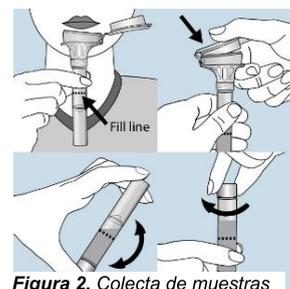


Figura 2. Colecta de muestras Kit Oragene DNA

## Extracción y purificación de DNAg

El tubo con muestra de saliva se mezcló con el amortiguador de extracción por inmersión. Posteriormente se colocó en baño maría durante una hora a 50°C. Pasado este tiempo, 1ml de cada muestra fue transferido a tubos eppendorf de 1.5ml en el cual se le agregaron 40µl de reactivo de lisis y fue mezclado en vortex por 5 segundos. Las muestras fueron colocadas en hielo durante 15 minutos y posterior a ello, se centrifugaron a 3,500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, el sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf nuevo y se añadió v/v etanol al 95%, se mezcló por inmersión 15 veces hasta lograr observar las fibras de DNA (Figura 3). Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y el tubo con el precipitado se dejó secar sobre papel absorbente durante 10 minutos. Posterior a ello, se le agregaron 30µl de agua libre de nucleasas al precipitado conteniendo el DNA y finalmente fue incubado a 50°C durante 10 minutos para disolver la molécula.

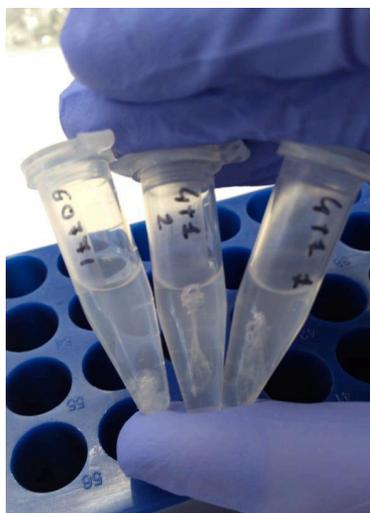


Figura 3. Visualización de fibras de DNA

## Cuantificación y calidad del DNAg

Se evaluó la concentración y pureza del DNA mediante espectrofotometría con el equipo Nanodrop 2000C (Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington, EUA). Los valores obtenidos cumplieron con los índices de calidad de pureza establecidos internacionalmente a 260/280 y 260/230.

## Electroforesis

Para comprobar la integridad de la muestra se prepararon geles de agarosa al 2%, para ello se disolvieron 0.6gr de agarosa en 30 ml de buffer TAE. A cada 2µl de muestra se le adicionaron 2µl de agua libre de nucleasas y 1µl de buffer de carga, se agregaron las muestras de DNA a cada pozo del gel y la electroforesis se corrió a 60 watts, 400 m/A durante 1 hora a 60



Figura 4. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

voltios (Figura 4). Para validar la integridad de las bandas de DNA, se realizó mediante el fotodocumentador (Bio-Rad Laboratories Inc. EUA) verificando que los fragmentos cumplieran el requisito para la secuenciación ( $\geq 2.5$  kpb). Al terminar la validación de la integridad del DNA las muestras fueron almacenadas.

### Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

La realización de esta técnica fue mediante el equipo Light Cycler 480 (Technology, Inc. Salt Lake City, UT, EUA) en placas grado óptico de 96 pozos. La mezcla de reacción de cada una de las muestras consistió en: 5  $\mu$ l de Master Mix, 0.2  $\mu$ l de sondas (10 pmol/ $\mu$ l), 2.6  $\mu$ l de agua grado biología molecular, y 2  $\mu$ l de DNA (20 ng/ $\mu$ l). Para el control negativo se agregó 2  $\mu$ l de agua estéril en sustitución del DNA. Se realizó una curva estándar para cada gen.

**Tabla 1. Condiciones de amplificación qPCR**

GEN		<i>IL-1R1</i>	<i>IL-12B</i>
<b>DENATURACIÓN INICIAL</b>		95° C - 2 min	95° C - 2 min
<b>45 ciclos</b>	<b>DESNATURALIZACIÓN</b>	95° C - 30 seg	95° C - 30 seg
	<b>ALINEAMIENTO</b>	58° C - 20 seg	60° C - 20 seg
	<b>EXTENSIÓN</b>	72° C - 20 seg	72° C - 20 seg
<b>Melting Curve</b>		95° C - 5 seg	95° C - 5 seg
		65° C - 1 min	65° C - 1 min
		97° C - continuo	97° C - continuo
<b>ENFRIAMIENTO</b>		40°C - 30 seg	40°C - 30 seg

### Evaluación estadística

Para estimar la contribución genética de las mujeres que presentaron los SNPs asociados al nacimiento PT, con la técnica de PCR en tiempo real, se evaluó estadísticamente la relación entre el alelo menor de cada polimorfismo con el desenlace de NPT. Para ello fueron utilizados los dos SNPs correspondientes a los genes de IL1R1 e IL12B compartidos en ambos grupos de estudio, para comparar la frecuencia de exposición de cada SNP entre casos y controles y demostrar si existen diferencias significativas. Se evaluó la frecuencia en la distribución de los genotipos a partir del modelo de herencia dominante, así como la frecuencia alélica de cada polimorfismo entre los dos grupos, a partir de la prueba de independencia

“ $\chi^2$  de Pearson”, utilizando un nivel de significancia del 5% ( $p < 0.05$ ). Además, se determinó la fuerza de asociación entre la presencia de cada polimorfismo con el desenlace del NPT a partir de la prueba de OR (IC 95%), considerando como SNPs de riesgo, todos aquellos con valor de OR igual o mayor a 2.

## Resultados y discusión

### Grupos de estudio.

La tabla 2 muestra las características descriptivas de las mujeres que participaron en el estudio. La edad materna, el peso pregestacional y el IMC no mostraron diferencia significativa, la cual fue notable para las SDG en que ocurrió el desenlace.

**Tabla 2.** Características de las mujeres que conforman los grupos de estudio.

Característica	Pretérmino n=57	Término n=153	<i>p-value</i>
Edad materna (promedio $\pm$ DS)	24.9 $\pm$ 5.8	25.2 $\pm$ 6.3	0.751
Talla (cm)	152 $\pm$ 8.5	155 $\pm$ 5.4	<0.05*
Peso pregestacional (kg)	60.2 $\pm$ 12	63.6 $\pm$ 12.9	0.266
IMC	25.1 $\pm$ 4.6	26.1 $\pm$ 5.3	0.168
SDG	31.7 $\pm$ 5.1	38.9 $\pm$ 1.1	$p < 0.001^*$

IMC: Índice de masa corporal.

SDG: Semanas de gestación.

(\*): Significancia estadística.

### Frecuencia genotípica

De acuerdo con los resultados obtenidos de IL 1R1 el genotipo TT no se encuentra una asociación estadísticamente significativa con el NPT, tiene una tendencia a estar mayormente asociado con NT. Los genotipos TG+GG son más frecuentes en nacimiento pretérmino. En cuanto al alelo T, hay una asociación significativa con el NT, lo que sugiere que dicho alelo puede tener un efecto protector contra el NPT. El alelo G se encuentra más asociado con NPT, lo que sugiere una posible predisposición genética a este (Tabla 3).

**Tabla 3.** Frecuencia genotípica y del alelo menor de cada SNP, asociado con el Nacimiento pretérmino.

Gen	SNP (Alelos) <sup>1</sup>	Genotipo	Frecuencia (%)		P-value	OR <sup>2</sup>	IC <sup>3</sup>	Ubicación
			NPT	NT				
<b>IL-1r1</b>	rs3771202(T>G)	TT	90.2	95.62	0.159	2.36	2.12 a 2.63	Intrón
		TG+GG	9.8	4.38				
		T	92	97	0.035	2.82	2.60 a 3.06	
		G	8	3				
<b>IL-12B</b>	rs13688439 (T>G)	TT	78.43	99.92	0.01	3.13	2.76 a 3.49	Intrón
		TG +GG	21.57	0.08				
		T	81	92	0.002	2.75	2.54 a 2.98	
		G	19	8				

<sup>1</sup>Muestra el cambio del alelo mayor o de referencia por el alelo menor o de riesgo.

<sup>2</sup>OR: Odds ratio.

<sup>3</sup>IC: intervalo de confianza.

NT: Nacimiento a Término

NPT: Nacimiento pretérmino

Franchim *et.al*, 2011, estudió la asociación de SNPs en genes relacionados con mediadores inflamatorios y su riesgo de desarrollar preeclampsia, dentro de ellos el receptor IL1R1. El trabajo destaca que la señalización mediada por este gen (procesos inmunológicos e inflamatorios) es esencial para la comunicación entre el embrión y la madre durante la implantación y el desarrollo del embarazo, mutaciones en éste, podrían ser la causa de la enfermedad.

Green *et. al*, 2023, menciona como la familia de las interleucinas-1 se encuentra involucrada en complicaciones con bebés prematuros. Teniendo énfasis la IL 1R1, debido que inicia una cascada de señales inflamatorias. La inflamación perinatal excesiva o mal regulada puede llevar a un daño en órganos y sistemas de desarrollo. Por lo anterior, es importante subrayar la importancia de las vías inflamatorias en el PP.

Por su parte, se encontró el genotipo TT del gen IL12B tiene una asociación significativa con los nacimientos término, mientras que el genotipo TG+GG y el alelo G se encuentran asociados con el NPT. Estos resultados indican que la presencia de este gen puede influir en el riesgo de presentar PP, destacando la importancia del SNP rs 13688439 en la predisposición genética (Tabla 3).

La predisposición genética al PP se ha demostrado en distintos estudios, en los cuales se han identificado genes de susceptibilidad y disparidad racial, de acuerdo

con la investigación de Capece *et.al*, 2014, donde incluyó tres poblaciones: sudamericana (chilena), afroamericana y caucásica, encontró SNPs relacionados con el desarrollo del PP, siendo el gen de IL12B, el que correlacionaba con esta patología sugiriendo que la modulación de la actividad de IL12B podrían ser una estrategia para prevenir o tratar la ruptura de membranas, causantes del desarrollo pretérmino.

En el estudio de Rutigliano *et. al*, 2022, se encontró que el gen de IL12B participa en la mediación de la respuesta inmunitaria, al promover la activación de células T y producción de interferón gamma (IFN-  $\gamma$ ), así como su intervención en la regulación de la respuesta inmunitaria en la interfase materno fetal. Por lo anterior, es importante resaltar la importancia de la sobreexpresión de IL12B debido que podría tener implicaciones para la salud materna y fetal, así como el desarrollo del PP.

### **Conclusión**

Los resultados del presente estudio junto con investigaciones previas señalan el papel de la inflamación y mediadores inmunitarios en el PP. La señalización inflamatoria mediada por IL 1R1 e IL12B es esencial para la comunicación materno fetal. Es importante seguir realizando estudios de esta índole para generar estrategias que ayuden a prevenir el PP.

## Bibliografía

1. Chawla D. (2018). Genetic Polymorphism and Preterm Birth. *Indian journal of pediatrics*, 85(2), 83–84.
2. Capece, A., Vasieva, O., Meher, S., Alfirevic, Z., & Alfirevic, A. (2014). Pathway analysis of genetic factors associated with spontaneous preterm birth and pre-labor preterm rupture of membranes. *PloS one*, 9(9), e108578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108578>
3. CEVECE (2019). Nacimientos prematuros. Consultado el 10 de marzo, 2024 en:  
<https://cevece.edomex.gob.mx/sites/cevece.edomex.gob.mx/files/files/docs/tripticos/2019/Semana47.pdf>
4. Franchim, C. S., Sass, N., Mattar, R., Pendeloski, K. P., Lin, L. H., Torloni, M. R., & Daher, S. (2011). Inflammatory mediators gene polymorphisms in preeclampsia. *Hypertension in pregnancy*, 30(3), 338–346. <https://doi.org/10.3109/10641950903455389>
5. Green, E. A., Garrick, S. P., Peterson, B., Berger, P. J., Galinsky, R., Hunt, R. W., Cho, S. X., Bourke, J. E., Nold, M. F., & Nold-Petry, C. A. (2023). The Role of the Interleukin-1 Family in Complications of Prematurity. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2795. <https://doi.org/10.3390/ijms24032795>
6. Huertas T, E. (2018). Parto pretérmino: causas y medidas de prevención. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 64(3), 399-404.
7. Jiang M, Mustafa M, Lu D y Yin Xianghua (2018). A case control study of risk factors and neonatal outcomes of preterm birth, *Taiwan J Obstet Gynecol*. 57: 814-118.
8. Mora-Palazuelos, C., Bermúdez, M. G., Aguilar-Medina, M., Rosalío Ramos-Payan, Ayala-Ham, A., & José Geovanni Romero-Quintana. (2022). Cytokine-polymorphisms associated with Preeclampsia: A review. *Medicine*, 101(39): 124.
9. Khandre, V., Potdar, J. y Keerti, A. (2022). Preterm Birth: An Overview. *Cureus*, 14(12): 1-6.

10. López-García, B, Ávalos A. y Díaz G.N. (2018). Incidencia de prematuros en el Hospital General Naval de Alta Especialidad 2015-2017. *Revista de sanidad militar*, 72(1): 19-23.
11. Lorain P., Sibiude J., Kayem G. (2023). Parto prematuro: epidemiología, factores de riesgo y evaluación del riesgo en pacientes asintomáticas, *EMC - Ginecología-Obstetricia* 59 (4),1-11.
12. Pandey, M., Chauhan, M., & Awasthi, S. (2017). Interplay of cytokines in preterm birth. *The Indian journal of medical research*, 146(3), 316–327.
13. Pereyra L.S.M (2019). Análisis de la variabilidad y expresión génica en el parto prematuro espontáneo. [TESIS]. 11-20.
14. Rutigliano, H. M., Thomas, A. J., Umbaugh, J. J., Wilhelm, A., Sessions, B. R., Kaundal, R., Duhan, N., Hicks, B. A., Schlafer, D. H., White, K. L., & Davies, C. J. (2022). Increased expression of pro-inflammatory cytokines at the fetal-maternal interface in bovine pregnancies produced by cloning. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 87(3), e13520. <https://doi.org/10.1111/aji.13520>
15. Strauss III JF, Romero R, Gomez-Lopez N, Haymond-Thornburg H, Modi BP, Teves ME, Pearson LN, York TP, Schenkein HA. (2018) *Am J Obstet Gynecol*; 218(3): 294–314.e2
16. Turra, SE, Damaso, Ê.L., Veiga, ECdA. (2023) Serum cytokines in second trimester pregnancy and their relationship with spontaneous preterm births in the Ribeirão Preto and São Luiz cohorts. *BMC Pregnancy Childbirth* 23, 460
17. Villalón H, Caussade Marie-Chantal, Vial M.A, Pantoja S, Vergara N, Escobar J (2021) Síndrome inflamatorio perinatal persistente. Importante factor de morbimortalidad en el prematuro extremo, *Revista Médica Clínica Las Condes*, (32)6, 664-671.
18. Wang, X., Guo, M., Li, S., Li, N., Song, W., Wang, H., & Liu, S. (2016). The Role of the IL-12 polymorphism rs3212227 in preeclampsia in Chinese Han Women. *Clinical and experimental hypertension*. 38(4): 388–392.