



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Efecto de vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis* sobre la interacción de células trofoblásticas con células endoteliales y su impacto en la remodelación vascular.

Tesis presentada para optar al título de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Matías Sassot

Directora

Dra. Vanesa Hauk

Directora asistente

Dra. Daiana Vota

Laboratorio de Inmunofarmacología

IQUIBICEN-CONICET

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Julio 2024

INDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCION.....	8
1) Generación de la interfase materno-fetal.....	9
1.1) Implantación.....	9
1.2) Placentación.....	12
1.3) Gestación en ratones.....	14
2) Remodelación vascular.....	15
3) Periodontitis y complicaciones del embarazo.....	17
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	22
MATERIALES Y METODOS.....	24
1) Cultivos celulares.....	25
1.1) Líneas celulares.....	25
1.2) Mantenimiento.....	25
1.3) Preparación de medios condicionados de células trofoblásticas.....	26
2) Aislamiento de vesículas de membrana externa de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	26
3) Ensayo de migración.....	27
4) Ensayo de activación de endotelio.....	28
5) Producción de especies reactivas de oxígeno.....	28
6) Animales, condiciones de apareo y gestacionales.....	28
7) Cultivos de sitios de implantación.....	28
8) Generación de cortes histológicos.....	29
9) RT-PCR y RT-qPCR.....	29
7.1) Extracción de ARNm.....	29
7.2) Obtención de ADNc y ensayos RT-qPCR.....	30
10) Análisis estadístico.....	31
RESULTADOS.....	32
1) Capítulo 1: Efecto del tratamiento <i>in vitro</i> con OMV de <i>Porphyromonas gingivalis</i> sobre la interacción de células trofoblásticas con células endoteliales.....	33
2) Capítulo 2: Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con OMV de <i>Porphyromonas gingivalis</i> en un modelo murino de gestación.....	37
DISCUSION.....	43
REFERENCIAS.....	51

RESUMEN

La periodontitis es una de las enfermedades inflamatorias crónicas orales más frecuentes que afecta hasta al 50% de las mujeres embarazadas. Se ha demostrado una asociación entre periodontitis y complicaciones de la gestación. Las mujeres embarazadas con infección oral crónica activa tienen un riesgo de dos a cuatro veces mayor de parto pre-término, pre-eclampsia (PE) y restricción del crecimiento fetal (RCF), las últimas asociadas a defectos en la placentación. Estas complicaciones asociadas a defectos en la placentación son un problema de salud pública mundial ya que contribuyen en mayor medida a la morbilidad materna y neonatal. *Porphyromonas gingivalis* (Pg) es considerado uno de los patógenos más importantes en la inflamación periodontal. Pg libera vesículas de membrana externa (OMV) que contienen diversos factores de virulencia y son fundamentales en los mecanismos patogénicos de la bacteria. Pg se ha detectado en fluido amniótico, placenta y placa subgingival en pacientes con complicaciones gestacionales. Si bien se han acumulado numerosas evidencias de estudios epidemiológicos y diseños *in vivo* e *in vitro* que confirman la asociación entre enfermedad periodontal y evolución adversa del embarazo, al presente no hay suficientes pruebas de una relación causal.

Durante la gestación temprana, las células trofoblásticas adquieren perfiles funcionales y fenotípicos con capacidad de proliferar, diferenciarse a fenotipos que migran e invaden el estroma decidual, formar sincicios, participar en la transformación vascular y en el transporte de nutrientes al feto y de modular la respuesta inmune frente a patógenos o injuria exacerbada a través de su interacción con leucocitos maternos. Dichos procesos requieren un fino control por factores maternos y fetales para mantener la homeostasis placentaria y asegurar un adecuado crecimiento fetal. Está reportado que una transformación deficiente o incompleta de las arterias maternas e insuficiencia placentaria se asocian con patologías gestacionales como PE y RCF. En este sentido, la infección materna crónica con patógenos orales podría alterar la homeostasis placentaria afectando el desarrollo normal de la placenta y el crecimiento fetal.

El objetivo de este proyecto es investigar el efecto de factores de virulencia de patógenos periodontales sobre la función endovascular de las células trofoblásticas y su impacto en la remodelación vascular. En este trabajo enfocamos el efecto de OMV de *P. gingivalis*, una bacteria anaerobia reconocida por estar asociada a déficit placentario y complicaciones de la gestación.

Para abordar este objetivo, se utilizaron dos diseños experimentales. Por un lado, diseños *in vitro* con células humanas utilizando la línea celular derivada de trofoblasto de primer trimestre HTR-8, la cual fue tratada con OMV-Pg, y la línea celular endotelial EA.hy926. Por otro lado, se realizaron ensayos *in vivo* en un modelo de gestación murina utilizando hembras de la cepa C57BL/6 que fueron tratadas con una única dosis de OMV-Pg al día 6,5 de gestación para determinar el efecto del tratamiento sobre la placentación y la evolución de la gestación, con foco en la remodelación vascular.

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento de las células trofoblásticas con OMV-Pg produce un desequilibrio en el balance de expresión de mediadores pro- y anti-angiogénicos respecto a las células control. A su vez, el medio condicionado de dichas células afecta la función de las células endoteliales que se evidencia con una reducción en su capacidad de migrar, un aumento en la adhesión de células inmunes y mayor producción de especies reactivas del oxígeno. Los ensayos *in vivo* realizados al día de gestación 8,5, muestran que el tratamiento con una dosis de OMV-Pg al dg 6,5 induce alteraciones histológicas con aumento en la expresión del marcador de células trofoblásticas gigantes Prl3d1, asociado a una deficiencia en la diferenciación de las células trofoblásticas. Asimismo, en los sitios de implantación de las hembras al dg 8,5 que fueron tratadas con OMV-Pg encontramos una disminución en la expresión de los marcadores angiogénicos VEGF-A y PlGF que se encuentra acompañado con una disminución en la expresión del factor HIF-1 α . Por otro lado, estos sitios de hembras tratadas con OMV-Pg presentan un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno respecto a los sitios de implantación de las hembras control. Por último, al evaluar marcadores inmunes encontramos una disminución en la expresión de la citoquina IL-1 β e IL-15, sin evidenciar cambios en la expresión de MCP-1 e IL-6.

En conjunto, los resultados respaldan un papel patogénico de las OMVs de Pg en las primeras etapas del embarazo y la placentación, a través de la disrupción de la contribución de las células trofoblásticas a la transformación vascular y al mantenimiento de la homeostasis placentaria.

Con este estudio esperamos aportar conocimiento original sobre los mecanismos etiopatogénicos de complicaciones de la gestación asociadas a altas tasas de morbilidad materna y neonatal aportando evidencias que demuestren de forma causal la asociación entre bacterias causantes de infecciones periodontales y complicaciones de la gestación.

ABSTRACT

“Effect of outer membrane vesicles from *Porphyromonas gingivalis* on the interaction of trophoblastic cells with endothelial cells and their impact on vascular remodelling”

Periodontitis is one of the most common chronic inflammatory oral diseases, affecting up to 50% of pregnant women. An association has been demonstrated between periodontitis and pregnancy complications. Pregnant women with active chronic oral infections have a two to four times higher risk of preterm birth, pre-eclampsia (PE), and fetal growth restriction (FGR), the latter associated with defects in placentation. These complications related to defects in placentation are a global public health issue as they significantly contribute to maternal and neonatal morbidity and mortality. *Porphyromonas gingivalis* (Pg) is considered one of the most important pathogens in periodontal inflammation. Pg releases outer membrane vesicles (OMVs) containing various virulence factors, which are crucial in the bacterium's pathogenic mechanisms. Pg has been detected in amniotic fluid, placenta, and subgingival plaque in patients with gestational complications. While numerous epidemiological studies and *in vivo* and *in vitro* designs have accumulated evidence confirming the association between periodontal disease and adverse pregnancy outcomes, there is currently insufficient evidence of a causal relationship.

During early pregnancy, trophoblast cells acquire functional and phenotypic profiles with the ability to proliferate, differentiate into migratory and invasive phenotypes in the decidual stroma, form syncytia, participate in vascular transformation, and transport nutrients to the fetus, while modulating the immune response to pathogens or exacerbated injury through interaction with maternal leukocytes. These processes require fine control by maternal and fetal factors to maintain placental homeostasis and ensure adequate fetal growth. It is reported that deficient or incomplete transformation of maternal arteries and placental insufficiency are associated with gestational pathologies such as PE and FGR. In this sense, chronic maternal infection with oral pathogens could disrupt placental homeostasis, affecting normal placental development and fetal growth.

The objective of this project is to investigate the effect of virulence factors from periodontal pathogens on the endovascular function of trophoblastic cells and their impact on vascular remodelling. This study focuses on the effect of Pg OMVs, an anaerobic bacterium known to be associated with placental deficits and pregnancy complications.

To address this objective, two experimental designs were used. On one hand, *in vitro* designs with human cells using the first-trimester trophoblastic cell line HTR-8 treated with Pg OMVs and EA.hy926 endothelial cells. On the other hand, *in vivo* assays were conducted in C57BL/6 females treated with a single dose of Pg OMVs on day 6.5 of gestation to determine the treatment's effect on placentation and pregnancy outcomes, focusing on vascular remodelling.

Our results demonstrate that treatment of trophoblast cells with Pg OMVs disrupts the balance of expression of pro- and anti-angiogenic mediators compared to control cells. Moreover, conditioned media from these cells affects the function of endothelial cells, evidenced by reduced migratory capacity, increased immune cell adhesion, and higher reactive oxygen species production. *In vivo* assays conducted on day 8.5 of gestation, show that treatment with a dose of Pg OMVs on day 6.5 induces histological alterations with increased expression of the giant trophoblastic cell marker Prl3d1, associated with deficient trophoblastic cell differentiation. Additionally, at implantation sites on day 8.5 in females treated with Pg OMVs, there is decreased expression of the angiogenic markers VEGF-A and PlGF, accompanied by decreased expression of HIF-1 α . Furthermore, these implantation sites in females treated with Pg OMVs show increased reactive oxygen species production compared to control implantation sites. Lastly, immune marker evaluation reveals decreased expression of IL-1 β and IL-15, with no changes observed in MCP-1 and IL-6 expression.

Taken together, the results support a pathogenic role of Pg OMVs in early pregnancy and placentation stages, disrupting the contribution of trophoblastic cells to vascular transformation and placental homeostasis maintenance.

With this study, we aim to provide original insights into the etiopathogenic mechanisms of pregnancy complications associated with high rates of maternal and neonatal morbidity and mortality, providing evidence that causally demonstrates the association between bacteria causing periodontal infections and pregnancy complications.

ABREVIATURAS

Ae: arterias espiraladas uterinas

ANGPT: Angiopoyetina

BPN: Bajo peso al momento del nacimiento

CTB: Citotrofoblasto

dNK: Linfocitos natural killer deciduales

DLS: Dynamic Light Scattering

DG: Día gestacional

DPO: Día post ovulación

EC: Células Endoteliales

EPC: Cono ectoplacentario

EVT: Células trofoblásticas extravellosas

EVTen: EVT endoteliales

EVTin: EVT intersticiales

H8: Línea celular trofoblástica humana HTR-8/SVneo

HIE: Trastornos hipertensivos asociados al embarazo

HIF: Hipoxia Inducible Factor (Factor inducible de hipoxia)

I.F.M.: Intensidad de fluorescencia media

I.P.: Intraperitoneal

IL: Interleuquina

LPS: Lipopolisacárido

MC: Medio condicionado

MC Tb: Medio condicionado células trofoblásticas

MC Tb OMV: Medio condicionado células trofoblásticas y OMV-Pg

MC OMV: Medio condicionado OMV-Pg

MCI: Macizo Celular Interno

MCP-1 (o CCL2): Proteína quimioattractante de monocitos

MMP: Matrix metaloproteinasa (metaloproteinasa de la matriz)

NK: Linfocitos natural killer

OMV: Vesículas de membrana interna, del inglés Outer Membrane Vesicle

PE: preeclampsia

Pg: Porphyromonas gingivalis

PG: Peptidoglicano

PIGF: factor de crecimiento placentario

PMAD: patrón molecular asociado a daño

PMAP: Patrón molecular asociado a patógeno

PrI3D1: Prolactina 3 D1

RCF: Restricción de crecimiento fetal

RCIU: restricción del crecimiento intrauterino

ROS: Especies reactivas de oxígeno, del inglés Reactive Oxygen Species

RRP: Receptor de reconocimiento de patrones

sENG: S-endoglin

SFB: Suero fetal bovino

sFLT-1: Soluble fms-like tyrosine kinase-1

St: Solución estándar

STB: Sinciciotrofoblasto

Tb: Células trofoblásticas

TGC: Células trofoblásticas gigantes

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante β 1

THP1: Línea celular promonocítica humana THP1

TLR: receptor tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

Treg: Célula T regulatoria

VEGF-A: Factor de crecimiento endotelial vascular A

VEGF-C: Factor de crecimiento endotelial vascular C

ZP: Zona pelúcida

INTRODUCCIÓN

1. Generación de la interfase materno fetal

En condiciones fisiológicas, para que un embarazo exitoso se produzca, el útero experimenta remodelaciones cíclicas que generan un ambiente apropiado para que se dé la implantación del embrión en el endometrio y luego la placentación temprana. Estos procesos sólo son posibles si se establece una interacción sincronizada entre el endometrio receptivo y un embrión competente para implantarse.

1.1. Implantación

La implantación se define como el proceso mediante el cual el embrión se adhiere a la superficie endometrial del útero, invade el epitelio y luego la circulación materna para formar la placenta.

En humanos, como resultado de una compleja interacción entre hipotálamo, hipófisis, ovario y útero, se da un ciclo menstrual de aproximadamente 28 días, en donde el día 1 corresponde a la menstruación y el día 14 a la ovulación (Fig. A). Este ciclo puede ser dividido en dos fases: los primeros 14 días a partir de la menstruación constituyen la **fase proliferativa** (fase folicular), que está bajo la influencia del aumento de los niveles de estrógeno, lo que conduce a la proliferación de las células epiteliales, estromales y el endotelio vascular para regenerar el endometrio, y que culmina en el día 14 con la ovulación, dada por un pico de las hormonas folículo estimulante y luteinizante. En este punto del ciclo, comienza la **fase secretoria** (fase luteal), que está caracterizada por la formación del cuerpo lúteo a partir del folículo roto, y la consecuente liberación de progesterona, lo que conduce a importantes cambios en la morfología y función endometrial que son indispensables para preparar el endometrio para una posible implantación del blastocisto (Cha et al., 2012; Munoz-Suano et al., 2011)

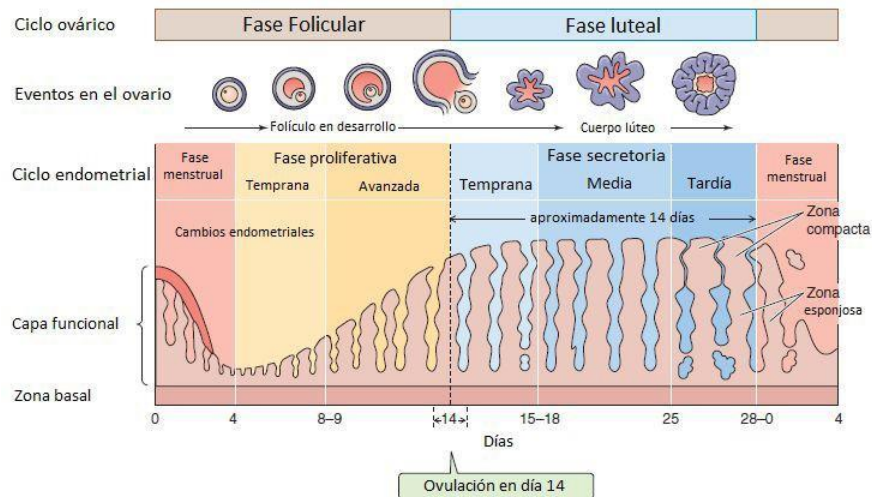


Figura A: Ciclo menstrual en humanos. Modificado de (Boron & Boulpaep, 2012).

La fertilización del ovocito por un espermatozoide ocurre en las trompas de Falopio entre 24 y 48 horas luego de la ovulación. Durante el **período pre-implantatorio**, el óvulo fertilizado (cigoto) comienza a sufrir sucesivas divisiones mitóticas, generando células cada vez más pequeñas llamadas blastómeros, que cuando alcanzan un tamaño de entre 12 a 16 células (mórula) atraviesan la trompa de Falopio protegido por una capa protectora no adhesiva llamada zona pelúcida (ZP). Alrededor de 2 o 3 días post-fertilización, la **mórula** ingresa en la cavidad uterina en donde comienza la transición hacia **blastocisto**. Durante este estadio, la entrada de agua y sales entre los blastómeros internos genera el blastocele, dejando un agrupamiento de células en el polo apical que forma el **macizo celular interno** (MCI), que luego dará origen al embrión propiamente dicho. Al mismo tiempo, los blastómeros externos se compactan y generan una capa superficial de células epiteliales continua e impermeable que rodea y recubre al MCI, llamada **trofoectodermo**, que dará origen a las estructuras extraembrionarias como la placenta y membranas amnióticas (Norwitz et al., 2001)

Durante el **período peri-implantatorio** ocurren modificaciones que van a hacer que el endometrio sea receptivo para la anidación del blastocisto, delimitando así una etapa ubicada en la fase secretoria media entre 6 y 10 días post-ovulación (dpo) conocida como **ventana de implantación**, en donde es posible que ocurra la adhesión del blastocisto exclusivamente. La **receptividad endometrial** consiste en la adquisición de ligandos de adhesión junto con la pérdida de componentes inhibitorios que pueden actuar como una barrera ante la presencia de un embrión por implantarse, por lo que durante este periodo la membrana plasmática de las células epiteliales endometriales sufre importantes cambios morfológicos y bioquímicos. Este estado del útero estaría sincronizado con la activación del

blastocisto, por ese motivo es fundamental la existencia de una interacción sincronizada entre el endometrio receptivo y el blastocisto funcional. En el caso de la ausencia de un blastocisto competente, la ventana de implantación transita espontáneamente hacia una fase refractaria, lo que lleva a la luteólisis y posterior retirada de hormonas, restableciéndose entonces el ciclo con la menstruación (Cha et al., 2012; Fontana, 2008)

La **decidualización** en humanos es un proceso que ocurre independientemente de la presencia del blastocisto en la cavidad uterina, pero sí dependiente de señales maternas, que comienza en la fase secretoria tardía (aproximadamente 10 dpo) con la secreción de progesterona y que continúa durante el embarazo, en donde se modifican las células estromales del endometrio, las glándulas uterinas, los vasos y la población de células inmunes uterinas (Dey et al., 2004; Lunghi et al., 2007; Salamonsen et al., 2009).

La **implantación** ocurre alrededor de 8 o 9 días post fecundación, durante la ventana de implantación comprendida entre los días 20 y 24 del ciclo menstrual. Antes de que el blastocisto pueda anclarse en la superficie uterina, es indispensable que suceda la ruptura de la ZP o "*hatching*", efectuada por una enzima tipo tripsina producida por el trofoectodermo alrededor del sexto día post fecundación (Fontana, 2008; Norwitz et al., 2001).

Dentro del proceso de implantación, se pueden distinguir tres etapas (Fig. B):

- 1) Aposición: consiste en la adhesión inicial de tipo inestable del blastocisto con la pared uterina. Durante este periodo la membrana plasmática de las células trofoblásticas y de las células epiteliales uterinas se encuentran yuxtapuestas y separadas por una mínima distancia.
- 2) Adhesión estable: está caracterizada por una conexión física más estrecha entre el trofoblasto y el epitelio. En la ventana de implantación hay una reorganización e inducción de moléculas de adhesión en las células epiteliales, como selectinas e integrinas que aseguran una unión más estable.
- 3) Invasión: comienza cuando el blastocisto atraviesa la membrana basal del epitelio uterino y endotelio, estableciendo una conexión con el suministro sanguíneo materno. Es un proceso autolimitado y controlado tanto por el útero como por las células trofoblásticas que conforman al blastocisto.

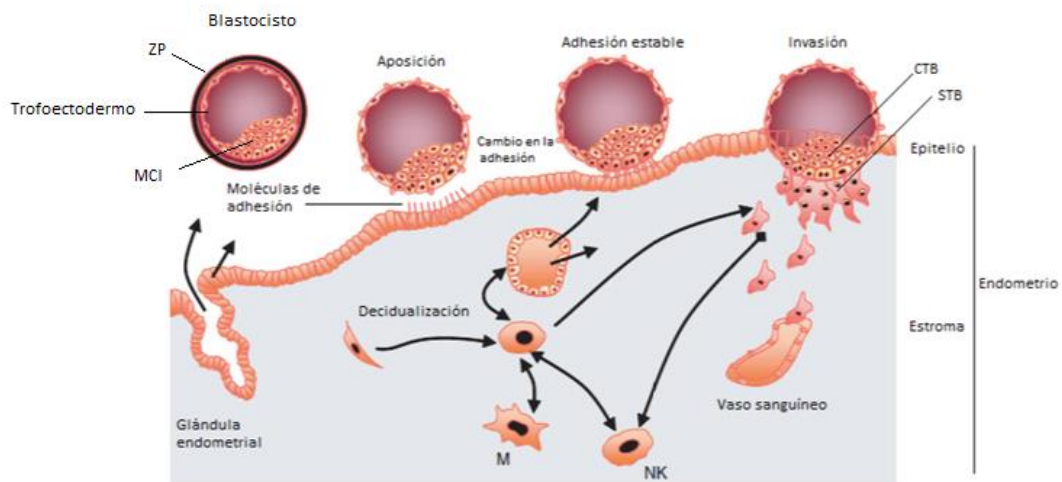


Figura B: Proceso de implantación. Imagen tomada y adaptada de (Salamonsen et al., 2009). M: macrófago, NK: célula *natural killer*.

1.2. Placentación

La placenta es la principal **interfase materno-placentaria**, y está compuesta por dos partes: el trofoblasto de origen embrionario y la decidua de origen materno. Las funciones de la misma son fundamentales, ya que de ella depende el desarrollo fetal intrauterino. Por un lado, se encarga de proporcionar nutrientes, oxígeno y de eliminar los desechos metabólicos generados a medida que avanza la gestación, así como de producir hormonas que tienen efectos en el crecimiento y desarrollo fetal (Fowden et al., 2008). Por otro lado, la placenta ejerce funciones inmunológicas, gracias a la expresión de receptores de reconocimiento de patrones (RRP) como los de tipo Toll (TLR), que son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) y actuar como una barrera de protección contra agentes patógenos, además de la capacidad para modular los perfiles funcionales de los leucocitos presentes en la decidua contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis inmune (Abrahams et al., 2004; Racicot et al., 2014).

Durante la implantación del blastocisto en el epitelio uterino, las células trofoblásticas que conforman al trofoectodermo comienzan a diferenciarse, y con ello a adquirir distintas características. Por un lado, las células cercanas al embrioblasto o MCI retienen su carácter epitelial y generan una capa de células mononucleadas llamada **citotrofoblasto** (CTB). Estas células proliferan continuamente, se diferencian y se fusionan generando una capa más externa formada por células multinucleadas no proliferativas llamada **sinciotrofoblasto** (STB). Esta capa de células posee capacidad invasiva y ayuda a penetrar el tejido materno

al comienzo de la implantación, gracias a la producción de proteasas unidas a la membrana del trofoblasto o secretadas al espacio extracelular que van degradando la matriz extracelular del epitelio uterino (Huppertz, 2008; Lunghi et al., 2007).

La capa de STB desempeña un papel crucial en el intercambio de gases y nutrientes, y además posee actividad endocrina, liberando hormonas involucradas en la homeostasis del embarazo. Como el crecimiento y la demanda de nutrientes del feto aumentan con el embarazo, este epitelio multinucleado debe expandirse y renovarse continuamente para asegurar el progreso de la gestación. Como consecuencia, la proliferación de CTB durante el primer trimestre es fundamental para el crecimiento placentario, dado que es la población germinativa que prolifera y se diferencia continuamente hacia CTB y STB (Forbes & Westwood, 2010).

Los primeros días después de la implantación están caracterizados por una intensa reorganización del STB, en donde se desarrolla una capa que rodea completamente al embrión y se forman cavidades que luego se fusionan y generan otras más amplias llamadas lagunas sinciciales. Estos espacios lacunares sinciciales se van comunicando con los senos vasculares maternos y con la luz glandular, obteniendo así nutrientes provenientes de la degradación del estroma endometrial, la sangre materna extravasada y las secreciones glandulares (Moffett & Loke, 2006).

Aproximadamente 2 semanas después de la implantación, las células CTB se abren paso en la capa de STB para dar lugar a las **células trofoblásticas extravelosas (EVT)**, que comienzan a invadir el estroma uterino en forma de columnas celulares. A su vez, las células EVT se clasifican según el lugar al cual migran en el endometrio y su función. Por un lado, están las células **EVT intersticiales (EVTin)**, que son las que primero migran a la decidua materna e interaccionan con leucocitos y células musculares y epiteliales de los vasos sanguíneos. Estas interacciones son importantes tanto en la generación de la tolerancia inmunológica hacia el feto, como también para el remodelado de las arterias espiraladas (Ae), ya que generan la apoptosis principalmente de las células musculares de éstas. Por otro lado, están las células **EVT endoteliales (EVTen)** con fenotipo invasivo que migran hacia las Ae, disociando y sustituyendo las capas musculares y endoteliales de las mismas, generando hacia el final de la semana 6 de gestación un canal de diámetro considerablemente mayor respecto a la arteria inicial. De esta manera, hacia la semana 10-12 de gestación se establece la placentación hemocorial que se completa en las siguientes semanas (Fig. C), en donde la sangre materna en el espacio intervelloso está en contacto directo con el trofoblasto (Knöfler & Pollheimer, 2013; Lunghi et al., 2007).

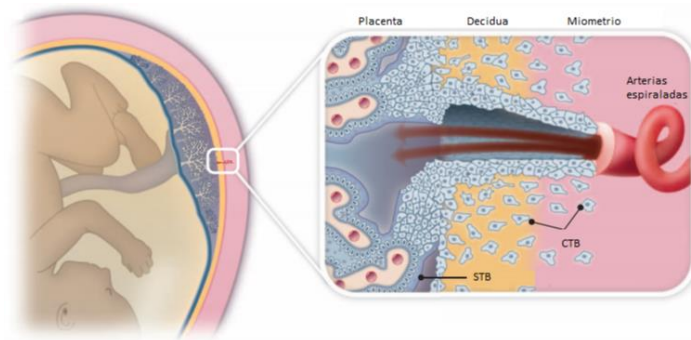


Figura C: Esquema la Interfase materno-placentaria. Imagen tomada y modificada de (Romero et al., 2014).

1.3. Gestación en ratones

Anatómicamente el útero de los ratones, a diferencia de los humanos, posee dos cuernos que están conectados a la vagina mediante el cérvix (Fig. D). En los extremos, se encuentran los ovarios con los respectivos oviductos (Treuting P, 2017)

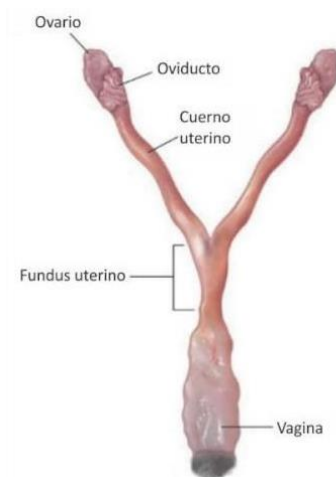


Figura D: Aparato genito-urinario murino. Imagen tomada y modificada de (Treuting P, 2017)

Los ratones son ovuladores espontáneos y tienen un ciclo estral que se repite cada 4 a 5 días y se divide en proestro, estro, metaestro y diestro. Brevemente, el proestro es el momento en el cual se desarrolla el folículo ovárico, el estro es el estadio en que la hembra se encuentra receptiva a los machos y ocurre la cópula, en el metaestro los óvulos formados y madurados se mueven por el oviducto hacia el útero y en el diestro los folículos sufren un rápido desarrollo para prepararse para la próxima ovulación (Croy et al. Eds, 2015).

Dependiendo de la cepa utilizada, el período de gestación dura entre 19 y 21 días a partir de la cópula y la camada varía entre 6 y 14 crías. El día de apareo puede determinarse a partir de la observación del tapón vaginal que es una sustancia viscosa liberada por el macho y la hembra. Tanto el endometrio como el miometrio funcionan en conjunto para recibir al embrión, sostener su crecimiento y expulsar al feto en el momento del parto, de manera similar a lo que ocurre en humanos (H. Wang & Dey, 2006)

Los ratones al igual que los humanos presentan placentación hemocorial (Moffett & Loke, 2006). En el ratón, los blastocistos entran en el cuerno uterino y pierden la zona pelúcida al día 4,5-5 de gestación avanzan hasta alcanzar el segmento medio y posteriormente comienzan a espaciarse igualmente en ambas direcciones desde el centro de cada cuerno, logrando diseminarse uniformemente para luego implantarse. Una vez implantado el embrión, al día 5,5 de gestación las células más externas del trofoectodermo se diferencian a **células trofoblásticas gigantes (TGC)** que conforman una capa simple de células o monocapa que envuelven al embrión. A los 6,5 días de gestación el trofoectodermo prolifera dando lugar al cono ectoplacentario (EPC) y, a su vez, del EPC migran irregularmente células trofoblásticas formando lagunas intercelulares en las que puede observarse sangre materna.

Entre los días gestacionales 8,5 y 10,5 las TGC se observan entre los capilares de la decidua y la placenta y secretan moléculas que intervienen en la remodelación vascular. Por sus características funcionales, a las TGC se las compara con las células de trofoblasto extraveloso invasivas. Las TGC presentan aumento de actividad de MMP9 y una intensa actividad fagocítica con erosión y desplazamiento del epitelio y estroma decidual. En ratones, a diferencia de los humanos, la invasión es menos profunda; los vasos pierden la capa de músculo liso, pero a diferencia de los cambios en placenta humana, los vasos no se transforman completamente en la decidua y el primer segmento del miometrio (Carter, 2007; Clark, 2014). Finalmente, para el día 10,5 de gestación las distintas regiones de la placenta ya están formadas.

2. Remodelación vascular en la interfase materno-placentaria

El desarrollo fetal saludable depende fundamentalmente de la adecuada transferencia de nutrientes y oxígeno a través de la placenta. Para asegurar esto, es crucial una vasculatura placentaria óptima que facilite el desarrollo intrauterino. La vasculogénesis, proceso mediante el cual células mesenquimales se diferencian a células madre hematopoyéticas y luego a precursores endoteliales (Demir et al., 2007) junto con la angiogénesis, que remodela la

vasculatura existente son esenciales para formar y madurar las vellosidades placentarias, que forman la interfase materno-fetal. Este desarrollo vascular comienza temprano en el embarazo y experimenta cambios a lo largo de la gestación (Y. Wang, 2010). La adaptación vascular materna implica la remodelación de las arterias espirales uterinas por parte de las EVT invasivas, permitiendo un flujo sanguíneo de baja resistencia hacia el espacio intervilloso de la placenta (Weckman et al., 2019).

La familia de ligandos y receptores VEGF (Vascular endothelial growth factor) juegan un papel crucial en la regulación tanto de la vasculogénesis como de la angiogénesis. Desde las etapas tempranas del desarrollo, la expresión de VEGF por células citotrofoblásticas y células de Hofbauer impulsa la formación de la red vascular placentaria necesaria para el adecuado desarrollo fetal a lo largo del embarazo. Numerosos estudios indican que las infecciones maternas sistémicas y la inflamación resultante pueden alterar tanto la vasculogénesis como la angiogénesis placentaria comprometiendo el crecimiento fetal y contribuyendo a patologías gestacionales como parto prematuro, restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), preeclampsia (PE) y bajo peso al nacer (BPN). Las células trofoblásticas, además de expresar VEGF, juegan un papel crucial en el equilibrio de otros factores como PIGF (Factor de Crecimiento Placentario) y su inhibidor sFlt-1 (Receptor semejante a tirosina quinasa-1 soluble). La señalización de ANGPT1 (Angiopoyetina 1) y su antagonista ANGPT2 (Angiopoyetina 2), a través de su receptor Tie2, también son esenciales para la vascularización placentaria, promoviendo la maduración y estabilidad vascular, así como la angiogénesis y remodelación vascular necesarias para un desarrollo placentario adecuado. El control riguroso de estas vías es crucial para asegurar la función placentaria (Carmeliet, 2000; Geva et al., 2002; Kaufmann et al., 2004).

Las infecciones maternas pueden desregular estos procesos, alterando el equilibrio entre factores pro- y anti-angiogénicos y contribuyendo a patologías gestacionales. Estudios han documentado la desregulación de mediadores angiogénicos como sFLT-1, ANGPT1, ANGPT2 y PIGF, así como alteraciones estructurales y funcionales en la vasculatura placentaria en contextos de infección materna, asociándose con complicaciones gestacionales (Geva et al., 2002; Levine et al., 2004; Romero et al., 2011; SHARKEY et al., 1996; Venkatesha et al., 2006).

Durante el embarazo, el sistema inmune materno se adapta para proteger al feto y la placenta (Regal et al., 2015). Las principales poblaciones leucocitarias presentes en la decidua materna durante el comienzo de la gestación son células NK, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T. En menor medida también se encuentran linfocitos B y granulocitos

como los neutrófilos, si bien estos últimos son reclutados en alta proporción cerca del parto (Gomez-Lopez et al., 2010). Las células NK deciduales (dNK), quienes constituyen un 70 % de la población leucocitaria presente en la decidua durante el primer trimestre de gestación, debido a que cumplen funciones en conjunto con las células trofoblásticas en el remodelamiento vascular durante la formación de la placenta. Estas células exhiben un fenotipo único que difiere de las NK periféricas, ya que poseen baja citotoxicidad, son capaces de interactuar con macrófagos deciduales e inducen la generación de células Treg (Vacca et al., 2010). Los macrófagos deciduales, a su vez constituyen entre el 20-30% de las células inmunes deciduales, son esenciales en la remodelación del tejido, fagocitando células apoptóticas y produciendo factores de crecimiento y citoquinas que facilitan la angiogénesis y el desarrollo placentario (Abrahams et al., 2004).

3. Periodontitis y complicaciones del embarazo

Los trastornos hipertensivos y la preeclampsia son la primera causa directa de mortalidad materna en la Argentina y la segunda a nivel mundial (Alkema et al., 2016). Junto a la prematuridad, bajo peso y muy bajo peso al nacer (<2500 g o <1500 g) contribuyen en más de la mitad a la tasa de mortalidad infantil en Argentina y se asocian con reprogramación fetal de enfermedad metabólica y cardiovascular en la vida adulta (Luu et al., 2017). La importancia que reviste su caracterización clínica y la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que expliquen su etiología y desarrollo. Al momento, no se dispone de marcadores específicos y tempranos predictores de insuficiencia placentaria que lleva a PE, trastornos hipertensivos asociados al embarazo (HIE) y BPN.

La PE es un desorden multisistémico del embarazo caracterizado por un cuadro de hipertensión luego de la semana 20 con presencia de proteinuria (Redman & Sargent, 2010). Si bien inicialmente se creía que el cuadro tiene etiología en una invasión trofoblástica deficiente con perfusión intervillosa deficiente, principalmente para el desarrollo de PE tempranas, las cuales suelen estar asociadas a RCF (Burton & Jauniaux, 2018), actualmente se comprende que es una enfermedad de alta heterogeneidad. Sin embargo, se cree que los signos sistémicos observados en la PE, tanto en la PE de desarrollo temprano como en la PE de desarrollo tardío, son causados por factores producidos y liberados por el STB como exosomas y citoquinas pro-inflamatorias en condiciones de estrés (Burton & Jauniaux, 2018; Deer et al., 2023).

Se ha establecido una asociación positiva entre la enfermedad periodontal durante el embarazo y ciertas complicaciones vinculadas a la insuficiencia placentaria. Si bien el espectro de tales complicaciones es amplio, un meta-análisis publicado en 2022 centra el mayor riesgo de desarrollar HIE, PE y BPN por prematurez asociado a la periodontitis (Le et al., 2022).

En placentas de mujeres con PE, se reportó la presencia de microorganismos periodontopáticos como *Variovorax*, *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Dialistero*, así como de sus productos derivados (Amarasekara et al., 2015; Barak et al., 2007). *Porphyromonas gingivalis* (Pg) se ha detectado en fluido amniótico y placa subgingival en pacientes con parto pretérmino (León et al., 2007).

Utilizando diversos modelos murinos se ha demostrado que la infección al día 7,5 de gestación con *Campylobacter rectus* induce una restricción en el crecimiento intrauterino asociado a una disminución en la expresión de genes críticos para el crecimiento y el desarrollo fetal (Bobetsis et al., 2010) y que una inyección intravenosa al día 13,5 de gestación con *Fusobacterium nucleatum* induce parto pretérmino en ratones (Stockham et al., 2015). Asimismo, ratones que presentan una infección dental con *Pg* previa a la gestación, tienen parto pretérmino y bajo peso de las crías al nacer (Ao et al., 2015; Yoshida et al., 2022).

Sin embargo, tanto en humanos como en los modelos murinos no se han podido dilucidar los mecanismos celulares y moleculares por los cuales las infecciones por patógenos periodontales frecuentes conducen a las mencionadas complicaciones. En la figura E se describen los modelos propuestos sobre los mecanismos mediante los cual estarían vinculadas. Por un lado, las bacterias o productos derivados de las bacterias como sus factores de virulencia podrían alcanzar la placenta por diseminación hematógena desde la cavidad oral generando una respuesta deletérea en la placenta. Por otro lado, se propone que mediadores inflamatorios secretados en el sitio infectado generan un cuadro de inflamación sistémica. Estos mediadores serían los que llegan a la placenta generando una respuesta deletérea.

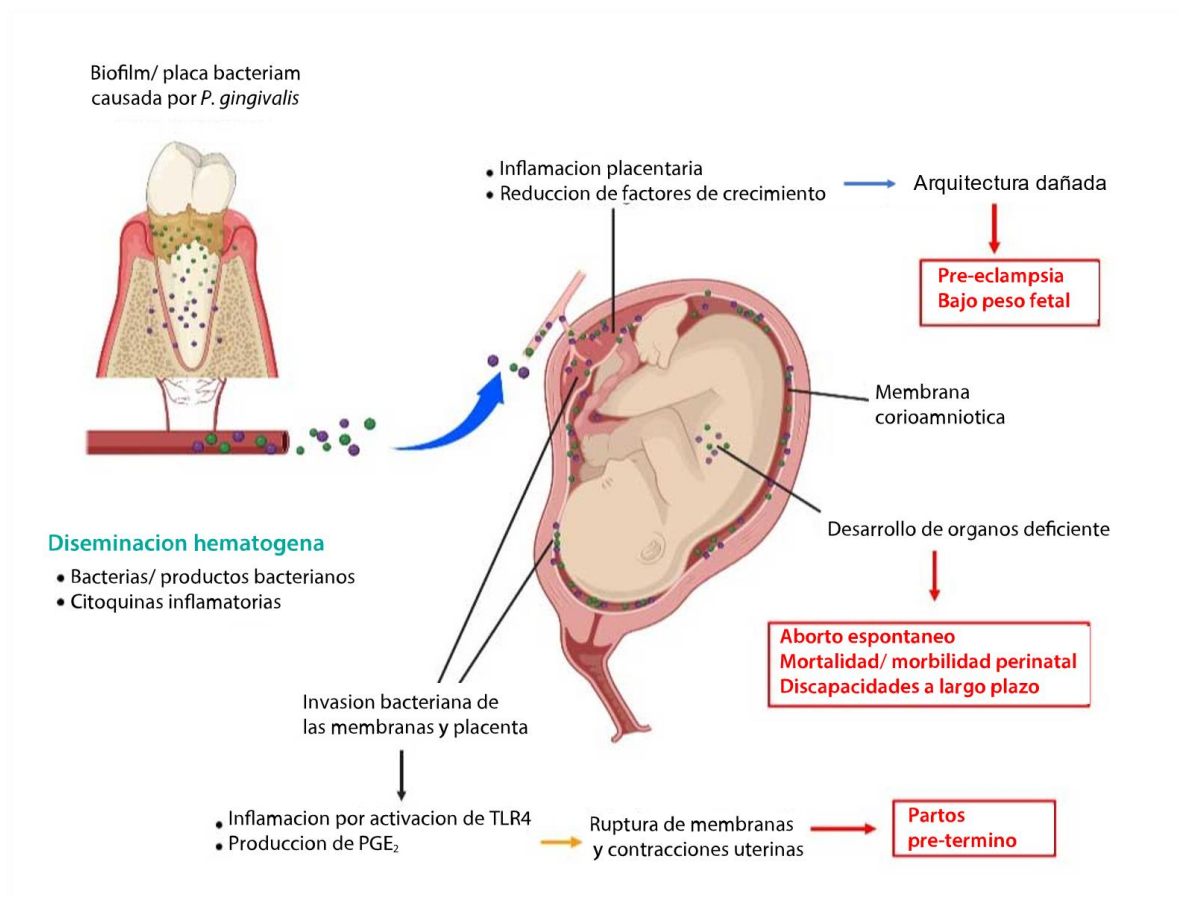


Figura E. Mecanismos propuestos que vincularían las infecciones periodontales y complicaciones en la gestación. Adaptado y modificado de (N. Madianos et al., 2013).

Porphyromonas gingivalis (Pg), una bacteria anaerobia gram-negativa, es considerada un patógeno clave en la patogénesis de las infecciones periodontales. Si bien los mecanismos de patogénesis no son completamente comprendidos, se ha reportado que Pg produce numerosos factores de virulencia, como el lipopolisacárido (LPS) junto con las gingipaínas y las fimbrias que van a permitir colonizar y destruir tejidos y evadir la respuesta inmune (Jia et al., 2019). Estos factores de virulencia pueden ser liberados después de la lisis bacteriana o como vesículas de membrana externa (OMV, del inglés *Outer Membrane Vesicles*) que son producidas por evaginaciones de membrana en células en fase de crecimiento y división de las bacterias (Cecil et al., 2019; Gui et al., 2016).

Estas vesículas son nanoestructuras compuestas por una bicapa similar a una membrana y poseen un diámetro de entre 50 y 250nm. Estas estructuras son derivadas de la membrana externa por un mecanismo de biogénesis común entre las bacterias gram-negativas. Están compuestas por proteínas de membrana, LPS, fosfolípidos, peptidoglicanos,

DNA, miRNAs y parte del periplasma bacteriano (Choi et al., 2017) y son fundamentales para la comunicación entre las células del huésped y la bacteria, entre poblaciones bacterianas y en la respuesta a factores ambientales (Stanton, 2021). Las OMVs presentan una ventaja frente la bacteria entera: por un lado, estas estructuras confieren protección frente a la degradación proteolítica, por otro lado, pueden ingresar y ser diseminadas por circulación sistémica y acceder a áreas en los tejidos que son inaccesibles para la bacteria entera. En este sentido, se ha reportado la presencia de Pg-OMV en muestras de sangre periférica y líquido cefalorraquídeo en modelos murinos con infecciones bacterianas severas (Bonnington & Kuehn, 2014; Zhang et al., 2021). En la figura F se detalla la estructura de las OMV, su biogénesis y sus potenciales roles.

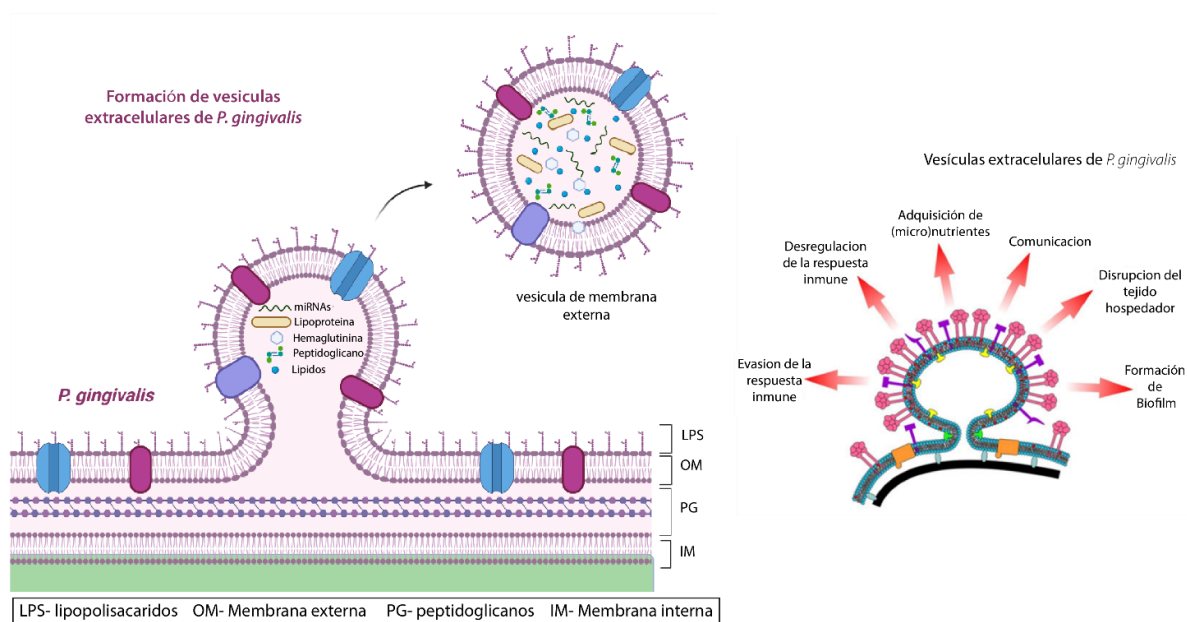


Figura F. Proceso de biogénesis de OMVs. En el interior y en las superficies de las OMVs se pueden encontrar factores de virulencia como lipopolisacáridos (LPS), miRNAs, peptidoglicanos (PG) y lípidos. Se considera que las OMVs cumplen funciones fundamentales para la supervivencia y la colonización de nichos biológicos. Modificado de (M. J. Gui et al., 2016)

En los tejidos diana las OMV-Pg inducen una variedad de respuestas inmunológicas y metabólicas en las células del hospedador (Zhang et al., 2021). En este sentido en diversos modelos se ha demostrado que las OMV-Pg interrumpen las uniones estrechas en monocapas epiteliales, inducen el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos y estimulan una alta respuesta de citoquinas proinflamatorias (Farrugia et al., 2020). En estudios previos del laboratorio hemos demostrado utilizando un modelo murino de gestación que el tratamiento

con OMV-Pg al día 6,5 de gestación altera la adecuada evolución de la gestación ya que al día 14,5 de gestación presentaron un menor peso fetal para su edad gestacional acompañada de una disminución en el peso placentario (Knöfler et al., 2019). Asimismo, utilizando la línea celular trofoblástica de primer trimestre HTR-8 hemos demostrado que el tratamiento con OMV-Pg induce una reprogramación metabólica de las células Tb que afectan su capacidad de migrar e invadir. Por otro lado, encontramos que las OMV-Pg alteran la expresión de factores pro y anti-angiogénicos en las células Tb (Dusza et al., 2023). *Sin embargo, al momento se desconoce los mecanismos por los cuales las OMV-Pg Tb podrían estar alterando la remodelación vascular durante la gestación.*

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO: OMV liberadas por *Porphyromonas gingivalis* (Pg) afectan la funcionalidad de las células trofoblásticas (Tb) en etapas tempranas de la gestación condicionando su interacción con las células endoteliales (EC). Esta disfunción de las células trofoblásticas conduce a fallas en la remodelación vascular durante la placentación afectando la evolución de la gestación y el crecimiento fetal.

Para abordar esta hipótesis nos proponemos los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Investigar el efecto de vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) sobre la función endovascular de las células trofoblásticas (Tb) y su impacto en la remodelación vascular.

Objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Estudiar el efecto de las OMV-Pg en la interacción de células Tb con EC y su impacto en la remodelación vascular.

- a) Determinar si el tratamiento de las Tb con OMV-Pg modula la expresión de marcadores angiogénicos.
- b) Determinar si factores solubles producidos por Tb tratadas con OMV-Pg modulan la migración, la activación y la producción de especies reactivas de oxígeno en células endoteliales EA.hy926.

Objetivo específico 2: Estudiar el efecto del tratamiento con OMV-Pg sobre la placentación en un modelo murino de gestación temprana, con especial foco en el proceso de remodelación vascular.

Se evaluará si el tratamiento con una única inyección i.p. de OMV-Pg 0,5 µg/kg al día 6,5 de gestación altera la constitución de la interfase materno-placentaria analizando los sitios de implantación al día 8,5 de gestación. Particularmente proponemos:

- a) Analizar la estructura de los sitios de implantación en cortes histológicos con tinción de hematoxilina-eosina.
- b) Evaluar la expresión de marcadores de placentación y angiogénesis en los sitios de implantación

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelos y protocolos experimentales

1. Cultivos celulares

1.1 Líneas Celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Línea celular trofoblástica humana HTR-8/SVneo (H8) que deriva de citotrofoblasto de primer trimestre (entre las semanas 6-12 de gestación) y fueron inmortalizadas con el antígeno largo T del virus de simio (del inglés, *simian virus 40 large T antigen*)
- Línea celular endotelial inmortalizada EA.hy926 que fue obtenida a partir de células HUVEC de pasaje 1 y células de la línea A549 de adenocarcinoma pulmonar humano, mediante un protocolo de fusión con polietilenglicol (Edgell et al., 1983).
- Línea celular monocítica THP-1 de leucemia humana derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda. Se utiliza como modelo para estudiar la función de los monocitos y los macrófagos.

1.2 Mantenimiento

Las células H8 y EA.hy926 se mantuvieron en medio humidificado a 37°C, con 5% CO₂ en Dulbecco's modified Eagle's medium and Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) (Life Technologies, Grand Islands, NY, USA) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Natocor) inactivado por calor, glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich) y solución de estreptomicina 100 U/ml - penicilina 100 µg/ml (Life Technologies, Grand Islands, NY, USA). Las líneas se cultivaron en 3 ml de DMEM-F12 10% SFB en botellas T25. Para realizar los repiques, las líneas se trataron con 1 ml de Tripsina 0,25%/EDTA (Life Technologies, Grand Islands, NY, USA). Para la criopreservación de las células, el pellet obtenido luego del tratamiento con Tripsina se resuspendió en 1 ml de medio de congelación (10% DMSO en SFB), se traspasó a un criotubo y se enfrió gradualmente desde -20 ° C hasta N₂ líquido. Para el descongelamiento se retiraron los criotubos de N₂ líquido, se centrifugaron y las células se resuspendieron en 3 ml de DMEM-F12 10% SFB.

Las células THP-1 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con NaHCO₃ 26,8 mM y suplementado con SFB 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, glutamina 1%, glucosa 250 mg/ml, piruvato de sodio 11 mg/L y β-mercaptoetanol 50 µM. Las mismas fueron mantenidas a una densidad de 1,5x10⁵ cél/ml en estufa a 37 °C y 5% de CO₂. El medio fue renovado cada 3-4 días. Para ello, las células fueron centrifugadas a 350 g durante 10 minutos y resuspendidas en medio de cultivo.

1.3 Preparación de medios condicionados de células trofoblásticas.

Los medios condicionados utilizados en los ensayos de migración, activación del endotelio, y producción de especies reactivas de oxígeno (que se describirán a continuación) fueron obtenidos a partir de células H8. Brevemente, se sembraron 50.000 células en placa de 6 pocillos. Una vez que las células llegaron al 80% de confluencia las mismas fueron estimuladas por 6 horas en presencia o ausencia de OMV-Pg 1 µg/ml. Luego se realizaron varios lavados para eliminar las vesículas no internalizadas y se reemplazó el medio con DMEM fresco. Las células fueron incubadas en estufa a 37°C, con 5% CO₂ durante 24 horas. De esta manera se obtuvieron medio condicionado de células trofoblásticas (MC Tb) o medio condicionado de células trofoblásticas pretratadas con OMV-Pg (MC Tb OMV-Pg). Los MC se recolectaron, se centrifugaron para remover debris celular y congelaron a -20 °C hasta su uso.

2. Aislamiento de vesículas de membrana externa de *Porphyromonas ginigvalis*

Las OMV-Pg fueron aisladas de sobrenadantes de 5 días de cultivo de *P. gingivalis* ATCC 33277 en condiciones de anaerobiosis. Los sobrenadantes de cultivo fueron centrifugados a 4 °C durante 20 minutos a 4000 x g. El sobrenadante obtenido fue filtrado a través de una membrana estéril con un tamaño de poro de 0,22 µm.

El sobrenadante filtrado fue ultracentrifugado a 100.000 x g a 4 °C durante 1 hora. Una vez terminada la ultracentrifugación, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido con 1 mL de buffer fosfato salino (PBS) y filtrado a través de un filtro estéril de 0,22 µm nuevamente. Luego se realizó un segundo paso de ultracentrifugación a 4 °C durante 70 minutos y a 100.000 x g. El pellet obtenido fue resuspendido en 500 µl de PBS estéril y filtrado nuevamente a través de un filtro estéril con tamaño de poro de 0,22 µm y alicuotado de a 50 µl (Figura G).

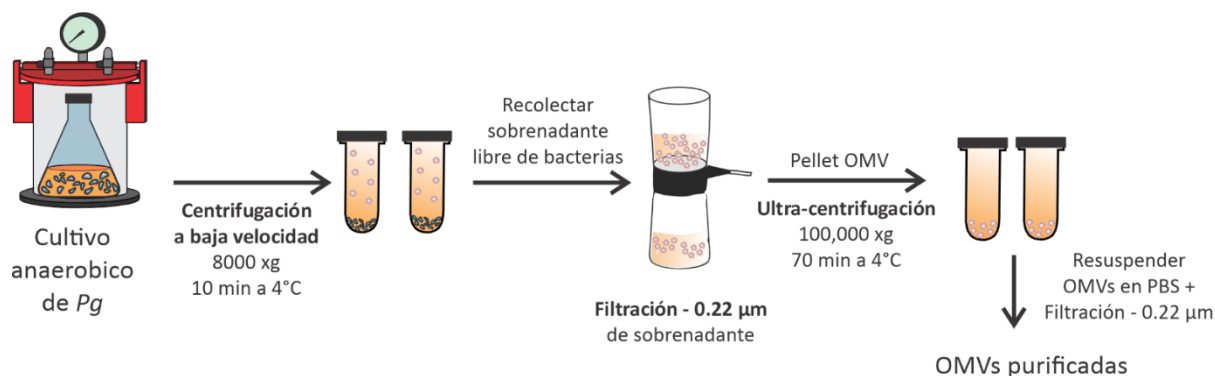


Figura G. Protocolo de aislamiento de OMVs. Modificado de B. Lara, *et al.*, 2023)

Las vesículas obtenidas fueron caracterizadas siguiendo las normativas establecidas por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) como se muestra en la figura H. Las vesículas se visualizaron por microscopía de transmisión electrónica (Figura H.a). Se determinó la distribución de tamaños de las partículas por medio del análisis de la dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering-DLS) utilizando el Zetasizer ZS90 (Malvern Panalytical, Malvern, UK) (Figura H.b) y se determinó la concentración proteica por la técnica de µBCA (Figura H.a). Las OMVs obtenidas se conservaron a -80 °C para los experimentos posteriores.

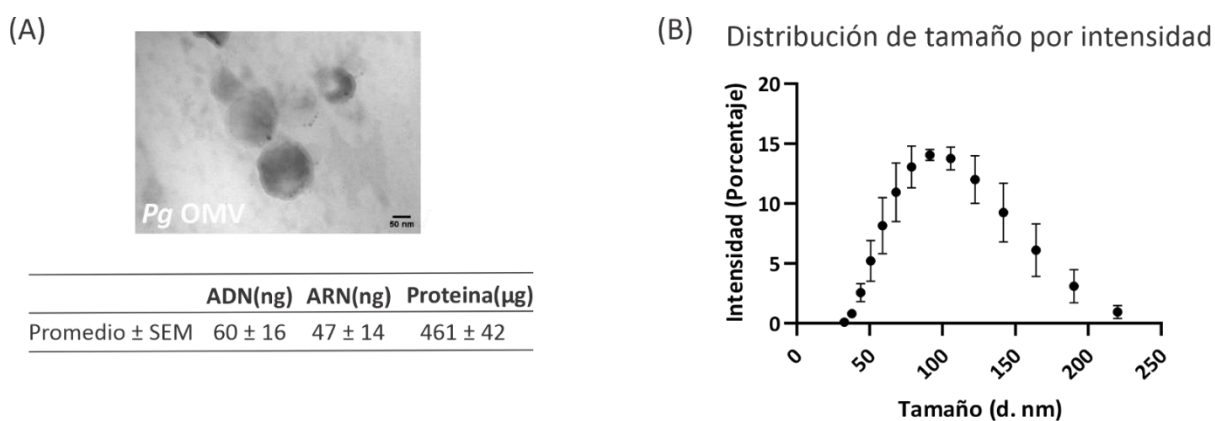


Figura H. Microscopía de transmisión electrónica mostrando imagen representativa de las OMVs extraídas donde la barra de escala representa 50 nm, la magnificación es de 250.000X (A). Análisis de distribución de tamaños de OMV-Pg por DLS en donde el diámetro está notado en nm (B).

3. Ensayo de migración

Para evaluar la capacidad de migración se realizó un ensayo de *wound-healing*. Brevemente, 40.000 células EA.hy926 fueron sembradas sobre una placa de 48 pocillos. Al llegar a confluencia las células fueron lavadas 2 veces con PBS para eliminar los restos de SFB y se las incubó por 8 horas en medio DMEM-F12 en ausencia de SFB a fin de sincronizar a las células. Posteriormente se realizó una herida con un tip p10 y se agregaron los distintos MC diluidos al medio con medio DMEM/F12 sin SFB. Para determinar la cinética del cierre de la herida, se tomaron fotografías a tiempo 0, a las 18 horas post-herida. Para calcular el porcentaje de cierre de herida, en todos los casos, se determinó el área de la herida en las distintas condiciones, en los tiempos indicados, y se analizaron utilizando el programa ImageJ. Las fotografías se tomaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse TS100 con un objetivo de 10X.

4. Ensayo de activación del endotelio

Se estimularon células EA.hy926 durante 24 horas en presencia de MC Tb, OMV-Pg MC Tb o en medio basal (control). Por otro lado, células THP-1 (aproximadamente 10^5) fueron marcadas con calceína AM (5 μ M en PBS) por 15 minutos a 37°C. A continuación, las células fueron lavadas 2 veces con medio RPMI y resuspendidas en 100 μ L de medio antes de agregarlas a cultivos de EA.hy926 durante 1 hora para permitir su adhesión. Pasado el tiempo de interacción, las células endoteliales fueron cuidadosamente lavadas con PBS precalentado para remover a las células THP-1 no adheridas. Se agregaron 100 μ L de PBS a cada well y se tomaron microfotografías con un microscopio de epifluorescencia. Los monocitos adheridos fueron contados. Los resultados se informan como veces de cambio relativo a las células control.

5. Producción de especies reactivas de oxígeno

10.000 células fueron sembradas en placa de 96 pocillos negra con fondo transparente. Las mismas fueron estimuladas por 24 horas con condiciones basales, en presencia de OMV-Pg o con MC Tb o MC Tb OMV-Pg. Pasado el tiempo de estimulación, las mismas se incubaron por 30 minutos adicionales con la sonda diclorofluoresceína diacetato (5 μ M) (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich). Al finalizar la incubación, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y la fluorescencia se determinó por fluorimetría utilizando el equipo FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Alemania).

6. Animales, condiciones de apareo y parámetros gestacionales

Se usaron ratones C57BL/6 WT criados y mantenidos durante 12:12 horas de luz-oscuridad en el Bioterio Central de la FCEyN. Se estudiaron apareos de ratones adultos (9-10 semanas de edad) considerando la aparición de tapón vaginal como día gestacional 0,5. Al día 6,5 de gestación se inyectó intraperitonealmente una dosis 5 µg/kg de OMV-Pg o PBS como control. No fue parte de esta tesis el manejo de los animales en el bioterio por parte del autor. A los días 8,5 las hembras fueron eutanasiadas y se evaluaron la tasa de reabsorción embrionaria, indicadores macroscópicos de gestación y se realizó el aislamiento de los sitios de implantación. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con los protocolos estándar y fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Buenos Aires.

7. Cultivos de sitios de implantación

Después de sacrificar a las hembras preñadas en el día 8,5 de gestación se extrajeron los úteros completos y se diseccionaron y separaron los sitios de implantación. 3 sitios de implantación de cada hembra fueron utilizados para la realización de los cultivos *ex vivo*. Estos sitios seleccionados fueron pesados individualmente. Luego fueron cultivados individualmente en medio DMEM/F12 por 24 horas en presencia o ausencia de OMV-Pg 1 µg/ml. Pasado el tiempo de estimulación, los mismos se incubaron por 30 minutos adicionales con la sonda diclorofluoresceína diacetato (5 µM) (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich). Al finalizar la incubación, los sitios fueron lavados 2 veces con PBS y se colocaron en 0,2 ml de buffer RIPA frío respectivamente y se homogeneizaron con Ultra Turrax (IKA, Alemania). Los homogeneizados se centrifugaron a 12500 g a 4 °C durante 15 minutos y se usaron 100 µl de cada sobrenadante para la cuantificación de la fluorescencia en el lector de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Alemania). Se cuantificaron los microgramos de proteínas presentes en cada una de las muestras. Los resultados obtenidos se expresan como intensidad de fluorescencia (I.F.M.) sobre microgramos de proteínas totales en el extracto.

8. Generación de cortes histológicos

Después de sacrificar a las hembras preñadas en el día 8,5 de gestación se extrajeron los úteros completos y se diseccionaron y separaron los sitios de implantación. 2 sitios por hembra de cada grupo fueron fijados en PFA 4% durante 24 horas. Luego los sitios fueron embebidos en parafina, se realizaron cortes de 4 μ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E).

9. RT-PCR y RT-qPCR

La expresión génica de ARNm fue determinada por qPCR.

9.1. Extracción de ARNm

Los sitios de implantación fueron resuspendidos en 500 μ l de Trizol® y se procedió a realizar la extracción de ARN total siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se añadió 1/5 de volumen de cloroformo y se centrifugó a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. El ARN se encuentra disuelto en la fase acuosa, la cual se transfirió a un tubo nuevo y para precipitarlo se incubó 10 minutos a 4 °C con isopropanol en relación 1:1. Luego se centrifugó 10 minutos a 12.000 g a 4 °C, quedando el ARN en el pellet. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con 500 μ l de etanol 75% por centrifugación a 7.500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y luego de evaporado el etanol, el ARN fue resuspendido en agua estéril. El ARN fue incubado 10 minutos a 60 °C para desestabilizar su estructura secundaria y luego fue cuantificado a 260 nm en NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Cuando no se realizó la retrotranscripción inmediatamente después, el ARN fue conservado a -80 °C hasta su utilización.

9.2. Obtención de ADNc y ensayos de RT-qPCR

Los ADNc se generaron a partir de 1 μ g de ARN total. La mezcla de reacción fue: dNTPs 25 mM (Embiotec), oligo dT 5 ng/ μ l (Biodynamics), RT M-MLV 100 U, RNAsin 15 U y Buffer RT M-MLV 1X (Promega), hasta un volumen final de 20 μ l. La reacción se llevó a cabo a 42 °C durante 1 hora y se detuvo incubando durante 10 minutos a 90 °C en una termocicladora Bio-Rad MyCycler. El ADNc obtenido se conservó a -20 °C hasta su uso.

Para la determinación de la expresión de ARN mensajeros por PCR a tiempo real, 100 ng de ADNc (50 ng para el gen constitutivo S29 (M)) fueron incubados con FastStart SYBR

Green Master (Roche) y los *primers* correspondientes sentido y antisentido (**Tabla A**) en una termocicladora Bio-Rad iQ2 para PCR en tiempo real. Para evaluar la expresión relativa de los ARNm se utilizó el método de ciclo umbral ($2^{-\Delta CT}$), normalizando la expresión al gen constitutivo (Bookout & Mangelsdorf, 2003).

Gen y Especie	Primer	Secuencia (5'-3')	Ta (C°)
VEGF-A H	Sentido Antisentido	CGCAGCTACTGCCATCCAAT GTGAGGTTTGATCCGCATAATCT	60
PIGF H	Sentido Antisentido	TGTTTCAGCCCATCCTGTGTCTC CCCAGAACGAACGGATCTTTAGG	60
sFLT-1 H	Sentido Antisentido	AGAGGTGAGCACTGCAACAA TCTCCTCCGAGCCTGAAAGT	60
YWAHZ H	Sentido Antisentido	CAGAGAGAAAATTGAGACGGAGC GTGACTGATCGACAATCCCTTTC	60
ANGPT1 M	Sentido Antisentido	GGGGGAGGTTGGACAGTAA CATCAGCTCAATCCTCAGC	60
MCP-1 M	Sentido Antisentido	CTCACCTGCTGCTACTCATTAC ATGTCTGGACCCATTCTTCTTG	62
HIF-1α M	Sentido Antisentido	ACCTTCATCGGAAACTCCAAAG CTGTTAGGCTGGGAAAAGTTAGG	60
HIF-2α M	Sentido Antisentido	CTGAGGAAGGAGAAATCCCGT TGTGTCCGAAGGAAGCTGATG	60
IL-1β M	Sentido Antisentido	TTCAGGCAGGCAGTATCAC CAGCAGGTTATCATCATCATCC	60
IL-6 M	Sentido Antisentido	ACCGCTATGAAGTTCCTCTCTGC AGTGGTATCCTCTCTGTGAAGTCTCC	60
IL-15 M	Sentido Antisentido	CAGTTGCAGAGTTGGACGAAG GCAAGGACCATGAAGAGGCAG	60
PIGF M	Sentido Antisentido	GGAGACGACAAAGGCAGAAAG GGAGACGACAAAGGCAGAAAG	62
PRL3D1 M	Sentido Antisentido	GTCTTGAGGTGCCGAGTTGTC CTGGGTGGGCACTCAACATT	60
RPS29 M	Sentido Antisentido	GGAGTCACCCACGGAAGTTCGG GGAAGCACTGGCGGCACATG	60
sFLT-1 M	Sentido Antisentido	AGAGGTGAGCACTGCAACAA TCTCCTCCGAGCCTGAAAGT	60
VEGF-A M	Sentido Antisentido	CACGACAGAAGGAGAGCAGAAG CTCAATCGGACGGCAGTAGC	60
VEGF-C M	Sentido Antisentido	CACGACAGAAGGAGAGCAGAAG CTCAATCGGACGGCAGTAGC	60

Tabla A: Secuencia de *primers* empleados para el análisis de la expresión génica. ANGPT1 (Angiopoietin 1), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), HIF-1 α (Hipoxia-Inducible Factor 1 α),

HIF-2 α (Hipoxia-Inducible Factor 2 α), IL-1 β (Interleukin 1 β) IL-6 (Interleukin 6), IL-15 (Interleukin 15), PlGF (Placental Growth Factor) PRL3D1 (Placental Lactogen-I Alpha), RPS29 (Ribosomal Protein S29), sFLT-1 (Soluble fms-like tyrosine kinase-1) VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor A), VEGF-C (Vascular Endothelial Growth Factor C) y YHWAZ (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta), M: murino; H: humano.

10. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con GraphPad 9, San Diego, CA. Los sets de datos fueron analizados para evaluar la normalidad y homocedasticidad. Para la comparación entre medias se utilizaron las pruebas estadísticas de t-test de 2 colas para la comparación entre 2 grupos o ANOVA de un factor seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak. En el caso de los datos que no cumplieron los supuestos de normalidad, se realizó un análisis empleando a la prueba no paramétrica de Mann-Whitney o la prueba de Friedman seguida de la comparación de Dunn para las comparaciones entre múltiples grupos. Los resultados se expresan como la media \pm S.E.M. Los resultados se consideraron significativos con $p < 0,05$

RESULTADOS

Capítulo 1

Efecto del tratamiento *in vitro* con OMV de *Porphyromonas gingivalis* sobre la interacción de células trofoblásticas con células endoteliales.

La remodelación de las arterias espiraladas en la interfaz materno-placentaria es crucial para el éxito del embarazo y depende de la interacción entre las células trofoblásticas y las células endoteliales de los vasos maternos. Diversas condiciones pueden interferir con esta remodelación, entre ellas, las infecciones maternas.

Teniendo en cuenta a su vez la asociación entre infecciones odontogénicas maternas y complicaciones gestacionales como el parto prematuro, la pre-eclampsia, y restricción del crecimiento fetal y que las OMVs de *P. gingivalis* han sido implicadas en la modulación de la respuesta inflamatoria y la disrupción de la función endotelial en diversos modelos, nos preguntamos si las vesículas de membrana externa de la bacteria *Porphyromonas gingivalis* modulaba la expresión de los principales mediadores pro y antiangiogénicos en las células trofoblásticas. Como se puede observar en la figura 1 a, el tratamiento con OMV Pg indujo una disminución en la expresión de VEGF-A, PlGF y un aumento en la expresión de sFLT-1.

Teniendo en cuenta que la relación sFLT-1/PlGF ha sido aprobada en la detección de la preeclampsia como una herramienta diagnóstica junto con otros hallazgos clínicos y fue validada como una prueba predictiva, calculamos dicha relación en células trofoblásticas tratadas o no con OMV-Pg. Encontramos que la proporción sFLT-1/PlGF se encuentra aumentada en las células tratadas con vesículas de Pg en cuatro ensayos independientes (Figura 1b).

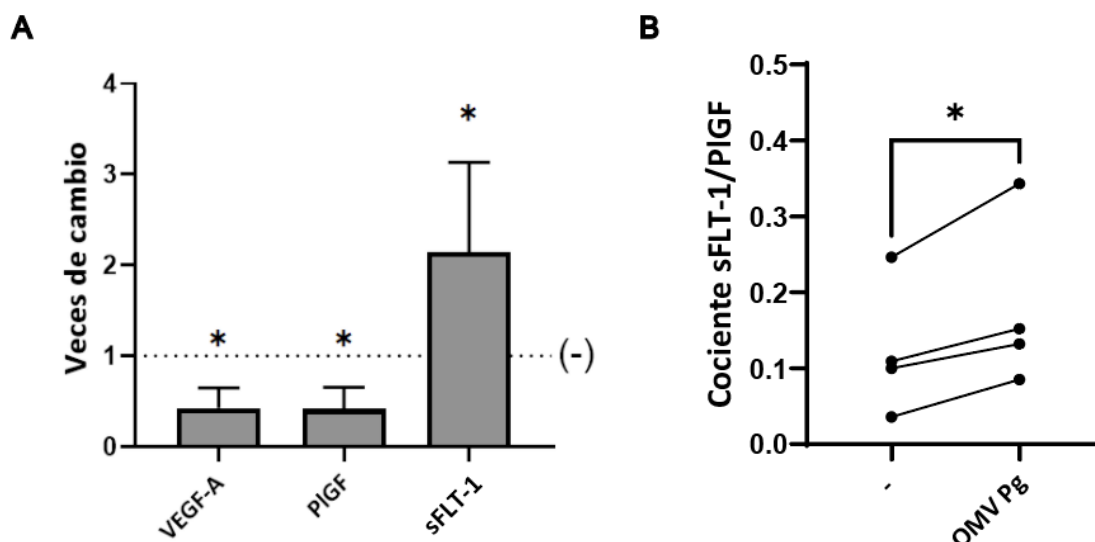


Figura 1. El tratamiento con OMV de Pg modula la expresión de marcadores pro y antiangiogénicos en células trofoblásticas. (A) Las células HTR-8 trofoblásticas fueron incubadas durante 6 horas en presencia o ausencia de 1 µg/mL OMV-Pg. Los niveles de ARNm de VEGF-A, PlGF y sFLT-1 fueron cuantificados por qPCR. Las barras representan las veces de cambio en la expresión génica de células tratadas con OMV-Pg relativo a las células sin este tratamiento (líneas de puntos). N=4, t-test. **(B)** Se calculó el cociente de sFLT-1/PlGF para células HTR-8 trofoblásticas basales (-) o tratadas con OMV-Pg. *p<0,05; t-test pareado.

Dado el desequilibrio en la expresión de mediadores pro- y anti-angiogénicos inducido por el tratamiento con OMV-Pg (Figura 1), a continuación, quisimos evaluar si el tratamiento de las células trofoblásticas con OMV-Pg alteraban la interacción con las células endoteliales. Específicamente decidimos evaluar si los mediadores solubles que liberan las células trofoblásticas tratadas o no con OMV-Pg afectan la funcionalidad de las células endoteliales. Cabe destacar que para la obtención de MC las células son estimuladas con OMV-Pg durante 8 horas y luego son lavadas e incubadas durante 16 horas para la obtención de medio condicionado libre de vesículas. En primer lugar, estudiamos la capacidad de migración de las células endoteliales mediante un ensayo de cierre de la herida. Como se puede observar en la figura 2 el MC de células trofoblásticas pretratadas con OMV-Pg disminuye significativamente la migración de las células endoteliales en comparación con el medio condicionado control (Figura 2).

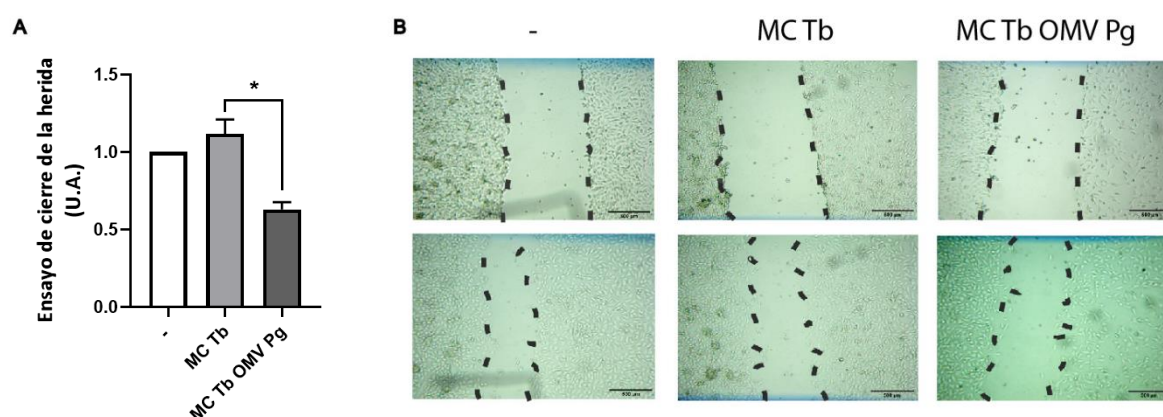


Figura 2. El medio condicionado de células trofoblásticas tratadas con OMV-Pg disminuye la capacidad de migrar de las células endoteliales. Se realizó un ensayo de herida para evaluar la migración de células endoteliales. A) Se cultivaron células EA.hy926 hasta que llegaron a confluencia. Luego, se realizó una herida en la monocapa de células. Las células fueron incubadas durante 18 horas en DMEM 0% SFB (-) o en presencia de MC Tb o MC Tb OMV-Pg. Se tomaron microfotografías a tiempo 0 y a las 18 horas. B) Se observan imágenes representativas a las 0 y 18 horas luego de la herida. Las líneas negras representan los frentes de migración. * $p < 0,05$; $n = 4$; ANOVA de un factor.

Un factor importante que contribuye a la disfunción endotelial es su activación y la subsecuente mayor adhesión de leucocitos circulantes. Por lo tanto, a continuación, evaluamos este proceso mediante un diseño *in vitro*, analizando la adhesión de monocitos a las células endoteliales como un marcador de activación endotelial. Como se muestra en la figura 3, las células endoteliales tratadas con MC Tb OMV-Pg aumentaron significativamente la adhesión monocito-endotelio respecto al MC Tb.

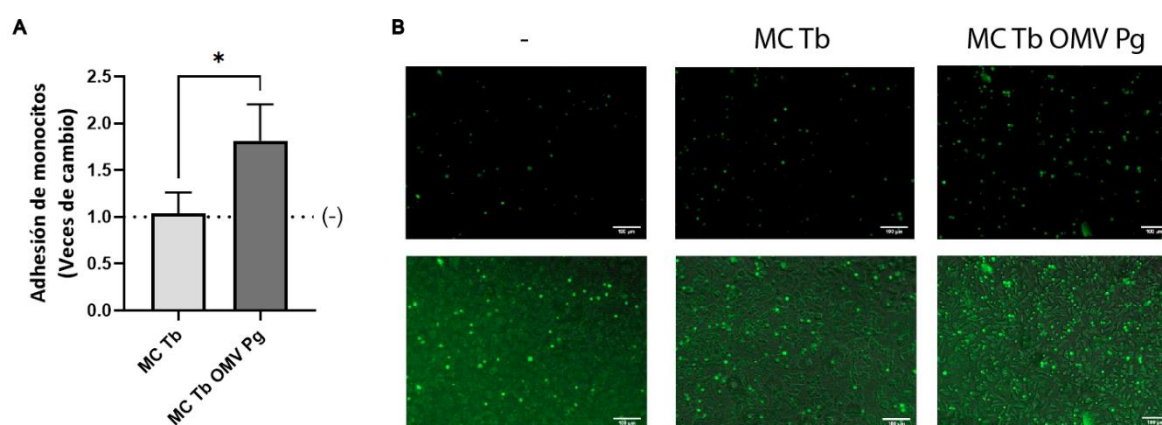


Figura 3. El medio condicionado de células trofoblásticas tratadas con OMV-Pg induce la activación de las células endoteliales. A) Las células EA.hy926 fueron pre-tratadas con MC Tb o MC Tb OMV-Pg durante 24 horas. El grupo control (-) fueron células no tratadas. Células THP-1 fueron marcadas con calceína AM (5 μ M) y co-cultivadas con células endoteliales por 1 hora para permitir adhesión. B) Imagen superior: Células THP-1 marcadas con calceína-AM se adhirieron a células EA.hy926 observadas bajo un microscopio de fluorescencia. Imagen inferior: superposición de microfotografía de fluorescencia con campo visible * $p < 0,05$; $n = 4$; scale bar = 100 μ m; t-test pareado.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son intermediarios reactivos del oxígeno molecular que actúan como segundos mensajeros dentro de las células; sin embargo, un desequilibrio entre la generación de ROS y de los sistemas de defensa antioxidantes representa la causa principal de la disfunción endotelial, lo que conlleva daño vascular. De hecho, las ROS pueden inducir apoptosis de las células endoteliales (ECs), aumentar la adhesión de las ECs a los monocitos o modificar el potencial de angiogénesis de las ECs. Por eso a continuación evaluamos si el medio condicionado de células trofoblásticas tratadas o no con OMV-Pg modulaban la producción de especies reactivas del oxígeno. Como se puede observar en la figura 4 el tratamiento con MC OMV-Pg indujo un aumento significativo en la producción de ROS por las células tratadas respecto a la condición control.

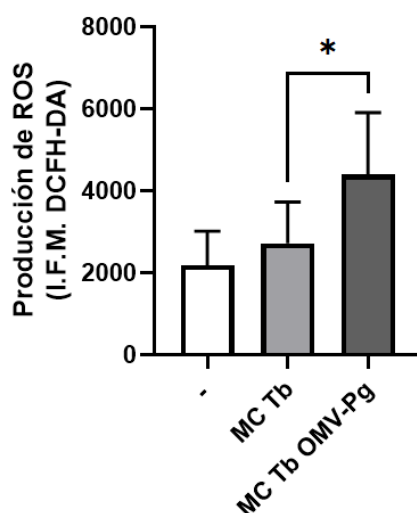


Figura 4. El medio condicionado de células trofoblásticas tratadas con OMV-Pg aumentó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las células EA.hy926 fueron estimuladas por 24 horas con MC Tb o MC Tb OMV-Pg y luego se incubaron por 30 minutos adicionales con la sonda diclorofluoresceína diacetato (5 μ M) (DCFH-DA). Al finalizar la incubación, las células fueron lavadas con PBS y la fluorescencia (I.F.M) se determinó por fluorimetría. * $p < 0,05$; $n = 4$; ANOVA de un factor.

Capítulo 2

Efecto del tratamiento *in vivo* con OMV de *Porphyromonas gingivalis* en un modelo murino de gestación

Dado que previamente observamos alteraciones en la expresión de mediadores angiogénicos de las células trofoblásticas debido al tratamiento con OMV-Pg, y que los medios condicionados de éstas afectaron la activación y funcionamiento de las células endoteliales *in vitro*, quisimos profundizar en el estudio de remodelación vascular durante la generación de la interfase materno-fetal utilizando un modelo de gestación murino.

Con este propósito ratones C57BL/6 fueron puestos en apareo. Al día 6,5 de gestación realizamos una única inyección i.p. con OMV-Pg 5 µg/kg o con PBS como control. La elección del día de inyección se debe a que es posterior al proceso de implantación (que tiene lugar al día 4,5 de gestación) y previo a la placentación completa (dg 12,5). Es necesario destacar que en estudios previos del laboratorio hemos demostrado que las OMV-Pg alcanzan la interfase materno-placentaria 6 horas luego de ser inyectadas (Lara et al., 2023).

En primer lugar, realizamos estudios histológicos para evaluar la estructura de los sitios de implantación al día 8,5 de gestación. En los ratones control (PBS), se observa una monocapa de células trofoblásticas gigantes que migran del cono ectoplacentario. Sin embargo, en hembras tratadas con OMV-Pg se puede observar una expansión evidente de la capa de células trofoblásticas gigantes (TGC) (Figura 5a) que indica defectos en la diferenciación y capacidad invasiva. Paralelamente, al evaluar la expresión de Prl3d1, un marcador específico de TGC, en los sitios de implantación, encontramos que las hembras tratadas con OMV-Pg presentan una tendencia al aumento en la expresión de este marcador (Figura 5b), lo cual es consistente con lo observado en los estudios histológicos.

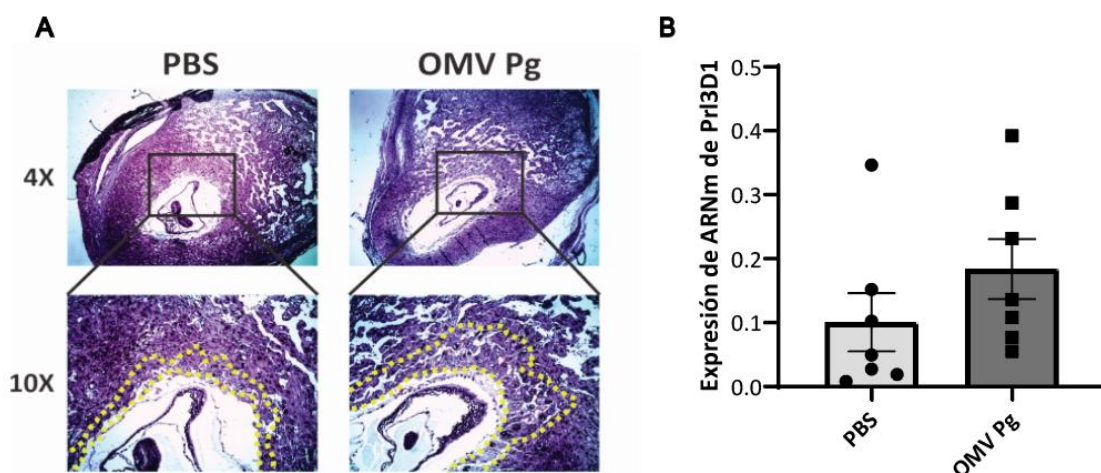


Figura 5: Efecto de una única dosis de OMV-Pg inyectada al día 6,5 de gestación sobre la histología y la expresión de ARNm de Prl3d1 en el día 8,5 de gestación. Hembras C57BL/6 fueron puestas en apareo. A) Al día 6,5 de gestación se inyectó una dosis de 5 µg/kg OMV-Pg o PBS como control. Al día 8,5 fueron sacrificadas y se aislaron los sitios de implantación para realizar estudios histológicos. B) Asimismo, algunos sitios fueron utilizados para evaluar por qPCR los niveles de expresión del marcador de células trofoblásticas gigantes, Prl3d1. * $p < 0,05$; t-test no pareado.

La angiogénesis es un proceso crítico durante la implantación y placentación normal, y en etapas tempranas de la gestación murina está fuertemente regulada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (H. Wang & Dey, 2006). Las complicaciones gestacionales relacionadas con defectos en la placentación y remodelación vascular como la preeclampsia y la restricción del crecimiento fetal están fuertemente asociadas a alteraciones en la expresión de factores de placentación y angiogénesis como VEGF, factor de crecimiento placentario (PIGF) y angiopoyetina (ANGPT) entre otros. Se cree que la presencia de bacterias patógenas en la placenta podría desencadenar una mayor liberación de factores antiangiogénicos como sFLT-1 y sENG, que generan una disminución de la liberación de factores proangiogénicos como PIGF y VEGF, lo cual daría lugar a un estadio antiangiogénico. Esto se asocia a una remodelación vascular ineficiente y como consecuencia tiene lugar un déficit de la función endotelial que conduce a las manifestaciones clínicas de la PE (Amarasekara et al., 2015) (Kappou et al., 2015).

Como se mencionó anteriormente, experimentos en modelos murinos han revelado que la infección con bacterias periodontales no solo induce RCF (D. Lin et al., 2003), sino, además, a través de la evaluación histológica de placentas de fetos que presentaron RCF y crías con bajo peso al nacer, se ha demostrado que éstas exhibían defectos estructurales asociados a fallas en la vasculatura (Ao et al., 2015; Barros et al., 2005).

Considerando estas evidencias y teniendo en cuenta que el tratamiento con OMV-Pg alteró el peso de los embriones de hembras tratadas respecto a las hembras control (resultados previos) y que la estructura histológica en etapas tempranas se encuentra afectada, nos propusimos estudiar la expresión de dichos marcadores asociados a disfunción placentaria.

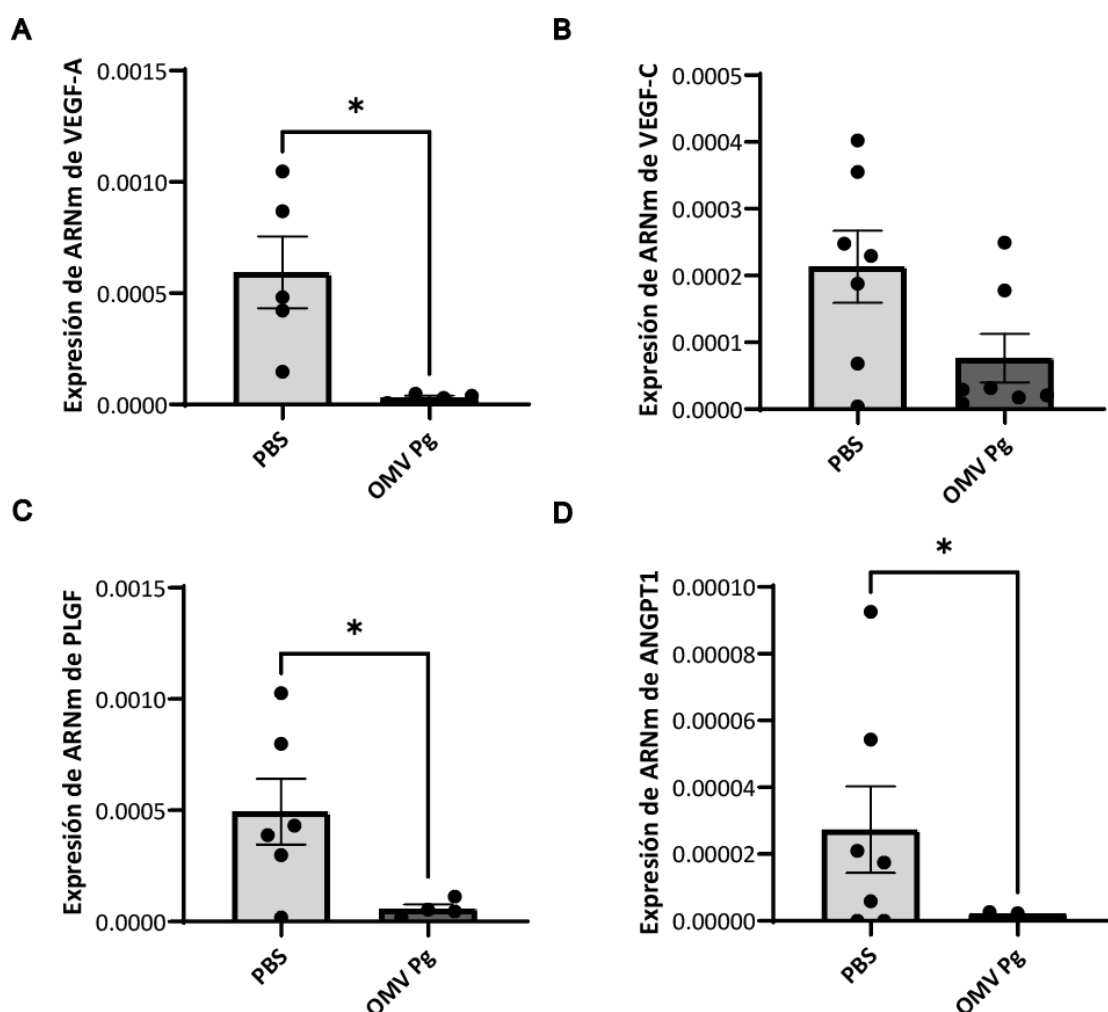


Figura 6. Efecto de una única dosis de OMV-Pg inyectada al día 6,5 de gestación sobre la expresión de ARNm de factores placentarios y angiogénicos en los sitios de implantación al día 8,5 de gestación. Hembras C57BL/6 fueron puestas en apareo programado. Al día 6,5 de gestación se inyectó una dosis de OMV-Pg o PBS como control. Al día 8,5 fueron sacrificadas y se aislaron las placentas, se realizó la extracción de ARN y posterior obtención de ADNc para determinar por qPCR los niveles de expresión de VEGF-A (A), VEGF-C (B) y PIGF (C) y ANGPT1 (D). * $p < 0,05$; t-test no pareado.

Los resultados de la figura 6 indican que el tratamiento *in vivo* con OMV-Pg disminuyó significativamente los niveles de VEGF-A, PIGF y ANGPT1 en los sitios de implantación de

hembras C57BL/6 inyectadas. Además, se pudo observar una tendencia a la disminución en los niveles de expresión de VEGF-C.

Teniendo en cuentas que el factor inducible por hipoxia (HIF) regula la expresión de varios mediadores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) desempeñando un papel fundamental en la angiogénesis y que dicho factor activa la transcripción de genes de factores pro-angiogénicos, a continuación, evaluamos la expresión de las isoformas HIF-1 α y HIF-2 α .

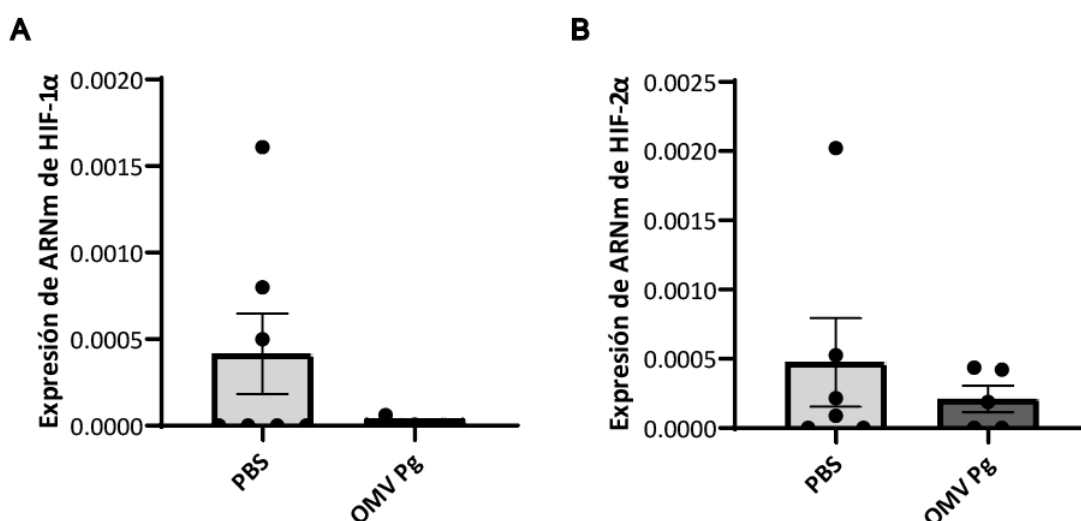


Figura 7. Efecto de una única dosis de OMV-Pg inyectada al día 6,5 de gestación sobre la expresión de ARNm de las isoformas 1 y 2 del factor de transcripción inducible por hipoxia en sitios de implantación al día 8,5 de gestación. Hembras C57BL/6 fueron puestas en apareo programado. Al día 6,5 de gestación se inyectó una dosis de OMV-Pg o PBS como control. Al día 8,5 fueron sacrificadas y se aislaron las placentas, se realizó la extracción de ARN y posterior obtención de ADNc para determinar por qPCR los niveles de expresión de HIF-1 α (A) y HIF-2 α (B). * $p < 0,05$; t-test no pareado.

Los resultados presentados en la figura 7 muestran que los sitios de implantación de hembras tratadas con OMV-Pg presentan una tendencia a la disminución de la expresión de ambos factores respecto a sitios de hembras control.

En base a los resultados previos y teniendo en cuenta que las OMVs de *P. gingivalis* podrían estar induciendo estrés oxidativo y daño celular, lo que podría alterar la homeostasis celular y disminuir la estabilización de HIF, en siguiente lugar quisimos estudiar la producción de ROS como mediador de estrés oxidativo en los sitios de implantación de hembras tratadas

o no con OMV Pg. Empleamos dos estrategias experimentales, por un lado, tratamos a las hembras al dg 6,5 con las OMV-Pg y analizamos los sitios al dg 8,5 la producción de ROS en condiciones basales (Figura 8A). Por otro lado, aislamos sitios de implantación de hembras en gestación normal al dg 8,5 y estos explantes fueron tratados *ex vivo* con OMV-Pg (Figura 8B). Como se puede observar en la figura 8, resultados preliminares muestran que los sitios de implantación de hembras tratadas con OMV-Pg *in vivo* presentan un incremento en la producción de ROS (Figura 8A). Más aún, en cultivos *ex vivo* de sitios de implantación provenientes de hembras controles (Figura 8B), observamos que el tratamiento con OMV-Pg induce un aumento en la producción de ROS a niveles similares a los encontrados en los sitios de implantación que provienen de hembras tratadas con OMV-Pg.

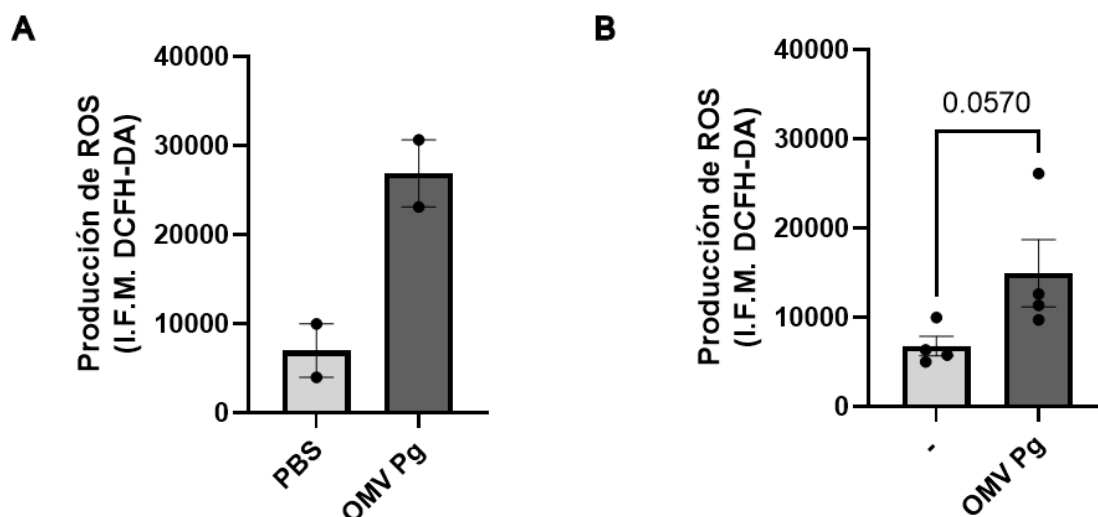


Figura 8. Producción de ROS en sitios de implantación de hembras tratadas o no con OMV-Pg.

A) Se aislaron sitios de implantación de hembras C57BL/6 tratadas o no con OMV-Pg en el día 8,5 de gestación. Durante los últimos 30 minutos de cultivo, los sitios se incubaron con la sonda diclorofluoresceína diacetato (5 µM) (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich). Al finalizar la incubación, los sitios fueron lavados con PBS, homogenizados en buffer RIPA, centrifugados y la fluorescencia se determinó en el sobrenadante por fluorimetría. B) Sitios provenientes de hembras control al dg 8,5 fueron aislados y se cultivaron *ex vivo* en presencia o ausencia de 1 µg/ml de OMV-Pg. Se cuantificó la producción de ROS como en A). Los resultados obtenidos se expresaron como intensidad media de fluorescencia (IMF) normalizado por µg de proteínas totales en el extracto.

Durante la gestación, distintas poblaciones leucocitarias son reclutadas a la interfase materno-placentaria. Allí, deben ser estrictamente reguladas en su función, ya que deficiencias en los mecanismos de control se asocian a diversas complicaciones como aborto recurrente espontáneo o PE, entre otros síndromes. Por este motivo, lo siguiente que

decidimos estudiar fue la expresión de quimioquinas y marcadores leucocitarios en los sitios de implantación en el día 8,5 de gestación.

Evaluamos la expresión de las citoquinas: - IL-1 β , que tiene un rol dual durante la gestación ya que por un lado puede influir en la diferenciación y la invasión de las células trofoblásticas, lo que es esencial para una implantación exitosa y la formación de una placenta funcional, mientras que a su vez es un fuerte inductor de la inflamación y se asocia a diversas complicaciones gestacionales (Löb et al., 2021) - IL-6, citoquina que favorece la migración trofoblástica y promueve el reclutamiento de células deciduales involucradas en el remodelamiento vascular (Vilotić et al., 2022), e - IL-15, un regulador de la diferenciación de células NK uterinas que favorecen la angiogénesis (Gordon, 2021), y la quimioquina MCP-1 (o CCL2), que es un importante factor quimiotáctico de monocitos y neutrófilos (Z. Lin et al., 2023).

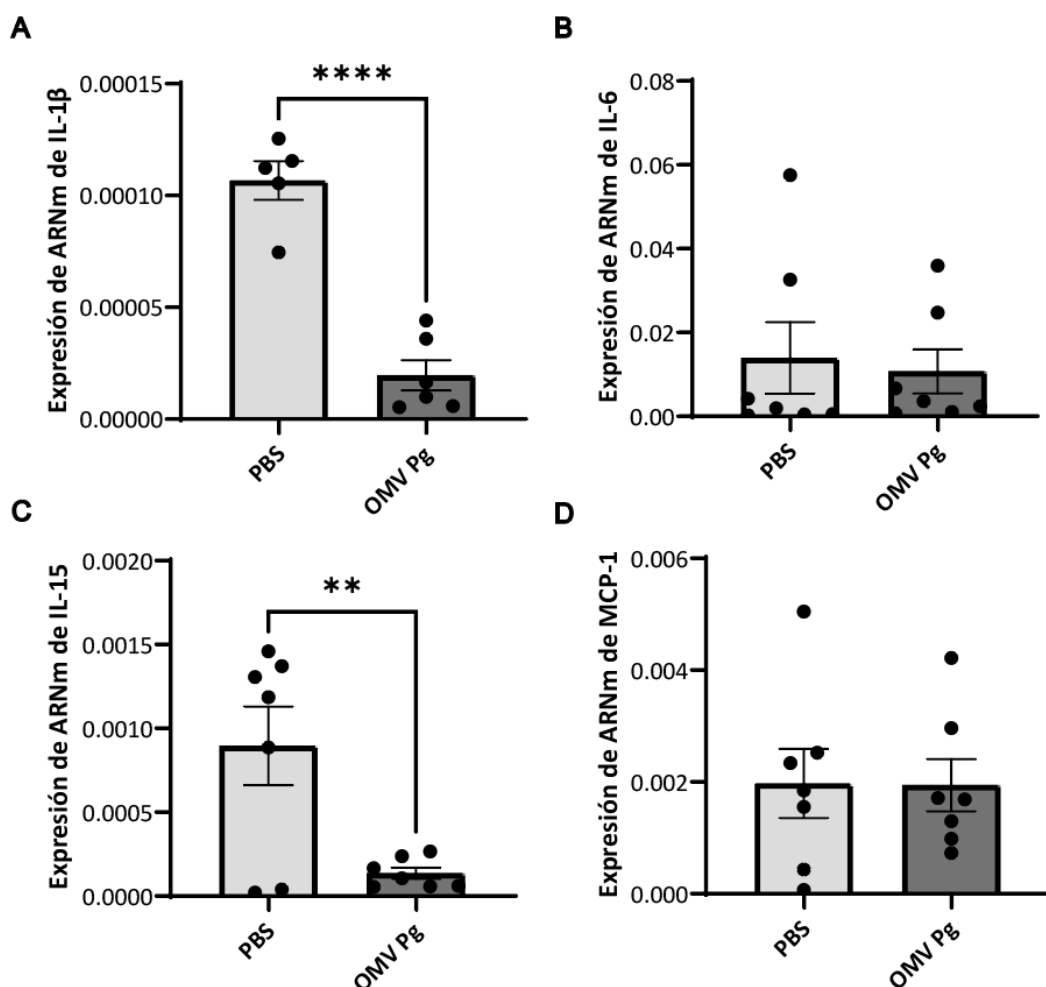


Figura 9. Efecto de una única dosis de OMV-Pg sobre la expresión de ARNm de marcadores leucocitarios y citoquinas en sitios de implantación. Hembras C57BL/6 fueron puestas en apareo programado. Al día 6,5 de gestación se inyectó una dosis de OMV-Pg o PBS como control. Al día 8,5 fueron sacrificadas y se aislaron las placentas, se realizó la extracción de ARN y posterior obtención de ADNc para determinar por qPCR los niveles de expresión de IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-15 (C) y MCP-1 (D). ****p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; t-test no pareado.

Los resultados indican que el tratamiento *in vivo* con OMV-Pg reduce significativamente la expresión de IL-1 β e IL-15 con respecto al tratamiento control (PBS). No se observaron cambios para la expresión de IL-6 y MCP-1 (Figura 9).

DISCUSIÓN

La remodelación vascular es un proceso esencial para el éxito del embarazo, asegurando un suministro adecuado de sangre y nutrientes al feto en desarrollo. Este proceso requiere una interacción coordinada entre las células trofoblásticas y las células endoteliales. Las células trofoblásticas, a través de la liberación de factores solubles como VEGF, PlGF y otras citoquinas angiogénicas, juegan un rol fundamental en la remodelación de las arterias espirales, facilitando la invasión trofoblástica y la transformación de estas arterias en vasos de baja resistencia y alta capacidad (Harris, 2011). Esta interacción no solo es crucial para la remodelación estructural, sino también para la regulación del ambiente inflamatorio y angiogénico en el sitio de implantación. Las células endoteliales, por su parte, responden a estas señales trofoblásticas mediante cambios en la expresión de moléculas de adhesión y la producción de mediadores angiogénicos, contribuyendo así a la formación de un lecho vascular adecuado para el desarrollo placentario (Red-Horse et al., 2004). Las alteraciones en cualquiera de estos mecanismos pueden resultar en una remodelación vascular inadecuada, llevando a condiciones de insuficiencia placentaria como la preeclampsia (PE) (Aplin et al., 2020) y el retraso en el crecimiento intrauterino (RCIU). Asimismo, factores externos como las infecciones maternas pueden influir negativamente en este delicado equilibrio. En ese sentido, una asociación entre la enfermedad periodontal y complicaciones en el embarazo ha sido ampliamente reportada (Daalderop et al., 2018) aunque hasta ahora la existencia de una relación causal ni los mecanismos etiopatogénicos asociados han sido completamente aclarados.

En este trabajo nos propusimos analizar la interacción de las vesículas de membrana externa (OMV) derivadas de la bacteria periodontopática *Porphyromonas gingivalis* (Pg) con células trofoblásticas (Tb), centrales en el proceso de la remodelación vascular durante la gestación. En particular, nos enfocamos en el estudio del condicionamiento de células endoteliales (EC) y su impacto en este proceso crucial para asegurar una adecuada placentación.

Nuestros resultados muestran un efecto disruptivo de las OMVs de Pg en la expresión de marcadores pro-/anti-angiogénicos en células Tb que se refleja en la incapacidad de las células Tb para modular la función endotelial. En primer lugar, encontramos que las células Tb tratadas con OMV-Pg disminuyen tanto la expresión de VEGF-A como de PlGF, mientras que aumentan la expresión de sFLT-1. Niveles de VEGF-A y PlGF insuficientes, puede conducir a una formación inadecuada de los vasos sanguíneos y al flujo sanguíneo insuficiente hacia la placenta, lo que potencialmente resulta en complicaciones del embarazo. De hecho, diversos reportes han descripto tanto en plasma como en placentas de mujeres con PE un aumento en la expresión de sFLT-1 y una disminución de los niveles de VEGF-A y

PIGF (Guo et al., 2021). De hecho, más allá que las pruebas clínicas disponibles no son suficientemente específicas para anticipar el diagnóstico y/o proveer indicadores predictivos para identificar a las madres con mayor riesgo de desarrollar estas complicaciones se ha aprobado el uso del cociente sFLT-1/PIGF para el diagnóstico de mujeres en riesgo de PE en combinación con otros datos clínicos, de laboratorio de rutina y ecografías (Verlohren et al., 2022).

En línea con estos estudios, después de la estimulación de las células Tb con OMV-Pg, los factores solubles de las células trofoblásticas redujeron la migración de las ECs, indujeron la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y promovieron la adhesión de monocitos, reflejando su estado de activación proinflamatorio. La disfunción endotelial es uno de los mecanismos clave en el desarrollo de las complicaciones gestacionales como la PE (Maynard & Karumanchi, 2011; Roberts & Cooper, 2001). El endotelio disfuncional promueve la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión que inducen la migración y activación las células inmunitarias, provocando respuestas inflamatorias excesivas. Está reportado a su vez que la activación prolongada de las células endoteliales resulta en un ciclo de inflamación y estrés oxidativo, que a su vez inducen disfunción mitocondrial. Asimismo, un desequilibrio entre la generación de ROS, ya sea por una falla del sistema de defensa antioxidante o la producción excesiva de radicales libres que excede la capacidad de los antioxidantes, representa la causa principal de la disfunción endotelial, lo que conlleva daño vascular. Además, las ROS pueden inducir la apoptosis de las células endoteliales, aumentar la adhesión de las mismas a los monocitos y neutrófilos o modificar su potencial de angiogénesis. De esta manera la administración de antioxidantes puede ser protectora contra dichos daños celulares. Actualmente estamos realizando ensayos en presencia del antioxidante N-acetilcisteína, para evaluar dicha posibilidad.

Por otro lado, teniendo en cuenta que en la placenta las ECs están continuamente expuestas a factores celulares y humorales, así como a todos esos elementos (biológicos, químicos o hemodinámicos) que circulan en la sangre en un momento dado, en futuros ensayos como continuación de esta línea de investigación queremos evaluar el efecto directo de las vesículas de *Porphyromonas gingivalis* sobre las células endoteliales.

En el estudio de complicaciones gestacionales asociadas a infecciones odontogénicas, se han utilizado varios modelos animales. En efecto, teniendo en cuenta las diferencias con la gestación humana, se ha intentado modelar algunos signos de estas complicaciones para comprender los mecanismos etiopatogénicos e identificar posibles biomarcadores o blancos terapéuticos. Existen modelos murinos donde la infección con

Porphyromonas gingivalis induce parto pretérmino y crías con bajo peso al nacer (Ao et al., 2015a; Miyauchi et al., 2018; Tavarna et al., 2020). En estudios previos de nuestro laboratorio hemos reportado que el tratamiento con OMV-Pg al día 6,5 de gestación induce una disminución en el peso placentario y fetal al día 14,5 de gestación (Lara et al., 2023). Una limitación de este trabajo previo fue que no pudimos establecer mecanismos de los efectos observados. Es por eso que en esta tesis quisimos evaluar los efectos del tratamiento con OMV-Pg al día 8,5 de gestación, que se considera etapa temprana de la placentación, utilizando el modelo de gestación previamente establecido. Como se mencionó en la introducción la placentación es un proceso estrictamente regulado que involucra la diferenciación y migración del trofoblasto y la transformación de las arterias maternas para satisfacer las demandas del feto en crecimiento. Las células gigantes trofoblásticas (TGC) de ratón son los análogos funcionales del fenotipo invasivo del trofoblasto extraveloso (EVT) humano (Hu & Cross, 2010; Malassine et al., 2003). El comportamiento invasivo de las células del trofoblasto en ratones implica la degradación y remodelación de la matriz extracelular uterina, regulada en parte por la activación de MMP9 (Gordon, 2021; Yadi et al., 2008). Nuestros resultados histológicos muestran que el tratamiento con OMV-Pg induce defectos en la placentación evidenciados en primer lugar por un aumento en la capa de células trofoblásticas gigantes, que está asociado a un aumento en la expresión de Prl3d1, marcador específico de dichas células, lo que confirma una falla en la diferenciación de dichas células. Un correcto equilibrio espacio-temporal entre la proliferación de las células progenitoras y su diferenciación en los tipos de células trofoblásticas está controlado por las acciones de factores de crecimiento y otras señales en el microambiente que influyen en los perfiles de expresión génica de las células target, incluyendo los genes que determinan su destino.

A su vez teniendo en cuenta que como ya se mencionó anteriormente la angiogénesis es esencial para una implantación y placentación normal, y es influenciada por el factor de crecimiento endotelial (VEGF), el factor de crecimiento placentario (PIGF), Angiopoyetina 1 (ANGPT1), entre otros factores angiogénicos. En segundo lugar, evaluamos la expresión de dichos mediadores teniendo en cuenta que, una disminución en la expresión local de VEGF en placentas murinas estaría potencialmente asociado al desarrollo de complicaciones gestacionales. En nuestro modelo murino encontramos que el tratamiento con OMV-Pg induce una disminución en la expresión de VEGF-A, PIGF y ANGPT1.

HIF-1 α es uno de los factores que regulan la expresión de varios mediadores angiogénicos, como VEGF-A, desempeñando un papel fundamental en la angiogénesis (Park et al., 2010). HIF-1 α no solo aumenta en respuesta a condiciones hipóxicas, sino que también es activado por otros activando la transcripción de genes pro-angiogénicos, por lo que su

función deficiente está asociada a patologías como PE (Rath et al., 2016). Fallas en su activación pueden llevar a disfunciones metabólicas en las células placentarias y deciduales, afectando su capacidad para responder adecuadamente (Hayashi et al., 2005; Kierans & Taylor, 2021). HIF desempeña un papel importante en este proceso, y su activación defectuosa también puede llevar a una invasión trofoblástica insuficiente. Nuestros resultados demuestran una disminución en la expresión de HIF que podría estar involucrada en los defectos de placentación observados. A su vez, esta disminución podría estar asociada al aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. En línea con estos resultados Tavarna y colaboradores reportaron en un modelo de gestación en ratas que la infección con *P. gingivalis* induce un retraso del crecimiento fetal que está asociado a una desregulación de Htra1 placentario, marcador de estrés oxidativo (Tavarna et al., 2020).

Las citoquinas y quimioquinas son los principales mediadores inmunes durante el embarazo, mediando diversas etapas como la receptividad uterina, la implantación, la placentación y el desarrollo fetal, así como el inicio del parto, ya sea desencadenando procesos inflamatorios o induciendo la tolerancia inmunitaria. Asimismo, la decidua post-implantación es rica en diversas poblaciones leucocitarias, que deben ser estrictamente reguladas en su función. Entre las células inmunes más relevantes tanto los macrófagos deciduales como las células NK uterinas juegan un papel importante en varios procesos como en la angiogénesis, la remodelación de las arterias espiraladas (Ae), la invasión trofoblástica, la fagocitosis de células apoptóticas y la inmunomodulación produciendo diversos factores, como metaloproteasas de matriz extracelular (MMP) que ayudan a las células trofoblásticas durante el remodelado de las Ae, y citoquinas antiinflamatorias como IL-10 (Ning et al., 2016). Tanto deficiencias en los mecanismos de control de estas células como en la expresión de citoquinas se asocian a diversas complicaciones como aborto recurrente espontáneo o PE, entre otros síndromes.

Nuestros resultados muestran que los sitios de implantación de hembras tratadas con OMV-Pg presentan una disminución en la expresión de IL-1 β e IL-15. La IL-15 se induce durante el período de preimplantación, en el día embrionario 3 (E3), y alcanza su máximo durante la mitad de la gestación, desde E8 hasta E10. Posteriormente, disminuye a un nivel más bajo pero constante hasta E18,5. (Gordon, 2021). En un estudio donde se muestra la cinética de células uNK DBA+ durante la gestación murina, se observó que las células uNK al día E6,5, se expanden al menos 10 veces respecto a su nivel normal y alcanzan su pico en E9.5, y regresan casi a los niveles previos al embarazo en E13,5 (Yadi et al., 2008). Estos datos apoyan un modelo en el cual la IL-15 se induce justo antes de la implantación del embrión en ratones, alcanza su máximo a mitad de la gestación alrededor del tiempo de la

remodelación de las arterias espirales, y disminuye, pero persiste hasta el término. Teniendo en cuenta la cinética de expresión de IL-15, las células NK uterinas pueden entonces diferenciarse y expandirse en respuesta a dicha citoquina. De esta manera, una disminución en la misma podría implicar una disminución en el reclutamiento de células uNK, células que tienen gran importancia durante la remodelación vascular. Creemos que sería relevante para entender los mecanismos que conducen la pérdida de la homeostasis inmune y a fallas en la placentación y remodelación vascular, evaluar a futuro tanto la presencia de células uNK como de otras células inmunes reclutadas durante la generación de la interfase materno-fetal. La IL-1 β es una citoquina proinflamatoria que tiene un rol dual durante la gestación. Por un lado, hay diversos estudios que demuestran un aumento en la expresión y secreción de dicha citoquina en muestras de placentas de pacientes con PE e RCIU como en macrófagos deciduales (Perez-Sepulveda et al., 2014). A su vez en etapas tempranas de la gestación, IL-1 β puede inducir la expresión de factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Shan et al., 2022). Además, esta citoquina está reportado que regula la invasión trofoblástica (Gan et al., 2024). Asimismo, se ha demostrado que los niveles de IL-1 β aumentan a medida que el blastocisto se desarrolla (Tsai et al., 2024). Estos resultados demuestran que un equilibrio de la producción y la actividad de IL-1 β es crucial. Tanto un aumento o una disminución desregulada puede tener efectos adversos, que puede contribuir a complicaciones en el embarazo.

El hecho de que los efectos deletéreos en el modelo *in vitro* de interacción trofoblasto-endotelio como en el modelo *in vivo* de gestación que encontramos sean provocados por OMVs de Pg proporciona nuevas evidencias para entender los mecanismos que operan en las células trofoblásticas tras la infección por Pg en el embarazo temprano, ya que la presencia de Pg es escasa en la placenta (Aagaard et al., 2014). Un estudio reciente que muestra que las OMVs de bacterias anaerobias llegan efectivamente a la placenta en embarazos normales ha resaltado la relevancia de los efectos mediados por OMVs en embarazos saludables y patológicos (Menon et al., 2023). A la luz de esta observación y de nuestros resultados presentes, es concebible que los efectos deletéreos de Pg durante la placentación en embarazos asociados a periodontitis estén relacionados con la liberación de OMVs y su papel promotor para la posterior infección por Pg o la disrupción de la función de las células trofoblásticas.

La asociación entre infecciones odontogénicas y complicaciones gestacionales fundamentan nuestro objetivo de explorar a nivel celular y molecular los efectos de bacterias periodontopáticas sobre el rol de las células trofoblásticas en la remodelación vascular y el condicionamiento de células endoteliales en la interfase materno-placentaria.

Consideramos que los resultados obtenidos en el presente trabajo son relevantes para aportar al conocimiento de los mecanismos etiopatogénicos que subyacen a la relación entre las complicaciones gestacionales y las infecciones periodontales, lo que permitirá a futuro la identificación y validación de nuevos marcadores aportando una herramienta clínica de gran potencial para el diagnóstico, el pronóstico de severidad y eventual tratamiento desde etapas tempranas del embarazo.

REFERENCIAS

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Abrahams, V. M., Bole-Aldo, P., Kim, Y. M., Straszewski-Chavez, S. L., Chaiworapongsa, T., Romero, R., & Mor, G. (2004). Divergent Trophoblast Responses to Bacterial Products Mediated by TLRs. *The Journal of Immunology*, 173(7), 4286–4296. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4286>
- Alkema, L., Chou, D., Hogan, D., Zhang, S., Moller, A.-B., Gemmill, A., Fat, D. M., Boerma, T., Temmerman, M., Mathers, C., & Say, L. (2016). Global, regional, and national levels and trends in maternal mortality between 1990 and 2015, with scenario-based projections to 2030: A systematic analysis by the UN Maternal Mortality Estimation Inter-Agency Group. *The Lancet*, 387(10017), 462–474. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00838-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00838-7)
- Amarasekara, R., Jayasekara, R. W., Senanayake, H., & Dissanayake, V. H. W. (2015a). Microbiome of the placenta in pre-eclampsia supports the role of bacteria in the multifactorial cause of pre-eclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 41(5), 662–669. <https://doi.org/10.1111/jog.12619>
- Amarasekara, R., Jayasekara, R. W., Senanayake, H., & Dissanayake, V. H. W. (2015b). Microbiome of the placenta in pre-eclampsia supports the role of bacteria in the multifactorial cause of pre-eclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 41(5), 662–669. <https://doi.org/10.1111/jog.12619>
- Ao, M., Miyauchi, M., Furusho, H., Inubushi, T., Kitagawa, M., Nagasaki, A., Sakamoto, S., Kozai, K., & Takata, T. (2015a). Dental Infection of Porphyromonas gingivalis Induces Preterm Birth in Mice. *PLOS ONE*, 10(8), e0137249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137249>
- Ao, M., Miyauchi, M., Furusho, H., Inubushi, T., Kitagawa, M., Nagasaki, A., Sakamoto, S., Kozai, K., & Takata, T. (2015b). Dental infection of Porphyromonas gingivalis induces preterm birth in mice. *PLoS ONE*, 10(8), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137249>
- Aplin, J. D., Myers, J. E., Timms, K., & Westwood, M. (2020). Tracking placental development in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(9), 479–494. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0372-6>
- Barak, S., Oettinger-Barak, O., Machtei, E. E., Sprecher, H., & Ohel, G. (2007). Evidence of Periopathogenic Microorganisms in Placentas of Women With Preeclampsia. *Journal of Periodontology*, 78(4), 670–676. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060362>

- Barros, S. P., Bobetsis, Y. A., Lin, D., Beck, J. D., Offenbacher, S., & Riche, E. L. (2005). *Effects of Maternal Campylobacter rectus Infection on Murine Placenta* ,. 2005(November).
- Bobetsis, Y. A., Barros, S. P., Lin, D. M., Arce, R. M., & Offenbacher, S. (2010). Altered gene expression in murine placentas in an infection-induced intrauterine growth restriction model: A microarray analysis. *Journal of Reproductive Immunology*, 85(2), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2010.04.001>
- Bonnington, K. E., & Kuehn, M. J. (2014). Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1612–1619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.011>
- Bookout, A. L., & Mangelsdorf, D. J. (2003). Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nuclear Receptor Signaling*, 1(1), nrs.01012. <https://doi.org/10.1621/nrs.01012>
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2018). Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 218(2), S745–S761. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.11.577>
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6(4), 389–395. <https://doi.org/10.1038/74651>
- Carter, A. M. (2007). Animal Models of Human Placentation—A Review. *Placenta*, 28(SUPPL.), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.11.002>
- Cecil, J. D., Sirisaengtaksin, N., O'Brien-Simpson, N. M., & Krachler, A. M. (2019). Outer Membrane Vesicle-Host Cell Interactions. *Microbiology Spectrum*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PSIB-0001-2018>
- Cha, J., Sun, X., & Dey, S. K. (2012). Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. *Nature Medicine*, 18(12), 1754–1767. <https://doi.org/10.1038/NM.3012>
- Choi, J.-W., Kim, S.-C., Hong, S.-H., & Lee, H.-J. (2017). Secretable Small RNAs via Outer Membrane Vesicles in Periodontal Pathogens. *Journal of Dental Research*, 96(4), 458–466. <https://doi.org/10.1177/0022034516685071>
- Clark, D. A. (2014). The use and misuse of animal analog models of human pregnancy disorders. *Journal of Reproductive Immunology*, 103(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.02.006>
- Croy et al. Eds. (2015). *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy Edited by*.

Daalderop, L. A., Wieland, B. V., Tomsin, K., Reyes, L., Kramer, B. W., Vanterpool, S. F., & Been, J. V. (2018). Periodontal Disease and Pregnancy Outcomes: Overview of Systematic Reviews. *JDR Clinical & Translational Research*, 3(1), 10–27.

<https://doi.org/10.1177/2380084417731097>

Deer, E., Herrock, O., Campbell, N., Cornelius, D., Fitzgerald, S., Amaral, L. M., & LaMarca, B. (2023). The role of immune cells and mediators in preeclampsia. *Nature Reviews Nephrology*, 19(4), 257–270. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00670-0>

Demir, R., Seval, Y., & Huppertz, B. (2007). Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochemica*, 109(4), 257–265.

<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2007.02.008>

Dey, S. K., Lim, H., Das, S. K., Reese, J., Paria, B. C., Daikoku, T., & Wang, H. (2004). Molecular Cues to Implantation. *Endocrine Reviews*, 25(3), 341–373.

<https://doi.org/10.1210/er.2003-0020>

Dusza, H. M., Boxel, J. van, Duursen, M. B. M. van, Forsberg, M. M., Legler, J., & Vähäkangas, K. H. (2023). Experimental human placental models for studying uptake, transport and toxicity of micro- and nanoplastics. *Science of The Total Environment*, 860, 160403. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160403>

Edgell, C. J., McDonald, C. C., & Graham, J. B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(12), 3734–3737.

<https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3734>

Farrugia, C., Stafford, G. P., & Murdoch, C. (2020). *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles Increase Vascular Permeability. *Journal of Dental Research*, 99(13), 1494–1501. <https://doi.org/10.1177/0022034520943187>

Fontana, V. A. (2008). “Citoquinas: El lenguaje del diálogo materno-embrionario”. 80–102.

Forbes, K., & Westwood, M. (2010). Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth. *Journal of Endocrinology*, 207(1), 1–16.

<https://doi.org/10.1677/JOE-10-0174>

Fowden, A. L., Forhead, A. J., Coan, P. M., & Burton, G. J. (2008). The Placenta and Intrauterine Programming. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(4), 439–450.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01663.x>

Gan, X., Liu, H., Chen, D., Liu, Z., Lu, Q., Lai, X., Hou, H., Zhang, M., Zhang, J. Y., Duan, Y., Lu, S., Chen, M., Lash, G. E., & Ning, F. (2024). Interleukin-1 beta signals through the ERK signalling pathway to modulate human placental trophoblast migration and

invasion in the first trimester of pregnancy. *Placenta*, 151, 67–78.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2024.04.010>

Geva, E., Ginzinger, D. G., Zaloudek, C. J., Moore, D. H., Byrne, A., & Jaffe, R. B. (2002). Human Placental Vascular Development: Vasculogenic and Angiogenic (Branching and Nonbranching) Transformation Is Regulated by Vascular Endothelial Growth Factor-A, Angiopoietin-1, and Angiopoietin-2. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(9), 4213–4224. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020195>

Gomez-Lopez, N., Guilbert, L. J., & Olson, D. M. (2010). Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(4), 625–633. <https://doi.org/10.1189/jlb.1209796>

Gordon, S. M. (2021). Interleukin-15 in Outcomes of Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11094. <https://doi.org/10.3390/ijms222011094>

Gui, M. J., Dashper, S. G., Slakeski, N., Chen, Y.-Y., & Reynolds, E. C. (2016). Spheres of influence: *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Molecular Oral Microbiology*, 31(5), 365–378. <https://doi.org/10.1111/omi.12134>

Guo, X., Yi, H., Li, T. C., Wang, Y., Wang, H., & Chen, X. (2021). Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Human Embryo Implantation: Clinical Implications. *Biomolecules*, 11(2), 253. <https://doi.org/10.3390/biom11020253>

Harris, L. K. (2011). IFPA Gabor Than Award lecture: Transformation of the spiral arteries in human pregnancy: Key events in the remodelling timeline. *Placenta*, 32, S154–S158. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.11.018>

Hayashi, M., Sakata, M., Takeda, T., Tahara, M., Yamamoto, T., Minekawa, R., Isobe, A., Tasaka, K., & Murata, Y. (2005). Hypoxia Up-Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression through RhoA Activation in Trophoblast Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(3), 1712–1719. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1547>

Hu, D., & Cross, J. C. (2010). Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(2–3), 341–354. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082768dh>

Huppertz, B. (2008). Placental Origins of Preeclampsia. *Hypertension*, 51(4), 970–975. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107607>

Jia, L., Han, N., Du, J., Guo, L., Luo, Z., & Liu, Y. (2019). Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>

- KAPPOU, D., SIFAKIS, S., KONSTANTINIDOU, A., PAPANTONIOU, N., & SPANDIDOS, D. A. (2015). Role of the angiopoietin/Tie system in pregnancy (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(4), 1091–1096. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2280>
- Kaufmann, P., Mayhew, T. M., & Charnock-Jones, D. S. (2004). Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. II. Changes During Normal Pregnancy. *Placenta*, 25(2–3), 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2003.10.009>
- Kierans, S. J., & Taylor, C. T. (2021). Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): Implications for cellular physiology. *The Journal of Physiology*, 599(1), 23–37. <https://doi.org/10.1113/JP280572>
- Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J., Gamage, T. K. J. B., & James, J. (2019). Human placenta and trophoblast development: Key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(18), 3479–3496. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03104-6>
- Knöfler, M., & Pollheimer, J. (2013). Human placental trophoblast invasion and differentiation: A particular focus on Wnt signaling. *Frontiers in Genetics*, 4. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00190>
- Lara, B., Loureiro, I., Gliosca, L., Castagnola, L., Merech, F., Gallino, L., Calo, G., Sassot, M., Ramhorst, R., Vota, D., Leirós, C. P., & Hauk, V. (2023). *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles shape trophoblast cell metabolism impairing functions associated to adverse pregnancy outcome. *Journal of Cellular Physiology*, 238(11), 2679–2691. <https://doi.org/10.1002/jcp.31138>
- Le, Q.-A., Akhter, R., Coulton, K. M., Vo, N. T. N., Duong, L. T. Y., Nong, H. V., Yaacoub, A., Condous, G., Eberhard, J., & Nanan, R. (2022). Periodontitis and Preeclampsia in Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Maternal and Child Health Journal*, 26(12), 2419–2443. <https://doi.org/10.1007/s10995-022-03556-6>
- León, R., Silva, N., Ovalle, A., Chaparro, A., Ahumada, A., Gajardo, M., Martinez, M., & Gamonal, J. (2007). Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the Amniotic Fluid in Pregnant Women With a Diagnosis of Threatened Premature Labor. *Journal of Periodontology*, 78(7), 1249–1255. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060368>
- Levine, R. J., Maynard, S. E., Qian, C., Lim, K.-H., England, L. J., Yu, K. F., Schisterman, E. F., Thadhani, R., Sachs, B. P., Epstein, F. H., Sibai, B. M., Sukhatme, V. P., & Karumanchi, S. A. (2004). Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. *New England Journal of Medicine*, 350(7), 672–683. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031884>
- Lin, D., Smith, M. A., Champagne, C., Elter, J., Beck, J., & Offenbacher, S. (2003). *Porphyromonas gingivalis* infection during pregnancy increases maternal tumor

necrosis factor alpha, suppresses maternal interleukin-10, and enhances fetal growth restriction and resorption in mice. *Infection and Immunity*, 71(9), 5156–5162.

<https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5156-5162.2003>

Lin, Z., Shi, J.-L., Chen, M., Zheng, Z.-M., Li, M.-Q., & Shao, J. (2023). CCL2: An important cytokine in normal and pathological pregnancies: A review. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1053457>

Löb, S., Amann, N., Kuhn, C., Schmoeckel, E., Wöckel, A., zehni, A. Z., Kaltofen, T., Keckstein, S., Mumm, J.-N., Meister, S., Kolben, T., Mahner, S., Jeschke, U., & Vilsmaier, T. (2021). Interleukin-1 beta is significantly upregulated in the decidua of spontaneous and recurrent miscarriage placentas. *Journal of Reproductive Immunology*, 144, 103283. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2021.103283>

Lunghi, L., Ferretti, M. E., Medici, S., Biondi, C., & Vesce, F. (2007). Control of human trophoblast function. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 5(1), 6.

<https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-6>

Luu, T. M., Mian, M. O. R., & Nuyt, A. M. (2017). Long-Term Impact of Preterm Birth. *Clinics in Perinatology*, 44(2), 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2017.01.003>

Malassine, A., Frendo, J.-L., & Evain-Brion, D. (2003). A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Human Reproduction Update*, 9(6), 531–539. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg043>

Maynard, S. E., & Karumanchi, S. A. (2011). Angiogenic Factors and Preeclampsia. *Seminars in Nephrology*, 31(1), 33–46.

<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.10.004>

Menon, R., Khanipov, K., Radnaa, E., Ganguly, E., Bento, G. F. C., Urrabaz-Garza, R., Kammala, A. K., Yaklic, J., Pyles, R., Golovko, G., & Tantengco, O. A. G. (2023). Amplification of microbial DNA from bacterial extracellular vesicles from human placenta. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1213234.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1213234>

Miyauchi, M., Ao, M., Furusho, H., Chea, C., Nagasaki, A., Sakamoto, S., Ando, T., Inubushi, T., Kozai, K., & Takata, T. (2018). Galectin-3 Plays an Important Role in Preterm Birth Caused by Dental Infection of *Porphyromonas gingivalis*. *Scientific Reports*, 8(1), 2867. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21072-y>

Moffett, A., & Loke, C. (2006a). Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature Reviews Immunology*, 6(8), 584–594. <https://doi.org/10.1038/nri1897>

Moffett, A., & Loke, C. (2006b). Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature Reviews Immunology*, 6(8), 584–594. <https://doi.org/10.1038/nri1897>

- Munoz-Suano, A., Hamilton, A. B., & Betz, A. G. (2011). Gimme shelter: The immune system during pregnancy. *Immunological Reviews*, 241(1), 20–38. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x>
- Ning, F., Liu, H., & Lash, G. E. (2016). The Role of Decidual Macrophages During Normal and Pathological Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 75(3), 298–309. <https://doi.org/10.1111/aji.12477>
- Norwitz, E. R., Schust, D. J., & Fisher, S. J. (2001). Implantation and the Survival of Early Pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 345(19), 1400–1408. <https://doi.org/10.1056/NEJMra000763>
- Perez-Sepulveda, A., Torres, M. J., Khoury, M., & Illanes, S. E. (2014). Innate Immune System and Preeclampsia. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00244>
- Racicot, K., Kwon, J.-Y., Aldo, P., Silasi, M., & Mor, G. (2014). Understanding the Complexity of the Immune System during Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 72(2), 107–116. <https://doi.org/10.1111/aji.12289>
- Rath, G., Aggarwal, R., Jawanjal, P., Tripathi, R., & Batra, A. (2016). HIF-1 Alpha and Placental Growth Factor in Pregnancies Complicated With Preeclampsia: A Qualitative and Quantitative Analysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30(1), 75–83. <https://doi.org/10.1002/jcla.21819>
- Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., McMaster, M., & Fisher, S. J. (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *Journal of Clinical Investigation*, 114(6), 744–754. <https://doi.org/10.1172/JCI22991>
- Redman, C. W. G., & Sargent, I. L. (2010). REVIEW ARTICLE: Immunology of Pre-Eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6), 534–543. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00831.x>
- Regal, J. F., Gilbert, J. S., & Burwick, R. M. (2015). The complement system and adverse pregnancy outcomes. *Molecular Immunology*, 67(1), 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.02.030>
- Roberts, J., & Cooper, D. (2001). Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *The Lancet*, 357(9249), 53–56. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03577-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03577-7)
- Romero, R., Dey, S. K., & Fisher, S. J. (2014). *Preterm labor: One syndrome, many causes*. 345(6198).
- Romero, R., Kusanovic, J. P., Chaiworapongsa, T., & Hassan, S. S. (2011). Placental bed disorders in preterm labor, preterm PROM, spontaneous abortion and abruptio

placentae. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 313–327. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2011.02.006>

Salamonsen, L. A., Nie, G., Hannan, N. J., & Dimitriadis, E. (2009a). Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2009. Preparing fertile soil: The importance of endometrial receptivity. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(7), 923. <https://doi.org/10.1071/RD09145>

Salamonsen, L. A., Nie, G., Hannan, N. J., & Dimitriadis, E. (2009b). Society for reproductive biology founders lecture 2009. Preparing fertile soil: The importance of endometrial receptivity. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(7), 923–934. <https://doi.org/10.1071/RD09145>

Shan, Y., Chen, Y., Brkić, J., Fournier, L., Ma, H., & Peng, C. (2022). miR-218-5p Induces Interleukin-1 β and Endovascular Trophoblast Differentiation by Targeting the Transforming Growth Factor β -SMAD2 Pathway. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 842587. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.842587>

SHARKEY, A. M., COOPER, J. C., BALMFORTH, J. R., MCLAREN, J., CLARK, D. E., CHARNOCK-JONES, D. S., MORRIS, N. H., & SMITH, S. K. (1996). **Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia.** *European Journal of Clinical Investigation*, 26(12), 1182–1185. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1996.830605.x>

Stanton, B. A. (2021). Extracellular Vesicles and Host–Pathogen Interactions: A Review of Inter-Kingdom Signaling by Small Noncoding RNA. *Genes*, 12(7), 1010. <https://doi.org/10.3390/genes12071010>

Stockham, S., Stamford, J. E., Roberts, C. T., Fitzsimmons, T. R., Marchant, C., Bartold, P. M., & Zilm, P. S. (2015). Abnormal Pregnancy Outcomes in Mice Using an Induced Periodontitis Model and the Haematogenous Migration of *Fusobacterium nucleatum* Sub-Species to the Murine Placenta. *PLOS ONE*, 10(3), e0120050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120050>

Tavarna, T., Phillips, P. L., Wu, X., & Reyes, L. (2020). Fetal growth restriction is a host specific response to infection with an impaired spiral artery remodeling-inducing strain of *Porphyromonas gingivalis*. *Scientific Reports*, 10(1), 14606. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71762-9>

Tsai, T.-C., Wang, Y.-W., Lee, M.-S., Wu, W.-N., Hsu, W., Yao, D.-J., & Huang, H.-Y. (2024). Detection of Interleukin-1 β (IL-1 β) in Single Human Blastocyst-Conditioned Medium Using Ultrasensitive Bead-Based Digital Microfluidic Chip and Its Relationship with Embryonic Implantation Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 4006. <https://doi.org/10.3390/ijms25074006>

Vacca, P., Cantoni, C., Vitale, M., Prato, C., Canegallo, F., Fenoglio, D., Ragni, N., Moretta, L., & Mingari, M. C. (2010). Crosstalk between decidual NK and CD14⁺ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11918–11923. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001749107>

Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., Bdolah, Y., Lim, K.-H., Yuan, H.-T., Libermann, T. A., Stillman, I. E., Roberts, D., D'Amore, P. A., Epstein, F. H., Sellke, F. W., Romero, R., Sukhatme, V. P., Letarte, M., & Karumanchi, S. A. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Medicine*, 12(6), 642–649. <https://doi.org/10.1038/nm1429>

Verlohren, S., Brennecke, S. P., Galindo, A., Karumanchi, S. A., Mirkovic, L. B., Schlembach, D., Stepan, H., Vatish, M., Zeisler, H., & Rana, S. (2022). Clinical interpretation and implementation of the sFlt-1/PlGF ratio in the prediction, diagnosis and management of preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*, 27, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2021.12.003>

Vilotić, A., Nacka-Aleksić, M., Pirković, A., Bojić-Trbojević, Ž., Dekanski, D., & Krivokuća, M. J. (2022). IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14574. <https://doi.org/10.3390/ijms232314574>

Wang, H., & Dey, S. K. (2006a). Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*, 7(3), 185–199. <https://doi.org/10.1038/nrg1808>

Wang, H., & Dey, S. K. (2006b). Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*, 7(3), 185–199. <https://doi.org/10.1038/nrg1808>

Wang, Y. (2010). Vascular Biology of the Placenta. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*, 2(1), 1–98. <https://doi.org/10.4199/C00016ED1V01Y201008ISP009>

Weckman, A. M., Ngai, M., Wright, J., McDonald, C. R., & Kain, K. C. (2019). The Impact of Infection in Pregnancy on Placental Vascular Development and Adverse Birth Outcomes. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01924>

Yadi, H., Burke, S., Madeja, Z., Hemberger, M., Moffett, A., & Colucci, F. (2008). Unique Receptor Repertoire in Mouse Uterine NK cells. *The Journal of Immunology*, 181(9), 6140–6147. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6140>

Yoshida, S., Hatasa, M., Ohsugi, Y., Tsuchiya, Y., Liu, A., Niimi, H., Morita, K., Shimohira, T., Sasaki, N., Maekawa, S., Shiba, T., Hirota, T., Okano, T., Hirose, A., Ibi, R., Noritake, K., Tomiga, Y., Nitta, H., Suzuki, T., ... Katagiri, S. (2022). Porphyromonas gingivalis Administration Induces Gestational Obesity, Alters Gene Expression in the

Liver and Brown Adipose Tissue in Pregnant Mice, and Causes Underweight in Fetuses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.745117>

Zhang, Z., Liu, D., Liu, S., Zhang, S., & Pan, Y. (2021). The Role of Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles in Periodontal Disease and Related Systemic Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.585917>