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

# Papel del péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la función trofoblástica, la regulación de la respuesta inflamatoria y la transformación vascular en etapas tempranas de la gestación

**Tesis presentada para optar al título de Doctor en la UBA en el área de Química Biológica**

**Autor**

*Daniel Esteban Paparini*

**Directora**

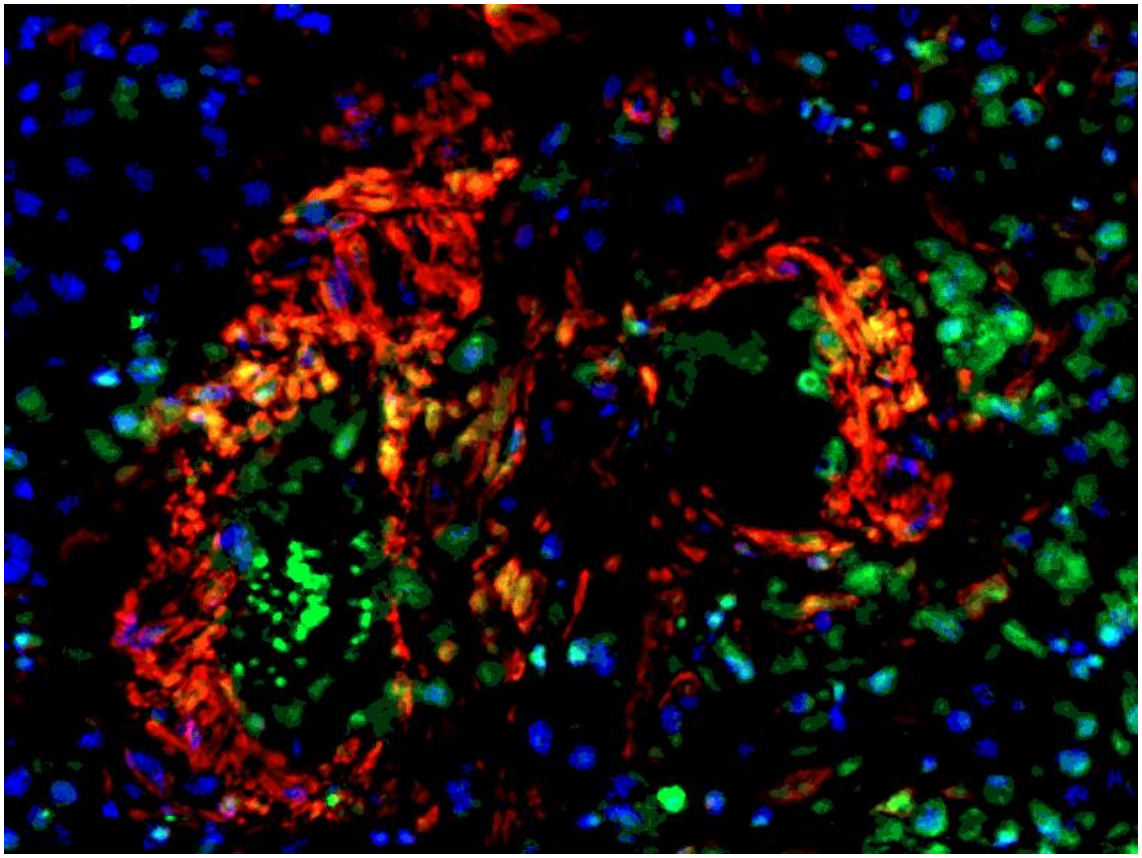
*Claudia Pérez Leirós*

**Consejero de Estudios**

*Juan Carlos Calvo*

*IQUIBICEN-CONICET- Laboratorio de Inmunofarmacología*
*Departamento de Química Biológica-CONICET*

**Buenos Aires, 22 de Diciembre de 2017**



*'No duermas para descansar, duerme para soñar, porque los sueños están para cumplirse'*

*Walt Disney*

# Agradecimientos

*En principio me gustaría agradecer a una investigadora y persona extraordinaria que me ha enseñado y formado a caminar y pensar como un científico que sueñe alto, la Dra. Claudia Pérez Leirós. Ella hace 8 años se atrevió a confiar en mí, me abrió todas las puertas y me permitió avanzar como nunca, enseñándome a ser un mejor científico y persona. Muchísimas gracias Cali!!*

*A Rochy con el cual competimos por el puesto de: La alegría del Lab. Su energía, pasión y empuje me han inspirado gran cantidad de veces.*

*Al VIP Team, cómo no agradecer los que me han ayudado en este año con experimentos, compañía, consejos, risas y MUCHA BUENA ONDA! A Esteban por ser un hermoso ser humano y sobre todo ser: ESTEBANNNNN!! A las más viejitas en el Lab: Vane y Lau Fracca (una vez VIP, por siempre VIP) que desde que se me reían de mi manera de rotular mis primeros eppendorf hasta los experimentos más complejos, ahí estuvieron dándome sus consejos y apoyo. A Dai, descubrimos que somos hermanos de distintos padres. Gracias por todo lo que sos, me inspiras. A Lu por siempre alumbrar el Lab y traer aire nuevo, ya que con su blancura refleja la luz y siempre pestañea como loca! Ajaja. Gracias Lu por tu compañía estos años. A Calo/Guille/Willy/GUINIEL por tantas horas de pipeteo, compartir el flujo y después entrenar juntos. A Lizzie, Fa y Lau que si bien no hemos compartido tantas cosas le han traído onda al team. Además, tenemos un evento muy importante el 21 o 27/10 de algún año. A Sole, que por vueltas de la vida nos volvimos a encontrar en un Lab (si, te estoy poniendo en el VIP Team y no como un anexo!!).*

*I want to thanks to Prof. John D. Aplin (John) a very important person and support in my life and career, to the lovely Alison and all the members in John's Lab: Ruhul the Bengal tiger who is an outstanding man and friend (CACHITO, my Bangladeshi version of Esteban), Viki, Silvia, Bo, Kate W. (the crazy one, I miss you!), Kate. T, my loves Magda and Carolyn, my racist TC2 friends: Cheryl and Abbi, Lynda, Natalie, Sarah, Sami, Teresa, Pete, Yousef, Stéphan and Melissa, among others. As I told you before, you have become in my UK family. Everybody dwell in an important place in my heart. Thank you for everything!*

*A la gente del IQUIBICEN y Dpto de QB: la emperatriz Elba, al grupo de Ale G. (Clau, Cami, Chole, etc, por sus préstamos, mates y correr por un tiempo conmigo!), a los Monte's group (Juli, Fer, Fa y ahora Fran), a Feli y Luqui, los Canepa, los Veros de antes y ahora, a las Nesse y a tanta gente linda que tuvo que aguantar mis cantos, gritos, sustos, etc. A los genios de la secretaría, a todos los bedeles y no docentes del departamento.*

*A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales que se convirtió en mi casa desde hace 10 años ya. A los profesores que han marcado mi vida y carrera por su excelencia, calidez y dedicación, para mencionar a algunos de ellos: Gabi Rabinovich, Juan C. Calvo, Alberto Kornblihtt, Nora Ceballos y las profes del VIP Lab: Rochy y Cali.*

*A AGENCIA y CONICET por brindarme becas y permitirme hacer el Doctorado. A la EMBO y Boehringer Ingelheim Fonds por las becas que me permitieron viajar 2 veces al Lab de John.*

*A mis amigos de la vida en la Facu: Chichi, Xime, Maty, Juan, Euge, Estefi, Lula, Naty pascualito, Sil y Osval, Puche, Andy, Aye, Martu, Feli, las Emis y muchas otras personas con las que compartí, disfrutamos de afters, mates y tiempos de calidad. Muchas Gracias!*

*A Moni y toda la gente del Cervera Running Team donde libero energía, entreno, me supero y comparto con excelentes personas. En especial a mis Perros y a la Tribu que con nuestras juntadas siempre me voy con la panza llena y corazón contento.*

*A la gente de PDD que siempre me ha impulsado a creer más en Dios y en mí, dar de lo que tengo sin miedo. Al Equipo Daniel y toda la gente de LBV en especial a Pablo, Roby y Libi, familia por elección. A mi gran hermano querido Juanjo y Diego D. y a un montón más que si los menciono esta tesis va a ser muy pesada.*

*A Saúl y toda la gente de UNLAM por darme la oportunidad de ser docente ahí y permitirme hacer los dos viajes, gracias a mis compañeros.*

*A mi familia, mis padres Graciela y Rodolfo por estar, enseñarme, amarme en todo contexto y animarme a ir por más. A los Kangaroos Debbie y Sebas, aún a la distancia siempre presentes incluso en oraciones.*

*A la familia Dubini y asociados: Sofi, Cami y Joaco, por obligarme a tomarme tiempo y estar con ustedes, a mis tíos Nancy y Gaby por su apoyo.*

*A mis abuelas: Chichi y Haydee, mis primas de Mendoza: Vero, Eli, Ruth y Ana que junto a sus maridos e hijos siempre están pendientes de mi carrera y vida animándome. Bueno chicos, lo logré!!*

*A mi familia de España y de EE.UU. que también me consideran en sus oraciones.*

*Por último y no menos importante, me gustaría agradecer a Dios y reconocer lo siguiente:*

*'TODO SE LO DEBO A ÉL'*

***A todos les quiero decir desde mi corazón, GRACIAS, MUCHAS GRACIAS, por hacer que todo esto fuera posible y perdón si me olvidé de alguien!***

# ÍNDICE

***RESUMEN*** ..... ***1***

***ABSTRACT*** ..... ***3***

***ABREVIATURAS*** ..... ***5***

***INTRODUCCIÓN*** ..... ***8***

GENERACIÓN DE LA INTERFASE MATERNO-FETAL ..... 9

1 - IMPLANTACIÓN ..... 9

A) aposición ..... 13

B) adhesión estable ..... 13

C) invasión ..... 13

2 - PLACENTACIÓN ..... 15

2.1- Inicio de la placentación ..... 15

2.2- Fin de la placentación ..... 18

PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS INMUNES EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL ..... 18

RELEVANCIA DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL ..... 22

CÉLULAS dNK, MA Y CD SON 'EDUCADAS' POR LOS MEDIADORES SECRETADOS POR EL TROFOBLASTO ..... 23

- MONOCITOS (Mo) Y MACRÓFAGOS (MA) ..... 24

A) reparación tisular ..... 24

B) regulatorio ..... 24

C) inflamatorio ..... 25

- CÉLULAS *NATURAL KILLER* DECIDUALES (dNK) ..... 29
- CÉLULAS DENDRÍTICAS (CD) ..... 30
- LINFOCITOS T ..... 31

A) Las Tregulatorias naturales (nTreg) ..... 33

B) Las Tregulatorias inducibles (iTreg) ..... 34

C) células Tregulatorias de tipo I (Tr1) ..... 34

Interacción de células trofoblásticas con leucocitos maternos ..... 34

REMODELACIÓN DE LOS VASOS MATERNOS ..... 35

ANGIOGÉNESIS ..... 38

FAGOCITOSIS DE CUERPOS APOPTÓTICOS ..... 39

VIP EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL ..... 42

COMPLICACIONES DEL EMBARAZO ..... 43

***MATERIALES Y MÉTODOS*** ..... ***11***

**Modelos Experimentales Y Protocolos Experimentales ..... 46**
1- Líneas celulares ..... 46
1.1 Procedencia de las líneas celulares ..... 46
1.1.i- Líneas celulares trofoblásticas humanas ..... 46
1.1.ii- Líneas celulares endoteliales humanas ..... 46
1.2 Mantenimiento de células trofoblásticas ..... 46
1.2.i- Propagación ..... 46
1.2.ii- Preservación ..... 47
1.3 Silenciamiento del VIP endógeno en la línea Swan 71 y BeWo ..... 47
2- Muestras ..... 48
2.1 Muestras de sangre ..... 48
2.2 Muestras de decidua y placenta de primer trimestre ..... 48
3- Preparación de medios condicionados ..... 48
4- Purificación y diferenciación de leucocitos ..... 49
4.1 Monocitos de sangre periférica ..... 49
4.2 Macrófagos diferenciados con M-CSF y GM-CSF ..... 49
4.3 Macrófagos y células NK deciduales ..... 50
5- Co-cultivo de células trofoblásticas y Mo ..... 51
6- Adherencia de Mo para distintos abordajes ..... 51
7- RT-PCR ..... 52
7.1 Extracción de ARN ..... 52
7.2 Retro-transcripción ..... 53
7.3 Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) ..... 53
7.4 Electroforesis en gel de agarosa y semicuantificación de los productos de RT-PCR ..... 56
7.5 Real Time PCR ..... 56
8- Ensayo de migración de Mo ..... 57
9- Inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo ..... 57
9.1 Inmunofluorescencia de superficie directa ..... 58
9.2 - Inmunofluorescencia intracitoplasmática ..... 58
10- ELISA para citoquinas y quimioquinas ..... 60
11- Fagocitois de Cuerpos Apoptóticos ..... 60
11.1 Obtención de células trofoblásticas y neutrófilos apoptóticos ..... 60
11.2 Marcación de las células apoptóticas con CFSE ..... 61
11.3 Fagocitosis ..... 61
12- Detección de la integrina $\alpha V\beta 3$ en Mo ..... 61
12.1 Expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ ..... 61
12.2 Localización celular ..... 62
13- Explantos de placenta de primer trimestre ..... 63
14- Outgrowth de las células trofoblásticas ..... 63

15- Inmunohistoquímica de tejido ..... 63
16- Inmunofluorescencia de Tejido ..... 64
17- Inmunoensayo de BioPlex humano ..... 65
18- Zimografía para medición de metaloproteasas ..... 66
19- Formación de Túbulos ..... 66
20- Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 microarray ..... 67
21- Análisis Estadístico ..... 68

**REACTIVOS Y SOLUCIONES ..... 68**

**CAPÍTULO 1 ..... 71**

**Efectos del VIP sobre células trofoblásticas y su impacto en el perfil funcional de los monocitos ..... 71**

Modulación del perfil fenotípico y funcional de los monocitos por las células trofoblásticas ..... 71
Fagocitosis de células apoptóticas por células CD14+. Mecanismos involucrados y modulación por células trofoblásticas ..... 76
Silenciamiento del VIP endógeno en las células trofoblásticas y su efecto sobre las células CD14+ ..... 81

**CAPÍTULO 2 ..... 83**

**Efectos del VIP y los MC de células trofoblásticas sobre macrófagos ..... 83**

1- Efectos sobre macrófagos diferenciados con GM-CSF ..... 83
1.1- Perfil de activación de los MA ..... 83
1.2 Fagocitosis de cuerpos apoptóticos ..... 84
1.3- Producción de mediadores de reparación tisular ..... 85
2- Diferencias entre MA (M-CSF) y MA (GM-CSF) ..... 87
2.1- Expresión diferencial de marcadores ..... 87
2.1.i- Factores de transcripción ..... 87
2.1.ii- Expresión de VEGF-A ..... 89
2.2- Producción de IL-10 ..... 90

**CAPÍTULO 3 ..... 92**

**Detección y estudio del VIP en placentas humanas de primer trimestre y en leucocitos maternos ..... 92**

Expresión de VIP en placentas humanas de primer trimestre. Papel en la migración de células trofoblásticas ..... 92
Rol de las células EVT VIP+ en la remodelación vascular, glandular y modulación del micro-ambiente. 98
Rol del VIP en las poblaciones leucocitarias más abundantes en la interfase materno-fetal durante el primer trimestre: NK y macrófagos deciduales ..... 107

**CAPÍTULO 4 ..... 115**

**Efecto del VIP y los macrófagos en procesos asociados a angiogénesis..... 115**

Efecto de VIP en la formación de túbulos por células endoteliales..... 115

***DISCUSIÓN ..... 121***

***REFERENCIAS..... 134***

# RESUMEN

**Role of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the function of trophoblast cells, the inflammatory response and vascular remodeling during early pregnancy**

Alteraciones en la proliferación y diferenciación de células trofoblásticas (TB) en sus diversos fenotipos funcionales, defectos en la transformación vascular y un control deficiente de la respuesta inflamatoria materna en etapas tempranas de la gestación se asocian con complicaciones gestacionales como la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino. Diversos factores solubles y de contacto participan en estos procesos durante la placentación. Proponemos la participación del péptido intestinal vasoactivo (VIP), ya que es sintetizado por TB y tiene actividad relajante muscular, vasodilatadora, e inmunomoduladora. **El objetivo de esta tesis fue investigar la contribución del VIP y sus receptores VPAC en diversas funciones de TB, en particular en su capacidad de diferenciarse, migrar e invadir; su capacidad de interactuar con células inmunes deciduales favoreciendo la remodelación tisular en un microambiente anti-inflamatorio.** Analizamos estos aspectos en diseños *in vitro* con líneas celulares trofoblásticas humanas de primer trimestre (Tb), la interacción de éstas con monocitos de voluntarios sanos o macrófagos derivados de ellos. En la segunda parte del trabajo evaluamos la expresión del VIP y los efectos del péptido en diseños *ex vivo* empleando explantos de placenta de primer trimestre obtenidas de abortos electivos en el marco de una colaboración con la Universidad de Manchester.

Nuestros resultados demuestran que Tb tiene la capacidad de aumentar la migración de monocitos (Mo), que adquieran un perfil anti-inflamatorio con aumento en la producción de IL-10 y fagocitosis de cuerpos apoptóticos. Esos efectos fueron aún mayores si las Tb se

incubaron previamente con VIP. Además, los medios condicionados de Tb tratadas con VIP disminuyeron la expresión de marcadores pro-inflamatorios, aumentaron los anti-inflamatorios y la fagocitosis de cuerpos apoptóticos en macrófagos (MA) diferenciados con GM-CSF.

Cuando estudiamos placentas humanas de primer trimestre, detectamos que las TB extravellosas expresan VIP y este aumentó la migración por una vía dependiente de PKA. Cuando silenciamos el VIP en Tb, observamos una disminución en la expresión de genes de remodelación de la matriz extracelular, en especial las metaloproteasas (MMP) 2 y 9. Las TB VIP positivas se encontraron principalmente en la luz de las arterias espiraladas y glándulas maternas sugiriendo su función de remodelación. Además, VIP aumentó la secreción de IL-10 y varias quimioquinas y disminuyó la de G-CSF en TB. Cuando analizamos las células NK y MA deciduales en estas muestras de placenta detectamos que expresan VPAC1 y VPAC2 y que el VIP disminuyó la secreción de los marcadores pro-inflamatorios IL-1β, IL-8 e IL-12 y aumentó IL-10. Además, solo en los dMA el VIP aumentó la expresión y actividad de la MMP-2, consistente con un efecto sobre la transformación vascular.

Estos resultados aportan evidencias acerca de la modulación por VIP de la función trofoblástica y su interacción con células inmunes en la interfase temprana y sugiere su papel como modulador endógeno a través de circuitos autocrinos y paracrinos. Las evidencias presentadas aquí sostienen un papel del VIP de origen trofoblástico durante la placentación. Su eventual potencial y validación como biomarcador requerirá abordajes en diseños clínicos de cohortes en pacientes con y sin complicaciones gestacionales.

Palabras claves: CÉLULAS-TROFOBLÁSTICAS, MONOCITOS, MACRÓFAGOS, INFLAMACIÓN, TRANSFORMACIÓN-VASCULAR, FAGOCITOSIS.

# ABSTRACT

**Role of vasoactive intestinal peptide (VIP) in trophoblast cells functions, controlling the inflammatory response and vascular remodeling during early pregnancy**

Alterations in the proliferation and differentiation of trophoblast cells, defects in vascular transformation or failure in the regulation of the inflammatory response during early pregnancy are events associated with pregnancy complications as preeclampsia and fetal growth restriction (FGR). Both pathologies present high rates of mortality and morbidity for the mother and the neonate. Among various soluble and contact factors involved in placentation, the participation of the vasoactive intestinal peptide (VIP) has been proposed. It is synthesized by trophoblast cells and it has vasodilating, immunosuppressive and smooth muscle relaxing effects. **The aim of this Thesis was to investigate the contribution of VIP and its receptors (VPAC) to trophoblast cell function. Particularly, their ability to differentiate, migrate and invade; to interact with decidual immune cells and to favour tissue remodelling in an anti-inflammatory microenvironment**. We studied these features in an *in vitro* model with human first trimester trophoblast (Tb) cell lines interacting or not with monocytes (Mo) obtained from healthy volunteers or macrophages (MA) differentiated from them. On the second hand, we studied the expression and effects of VIP in an *ex vivo* design with first trimester placental explants from elective terminations in collaboration with the University of Manchester.

Our results show that Swan 71 trophoblast cells increased the migration of Mo which acquired an anti-inflammatory profile with IL-10 production and increased apoptotic cell phagocytosis. All these effects were increased when Tb cells were grown in the presence of

VIP. Besides, the conditioned media of Tb cells treated with VIP were capable of decreasing pro-inflammatory markers and increasing anti-inflammatory markers and apoptotic cell phagocytosis in MA differentiated with GM-CSF.

In human first trimester placentas, we detected that extravillous trophoblast cells express VIP and that VIP increased the migration of these cells through the PKA pathway. When we treated Tb cells with a VIP siRNA, we observed a reduced expression of extracellular matrix remodelling proteins like metalloproteinase (MMP) 2 and 9. These VIP positive Tb cells were present in the lumen of the spiral arteries and maternal glands suggesting their role in remodelling functions. Moreover, VIP increased the secretion of IL-10 and some chemokines meanwhile it diminished G-CSF secretion in Tb cells. When we isolated decidual MA and NK cells from the explants, both expressed VIP receptors whereas VIP decreased some pro-inflammatory markers, such as IL-1β, IL-8 and IL-12 and increased IL-10. When decidual MA were treated with VIP, it increased the expression and activity of MMP-2, consistent with an effect of MA in vascular transformation.

The evidence presented in this Thesis support a novel role of VIP in trophoblast cells during placentation. Results provide evidence on the effects of VIP on Tb cells and their interaction with immune cells in early maternal placental interface to contribute to an anti-inflammatory microenvironment. Besides, they suggest an important role of VIP as an endogenous autocrine and paracrine modulator. New approaches with clinical trials in patient cohorts with normal and pathological pregnancies, such as preeclampsia and FGR, are needed in the future to assess the potential of VIP as a biomarker.

Keywords: TROPHOBLAST-CELLS, MONOCYTES, MACROPHAGES, INFLAMMATION, VASCULAR-TRANSFORMATION, PHAGOCYTOSIS

# ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| **Ac** | Anticuerpos |
| **Ae** | Arterias espiraladas |
| **AMBA** | Área Metropolitano de Buenos Aires |
| **CalDAG** | *Calcium and diacylglyceol-regulated guanine nucleotide exchange factor* I |
| **CD** | Células Dendríticas |
| **CMH** | Complejo Mayor de Histocompatibilidad |
| **CPAp** | Células Presentadoras de Antígenos profesionales |
| **DAMPs** | Patrones moleculares asociados a daño |
| **EC** | Células endoteliales |
| **EPAC** | *Exchange proteins directly activated by cAMP* |
| **EVT** | Células Trofoblásticas Extravellosas |
| - **gEVT** | EVT glandulares |
| - **iEVT** | EVT intersticiales |
| - **vEVT** | EVT endovasculares |
| **FGF-2** | Factor de crecimiento básico de fibroblasto 2 |
| **FOXP3** | *Forkhead Box P3* |
| **GAPDH** | Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa |
| **GM-CSF** | Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos |
| **GRO-α** | oncogen-α relacionado al crecimiento |
| **Hcg** | Gonadotrofina coriónica humana |
| **HLA** | Antígenos leucocitarios humanos |
| **HUtMvEC** | *Human Uterine Microvascular Endothelial Cells* |
| **IFN** | Interferón |
| **IRF-5** | *Interferon regulatory factor 5* |
| **ISP** | *Implantation Serineprotease* |
| **IDO** | Indolamina 2,3-dioxigenasa |
| **IL** | Interleuquina |
| **IP-10** | *Interferon gamma-induced protein* 10 |

| | |
|---|---|
| **IPEX** | *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked syndrome* |
| **KLF-4** | *Kruppel like factor 4* |
| **LIF** | *Leukemia Inhibitor Factor* |
| **MA** | Macrófagos |
| - **dMA** | Macrófagos deciduales |
| **M-CSF** | Factor estimulador de colonias de macrófagos |
| **MC** | Medios Condicionados |
| **MCI** | Macizo Celular Interno |
| **MCP-1** | Proteína quimioatractante de monocitos 1 |
| **MEC** | Matriz Extracelular |
| **MFG-E8** | *milk fat-globule EGF factor 8* |
| **MIP** | Proteína inflamatoria de macrófagos |
| **MMP** | Metaloproteasas |
| **MNT** | células mononucleares totales |
| **NET** | *neutrophil extracelular trap* |
| **Neu** | Neutrófilos |
| - **aNeu** | Neutrófilos apoptóticos |
| **NK** | Células *Natural Killer* |
| - **dNK** | *Natural Killer* deciduales |
| **Mo** | Monocitos |
| **ON** | Óxido Nítrico |
| **PCR** | Reacción de la Polimerasa en cadena |
| **PE** | Preeclampsia |
| **PECAM** | *Platelet endothelial cell adhesion molecule* |
| **PGE2** | Prostanglandina E2 |
| **PlGF** | Factor de crecimiento de la placenta |
| **RANTES** | *Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted* |
| **RCIU** | Restricción del crecimiento intrauterino |
| **RRP** | Receptor de Reconocimiento de Patógenos |
| **Scrl** | Secuencia *scramble* |
| **siVIP** | siRNA de VIP |

| | |
|---|---|
| **SF** | Solución fisiológica |
| **SFB** | Suero Fetal Bovino |
| **SN** | Sobrenadante |
| **SMA** | Actina del músculo liso |
| **Tb** | Células trofoblásticas |
| - **aTb** | Células trofoblásticas apoptóticas |
| **TGF** | Factor de crecimiento transformante |
| **Th** | Linfocito CD4+ *helper* |
| **TIMP** | Inhibidor de MMP de tejido |
| **TNF** | Factor de necrosis tumoral |
| **Treg** | Linfocitos T CD4+ reguladores |
| - **iTreg** | Linfocitos Treg inducibles |
| - **nTreg** | Linfocitos Treg naturales |
| - **Tr1** | Linfocito Treg de tipo 1 |
| **TSP-1** | Trombospondina 1 |
| **VEGF** | Factor de crecimiento de endotelio vascular |
| **VIP** | Péptido Intestinal Vasoactivo |
| **VSMC** | células vasculares del músculo liso |
| **YWHAZ** | *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta* |

# INTRODUCCIÓN

La reproducción humana involucra una paradoja fundamental: aunque es crítica para la supervivencia de la especie, es un proceso relativamente ineficiente. Por un lado, la fecundidad máxima, es decir, la probabilidad de concepción durante un ciclo menstrual, es de aproximadamente un 30%. Por el otro, los procesos de implantación y placentación requieren no solamente el balance entre diversas poblaciones celulares sino también una sincronización e interacción de mediadores producidos por las mismas, regulados por los sistemas nervioso, inmune y endócrino. Aproximadamente el 40 al 60% de todas las concepciones llegan a las 20 semanas de gestación y se propone que esta pérdida se debe anomalías en tal sincronización que resultan en un control deficiente de los diversos procesos a lo largo de la gestación [1,2]. Existe un gran interés en comprender estos mecanismos de regulación, en particular se ha demostrado que deficiencias en la regulación durante la placentación se asocian a complicaciones gestacionales con altas tasas de morbilidad y mortalidad materna y neonatal. A continuación se detallarán los mencionados procesos y las principales interacciones neuroinmuno-endocrinas que subyacen a esta compleja regulación.

## GENERACIÓN DE LA INTERFASE MATERNO-FETAL

## 1 - IMPLANTACIÓN

En condiciones fisiológicas deben ocurrir tres eventos para que se produzca un embarazo: la ovulación, la copulación y la fertilización. Estos eventos están acompañados de una serie de cambios metabólicos, hormonales y de citoquinas que preparan al útero para la implantación del blastocisto. Algunos de estos cambios persisten durante todo el embarazo[3].

Luego de la menstruación, el útero ha perdido parte del endometrio quedando solo el endometrio basal mientras que las arterias

espiraladas (Ae) han involucionado con el mismo. El ciclo sexual se reinicia y, asociado a la liberación de estrógenos, se produce una rápida proliferación de células epiteliales y estromales (fase proliferativa del ciclo menstrual o folicular). En esta, el endometrio funcional progresa desde el endometrio basal aumentando en tamaño las glándulas y las Ae en tamaño y cantidad. Posteriormente a la ovulación, cuando los niveles de progesterona comienzan a aumentar, cesa la proliferación y comienza la diferenciación (fase secretoria o lútea). En esta fase el endometrio se prepara para la implantación del blastocisto. Los cambios morfológicos clásicos descriptos son: disminución progresiva de la mitosis, aparición de vacuolas ricas en glucógeno en el epitelio endometrial secretadas por las glándulas, edema en el estroma, infiltración leucocitaria y aumento de las Ae generando un endometrio funcional bien irrigado. Todo este proceso se inicia en el ciclo menstrual normal y eventualmente termina en forma conjunta con este. Si ocurre la fertilización, los cambios en las células estromales son más marcados y estos llevan a la diferenciación de la decidua en distintas capas con funciones más especializadas.

Estos cambios producen que el estroma del endometrio se diferencie a decidua, proceso que involucra varias poblaciones celulares presentes en la mucosa uterina. Luego de la implantación, bajo la influencia de estrógenos, la principal función de la misma sería la de soporte sólido para la nutrición y desarrollo del feto[4,5].

La fertilización ocurre en la trompa de Falopio entre 24 y 48 h luego de la ovulación[1,6]. El ovocito humano fecundado pasa por una serie de cambios, a medida que atraviesa el oviducto, que lo preparan para su implantación en el útero. El cigoto tiene varias divisiones celulares sin cambiar su tamaño, llevando a un aumento rápido en la cantidad de células. Estas células son cada vez más pequeñas y se las denomina blastómeras. La compactación celular resultante de la serie

de divisiones mitóticas sin variar el tamaño inicial del ovocito se denomina mórula. Cuando esta alcanzó la etapa de 12 a 16 células, aún rodeada de la zona pelúcida. La mórula se introduce en la cavidad uterina donde se sigue dividiendo (Figura 1a). En esta fase, la superficie de la mórula se vuelve más lisa y esférica, debido a que las células se compactan e incrementan los contactos intercelulares estableciéndose uniones herméticas que sellan la mórula respecto del medio exterior. Poco después, los espacios intercelulares internos aumentan de tamaño generando una cavidad interna central llena de líquido, el blastocele. En ese momento la mórula se ha transformado en blastocisto. El **blastocisto** es el primer estadío del desarrollo en el que se pueden diferenciar dos tipos celulares: un pequeño cúmulo de células, que en el polo apical forma el macizo celular interno (MCI) y una monocapa de células epiteliales, continua e impermeable, que rodea y recubre al MCI y al blastocele llamada trofoectodermo (Figura 1B)[4,7]. Esta etapa inicial, se encuentra bajo el control de moléculas de información materna que se acumularon en el citoplasma del ovocito durante la ovogénesis[5].

Luego, el desarrollo depende de la activación del genoma embrionario, que codifica factores de crecimiento, componentes de uniones intercelulares y otras macromoléculas necesarias para la evolución normal del mismo[3,6,8,9].

Del MCI deriva el embrión propiamente dicho, que crece y comienza a diferenciarse dando origen a los tejidos embrionarios (ectodermo, mesodermo y endodermo) que luego darán lugar a los tejidos y órganos del feto. De este MCI también derivan algunas estructuras extraembrionarias: el saco vitelino, la lámina coriónica y el cordón umbilical[1].

El trofoectodermo es el epitelio precursor de la placenta y el principal componente del sistema de estructuras extraembrionarias. Cuando el

blastocisto llega al útero, las células del trofoectodermo establecen un contacto inicial con el epitelio uterino[5,10].

La **implantación** es el proceso por el cual el blastocisto invade el endometrio, esto ocurre entre los 8 y 9 días post-fertilización. La implantación solo puede ocurrir durante un lapso breve denominado ventana de implantación (a 20 días del inicio de la menstruación[5], en el cual el útero se encuentra receptivo. En humanos dura aproximadamente de 2 a 4 días. Este período de receptividad resulta de una serie de acciones programadas de la progesterona y los estrógenos sobre el endometrio e involucra cambios estructurales como pérdida de vellosidades y alteraciones en las uniones celulares estrechas. Existen evidencias que sugieren que el estado receptivo del útero esta sincronizado con la activación del blastocisto[5–7].

Para que la implantación ocurra es indispensable la pérdida de la zona pelúcida. Esta se lleva a cabo por enzimas serinproteasas, entre ellas *implantation serineprotease* (ISP) 1/2 sintetizadas por el trofoectodermo que digiere la matriz glicoproteica de la misma en la cavidad uterina 5 a 6 días post-ovulación.

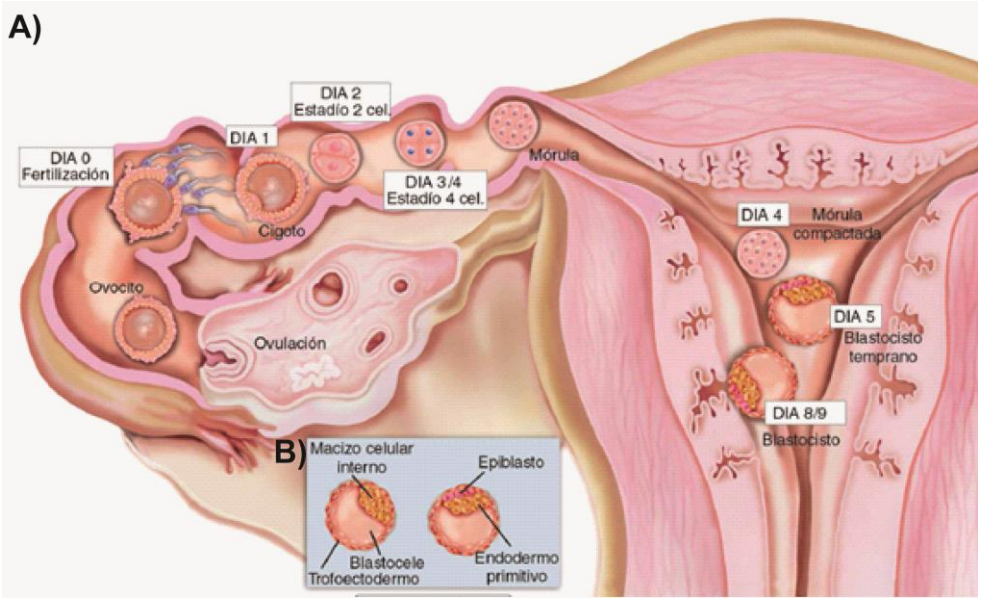



**Figura 1: Estadios tempranos del desarrollo embrionario humano**.
A) Luego de la fertilización en el oviducto, el cigoto sufre una serie de divisiones mitóticas hasta formar una mórula. En este estadio, entra en el útero y se transforma en blastocisto. Es este último el cual comienza el proceso de implantación (modificado de [1]).

B) El blastocisto está formado por un macizo celular interno (MCI) y una capa de células epiteliales llamada trofoectodermo que lo rodea (modificado de[5]).

Así, el blastocisto queda incluido en el endometrio, durante un proceso regulado en el que el trofoblasto está programado para invadir cualquier tejido y la decidua está especializada en controlar dicha invasión[4,10].

El proceso de implantación comprende tres estadíos:

**A) aposición,** adhesión inicial del blastocisto a la pared uterina, que es inestable e involucra la interdigitación entre las microvellosidades del sinciciotrofoblasto y los pinopodos (microprotrusiones producidas por efecto de la progesterona) de la superficie uterina. En la aposición predominan los efectos de la interacción entre uniones débiles con un rol crítico de la L-selectina fuertemente expresada por el trofoblasto (Figura 2A);

**B) adhesión estable**, caracterizada por un aumento en la interacción física entre trofoblasto y epitelio uterino. Predominan las interacciones estables de moléculas de adhesión, como las integrinas (Figura 2b);

**C) invasión**, el sinciciotrofoblasto penetra en el endometrio y establece la conexión directa con la circulación materna[1]. En esta etapa las proteasas tienen un rol fundamental, producidas tanto por la decidua como por el trofoblasto y son controladas por inhibidores [1,5]. (Figura 2C).

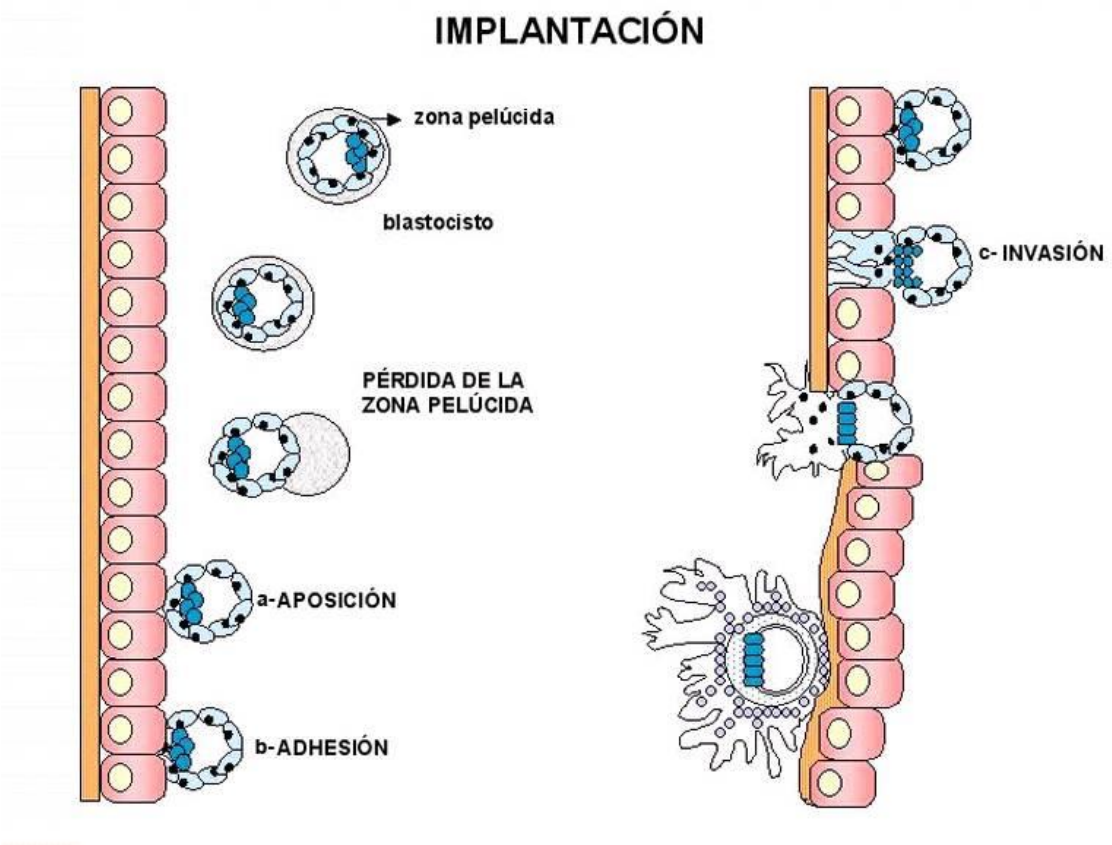



**Figura 2: Proceso de Implantación**. A) Aposición; B) Adhesión; C) Invasión y mantenimiento del embarazo. Esta imagen fue extraída y modificada de[5].

La implantación es uno de los períodos críticos en el embarazo donde cualquier interferencia en el camino invasivo del trofoblasto podría acarrear consecuencias serias, al poner en riesgo el embarazo o incluso la vida materna[1,2].

Como se mencionó anteriormente, las hormonas esteroides, en especial la progesterona y los estrógenos, desempeñan un papel fundamental en la preparación del endometrio para la implantación. Durante la fase folicular, el endometrio sometido a la acción de los estrógenos prolifera y crece. Luego de la ovulación, la progesterona promueve cambios sobre el endometrio produciendo su decidualización, independientemente si hubo fertilización o no[5]. La progesterona es producida en primer lugar por el cuerpo lúteo en respuesta al estímulo de la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) producida por el trofoblasto. Entre la sexta y octava semana de

gestación, cuando la producción lútea decae, la placenta se convierte en la principal fuente de dicha hormona. La secuencia hormonal necesaria para la implantación es: estrógenos seguidos por progesterona y luego estrógenos junto con progesterona[11].

Las hormonas que intervienen en la implantación son numerosas. Entre ellas se encuentran la hCG que inhibe la ovulación y tiene un papel importante en la implantación favoreciendo la receptividad del endometrio al blastocisto[11,12]. Por otro lado, la prolactina secretada por células estromales uterinas tiene un rol sobre la proliferación de células Natural Killer uterinas[13,14].

# 2 - PLACENTACIÓN

## 2.1- Inicio de la placentación

Una vez que el blastocisto entra en contacto con el epitelio uterino, el trofoectodermo constituye el llamado trofoblasto. Este se diferencia en una capa más externa multinucleada llamada **sinciciotrofoblasto** que recubre a todo el embrión y forma los troncos de las vellosidades primarias en la zona de implantación, y otra interna de células mononucleadas denominada **citotrofoblasto primitivo**. Antes de la segunda semana post-fertilización, el citotrofoblasto se diferencia siguiendo dos caminos: el citotrofoblasto velloso y el extravelloso. Ambas capas poseen tipos celulares fenotípica y funcionalmente distintos e interaccionan con células maternas diferentes. El **citotrofoblasto velloso** cubre la placenta definitiva por debajo del sinciciotrofoblasto y participa en funciones de oxigenación y transporte de nutrientes[1,9]. Por el contrario, el **citotrofoblasto extravelloso** penetra a través del sinciciotrofoblasto y las células se ubican en las extremidades de las vellosidades de anclaje, estableciendo contacto con la decidua y formando columnas celulares (Figura 3). Las células del citotrofoblasto velloso quedan en contacto

con la membrana basal y continúan proliferando, mientras que las que pierden el contacto, sufren una transición similar a la epitelio-mesenquimática en el cual pierden la capacidad proliferativa[15] y adquieren un fenotipo invasivo a las cuales llamaremos a partir de ahora **células trofoblásticas extravellosas (EVT)**[16–19].

Para que la placenta tenga nutrición hemocorial a partir de la semana 12-13 de gestación se requieren numerosos procesos que involucran la migración de las células EVT hacia distintas estructuras del útero como los vasos y las glándulas. Esta capacidad invasiva es dependiente de la secreción de **metaloproteasas (MMP)** en especial la 2, 9, 12 y la 14 y 15 que solo es expresada por las células EVT que degradan la matriz extracelular, y su regulación y control dependen de la expresión de inhibidores por los tejidos maternos, evitando una invasión excesiva[8,20–23]. Además, las EVT poseen otros marcadores moleculares que las identifican como invasivas: la integrina α1, α5, αvβ3[24–26], HLA-G[16,27], entre otros. A las células EVT se las clasificó según el lugar donde migran en el endometrio decidualizado y su función. En primer lugar, las células **EVT intersticiales (iEVT)**, migran por el estroma contactando las células maternas como leucocitos, células musculares y endoteliales de los vasos. Estas células llegan primero para el remodelamiento vascular generando apoptosis principalmente de las células musculares[8,27]. Las células **EVT endovasculares (vEVT)**, por otra parte, migran por el lumen de las arterias espiraladas maternas y forman tapones que disminuyen el flujo sanguíneo y favorecen su remodelación dejando pasar solo el plasma rico en nutrientes[28]. La invasión de las células vEVT está caracterizada por una disminución de la expresión de receptores de adhesión característicos de las células EVT y un aumento de expresión de receptores de adhesión característicos de células vasculares[8,22,29]. Las vEVT reemplazan el endotelio, formando un canal de diámetro considerablemente mayor respecto a la arteria inicial, y erosionan las paredes de las

arterias próximas a los espacios intervellosos, estableciendo una conexión directa con las arterias maternas. En paralelo, se ha propuesto que las células **EVT glandulares (gEVT)**, migran hacia las glándulas maternas donde las remodelan sin formar tapones y toman los nutrientes de estas mismas volcándolo a los espacios intervellosos para el mantenimiento de la placenta hasta establecerse la nutrición hemotrófica[28,30].

Tanto las EVT como las células provenientes del citotrofoblasto velloso poseen funciones secretoras de proteínas como: interleuquinas (IL) IL-6 y 8, Factor inhibidor de leucemia (LIF *por la sigla en inglés Leukemia Inhibitor Factor*), Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), Factor de crecimiento transformante *beta* (TGF-β) u hormonas como la hormona gonadotrofina coriónica humana, entre otras, que regulan el micro-ambiente de la interfase materno-placentaria tal que favorezca el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y una adecuado desarrollo de la gestación[8,31–33].

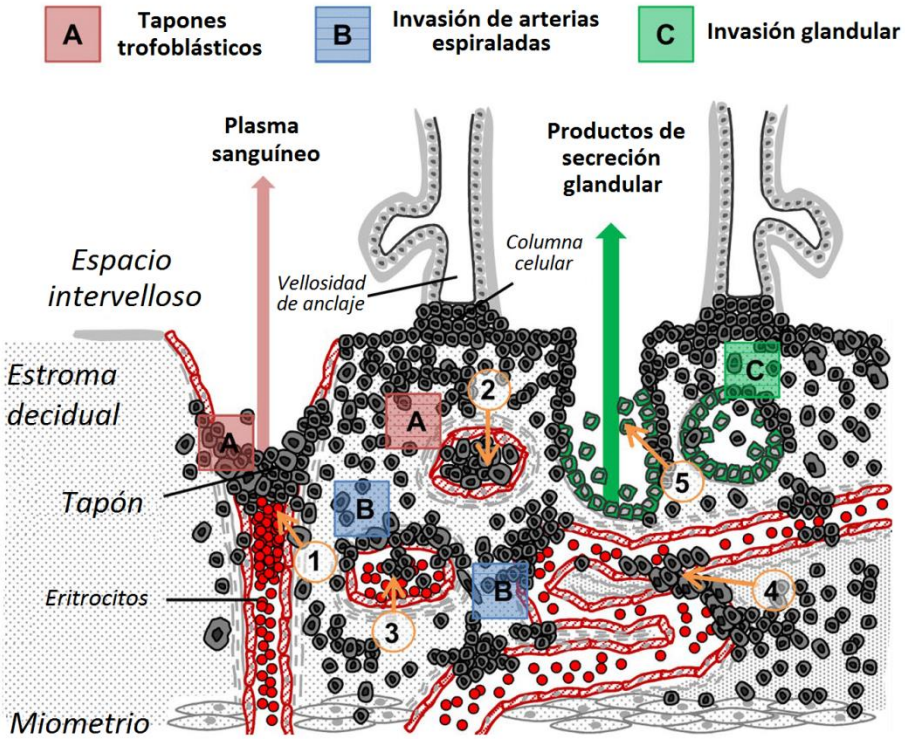


**Figura 3: Placentación en la semana 11 de gestación humana**: 1,2- Lumen arterial con tapón total; 3, 4- Lumen arterial con tapón parcial; 5: Epitelio endoglandular reemplazado por gEVT. Modificado de[28]

### 2.2- Fin de la placentación

A principios del segundo trimestre, los tapones se disuelven permitiendo el flujo directo de sangre materna que entra en contacto con el sinciciotrofoblasto, en el espacio intervelloso.

Todos los mecanismos mencionados anteriormente llevan a la formación de la placenta, y del modo en que ésta queda localizada se establece una interfase materno-placentaria conformada por una zona de contacto trofoblasto-sangre materna, y trofoblasto-decidua.

Las funciones de la placenta son muy importantes ya que es la encargada de regular el desarrollo intrauterino. Proporciona nutrientes, oxígeno y elimina desechos metabólicos y produce o metaboliza hormonas necesarias tanto para el feto como para la madre[34]. Además tiene funciones inmunológicas como barrera de protección frente a patógenos y más recientemente como órgano inmunológico para el mantenimiento de la homeostasis al modular los perfiles funcionales de los leucocitos presentes en la decidua [35,36].

## PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS INMUNES EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL

El sistema inmune ha evolucionado para defenderse de una gran variedad de potenciales patógenos a los que se encuentra expuesto. Los componentes de la respuesta inmune se pueden clasificar en innato y adaptativo según su rol y mediadores frente a una injuria. El sistema inmune innato, reconoce patrones presentes en los organismos patógenos así como los daños generados por ellos. Este reconocimiento de daño tisular es necesario para que ocurra la correcta activación del sistema inmune adaptativo. Un aspecto

fundamental de este segundo componente, es la generación de un repertorio amplio y variado de receptores de reconocimiento antigénico distribuidos clonalmente en linfocitos T y B, cada uno con especificidad por un antígeno particular[37]. Inherente a este mecanismo, y ante la posibilidad de generar linfocitos que expresen receptores capaces de reconocer 'antígenos propios', se han desarrollado mecanismos de tolerancia central (ocurren en la médula ósea y timo) o periféricos (en órganos linfáticos secundarios). Mediante éstos se elimina a los linfocitos autorreactivos para prevenir fenómenos de autoinmunidad[38,39].

En este contexto, el embarazo representa una situación particular ya que el feto en sí mismo se comporta como un semi-injerto dado que expresa moléculas del complejo mayor y menor de histocompatibilidad (CMH) tanto de origen materno como paterno[40]. A pesar de ello, las células fetales ocupan las estructuras del útero y el sistema inmune materno no genera una reacción de rechazo[7]. Las moléculas del CMH son glicoproteínas que se expresan en la superficie celular, cuya función principal es presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T, los cuales iniciarán una respuesta inmune adaptativa[38]. El receptor del linfocito T reconoce simultáneamente epítopes del antígeno y de la molécula de histocompatibilidad que lo presenta. En humanos este complejo se lo denomina 'Human Leukocyte Antigen o Antígenos Leucocitarios Humanos' (HLA). Existen 2 grupos de genes principales de HLA, genes de clase I y II que expresan proteínas presentadoras de antígeno a los linfocitos T[38]. Las glicoproteínas de clase I (HLA-A, B o C) presentan péptidos citosólicos y las glicoproteínas de clase II (HLA-DR, DQ, DP) péptidos endocitados. Además de los genes que codifican para clase I clásicas (clase Ia), existen otros genes de clase I denominados no clásicos (Ib). Entre los genes de clase Ib se encuentran los que mapean dentro del CMH: HLA-E, F, G, H y la familia de genes MIC. Por otro lado, existen otros genes no clásicos

ubicados por fuera del CMH como es el caso de los genes que codifican para las moléculas CD1 y el receptor neonatal para la porción Fc de la IgG[37].

Las moléculas clásicas, HLA-C, y no clásicas, HLA-G y E, se expresan en el citotrofoblasto extravelloso y presentan un rol inhibitorio de la acción citotóxica de las células Natural Killer uterinas y participan en promover la neo vascularización, ente otras funciones[37].

Las células fetales han sido identificadas en la circulación materna desde las 4 semanas post-fecundación hasta 36 años después del parto y se propone que participarían en la tolerancia fetal[41]. Se presume que células y moléculas fetales son liberadas al torrente sanguíneo durante la invasión de las células EVT en la decidua, momento en el cual podría haber pasaje de células maternas a la circulación fetal. Este intercambio de células entre la madre y el feto se conoce como microquimerismo[41].

El fenómeno de microquimerismo muestra claramente que el sistema inmune materno está en contacto directo con inmunógenos fetales y a pesar de ello el feto es tolerado y el embarazo llega a término sin complicaciones inmunológicas en la madre, en condiciones fisiológicas.

La tolerancia fetal por el sistema inmune materno constituye un enigma que ha estimulado a la investigación durante los últimos 60 años. Para una mejor comprensión de los mecanismos inmunológicos en la interfase materno-placentaria durante la gestación, Mor y colaboradores[42] han propuesto que el embarazo consta de tres fases inmunológicas, caracterizadas por procesos biológicos distintos, temprana, media y tardía, cada una con un perfil de respuesta inmune y mediadores particulares.

La etapa temprana se caracteriza por un perfil pro-inflamatorio, el cual se encuentra asociado a respuestas inmunes efectoras celulares

acompañado por la producción de mediadores inflamatorios. Estos últimos, disminuyen en la etapa media para volver a aumentar hacia el final del embarazo (Figura 4)[43,44].

Durante la primera etapa del embarazo, el embrión tiene que implantarse en el útero, dañando el endometrio y reemplazando el endotelio y músculo liso de la vasculatura materna para asegurarse un adecuado suministro de sangre[1,9]. En este ambiente inflamatorio, células con gran capacidad invasiva, células apoptóticas y células fagocíticas participan en la re-estructuración del endometrio uterino, la remoción de los cuerpos apoptóticos y el mantenimiento de la homeostasis tisular[45].

**Figura 4: Fases inmunológicas del embarazo**. Se caracterizan por una fase temprana pro-inflamatoria, una media anti-inflamatoria y una tardía pro-inflamatoria necesaria para el parto.

La etapa media del embarazo, se caracteriza por la inducción de un estado anti-inflamatorio que controla las interacciones inmunes y endócrinas para favorecer el crecimiento y desarrollo fetal[43].

Durante la última etapa, la etapa tardía, el feto ya ha concluido su desarrollo y es necesario que ocurra el parto, generándose

nuevamente una respuesta inflamatoria que promueva la contracción del útero y la expulsión del neonato y de la placenta[44,46].

Por lo tanto los mecanismos inmunológicos involucrados son múltiples, algunos de ellos redundantes y pueden actuar en forma sinérgica según la fase del embarazo[47].

## RELEVANCIA DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL

Los leucocitos son un componente importante del endometrio humano. Durante la fase proliferativa del ciclo menstrual llegan a conformar el 10% de las células estromales, en momentos previos a la implantación constituyen el 20% y en las etapas tempranas del embarazo, cuando el endometrio se convierte en decidua, los leucocitos representan el 30% de las células deciduales[48].

La presencia y número de determinados tipos celulares se ha correlacionado con su papel en la respuesta inmune local en las distintas fases del embarazo. Así, las principales poblaciones leucocitarias presentes en la decidua son: macrófagos (MA), células Natural Killer (NK), células dendríticas (CD), linfocitos B, linfocitos T CD4+ *naïve* o *helper* y CD8+ *naïve* o *helper*[1,44,49–51].

A su vez, en la interfase materno-fetal pueden distinguirse claramente distintas subpoblaciones leucocitarias con funciones y marcadores específicos como por ejemplo las NK deciduales (dNK)[52,53], macrófagos deciduales (dMA)[54,55], linfocitos T regulatorios con alta capacidad supresora[56–58]; todas necesarias para el éxito del embarazo (Figura 5).

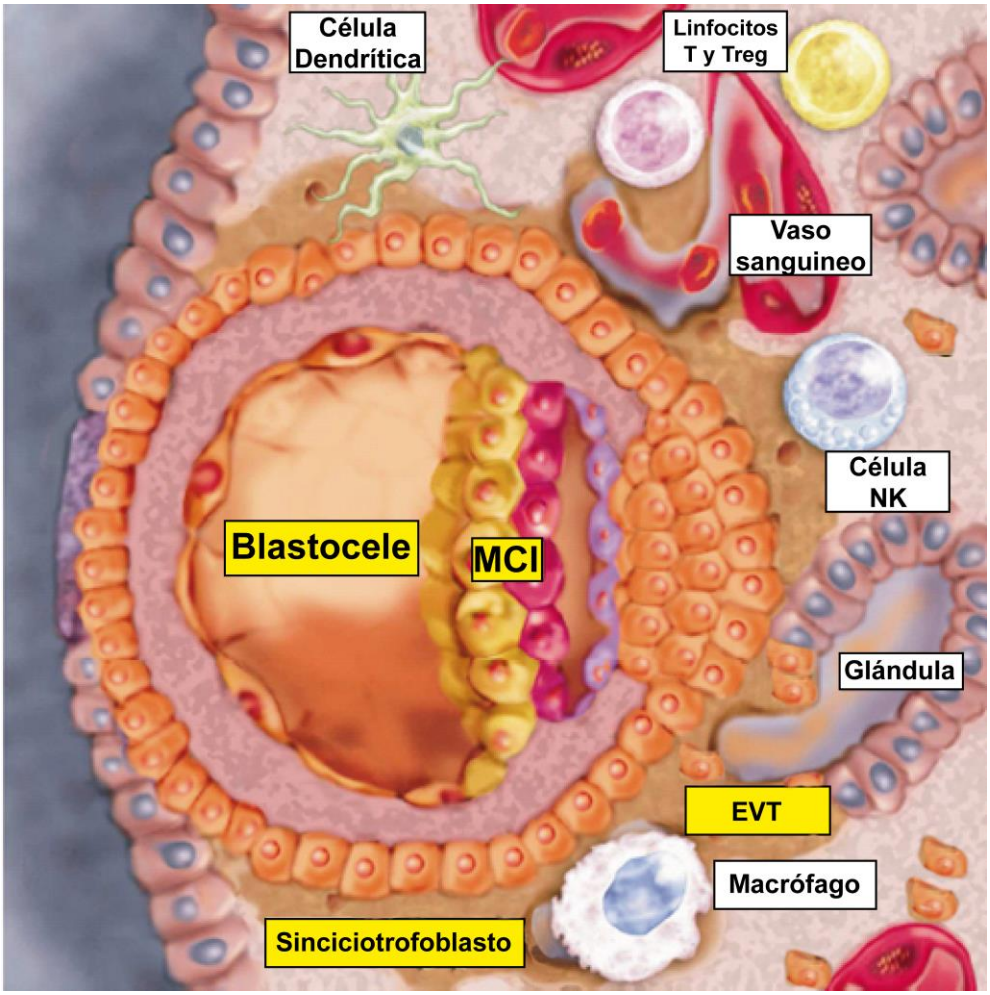



**Figura 5: Poblaciones celulares en la interfase materno-fetal.** Blastocisto implantado en el endometrio uterino, aún se ve la cavidad blastocele y el macizo celular interno (MCI). El sinciciotrofoblasto es el primero que invade y luego por debajo lo acompaña el citotrofoblasto. Las células citotrofoblásticas extravellosas (EVT) son las encargadas de migrar remodelar y contactarse con las células inmunes: células NK, Macrófagos, Células Dendríticas y linfocitos T y Tregulatorios. Imagen extraída y modificada de[59].

## CÉLULAS dNK, MA Y CD SON 'EDUCADAS' POR LOS MEDIADORES SECRETADOS POR EL TROFOBLASTO

El sistema inmune materno es capaz de reconocer y reaccionar ante los antígenos fetales. Sin embargo, durante un embarazo normal, esta capacidad no tiene consecuencias negativas, ya que existe una regulación tanto a nivel local como sistémica. Por un lado, los factores endócrinos tienen efectos moduladores en todo el sistema inmune materno y por el otro, contactos celulares o factores

parácrinos o autócrinos afectan la relación entre células maternas y fetales a nivel local.

- **MONOCITOS (Mo) Y MACRÓFAGOS (MA)**

Los **MA** poseen habilidad para integrar respuestas neuroinmuno-endócrinas respondiendo a mediadores correspondientes a cada sistema. Así, en su papel de 'centinelas', integran información proveniente del cerebro y de los sistemas inmunes y endócrino, respondiendo rápidamente a dichos estímulos. Esta plasticidad les permite desarrollar diversas funciones en la interfase materno-placentaria.

Se intentó clasificar a los perfiles de activación de los MA como M1/M2 siguiendo la nomenclatura Th1/Th2. Sin embargo, en la actualidad se conoce que la plasticidad funcional del MA se manifiesta en un espectro funcional con una gama de tres perfiles principales: perfil M2 o de activación alternativa que tiene funciones de remodelación tisular, regulatorias y fagocitosis de cuerpos apoptóticos y perfil M1 o clásico al que tiene funciones pro-inflamatorias[60] (Figura 6):

**A) reparación tisular**: Los MA que adquieren este perfil, ya sea por la activación del receptor de IL-4 y/o 13 o por señales liberadas por las células trofoblásticas, tienen la capacidad de derivar la L-arginina en ornitina para la síntesis de poliaminas necesarias en la remodelación[46,61].

**B) regulatorio**: La implantación e invasión del trofoblasto implica remodelación tisular y se caracteriza por una inducción continua de apoptosis celular principalmente de células vasculares y además células endoteliales y trofoblásticas[62,63]. Dado que las células trofoblásticas poseen antígenos extraños para el sistema inmune materno, la muerte celular podría liberarlos y por lo tanto acelerar una respuesta inmunológica materna con consecuencias letales para el feto[64]. Por otro lado su remoción rápida previene su necrosis y

reduce el daño asociado a este proceso. La remoción de cuerpos apoptóticos por macrófagos en este perfil se asocia a un ambiente anti-inflamatorio/inmunosupresor con inducción de la expresión de prostaglandina E2 (PGE2), IL-10, IDO y TGF-β en lugar de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, TNF-α e IL-1. Este perfil regulatorio contribuiría a un microambiente favorable para la sobrevida del trofoblasto e induciría tolerancia materna[65–67].

**C) inflamatorio**: En caso de presencia de patógenos como bacterias y virus, o señales de injuria tisular sin presencia de microorganismos, los MA actuarán secretando citoquinas inflamatorias como IL-1, 6 y TNF-α, quimioquinas como IL-8 para el reclutamiento de neutrófilos, óxido nítrico (ON) y otros factores que llevarán a la neutralización y/o remoción del patógeno[60,68,69]. Durante el proceso de implantación hay mediadores pro-inflamatorios como IL-1, 6, 8 entre otros, liberados en el micro-ambiente implantatorio por parte de distintas células, entre ellas los dMA [63,70]. Los MA de la interfase durante la implantación no solo producen proteínas pro-inflamatorias, sino que también liberan mediadores anti-inflamatorios como IL-10 y TGF-β para regular la homeostasis inmunológica. En el caso de una infección durante la gestación, los macrófagos responderán liberando mediadores pro-inflamatorios y, en caso de que esta respuesta este exacerbada, podría resultar deletérea para el embarazo[1,2,37].

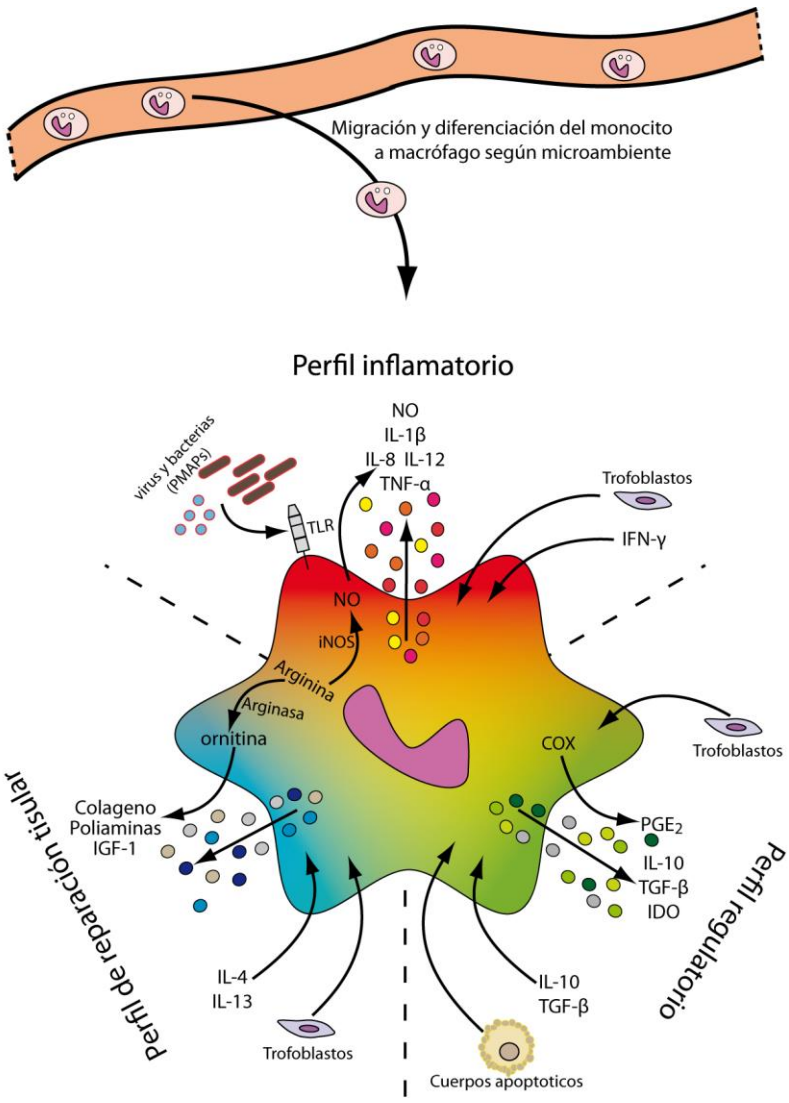



**Figura 6: Esquematización del macrófago y sus distintos perfiles**. El MA puede adoptar un perfil inflamatorio, regulatorio o de reparación tisular dependiendo los estímulos que recibe y el entorno que lo rodea. Las acciones que realizará dependerán de que perfil posea. Esquema basado en el trabajo de [60] y otros resultados publicados sobre la interfase[65].

Los MA representan un 20-25% de la población de leucocitos presentes en la decidua al momento de la implantación y se mantienen constantes durante toda la gestación. Los MA presentes en la interfase cumplen funciones relacionadas con la remodelación tisular necesaria para la expansión del trofoblasto[54,60,61,71], son esenciales para facilitar la migración del mismo y para la remoción de cuerpos apoptóticos[44,46,63]. Los mismos tienen la capacidad de producir citoquinas pro y anti-inflamatorias. En el microambiente

anti-inflamatorio de la interfase materno-fetal, caracterizado por la producción de citoquinas como IL-10 y TGF-β, los MA contribuyen a mantener este perfil principalmente por la secreción de las mismas[66,67,71]. Estas células son la segunda población inmune más abundante durante la implantación y placentación.

Además de los dMA presentes en la decidua que tienen capacidad proliferativa en condiciones de homeostasis inmunológica[72], las células trofoblásticas tienen la cualidad de atraer **monocitos (Mo)**[46] y favorecer la diferenciación a macrófagos en un perfil de activación alternativo (regulatorio y reparación tisular). Estos, presentan una ventana de plasticidad durante su etapa de diferenciación mayor que un macrófago ya diferenciado. Los Mo son reclutados y diferenciados en el microambiente regulado por las células trofoblásticas tal que favorezcan un micro-ambiente propicio para la supervivencia del feto[46,54].

Los MA pueden ser diferenciados *in vitro* a partir de Mo de sangre periférica. Cuando el estímulo de diferenciación es el factor de crecimiento de granulocitos macrófagos (GM-CSF) su perfil de activación adquiere ciertas características de un perfil M1, mientras que cuando se diferencian con el factor de crecimiento de macrófagos (M-CSF) se observan marcadores de un perfil alternativo o M2[72,73]. Teniendo en cuenta esto, se ha visto que durante el primer trimestre hay una mayor secreción de M-CSF en embarazos sin complicaciones. En contrario, en embarazos con complicaciones donde se observa un micro-ambiente pro-inflamatorio se han encontrado bajos niveles de M-CSF y altos de GM-CSF[64,67,74,75].

Numerosos trabajos han intentado identificar marcadores que diferencien los perfiles de MA. Entre algunos de los marcadores, el gen ***Kruppel like factor 4*** **(KLF-4)** es un factor de transcripción maestro involucrado en numerosos procesos como remodelamiento tisular, angiogénesis, proliferación y en especial asociado a un MA con

fenotipo M2[76,77]. Por otro lado, el factor de transcripción ***Interferon regulatory factor 5*** **(IRF-5)** es utilizado para definir el tipo de activación del MA. Este factor de transcripción está involucrado en la respuesta M1 de los MA y en procesos de división celular, apoptosis y modula la respuesta pro-inflamatoria del MA[78].

En la tabla 1 se muestran algunos de los marcadores que permiten diferenciar entre las distintas clases de MA.

| | **Subtipos** | |
|---|---|---|
| | **M1** | **M2** |
| **Inductores** | IFN-γ, LPS, GM-CSF, ácidos grasos, HMGB1 | IL-4, 10, 13, TGF-β, M-CSF, AMP (por CD39, ATP/ADP hidrolasa), GC |
| **Factores de transcripción** | NF-Kb, STAT1, IRF-1, IRF-5, HIF-1α, KLF-6 | STAT3, STAT6, IRF4, KLF-4, PPARγ, cMaf, cMuc |
| **Citoquinas** | Óxido Nítrico, TNF-α, IL-1β, IL-6, 12, 23 | IL-10, TGF-β |
| **Quimioquinas** | CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/IP-9 | CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL22/STCP-1 |
| **Enzimas metabólicas** | iNOS, gp91phox, p22phox, ferritina, ceruloplasmina, transportador de metales divalentes (DMT), Namp-1 | Arginasa-1, Arginasa-2, ornitina decarboxilasa, espermidina oxidasa, hemoxigenasa-1, ferroportina, receptor de transferrina |
| **Marcadores celulares** | CD80, CD86, TLR2, TLR4, MHCII | CD206, CD163, CD209, CD301, resistina tipo α (Fizzl), quitinasa 3 tipo 3 (Ym1/2) |
| **Funciones** | Pro-inflamatorio, actividad microbicida, remoción de patógenos | Anti-inflamatorio, inmunoregulador, reparador de tejidos |

**Tabla 1: Marcadores de diferenciación entre las distintas clases de MA**. Los siguientes datos se extrajeron de [72]

- **CÉLULAS *NATURAL KILLER* DECIDUALES (dNK)**

En el caso de los linfocitos, las dNK están muy abundantes en la decidua mientras que los linfocitos B y T no lo están.

Las células NK presentes en el sitio de implantación, dNK, alcanzan un 70% del total de leucocitos en el inicio de la gestación. Las mismas se acumulan alrededor de las glándulas y vasos endometriales cumpliendo un papel crucial en la angiogénesis y la invasión trofoblástica[44,79,80]. Estas células aumentan su frecuencia en la fase secretoria del ciclo menstrual, su número aumenta aún más si la concepción progresa y luego desciende rápidamente durante el segundo trimestre del embarazo[46].

Las células dNK al igual que los MA y CD son instruidas por los mediadores secretados por el trofoblasto de forma que todas las células funcionen en forma cooperativa en pos del crecimiento del feto.

Las dNK difieren de aquellas de sangre periférica. Hay 2 tipos de poblaciones de NK distinguibles en sangre periférica: aquellas con baja expresión de la molécula CD56 especializada en citolisis, mientras aquellas con alta expresión de CD56 son altas productoras de citoquinas como [81]. Estudios de transcripción de más de 10.000 genes revelan que las dNK se diferencian en 278 genes de las 2 sub-poblaciones de NK periféricas, principalmente en proteínas de membrana[52]. Las dNK expresan niveles altos de CD56, a diferencia de las NK de periferia expresan gran cantidad de receptores para quimioquinas (principalmente CXCR3/IP-10-R y menor cantidad de CXCR4/SDF-1-R) e integrinas ($\alpha_E\beta_7$, $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_D\beta_2$). Además, son grandes secretoras de quimioquinas (IL-8, SDF-1 e IP-10), como factores angiogénicos (VEGF y PLGF)[82] y algunas citoquinas (baja cantidad de IFN-γ) ([52,83–85]. Más recientemente, se propuso que habrían subpoblaciones de NK regulatorias productoras de TGF-β y

otra subpoblación productora de IL-10 en la decidua que en casos de aborto recurrente se encuentran disminuidas[86].

Las dNK cooperan con las células EVT en el remodelamiento de arterias espiraladas. Si bien la capacidad citolítica de las dNK se encuentra muy disminuida, las células EVT están protegidas de dicha acción al expresar los ligandos HLA no clásicos, C, E y G. HLA-G solo se expresa en las células EVT y las células medulares tímicas[87], mientras que HLA-C y -E tienen distribución ubicua.

- **CÉLULAS DENDRÍTICAS (CD)**

En la decidua, las CD representan alrededor de un 2% de las células inmunes presentes en la interfase temprana[5,37]. Estas células son presentadoras de antígeno profesionales (CPAp) y presentan una cualidad única: activar linfocitos T *naÏve* y poner en marcha la respuesta inmune adaptativa. Constituyen una población heterogénea de células que comparten la capacidad de captar, procesar y presentar antígenos a LT vírgenes. Además, son células plásticas: dependiendo de las señales en el tejido donde son activadas, inducirán la diferenciación de los linfocitos T naÏve en los órganos linfáticos secundarios (OLS) hacia un perfil T helper (Th) particular: Th1, Th2, Thf, Th17, o T regulatorias (Treg). Cada uno de estos perfiles presenta sesgos fenotípicos y funcionales propios y distintivos como se describió previamente[88]. Las CD de la decidua tienen un estado de activación semi-tolerogénico en el liberan grandes cantidades de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF-β, la molécula IDO entre otros, favoreciendo así un ambiente inmunosupresor y una mayor generación de células Treg[89–91].

Vale destacar que durante la gestación en ratones se le atribuye a las CD un papel en la decidualización que no está asociado ni depende de su capacidad de presentación antigénica, con producción de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)[43,92]. Efectivamente, las CD juegan un papel importante en

la fase temprana de implantación, no solo generando tolerancia fetal, sino también en el desarrollo de la decidua[43,93]: se observó que si se depletan las CD deciduales en modelos murinos, esto lleva a una implantación deficiente y una posterior reabsorción del embrión[43,92].

Las CD se diferencian en la médula ósea a partir de progenitores tanto mieloides como linfoides, y en respuesta a factores de crecimiento y de diferenciación como el GM-CSF y el ligando de Flt3. Sin embargo, también pueden ser generadas en la periferia, a partir de precursores circulantes como los monocitos y secundariamente a partir de otros precursores aún no del todo caracterizados[94–96]. Las CD se presentan en dos estadíos diferentes: CD inmaduras (CDi) y CD maduras (CDm). Las CDi se ubican en tejidos periféricos, particularmente, en la interfase con el medio externo como piel y mucosas. Cumplen allí dos tareas centrales: a) endocitar antígenos y procesarlos y b) decodificar las propiedades del proceso infeccioso en curso, de modo de adquirir la información requerida para activar luego una respuesta inmune apropiada[88,97]. Las CDm pierden su capacidad de endocitar y procesar antígenos, y adquieren un fenotipo particular: alta expresión de moléculas coestimulatorias y moléculas del HLA de clase II, que les permitirán activar a linfocitos T naive, en el área paracortical del ganglio linfático[98–100].

- **LINFOCITOS T**

Los linfocitos T conforman un 2-6% de los leucocitos deciduales, sin embargo, desarrollan funciones clave tanto para el mantenimiento de un perfil tolerogénico en condiciones de homeostasis en embarazos normales, como en la respuesta frente a injuria en condiciones patológicas. Como se mencionó previamente, las CD son CPAp que expresan la cualidad única de activar linfocitos T naive, poniendo en marcha la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, la relevancia de las CD en la respuesta inmune no sólo guarda relación con su

capacidad de activar a los linfocitos T naive. Son ellas las que inducen un perfil particular en las células T CD4+ al activarse, dando lugar a subpoblaciones Th1, Th2, Th17 o Treg. Esta diferenciación depende, en última instancia, de la producción de citoquinas por las propias CD. La producción de IL-12p70 favorecerá la diferenciación de las células T CD4+ en un perfil Th1, (células productoras principalmente de IFN-γ) en cambio, en su ausencia pero en presencia de IL-4, se promoverá la diferenciación de las células T CD4+ en un perfil Th2 (células productoras de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13). Por último, la producción de IL-6, IL-23 y TGF-β promoverá la diferenciación de las células T CD4+ en un perfil Th17 (productoras de IL-17) , mientras que la producción de IL-10 junto a TGF-β, en ausencia de IL-6, promoverá su diferenciación en un perfil T regulatorio[38,101,102].

En lo que respecta a la interfase materno-fetal, se consideraba inicialmente que la presencia de un perfil Th1 era sinónimo de aborto [103]. Si bien es cierto que un perfil Th1 se observa en esta y otras patologías con inflamación exacerbada, se sabe que tiene lugar una respuesta pro-inflamatoria en condiciones controladas, asociada a la remodelación tisular y la neo angiogénesis y que en ésta se encuentran bajas concentraciones de IFN-γ en el endometrio uterino. Por otro lado, un estadio inflamatorio caracteriza a la culminación del embarazo, favoreciendo el nacimiento y la expulsión de la placenta[56,104,105].

La población Th17 presente en la decidua es menor que 1,4 % del total de células inmunes. Estas células favoren la inflamación y por ende la remodelación tisular y angiogénesis. Esta población está altamente regulada por las células Treg y el desbalance de la relación Th17/Treg es un rasgo característico en casos de aborto recurrente y preeclampsia [56,106,107].

Se han descripto también en la interfase materno-fetal la presencia de LT CD8+ [108]. Esta población linfocitaria necesita de CD

estimuladas para su activación, y una vez activados, se expanden y diferencian en linfocitos efectores citotóxicos con el objetivo de eliminar el antígeno presentado junto a las moléculas del HLA de clase tipo I por las CD. Los LT CD8+ poseen un papel principal en la inmunidad antiviral y participa en la respuesta inmune contra ciertos parásitos y bacterias. Los LT CD8+ de memoria en el útero cumplen un rol en la primera etapa del embarazo favoreciendo un microambiente inflamatorio liberando IFN-γ provocada por las bacterias arrastradas por el semen[79]. La función de estas células está muy regulada por las células Treg[109]. Más recientemente se describió una población de linfocitos CD8+ efectores de memoria regulatorios que contribuyen en el micro-ambiente inmunoregulador de la interfase materno fetal[110,111].

Dentro de las poblaciones de LT con mayor relevancia en el embarazo normal están las **células Treg.** Cumplen un papel central como inmunoreguladoras y con un efecto tolerogénico al inhibir la proliferación y producción de citoquinas por células T CD4+ y CD8+, y la actividad citotóxica de las células NK. Se distinguen subpoblaciones de células T CD4+ reguladoras según el fenotipo, tejidos de origen, citoquinas que secretan y mecanismos de acción, como describimos brevemente a continuación:

**A) Las Tregulatorias naturales (nTreg)**, son CD4+CD25+Foxp3+ que derivan del timo y son centrales en la regulación de los LT autorreactivos y en prevenir la autoinmunidad. la expresión del factor de transcripción Foxp3 (*forkhead box protein 3*) las define como un linaje distinto. Cualquier mutación en Foxp3 resulta en una respuesta inmune totalmente exacerbada y desregulada que lleva a procesos autoinmunes como el síndrome IPEX (*immune dysregulation*, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked syndrome o síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado al

cromosoma X) caracterizado por una linfopoliendocrinopatía generalizada[102].

**B) Las Tregulatorias inducibles (iTreg)**, son CD4+CD25+, pueden comenzar a expresar Foxp3 luego de activarse y poseen una función reguladora similar a las nTreg[37].

**C) células Tregulatorias de tipo I (Tr1)**, son células Foxp3-, presentan capacidad supresora mediada por la citoquina IL-10. También se describieron células Th3 que median su actividad a través de TGF-β; estas son también células Foxp3-. Ambas poblaciones son inducidas por las citoquinas liberadas por las CD.

Las células Treg CD4+ CD25+ FOXP3+ son necesarias para la tolerancia materno-fetal[39,112,113]. La proporción de estas células aumenta en todos los compartimientos linfoides y se acumulan en el útero durante el embarazo, independientemente del carácter alogeneico (genéticamente diferente)o singeneico (genéticamente idéntico) del embarazo [39,56].

## Interacción de células trofoblásticas con leucocitos maternos

Así como las células inmunes presentes en la interfase, las células trofoblásticas expresan receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (RRP) que funcionan como sensores del ambiente que las rodea. Las células trofoblásticas se han propuesto como 'orquestadoras' de la respuesta inmune materna en la interfase materno placentaria. Las células trofoblásticas pueden reconocer la presencia de bacterias, virus, células muertas y tejido dañado, respondiendo con la secreción de citoquinas y quimioquinas como CCL2 (proteína quimioatractante de macrófagos 1 o MCP-1), CXCL8 (IL-8), CCL5 (RANTES por la sigla en inglés *Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted*), el oncogen-α

relacionado al crecimiento (GRO-α), liberando productos antimicrobianos y regulando las moléculas coestimulatorias[90,92,114]. Dichas citoquinas actuarán sobre los dMA, dNK y CD en la decidua, por un lado reclutándolas y por otro modulando su función para favorecer el crecimiento del feto[44,46]. Además de la modulación del perfil de las poblaciones inmunes durante las diferentes etapas del embarazo, se proponen diversos mecanismos por los cuales las células trofoblásticas interactúan con los leucocitos maternos en una acción cooperativa y modulan otros procesos como la remodelación vascular que se describen más abajo.

## REMODELACIÓN DE LOS VASOS MATERNOS

Durante el proceso de remodelación vascular, vasos angostos, musculares y altamente espiraladas son ensanchados para formar vasos de gran flujo, conductos de baja resistencia que carecen del control vasomotor. Este cambio radical en la arquitectura de los vasos involucra la pérdida de las células endoteliales (EC) y las células vasculares del músculo liso (VSMC) y la degradación de la matriz extracelular (MEC), en especial las fibras de elastina con lámina elástica interna y el medio musculoelástico. Las VSMC son reemplazadas por las células EVT en una matriz fibrinoide amorfa[24].

Aún más, recientemente se ha propuesto que la remodelación de vasos sanguíneos maternos puede ocurrir de 2 maneras:

- **Remodelación independiente de las células EVT**: Se observa primero que los dMA junto a las células dNK secretan MMPs (principalmente la 2 y 9) que les permite infiltrar las arterias espiraladas (Ae)[27,80,115]. Luego es seguida de la separación y desdiferenciación de VSMC, la vacuolización de EC, degradación de la MEC y la dilatación de los vasos.

- **Remodelación dependiente de células EVT**: Una vez que las células inmunes mencionadas infiltran los vasos maternos, se produce una mayor separación y desdiferenciación de las VSMC, desaparición transiente de las VSMC y EC, migración de VSMC, deposición de fibrinoides e inclusión de las células EVT[63,116].

Si bien se propone una remodelación de vasos independiente de las células EVT, lo hacen en un micro-ambiente regulado por ellas. En este ambiente hay un fino balance entre proteínas degradadoras de la MEC como lo son las MMPs y los **inhibidores de las MMPs o TIMPs**. Las MMPs son sintetizadas como zimógenos, que luego de ser clivadas adquieren su capacidad de proteasas. Estas proteínas tienen sitios de unión al zink y si bien se les atribuía el efecto de clivar proteínas de la MEC como colágeno, gelatinas, vitronectinas entre otros, hoy en día se conoce que también clivan otras proteínas y pro-metaloproteasas[117]. Las MMPs están reguladas bajo un control estricto de diferentes niveles. Generalmente son expresadas en baja cantidad y su transcripción está finamente regulada tanto positiva como negativamente por citoquinas y factores de crecimiento como las interleuquinas, TGF y los TNF. En la Tabla 2 se muestran las MMPs más representadas en la interfase materno-placentaria con sus sustratos.

| Metaloproteasas | Sustrato |
|---|---|
| **MMP-1** | Colágeno I, II, III, VII, VIII, X, XI, gelatina, fibronectina, fibrina, fibronógeno, laminina y vitronectina. |
| **MMP-2** (72 kDa) | Gelatina, colágeno IV, V, I, III, VII, VIII, IX, X y XI, fibronectina, fibrina, fibronógeno, laminina, plaminógeno, vitronectina, pro-MMP-13 y pro-MMP-9. |
| **MMP-3** | Laminina, gelatina, colágeno III, IV, V, VII, IX, X y XI, fibronectina, fibrina, fibronógeno, pro-MMP-9 y pro-MMP-1. |
| **MMP-7** | Fibronectina, laminina, colágeno I y IV, gelatina, elastina, fibronógeno y plasminógeno. |
| **MMP-8** | Colágeno I, II y III, C1q e Inhibidor de proteasa α1. |

| | |
|---|---|
| **MMP-9** (92 kDa) | Gelatina, colágeno IV, V, IX y XIV, decorina, elastina, fibrina, fibronógeno, plaminógeno e Inhibidor de proteasa α1. |
| **MMP-10** | Colágeno III, IV y V, gelatina, elastina y fibronectina. |
| **MMP-11** | Inhibidor de proteasa α1, laminina y fibronectina. |
| **MMP-13** | Colágeno I, II, III, IV, VI, IX y X, gelatina, fibronectina, fibrinógeno y pro-MMP-9. |
| **MMP-14** | Fibronectina, colágeno I, II y III, gelatina, vitronectina, fibronectina, Inhibidor de proteasa α1, pro-MMP-2 y pro-MMP-13. |
| **MMP-15** | colágeno I y pro-MMP-2 |

**Tabla 2: Metaloproteasas presentes en la interfase materno-placentaria y sus sustratos.** Esta información fue obtenida y modificada de[23,117].

Las MMPs presentes en la interfase son liberadas por las dNK[118–120], los dMA[119] y las EVT[70,120,121].

Además como se mencionó previamente, las MMPs su activación necesita estar regulada espacial y temporalmente. Entre los reguladores se encuentran las proteínas TIMPs (1, 2, 3 y 4) que si bien se las descubrió por su acción inhibidora de MMPs y ampliamente distribuidas en los distintos tejidos, actualmente se les conocen otras funciones como anti-apoptótico y promovedores de la proliferación[117,118]. La transcripción de los TIMPs también se encuentra regulada por distintas citoquinas y factores de crecimiento. En contraste con la inhibición por medio de los TIMPs, cuando hay bajos niveles de TIMP-2 aumenta MT1-MMP que induce la activación de MMP-2 en la membrana de la célula.

En el caso de la interfase materno-fetal se ha observado que TIMP-1 y TIMP-2 podrían tener un rol ya que en complicaciones del embarazo como la preeclampsia se encuentran disminuidas[122]

Por otro lado citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 tiene la capacidad de inhibir la función de MMP-9[123–125].

## ANGIOGÉNESIS

La diferenciación del estroma endometrial y la formación de nuevos vasos sanguíneos maternos en el momento de la implantación del blastocisto son críticas para el establecimiento y mantenimiento de la gestación[93]. En el proceso de angiogénesis, el brote de nuevos capilares tiene varios pasos los cuales están finamente regulados. No solo involucra brotes de nuevos vasos, sino que también migración celular, proliferación, formación de túbulos y sobrevida[126]. La angiogénesis se desarrolla en 5 pasos:

1- Degradación de la membrana basal por acción de las MMPs y activadores del plasminógeno, esto resulta en la formación de pequeños brotes de vasos penetrando en el estroma perivascular.
2- Migración de EC a la punta de los brotes por estímulos angiogénicos.
3- Proliferación de las EC debajo del brote.
4- Canalización, formación de ramas (mallas) y formación de bucles vasculares, estos llevan al desarrollo de una red circulatoria funcional.
5- Aposición perivascular de pericitos y VSMC como soporte de los nuevos vasos funcionales[127].

La función reguladora de los leucocitos deciduales durante la gestación, en particular CD, dNK y dMA, es importante no solo en la generación de la tolerancia inmunológica, sino también en la regulación de la diferenciación de las células estromales y en el equilibrio generación/destrucción de nuevos vasos. Las células dNK promueven modificaciones vasculares a través de la secreción de citoquinas (VEGF y PLGF), mediadores vasoactivos (óxido nítrico) y la liberación de MMPs y TIMPs[80,93]. Las CD controlan la proliferación y diferenciación de las células estromales, angiogénesis, el reclutamiento y maduración de precursores de NK y MA[92,93] al útero. La heterogeneidad de respuestas de los MA también se ve

observada en la angiogénesis, a través de la liberación de citoquinas pro-angiogénicas como VEGF-A y factor de crecimiento fibroblástico básico, en inglés *basic fibroblast growth factor* (FGF-2), interleuquinas (IL-10, TGF-β, IL-6, TNF-α), producción de MMPs como la 2, 9 y 12 y TIMP-1 y 2. En conjunto, estos mediadores intervienen en el balance de proliferación/apoptosis, migración y brotes angiogénicos por parte de las EC. Aquellos MA que intervienen en procesos angiogénicos presentan un fenotipo de activación predominantemente M2[72,128]

## FAGOCITOSIS DE CUERPOS APOPTÓTICOS

Como se mencionó anteriormente, las células apoptóticas que se generan en los procesos de remodelación de vasos y glándulas maternas requieren ser eliminados cuanto antes para evitar que progresen a necrosis. A este proceso de remoción se le llama **esferocitosis**. Cuando las células entran en necrosis liberan patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que son sensados por las células inmunes, en particular los dMA que responden tomando un perfil de activación pro-inflamatorio o M1 liberando mediadores pro-inflamatorios de manera desregulada y generando una ruptura de la homeostasis inmunológica[129–132].

La fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por los MA produce un perfil de activación anti-inflamatorio/inmunoregulador liberando localmente mediadores inmunosupresores como IL-10, PGE2, TGF-β, IDO entre otros. Estos factores son críticos durante la placentación para modular la respuesta inflamatoria desencadenada por DAMPs o el *debris* celular[42,133].

La fagocitosis involucra el reconocimiento e ingestión de partículas más grandes de 0,5 μm en vesículas endocíticas o fagosomas y es un proceso crítico en el desarrollo, homeostasis tisular e inmunidad. Los fagocitos profesionales se enfrentan con un rango diverso de

partículas, en un rango desde microorganismos a células apoptóticas; lo que requiere una variedad distinta de receptores para el reconocimiento, acople e internalización de los mismos.

Los receptores que facilitan la fagocitosis de células apoptóticas son:

- *Scavengers*: CD36, MARCO y SCARF-I
- Receptores que reconocen fosfatidilserina: TIM-4, BAII, Stabilina-2 y CD300f
- Receptores TAM (Tyro3, Axl y Mer) de la familia de receptores de tirosin-kinasas
- Integrinas: $\alpha_V\beta_3$ y $\alpha_V\beta_5$

Los receptores fagocíticos reconocen señales de la célula apoptótica que se las conoce como *eat-me*, la más conocida y explorada por los numerosos ligandos y receptores hacia la misma es el fosfolípido fosfatidilserina[134,135].

El receptor fagocítico señaliza a través de su receptor y puede activar receptores no fagocíticos que van a afectar el balance de la respuesta. En adición a esto, otros ligandos acoplados a sus respectivos receptores durante la fagocitosis pueden sinergizar o antagonizar la respuesta[136].

Los receptores fagocíticos de membrana como CD36 y las integrinas dependen estrictamente del citoesqueleto celular. En la esferocitosis se remodela el citoesqueleto de actina para realizar una deformación de la membrana plasmática, formar el bolsillo o portal de fagocitosis, y así fagocitar el cuerpo apoptótico. Los pasos para esto son:

1- La disrupción, se liberan monómeros de actina G para ser incorporados en los nuevos filamentos y se incrementa la motilidad de los receptores sin ligando y fosfatasas para generar un portal de conexión entre el cuerpo apoptótico y receptores del fagocito.
2- Unión de los filamentos de actina para comenzar la polimerización y extensión de los pseudópodos.

3- Cierre del fagosoma y la despolimerización de actina para cerrar el portal fagocítico.

Estos pasos requieren una precisión espacio-temporal, involucrando la activación e inactivación de múltiples proteínas que gobiernan la dinámica de los filamentos de F actina[136].

Las **integrinas** son moléculas de adhesión heterodiméricas compuestas por una subunidad α y una β. Las integrinas son esenciales para la esferocitosis[137]. Interesantemente, las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ no se unen directamente a las células apoptóticas, en cambio se unen a moléculas bifuncionales como *milk fat-globule EGF factor* 8 (MFG-E8), trombospondina 1 (TSP-1)[138], colágeno entre otras, que funcionan como puentes[136]. Las integrinas existen en configuraciones inactivas y activas. En su estado inactivo, las integrinas se encuentran en una conformación que no pueden unir los ligandos ni desencadenar la señalización del receptor. Para pasar a su estado activo, las integrinas necesitan recibir una señalización '*inside-out*'. Hay numerosas señales '*inside-out*', como Epac (*Exchange proteins directly activated by cAMP*) y CalDAG (*calcium and diacylglyceol-regulated guanine nucleotide exchange factor I*). Sin embargo, todas las señales convergen en la activación de Rap GTPasa para la activación de las integrinas. Una vez activas, las integrinas se unen al ligando y desencadenan señales '*outside-in'* para facilitar la fagocitosis[136]. Paradójicamente, integrinas activas también estimulan positivamente a Rap generando una inter-conexión entre señales '*inside-out*' e '*outside-in*'[139].

Se ha visto que los MA remueven eosinófilos apoptóticos a través del puente Integrina $\alpha_v\beta_3$-MFG-E8[140–142].

En el caso de la integrina $\alpha_v\beta_3$ se ha visto que favorece la implantación del blastocisto[143] y que TSP-1 y MFG-E8 están presentes en la interfase materno-fetal[144]. Defectos en las integrinas se han asociado a fallas en la fertilidad[141].

## VIP EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL

El péptido intestinal vasoactivo (VIP), es un péptido de 28 aminoácidos. Inicialmente descripto como neurotransmisor autonómico, es un péptido pleiotrópico con actividad relajante y vasodilatadora, anti-inflamatoria, inmunosupresora y trófica por acción sobre receptores VPAC en músculo liso vascular, en monocitos/macrófagos y en tejido nervioso embrionario[145–147]. La unión de VIP a receptores VPAC activa la señalización intracelular a través de AMPc/PKA y sitios CRE modulando la expresión de diversos genes[148,149]. Incluso VIP induce su propia síntesis en neuronas por la vía PKA/CRE. VIP tiene acción individual y también sinérgica en otros tipos celulares como neuronas y células inmunes, mediando efectos de proliferación, diferenciación y anti-inflamatorios[150–152]. A su vez, la expresión diferencial de sus receptores VPAC1 y VPAC2 durante el proceso inflamatorio, en el desarrollo nervioso, como también en procesos tumorales, sugiere una modulación de los efectos del VIP a distintos niveles[153].

Además de su función a nivel del sistema nervioso, se demostró su efecto en la respuesta inmune[154,155], en modelos de autoinmunidad[145,156–159], en tumores neuroendócrinos[160], en asma[161].

Por otro lado, si bien Marzioni y su grupo[162] detectaron la expresión en muestras de placentas de primer y tercer trimestre y que demostraron que el VIP incrementa la expresión de progesterona de manera dependiente de la concentración, el rol del VIP en la gestación no se ha estudiado.

Tomando estos resultados decidimos evaluar las funciones del VIP en la interfase materno-fetal. Algunas de las contribuciones hasta el momento indican que:

1- El VIP interviene en procesos de decidualización del endometrio lo cual favorecería la implantación y modularía la respuesta inmune local [163].

2- El VIP modula fenotipos inflamatorios de MA peritoneales en la preñez murina hacia dominancia de MA 'regulatorios'. [164–166].
3- El tratamiento con VIP de hembras preñadas de las cepas CBAxDBA y NOD indujo la expresión de marcadores de perfil inmunosupresor en sitios de implantación y aumentó el número de embriones viables[167].
4- Las células trofoblásticas expresan VIP y promueven migración de linfocitos CD4 *naïve* y diferenciación a Treg favoreciendo una respuesta inmunosupresora[101].
5- Las células Treg son atraídas a la interfase materna-fetal por acción de CCL5 (RANTES) el cual aumenta por concentración dependiente de VIP. En la cepa de ratones deficientes de VIP se observa una desregulación en la preñez y fallas en la misma[133].
6- Las células trofoblásticas inducen una desactivación de los neutrófilos favoreciendo su apoptosis, disminución de la secreción de ROS y la producción de *neutrophil extracelular trap* (NET) por mecanismos VIP dependientes[168].

## COMPLICACIONES DEL EMBARAZO

Se han descripto complicaciones del embarazo con alto riesgo para la salud materna y neonatal asociada a defectos en la función trofoblástica y placentación y/o fallas en los mecanismos de control de la respuesta inflamatoria que no alcanzan para mantener la homeostasis en la interfase. Existe gran interés en comprender a nivel celular y molecular estos procesos con el fin de identificar nuevos blancos moleculares con potencial traslacional en estas enfermedades.

En complicaciones de la gestación como la pre-eclampsia (PE) y la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) se describen fallas en la placentación. Las EVT presentan una invasión superficial que genera como consecuencia una remodelación incompleta de las Ae resultando en deficiencias en la placentación. Las Ae tienden a

desarrollar aterosis e hiperplasia intimal. Los leucocitos de mayor representación en la decidua materna, dNK y dMA, se ha visto que en PE y RCIU estas células inmunes están presentes en mayor porcentaje y expresan marcadores fenotípicos pro-inflamatorios[27,42,84,169], favoreciendo el desarrollo de estos síndromes en etapas tardías de la gestación [42,130,170,171]. Si bien en gestaciones normales no se encuentran neutrófilos en alta cantidad, sí se encuentran aumentada su actividad en embarazos con PE y además se demostró un aumento de formación de NETs en la placenta[172].

La PE afecta al 5-7 % de las gestaciones y destaca entre las causas más frecuentes de mortalidad materna. La etiopatogenia de la PE es un tema de intensa investigación y se propone que el inicio, la severidad y su progresión están condicionados por la respuesta materna a factores y proteínas derivados de la placenta[173].

En la Argentina, un estudio en 25 hospitales públicos del área metropolitano de Buenos Aires (AMBA) indicó que la hipertensión en el embarazo es la segunda causa de morbilidad materna severa (29,7% frente a un 38,0% por hemorragias)[174]. Estos datos refuerzan la importancia de encontrar marcadores tempranos en el embarazo que sirvan como indicadores con valor predictivo y el desarrollo de posibles terapias preventivas.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

**Hipótesis:**

*El sistema VIP/VPAC contribuye como modulador local a la generación y mantenimiento de la interfase materno-placentaria a través de la modulación de la función trofoblástica, la interacción de células trofoblásticas con células inmunes favoreciendo un microambiente anti-inflamatorio y afectando la angiogénesis.*

**Objetivo General**

Investigar la participación del VIP en la función de las células trofoblásticas, en la transformación vascular y en el control de la homeostasis inmunológica en etapas tempranas de la gestación.

**Objetivos Específicos**

1. Investigar el papel del sistema VIP/VPAC sobre células trofoblásticas y su impacto en el perfil fenotípico y funcional de los monocitos.

2. Investigar el efecto del VIP y los medios condicionados de las células trofoblásticas sobre el perfil fenotípico y funcional de los macrófagos.

3. Detectar la expresión y estudiar la participación de VIP en placentas humanas de primer trimestre y en leucocitos maternos.

4. Explorar los efectos del VIP en procesos de angiogénesis.

# MATERIALES Y MÉTODOS

# Modelos Experimentales Y Protocolos Experimentales

## 1- Líneas celulares

## 1.1 Procedencia de las líneas celulares

### 1.1.i- Líneas celulares trofoblásticas humanas

- **Swan 71**, derivan de trofoblasto humano de primer trimestre, son células inmortalizadas que se obtuvieron por transformación mediada por telomerasa a partir de células aisladas de citotrofoblasto de 7 semanas [175].

- **HTR-8/SVneo**, derivan de citotrofoblasto de primer trimestre (entre las semanas 6-12 de gestación) que fueron inmortalizadas con el antígeno largo T del virus de simio (del inglés, *simian virus 40 large T antigen*).

- **BeWo**, derivan de un coriocarcinoma por selección clonal[176].

Las mismas fueron provistas por el laboratorio del Dr. Gil Mor, Universidad de Yale, US.

### 1.1.ii- Líneas celulares endoteliales humanas

**HUtMvEC (*Human Uterine Microvascular Endothelial Cells*)**, compradas de Lonza (Cologne, DE) y provistas por el Prof. John D. Aplin, Universidad de Manchester, Reino Unido.

## 1.2 Mantenimiento de células trofoblásticas

### 1.2.i- Propagación

Tanto la línea celular Swan71 como HTR-8/SVNeo y BeWo fueron cultivadas a 37 °C y 5% $CO_2$ en 4 ml de medio DMEM-F12 (Life Technologies (Grand Island, NY, US)) con suero fetal bovino (SFB-Natocord) 10% y suplementado con glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina 100 U/ml y anfotericina B 0.25 µg/ml (ATB). A este

último medio se le llamará 'completo'. Las células trofoblásticas (Tb) crecieron en monocapa en botellas de 25 $cm^2$ y se reemplazó el medio cada 48 h en condiciones de esterilidad dentro de un flujo laminar clase II (Nuarie, USA).

En el caso de las células HUtMvEC fueron cultivadas con el medio *Endothelial Basal Medium (*EBM)-2 (Lonza) con 5% SFB proveniente en el mismo kit y los mismos antibióticos y condiciones de cultivo. Las HUtMvEC se usaron en repiques inferiores a 11.

### 1.2.ii- Preservación

Para la criopreservación de las células, las suspensiones celulares obtenidas luego del tratamiento con el análogo de la tripsina (TrypLE™, Gibco) se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de medio de congelación (10% de Dimetilsulfoxido-DMSO en SFB) en frío. Dicha suspensión se alicuotó en críotubos y luego se enfrió gradualmente desde una temperatura de -20ºC hasta $N_2$ líquido.

## 1.3 Silenciamiento del VIP endógeno en la línea Swan 71 y BeWo

Las células Swan 71 y BeWo fueron silenciadas con el siRNA de VIP (Santa Cruz Biotechnology) según las recomendaciones del proveedor. Las células en un 60 % de confluencia fueron arrestadas por 3 h con el medio mínimo Optimem®. Se formó un complejo 100 nM siRNA de VIP (siVIP):Lipofectamina RNAimax (Life Technologies) 15 min previo a la transfección. 24 h post-transfección, se cambió el medio Optimen® de las células por DMEM-F12 completo por otras 48 h. Un siRNA con una secuencia no específica (siScrl) se usó como control negativo. La disminución de la expresión endógena de VIP (<50%) se comprobó por Western Blot[177]. Las células se utilizaron para ensayos de co-cultivo con monocitos y los sobrenadantes o medios condicionados para ensayos de fagocitosis como se describirá en las secciones 5 y 11, respectivamente.

# 2- Muestras

## 2.1 Muestras de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de voluntarios sanos con el correspondiente consentimiento informado. Los estudios fueron desarrollados en el marco del proyecto: 'Efecto inmunomodulador del VIP en células inmunes de sangre periférica' avalado por el comité de ética de la Sociedad Argentina de Investigaciones Clínica. El tamaño de la muestra utilizada en esta tesis constó de un N=89, incluidas en algunos casos réplicas.

## 2.2 Muestras de decidua y placenta de primer trimestre

Las muestras de placenta y decidua se obtuvieron de abortos electivos de voluntarias que transitaban un embarazo sin complicaciones antes de la semana 15 de gestación. Dicho procedimiento fue avalado y realizado según las normas del hospital de St. Mary y la Universidad de Manchester en el Reino Unido. Las pacientes firmaron un consentimiento para que las muestras se utilizaran para investigación. Se utilizaron las muestras que se obtuvieron por cirugía o por aspiración, ya que estas mismas contienen remanentes de fragmentos de decidua. Para esta tesis fueron utilizadas un total de 33 muestras de entre 5 a 9 semanas de gestación.

# 3- Preparación de medios condicionados

Los medios condicionados (MC) utilizados en los ensayos de migración, perfil de activación de monocitos y fagocitosis (que se describirán en las secciones 8, 6 y 11 respectivamente), fueron obtenidos a partir de células Swan71 o HTR8/SVNeo, según se detalla en cada experimento. Se sembraron 50.000 células en placas de 24 con DMEM-F12 completo. Al llegar a un 80 % de confluencia, se les cambio el medio por DMEM-F12 2% SFB. El medio condicionado de

células incubadas con VIP 10 nM o VIP 100 nM por 20 h se las llamó MC (VIP 10 nM) y MC (VIP 100 nM), respectivamente. En el caso de los MC de las células Swan 71 silenciadas con siRNA por 72 h, se recolectó el sobrenadante de las últimas 24 h y se las llamó: MC (siVIP) y MC (siScrl). Los MC se recolectaron, se centrifugaron para remover debrís celular y congelaron a – 20 °C hasta su uso.

## 4- Purificación y diferenciación de leucocitos

### 4.1 Monocitos de sangre periférica

La sangre recolectada en una jeringa con heparina (Rivero, Argentina) se diluyó a la mitad con solución fisiológica y se utilizó para obtener las células mononucleares totales (MNT). Estas se purificaron por gradiente de densidad (1,007 g) utilizando Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech) y una centrifugación de 480 g por 20 min. Luego de 2 lavados con solución fisiológica (SF) se realizó un paso adicional de desplaquetización logrado por una centrifugación a 101 g por 10 min. A las células MNT suspendidas en un buffer Percoll se les realizó una deshidratación progresiva con NaCl 9% en el baño termostático a 37°C durante 45 min. Luego se las centrifugó en un gradiente de Percoll (GE Healthcare, SE) con 2 densidades de Percoll 50% y 40% a 430 g por 25 min a 4°C, se tomó el segundo halo donde se encuentran la mayoría de los monocitos (pureza hasta 85%). Luego de 2 lavados con SF, los monocitos se contaron y usaron dependiendo cada experimento, en forma directa (suspensión) para migración y co-cultivo o previa adherencia en placa de 24 wells para los ensayos de migración, perfil de activación, fagocitosis, microscopía, diferenciación a macrófagos, ELISA, cierre de la herida y fagocitosis.

### 4.2 Macrófagos diferenciados con M-CSF y GM-CSF

Los monocitos aislados por Percoll como previamente se describió en 4.1, se les realizó un paso de adherencia en placas de 6 well con RPMI 1640 sin suero con glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina

100 U/ml y anfotericina B 0.25 µg/ml. Luego de un período de 1-2 h en la estufa de incubación se lavó todo aquello que no se adhirió a la placa. Las células adherentes se diferenciaron con M-CSF (50 ng/ml) o con GM-CSF (100 ng/ml) en RPMI completo por 5 días. Luego de ese tiempo, 300.000 macrófagos se sembraron en placas de 24 wells y se trataron con DMEM-F12 2% SFB en ausencia o presencia de 100 nM de VIP, MC o MC (VIP 100 nM) por 20 h adicionales antes de utilizarse en los distintos experimentos.

## 4.3 Macrófagos y células NK deciduales

Se colectaron 2 g de decidua humana entre los períodos 5-9 semanas de gestación, se colocaron en RPMI sin suero y se realizó disección mecánica con tijeras. El tejido procesado se lavó con el buffer HBSS y se pasó por una malla. A continuación se realizó una digestión con colagenasa I (2 mg/ml. Sigma, Manchester, UK) y DNAsa I (0,15 mg/ml) por 20 min en el baño térmico a 37 °C en agitación. Luego de la digestión se agregó el mismo volumen de RPMI 1640 con 10% SFB para neutralizar la enzima y se pasó nuevamente por malla. El eluído se centrifugó a 1500 g por 10 min y el pellet se resuspendió en RPMI sin suero con antibiótico (penicilina-estreptomicina). A continuación se pasó por una malla con poro de 200 µm para obtener una suspensión sin agrupaciones celulares. El eluyente se sembró en un gradiente de Ficoll y se centrifugó a 2000 g por 10 min a 4°C. El halo obtenido, integrado por células estromales, epiteliales y leucocitos mononucleares, se resuspendió en HBSS y se centrifugó a 2000 g por 5 min a 4°C. Al pellet se lo resuspendió en 10 ml de buffer de MACS, se contaron las células con Trypan Blue para evaluar viabilidad y se lo centrifugó nuevamente a 2000 g por 5 min a 4°C. El pellet obtenido fue bloqueado por 5 min en 800 µl de buffer de MACS con 10% SFB y 10 % suero humano. Se centrifugó nuevamente a 2000 g por 5 min a 4°C. Al nuevo pellet se le agregó 80 µL de buffer de MACS por cada 10 millones de células con 20 µL de anticuerpo α-CD14 (Miltenyi, DE)

acoplado a perlas magnéticas y se incubó 15 min a 4°C. Se lavaron las células con buffer MACS y centrifugaron a 2000 g por 5 min a 4°C. Al pellet se lo resuspendió en buffer MACS (500 μl/10 millones de células). La suspensión se lo pasó por una columna de selección positiva, se lavaron las células y se recolectaron las células CD14+ con una pureza mayor al 98% (determinado por citometría de flujo marcando con un anticuerpo α-CD14). Se centrifugaron las células a 2000 g por 5 min a 4°C y se resuspendieron en RPMI sin suero con glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina 100 U/ml y anfotericina B 0.25 μg/ml para su uso.

Para las células NK, se usó el mismo protocolo utilizando un anticuerpo α-CD56 acoplado a perlas magnéticas en lugar de α-CD14. Se analizó su pureza por citometría de flujo.

## 5- Co-cultivo de células trofoblásticas y Mo

Las células Tb fueron cultivadas en placas de 24 wells en medio DMEM-F12 completo. Cuando las células estuvieron en 80% de confluencia se co-cultivaron o no con Mo o macrófagos diferenciados, purificadas de las células MNT de voluntarios sanos (300.000 células/*well*). Se probaron distintas condiciones en presencia o ausencia del co-cultivo, presencia o ausencia de VIP 10 o 100 nM. Por otro lado, se usaron las células Tb transfectadas con un siRNA de VIP o por uno Scrl 72 h post-transfección.

## 6- Adherencia de Mo para distintos abordajes

Se sembraron 300.000 Mo obtenidos como se describió en la sección 4.1 en placas planas de 24 well en RPMI sin suero durante 1-2 h para remover las células mononucleares que hayan quedado del Percoll no adherentes. Luego de ese tiempo, se realizaron distintos tratamientos como se describe en la Figura 1.

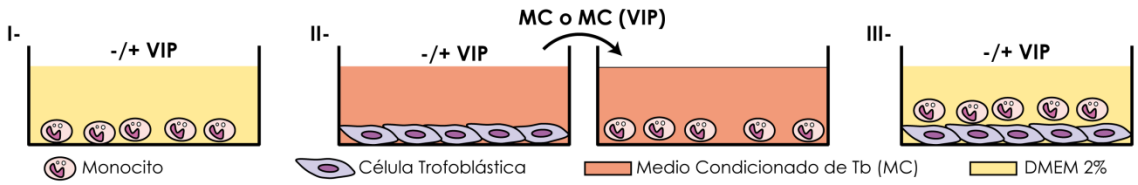



**Figura 1: Abordajes *in vitro* para la determinación funcional de los Mo**. I- Monocitos cultivados en presencia o ausencia del péptido VIP durante 20h. II- Las células trofoblásticas se cultivaron en presencia o ausencia de VIP durante 20 h. El MC previamente centrifugado se utilizó para condicionar a los Mo o MA. III- Co-cultivo de células trofoblásticas con Mo con o sin VIP durante 20 h.

- Los abordajes I, II y III se utilizaron para medir el fenotipo de activación de las células CD14+. Se despegaron las células con TrypLE™ y se marcaron con anticuerpos monoclonales anti marcadores moleculares específico de cada perfil. Los anticuerpos utilizados fueron: α-CD14, α-CD16, α-CD39, α-CD40, α-CD80, α-CD86 y α-HLA-DR para moléculas de superficie; y los anticuerpos: α-IL-10, α-IL-12 y α-TNF-α para citoquinas intracitoplasmáticas. Los abordajes I, II se utilizaron para la recolección de SN y su posterior uso en distintos experimentos. Se recuperó ARNm de las células con Trizol® para la medición de expresión génica cómo se detalla en la sección 7.
- Los abordajes I y II se utilizaron para los ensayos de fagocitosis de cuerpos apoptóticos que se describirá en el punto 11.
- Los abordajes I y II también se utilizaron en los macrófagos diferenciados por M-CSF o GM-CSF para posteriores estudios en determinación de proteínas por ELISA, ensayo del cierre de la herida, angiogénesis y expresión génica.

# 7- RT-PCR

## 7.1 Extracción de ARN

Las células recuperadas luego de los distintos tratamientos fueron resuspendidas en 500 µl de Trizol® (Life Technologies) y se procedió a realizar la extracción de ARN total siguiendo las recomendaciones

del fabricante. Brevemente, luego de incubar las muestras en presencia de cloroformo (100 μl) durante 5 min, se centrifugaron 15 min a 12.000 g a 4ºC. El ARN disuelto en la fase acuosa la cual se transfirió a un tubo nuevo y se incubó 10 min a 4ºC con 250 μl de isopropanol para precipitarlo. Se centrifugó 10 min a 12.000 g a 4ºC. Se descartó el sobrenadante, el pellet se lavó con 500 μl de etanol 75%. Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió en 30 μl de agua estéril de ampolla libre de RNAsas. El ARN se cuantificó por espectrometría (Nanodrop, ThermoFisher Scientific) midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

En el caso de las muestras provenientes de placentas humanas (dMA y dNK) se utilizó el kit de extracción de RNAeasy mini kit (QIAGEN, Manchester, UK) según las recomendaciones del proveedor.

## 7.2 Retro-transcripción

Para realizar el pasaje a ADN copia (ADNc) se utilizó 1 µg de ARN previamente incubado 10 min a 60ºC y la mezcla de reacción (dNTPs 25 mM (Embiotec), oligodT 5 ng/µl (Biodynamics), RT M-MLV 100 U, RNAsin 15 U y Buffer RT M-MLV 1X (Promega) hasta un volumen final de 20 µl. La reacción se llevó a cabo a 42ºC durante 1 h y se detuvo incubando durante 10 min a 90ºC. El ADNc obtenido se conservó a -20ºC hasta su uso.

Para el pasaje a ADNc a partir de ARN de dMA y dNK se usó 100 ng/ml de ARN con el kit *Affinity Script Multi-Temperature cDNA synthesis kit* (Agilent, Berkshire, UK) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

## 7.3 Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)

Los *primers* utilizados para amplificar los respectivos productos se describen en la Tabla 1.

| Primer | Sentido | Secuencia (5'->3') | Producto | T°*Annealing* (°C) |
|---|---|---|---|---|
| **GAPDH** | S | TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG | 240 | 62 |
| | AS | TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT | | |
| **VIP** | S | ACGTCACTCAGATGCAGTCTTCAC | 100 | 60 |
| | AS | TGCTCCTCTTTCCATTCAGAATT | | |
| **VPAC1** | S | CCCCTGGGTCAGTCTGGTG | 100 | 58 |
| | AS | GAGACCTAGCATTCGCTGGTG | | |
| **VPAC2** | S | CCAGATGTCGGCGGCAACG | 114 | 56 |
| | AS | GCTGATGGGAAACACGGCAAAC | | |
| **MCP-1** | S | CAGCAGCAAGTGTCCCAAAG | 146 | 64 |
| | AS | GAGTGAGTGTTCAAGTCTTCGG | | |
| **MIP-1α** | S | TTCAGACTTCAGAAGGACAC | 90 | 62 |
| | AS | TGAGCAGGTGACGGAATG | | |
| **IL-8** | S | CCAACACAGAAATTATTGTAAAGC | 163 | 62 |
| | AS | CACTGGCATCTTCACTGATTC | | |
| **RANTES** | S | TGCTGCTTTGCCTACATTGC | 95 | 64 |
| | AS | AAGACGACTGCTGGGTTGG | | |
| **TSP-1** | S | CCTGATGGAGAATGCTGTTC | 146 | 53 |
| | AS | CGGTTGTTGAGGCTATCG | | |
| **KLF4** | S | CGCTGCTCCCATCTTTCTCC | 159 | 60 |
| | AS | CCGCCGCCAGGTCATAGG | | |
| **IRF5** | S | CCAACACCCCACCACCCTTC | 132 | 60 |
| | AS | AGAACATCTCCAGCAGCAGTCG | | |
| **VEGF-A (RT-PCR)** | S | GCCTTGCCTTGCTGCTCTACC | 83 | 58 |
| | AS | GTGATGATTCTGCCCTCCTCCT | | |
| **VEGF-A (RT-qPCR)** | S | CGCAGCTACTGCCATCCAAT | 192 | 60 |
| | AS | GTGAGGTTTGATCCGCATAATCT | | |
| **VEGF-C** | S | AGGCTGGCAACATAACAGAGA | 161 | 60 |
| | AS | TCCCCACATCTATACACACCTC | | |
| **TGF-β2** | S | CAGCACACTCGATATGGACCA | 113 | 60 |
| | AS | CCTCGGGCTCAGGATAGTCT | | |
| **YWHAZ** | S | CCTGCATGAAGTCTGTAACTGAG | 120 | 60 |
| | AS | TTGAGACGACCCTCCAAGATG | | |
| **MMP-2** | S | TTTCCATTCCGCTTCCAGGGCAC | 253 | 60 |
| | AS | TCGCACACCACATCTTTCCGTCACT | | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **MMP-9** | S | CCTGCCAGTTTCCATTCATC | 455 | 60 |
| | AS | GCCATTCACGTCGTCCTTAT | | |
| **MMP-14** | S | GAGCTCAGGGCAGTGGATAG | 796 | 60 |
| | AS | AGCAGATGACCCCATTTGAC | | |
| **MMP-15** | S | AGGAGACACAGCGTGGAGAC | 514 | 60 |
| | AS | TTGCAGTAAAGCAGGACACG | | |
| **TIMP-1** | S | CTGCGGATACTTCCACAGGT | 356 | 60 |
| | AS | GCAGGATTCAGGCTATCTGG | | |
| **TIMP-2** | S | GATGCACATCACCCTCTGTG | 385 | 60 |
| | AS | TCCAGGAAGGGATGTCAGAG | | |
| **TIMP-4** | S | CGAGCCCTGGGAGGACCTGT | 465 | 60 |
| | AS | GGCAACAGGCTGAGGGCAGG | | |

**Tabla 1: Tabla de *Primers***. Secuencia de *primers* empleados para el análisis de la expresión génica junto al tamaño del producto y la temperatura de *annealing*.

La PCR se realizó mezclando el ADNc (1µl para todos los genes) con la mezcla de PCR (Buffer PCR 10X, $MgCl_2$ 1,5 mM, *primers* 0,20 µM, dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 25 U/ml, $H_2O$) para completar un volumen final de reacción de 25 µl.

La PCR se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) o una Real Time BioRad (IQ2). Las condiciones se muestran en la Tabla 2.

| | T° | tiempo | |
|---|---|---|---|
| Desnaturalización inicial | 94°C | 5 min | |
| Desnaturalización por ciclo | 94°C | 20 seg | 35 ciclos |
| Primer *Annealing* | según tabla 1 | 20 seg | |
| Elongación | 72°C | 20 seg | |
| Elongación final | 72°C | 10 min | |

**Tabla 2: Programa de amplificación**.

Para amplificar los otros productos de interés se utilizó el mismo programa de GAPDH, y solo se cambió la temperatura de *annealing* de *primers* (Tabla 2).

## 7.4 Electroforesis en gel de agarosa y semicuantificación de los productos de RT-PCR

Después de realizada la amplificación por RT-PCR, se analizaron 17,5 μl de cada producto mezclado con el buffer de siembra (0,25% xileno, 40% glicerol en buffer TBE) en un gel de agarosa al 2% conteniendo 0,5% de bromuro de etidio en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE). Se utilizó el marcador de peso molecular para ADN 50pb plus (PB-L, Argentina). La electroforesis se realizó en TBE a 180 V por 15 min. Las bandas obtenidas se visualizaron por fluorescencia del bromuro de etidio expuesto a luz UV. La intensidad de dichas bandas fue cuantificada utilizando el programa ImageJ (NIH, USA) y los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA) relativas a GAPDH.

## 7.5 Real Time PCR

Para el gen TSP-1 sobre células Tb se realizó PCR en tiempo real (qPCR) se utilizó MasterMix con 1ul de muestra para cada gen y 20 µl de volumen final. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que para PCR común agregando un paso de lectura luego de la extensión.

En los casos de las muestras provenientes de las células BeWo VIP silenciadas, dNK y dMA se utilizó *Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix*(Agilent) para la RT-qPCR. Se utilizaron 10 ng/ml de ADNc en un volumen final de 12,5 µl. El programa de amplificación fue: similar al de GAPDH, exceptuando que la T de *Annealing* fue 60°C donde se leyó la fluorescencia y se eliminó el paso de elongación de cada ciclo. Se usó el gen constitutivo YWHAZ como control.

## 8- Ensayo de migración de Mo

El ensayo de migración a través de una membrana de policarbonato realizó como previamente describieron[178]. Brevemente, los Mo se resuspendieron en DMEM-F12 suplementado con 2% de SFB. Se colocaron 200.000 Mo (150 µl) en la cámara superior del *transwell* (Costar, Corning Incorporated, NY, USA) de 6,5 mm de diámetro con un poro de diámetro de 5 µm. La cámara inferior de cada pocillo contiene 250 µl de DMEN-F12 con 2 % de SFB sin o con VIP 10 o 100 nM o MC, MC (VIP 10 nM) o MC (VIP 100 nM). Después de la incubación de 2 h a 37 °C con aire húmedo y 5 % de $CO_2$, se recuperó el contenido de la cámara inferior y las células que migraron se contaron por citometría de flujo como el número de células CD14 positivas adquiridas bajo una tasa de flujo definido.

Los MC para la migración de Mo se obtuvieron como se describió previamente en la sección 3 de materiales y métodos.

## 9- Inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo

Las células cultivadas bajo los distintos tratamientos fueron recuperadas y lavadas con buffer FACS a temperatura ambiente. En el caso de células adherentes, se recuperaron por tratamiento TrypLE™ (GIBCO cat# 12604-054). Los pellet celulares obtenidos se resuspendieron y se incubaron con los anticuerpos correspondientes según la marcación como se detalla a continuación en los puntos 9.1 y 9.2.

En la Tabla 3 al final de esta sección, se muestra un listado de los anticuerpos monoclonales empleados en las técnicas de inmunofluorescencia.

Todas las muestras se analizaron en un Citómetro de Flujo FacsAria II (BD) y se adquirieron entre 10.000 y 50.000 eventos. Los resultados se interpretaron utilizando el programa FlowJo® versión 7.6.2 y se

expresaron como porcentaje de células positivas usando los correspondientes controles para determinar en cada caso el cuadrante o punto de corte.

## 9.1 Inmunofluorescencia de superficie directa

Las células se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizaron marcaciones simples, dobles o triples según se indique en el ensayo. Posteriormente, las células se lavaron con buffer FACS y se analizaron por citometría de flujo. En los controles negativos los anticuerpos fueron reemplazados por los correspondientes controles de isotipo.

## 9.2 - Inmunofluorescencia intracitoplasmática

Para la detección de proteínas intracitoplasmáticas, las células se incubaron con un inhibidor del transporte de proteínas (GolgiStop™, BD) durante las últimas 4 h de cultivo, para promover la acumulación intracitoplasmática de proteínas por inhibición del transporte trans Golgi. Luego de realizar la marcación de superficie, las células se fijaron con una solución fijadora/permeabilizadora (Cytofix/Cytoperm™, BD) durante 20 min a 4ºC y posteriormente se permeabilizaron por lavado con solución BD Perm/Wash™ (BD). Los anticuerpos monoclonales se incubaron junto con el buffer de permeabilización durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se removió el anticuerpo no pegado lavando en presencia de ese mismo buffer y se resuspendieron nuevamente en Cytofix/Cytoperm hasta su análisis por citometría. En forma paralela se realizaron las marcaciones con los correspondientes controles de isotipo.

| Molécula | Fluoróforo | Fabricante | Catálogo |
|---|---|---|---|
| CD14 | PE | BD | 555398 |
| | APC | BD | 555399 |
| | FITC | BD | 555397 |
| | *Micro-beads* | Miltenyi | 130-056-201 |
| CD16 | PE | BD | 561313 |
| CD31 | ---- | Agilent | GA610 |
| CD39 | APC | BD | 560239 |
| CD40 | PE-Cy5 | BD | 555590 |
| CD45 | ---- | Agilent | GA761 |
| CD56 | *Micro-beads* | Miltenyi | 130-050-401 |
| | ---- | Agilent | IR628 |
| CD80 | PE-Cy5 | BD | 559370 |
| CD86 | PE-Cy5 | BD | 555659 |
| FoxP3 | PE | eBioscience | 12-4776 |
| IL-10 | PE | BD | 559337 |
| IL-12 | PE | BD | 559325 |
| HLA-DR | APC-Cy7 | BD | 335796 |
| VIP | ---- | ABCAM | AB78536 |
| IgG (2rio VIP) | Fitc | ABCAM | AB6717 |
| | HRP | ABCAM | AB97200 |
| IgG1 $\alpha V\beta 3$ | ---- | ABCAM | AB78289 |
| SMA | --- | Agilent | IR611 |
| IgG1 | Rodamina-triC | | |
| | Alexa 488 | Life technol. | A11001 |
| | Alexa 568 | Life technol. | A10037 |

**Tabla 3: Anticuerpos empleados para la marcación por inmunofluorescencia, selección positiva y ensayos de neutralización**.

## 10- ELISA para citoquinas y quimioquinas

Se evaluó la secreción de las quimioquinas: MCP-1 e IL-8 y la citoquina IL-10, a partir de los sobrenadante de los diferentes tratamientos luego de 24 h de cultivo a través de un ensayo de ELISA de captura estándar, utilizando el kit comercial ELISA *Ready, Set & Go*, siguiendo las instrucciones del fabricante (eBiosciences) como se describió en[179]. La densidad óptica se leyó a 450 nm mediante un lector de ELISA (Lab systems Multiskan MS) y los resultados se expresaron en pg/ml o ng/ml.

## 11- Fagocitois de Cuerpos Apoptóticos

### 11.1 Obtención de células trofoblásticas y neutrófilos apoptóticos

La línea celular Swan 71 se creció en DMEM-F12 10% SFB hasta un 80% de confluencia, y se les indujo a apoptosis con camptotecina (Sigma) 3 μM. Luego de 16 h con la droga se detectó un 50% de células apoptóticas.

Los neutrófilos autólogos se recolectaron luego del paso de Ficoll-Hypaque. Se sometieron a una purificación por Dextran y luego de una lisis de glóbulos rojos con agua destilada se llevó a osmolaridad con una solución NaCl 9% y solución fisiológica. Los neutrófilos purificados con un 99% de pureza se incubaron en eppendorf de 1,5 ml en 250 μl de RPMI 10% SFB durante 16 h. Aproximadamente un 40-50% de neutrófilos entraron en apoptosis espontánea como se describió en[168].

La determinación de células apoptóticas se realizó por citometría de flujo por marcación con ioduro de propidio y anexina V.

## 11.2 Marcación de las células apoptóticas con CFSE

Las células Tb y su sobrenadante fueron recolectados y centrifugados. El pellet se resuspendió en RPMI sin SFB y luego se tiñeron las células con CFSE (Life Technologies) durante 15 min en oscuridad. La marcación se detuvo agregando el mismo volumen de SFB e incubando durante 5 min. Luego se agregaron 2 veces el volumen de RPMI sin suero y se centrifugó a 1200 g por 5 min. El pellet se resuspendió en DMEM-F12 completo y se incubó durante 10 min a 37°C para permitir la salida del CFSE no unido. Este paso se repitió por lo menos 3 veces.

Este mismo protocolo se usó en los neutrófilos luego de las 16 h de incubación.

## 11.3 Fagocitosis

Para este ensayo, 300.000 células CD14+ fueron estimuladas con sus respectivos tratamientos. Luego de 20 h se les retiró el medio y se las lavó 2 veces con solución fisiológica. A continuación se las enfrentó con las células trofoblásticas apoptóticas (aTb) suspendidas en DMEM-F12 completo en una relación 1:3 (CD14+:aTb) durante 60 min; en el caso de aquellas células co-cultivadas con neutrófilos apoptóticos (aNeu) suspendidas en DMEM-F12 completo la relación empleada fue 1:10 (CD14+:aNeu) durante 40 min. Luego del enfrentamiento las células se levantaron y lavaron con buffer FACS y se marcaron con anticuerpo αCD14 acoplado a un fluoróforo APC o PE para análisis por citometría de flujo como se indicó en 9. Se consideró a las células dobles positivas como células CD14+ que fagocitaron cuerpos apoptóticos.

# 12- Detección de la integrina αVβ3 en Mo

## 12.1 Expresión de la integrina αvβ3

Aquellos Mo incubados como en el abordaje I y II (sección 6) con los siguientes tratamiento: Basal, VIP 10 y 100 nM, MC o MC (VIP 10 o

100 nM), fueron recuperadas con TrypLE™, lavadas con buffer FACS y marcadas con la molécula de superficie CD14 utilizando un anticuerpo acoplado al fluoróforo APC. Luego se fijaron y permeabilizaron con citofix/citoperm. Se bloquearon las células con FACS con 0,5 % BSA y se marcó con el anticuerpo α-integrina αVβ3, ya que su epítope se ubica del lado intracitoplasmático en la cadena β3. Luego se incubó por 1 h a temperatura ambiente, se lavó y agregó el anticuerpo secundario anti-mouse Rodamina triC conjugada por 1 h más. Se lavó, se suspendió en FACS y se analizó por citometría de flujo. Se buscó la población de células que dan positivo a ambas marcas, tanto para CD14 como para la integrina αVβ3.

## 12.2 Localización celular

Se sembraron 200.000 Mo en vidrios de 15 mm para microscopía esteriles, en placas de 24 wells. Luego se estimuló con el MC (VIP 100 nM) o el medio basal DMEM-F12 2% SFB por 20 h. Posteriormente, los vidrios con células fagocíticas se los enfrentó o no a las a células aTb marcadas con CFSE como se describió en la sección 11 y se incubó durante 60 min para permitir la fagocitosis. Una vez terminada la fagocitosis y lavado el excedente de células aTb con SF y se procedió a la marcación de la integrina como se describió previamente. Además se realizaron los controles negativos necesarios sin el anticuerpo primario para ver la marca inespecífica.

Se tomaron microfotografías con una cámara FV 300® Olimpus acoplada a un microscopio confocal - Olympus BX6I. Se utilizó para el análisis de imágenes el *software Fluoview* FV-ASW versión 4.1. Las imágenes mostradas en esta tesis tienen una magnificación de 120X.

La distribución de la integrina αVβ3 se analizó con el programa *ImageJ* versión 1.47. Se seleccionó el área de la membrana de las células fagocíticas y se cuantificó coeficiente de varianza del brillo por pixel en dichas áreas. Aquellas áreas con una distribución más

homogénea del brillo presentarán una menor varianza en los valores cuantificados y por ende menor desvío estándar (D.S.).

## 13- Explantos de placenta de primer trimestre

Con material quirúrgico autoclavado se aislaron pequeños fragmentos de placenta de primer trimestre bajo lupa en el flujo laminar. Estos fragmentos se colocaron sobre gotas de colágeno I previamente adherido en placas de 24 wells. A los explantos se les adicionó medio de cultivo DMEM-F12 completo y se utilizaron para los ensayos de medición de proliferación y formación de túbulos.

## 14- Outgrowth de las células trofoblásticas

Una vez que a los explantos se los colocó sobre la gota de colágeno I, se evaluó la capacidad migratoria de las células EVT a la cual llamamos de aquí en adelante *outgrowth.* Los tratamientos en los que se evaluó el *outgrowth* fueron: VIP (10, 100 y 1000 nM), anticuerpo neutralizante de VIP (ab78536) en ausencia o presencia de VIP (H-3775-BACHEM, DE) y por último un inhibidor de la vía de PKA, H89 (Sigma, UK). El *outgrowth* se evaluó cada 24 h tomando fotografías con una cámara Nikon acoplada a una lupa. Después de 96 h de tratamiento los sobrenadantes fueron recolectados y los explantos fijados con PFA 4% durante 20 h y luego guardados en PBS. El *outgrowth* se evaluó midiendo el área con el software ImageJ. Las fotografías mostradas en esta tesis tienen un aumento de 20X.

## 15- Inmunohistoquímica de tejido

Se realizaron cortes seriados de 5 $\mu$m en las muestras de deciduas humanas que se describieron en la sección 2.2. Luego se llevó a cabo un proceso de desparafinado en *Histo-Clear* (National Diagnostics, UK) y rehidratación en alcoholes decrecientes hasta llegar a agua. Luego se realizó un paso de recuperación antigénica con Buffer Citrato de Sodio (pH= 6.0) a punto de hervor y se dejó enfriar por 20 min. Posteriormente se hizo un paso de inactivación de la peroxidasa endógena con $H_2O_2$ por 10 min y seguido a esto, un paso de bloqueo

con TBS-Tween 0,1% y 10% de suero cabra, cisne o burro (dependiendo el animal donde se hizo el anticuerpo primario) y 2% de suero humano por 30 min. Luego se adicionó el anticuerpo (Ac) primario en esa solución de bloqueo y se dejó actuar ON en una cámara húmeda a 4 °C. Al día siguiente, se lavó con TBS el exceso de Ac, se le agregó la dilución del Ac secundario biotinilado (1/200-1/600) en TBS por 30 min a TA. Después de lavados con TBS, se realizó un paso de incubación con avidina-peroxidasa (1/200) por 30 min a TA. Antes de la coloración con DAB se lavó 3 veces en TBS. Una vez precipitado el DAB se le hizo una contratinción con Hematoxilina de Harris. Por último, se deshidrato la muestra en alcoholes crecientes hasta terminar en Histo-Clear y se montó con bálsamo. Los vidrios se dejaron secar para su análisis. Las imágenes fueron procesadas en un microscopio Olympus.

## 16- Inmunofluorescencia de Tejido

Los explantos que crecieron en la gota de colágeno y fijados con PFA 4% como se describió en la sección 14 se los utilizaron para inmunofluorescencia. Brevemente, se neutralizó el PFA con hidrato de boro (10 mg/ml) por 10 min a TA. Luego se permeabilizó empleando PBS-Tritón 0,5 % por 5 min. Se lavaron con PBS y se bloquearon con PBS-Tritón con 10% suero de burro durante 1 h. Se lavaron con PBS y se incubaron con los Ac primarios: 1/200 de Ac α -VIP (ab78536), 1/100 de Ac. α-integrina $\alpha V\beta 3$ (MAB 19762-milipore) o con ambos Ac ON. Se lavaron con PBS-Tritón y se incubaron con los Ac secundarios: 1/500 de Ac α rabbit Alexa488 (A21206-lifetech) para el VIP y 1/500 de Ac α -mouse Alexa568 (A10037-Lifetech) para la integrina $\alpha V\beta 3$. Se incubaron los Ac secundarios en PBS-Tritón con 5% de suero de burro durante 1 h. Se lavó con PBS y para montarlo se usó el reactivo VECTASHIELD (Vector Laboratories) que permite montar y tiñe el núcleo con DAPI. Se realizaron explantos controles donde no se incubaron con ningún Ac para medir la autofluorescencia y en otros

solo con los secundarios individuales o juntos para evaluar la inespecificidad de los mismos. Las inmunofluorescencias fueron tomadas en el microscopio de fluorescencia ZEISS que posee un ApoTome para la captura de imágenes en distintas capas acoplada a una cámara. Las imágenes fueron analizadas con el software Zen 2011 versión 1.0 edición azul obtenido de Microimágenes de Carl Zeiss. En cada imagen se detalla el aumento utilizado.

## 17- Inmunoensayo de BioPlex humano

El ensayo *Bio-PlexPro™ Human Cytokine Standard 27-Plex, Group I* (BioRad) consiste en medir 27 citoquinas por muestra a través de pequeñas perlas magnéticas de 6,5 μm. Dichas perlas contienen anticuerpos específicos para citoquinas asociadas a una combinación de 2 fluoróforos. Se siguieron las recomendaciones del proveedor. Brevemente, se reconstituyeron los estándares en el medio de cultivo usado en los experimentos y se le hicieron diluciones seriadas. Así como con los distintos sobrenadantes a analizar, los estándares se incubaron con las perlas magnéticas resuspendidas en el buffer del kit por 30 min en un agitador orbital. Luego de la reacción, se lavó con buffer de lavado y se volcó el líquido una vez que la placa se encontraba en el magneto. Posteriormente de la incubación, se agregó una dilución con los Ac secundarios por 30 min en el agitador. Por último, después de unos lavados con el buffer específico, se agregó una solución reveladora (solución SA-PE), que contiene lo necesario para unirse diferencialmente a cada Ac y emitir en una longitud de onda distinta tal que se puedan identificar cada producto por separado. Se la incubó 10 min y se leyó en un lector Bio-Rad (Bio-Plex 200) previamente calibrado. Tanto la curva de los estándares como los SN se realizaron por duplicados. Para analizar los datos se usó un software de Bio-Rad el cual procesó los datos de cada citoquina comparando con su estándar respectivo y restándole el blanco. La citoquina se expresa si los valores dan mayor que el

mínimo de autofluorescencia se expresan como pg/ml. Este ensayo se utilizó para medir las citoquinas de las muestras provenientes de los explantos, de los SN de dMA y dNK.

La lista de las citoquinas analizadas en este Bio-Plex son: IL-1β, -1RA, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -12 (p70), -13, -15, -17A, Eotaxina, FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-BB, RANTES, TNF-α y VEGF.

## 18- Zimografía para medición de metaloproteasas

Los SN de los dMA cultivados o no con VIP 100 nM durante 48 h fueron concentrados 5 veces usando columnas *Centricon Ultracell YM-10,000 membrane* (Millipore, Manchester, UK). Estas columnas concentran las proteínas con peso mayor a 10 KDa teniendo en cuenta que todas las MMP gelatinolíticas pesan por arriba de dicha cantidad. Se cuantificaron las proteínas y se sembraron 800 ng por condición en un gel de 10 % de poliacrilamida con 1% de gelatina porcina (SIGMA). Se dejó correr a 120 V por 2 h. Se lavó con buffer renaturalizante 1X en agitación por 30 min, se lavó con agua destilada y se dejó en *Developing buffer* en agitación a 37°C ON. Al día siguiente se tiñeron los geles con *Coomasie blue* por 60 min en agitación y después de esto se destiñó con la solución decolorante. Los geles se llevaron a un scanner para la toma de la fotografía. Como control positivo (Ct+) se utilizó el SN de la línea BeWo que son fuertes productoras de MMP-2. Todas las soluciones utilizadas se encuentran descriptas al final de esta sección.

## 19- Formación de Túbulos

Para la formación de túbulos se utilizaron las células HUtMvEC descriptas en 1.1.ii. Previamente a su uso, a la placa de 96 wells se la cubrió con una fina capa de la matriz extracelular *Geltrex® LDEV free* (Invitrogen, GIBCO, USA) de bajos nutrientes y se colocó en la estufa por 2 h. Se sembraron 20.000 células en DMEM-F12 2% (CT+) en presencia de distintas concentraciones de VIP (10, 50 y 100 nM), o

los distintos MC de Tb o los distintos sobrenadantes de MA (GM-CSF) o dMA. Se evaluó la formación de túbulos hasta las 8h.

Las microfotografías se tomaron en el microscopio Olympus y las imágenes se analizaron con el *software* ImageJ y el pluging *Angiogenesis Analyzer*. Un ejemplo se muestra en la Figura 2.

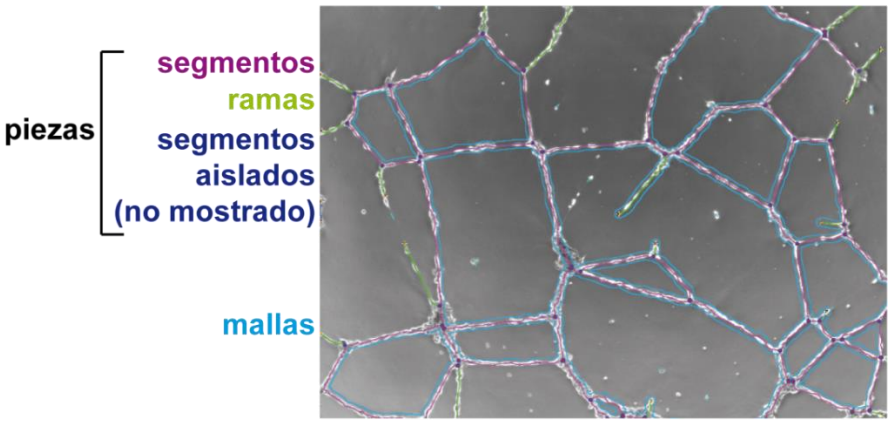



**Figura 2: Análisis de la formación de túbulos por las células HUVEC**. En color magenta se muestran los segmentos, en verde las ramas y en celeste las mallas. En esta imagen no hay segmentos aislados que junto a segmentos y ramas conforman la medición de piezas. Los segmentos aislados son ramas interconectadas pero desconectadas de las estructuras principales.

## 20- Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 microarray

Se trataron 200.000 células HUtMvEC con medio EBM-2 (BASAL) o con MC de EVT (Explantos de placenta) de 9 placentas distintas, por 24 h. Se recuperaron las células y se les extrajo el ARN como previamente se mencionó. Se realizó el *array* de *Affimetrix* siguiendo recomendaciones del proveedor. Los controles de calidad, normalización y análisis de expresión fueron descriptos en[180–182]. Utilizando actualizaciones posicional y algoritmos de apareos, se calculó la probabilidad del log de la relación (PPLR-*probability of positive log ratio*) [182]. Los umbrales de significancia se definen como PPLR>0,9 (sobreexpresados) y PPLR<0,1 (expresión disminuida). Los valores son significativos cuando la intensidad de señal es mayor a 50 unidades arbitrarias (UA).

## 21- Análisis Estadístico

Para los casos en donde se comparó el control basal vs. tratado, se utilizaron test T de Student para muestras paramétricas, test U de Mann Whitney para muestras no paramétricas no apareadas y test de Wilcoxon para muestras no paramétricas apareadas.

En caso de 3 o más condiciones se realizó una prueba de ANOVA con Tukey o Silak como post-test para comparaciones múltiples.

Se consideró $p<0.05$ como diferencia significativa.

Se utilizó el software GraphPad Prism 7 (GraphPad software Inc) para realizar las pruebas estadísticas.

# REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados en esta tesis son libres de endotoxinas.

Plásticos de JetBioFilm, Corning y Axygen(Buenos Aires, ARG) exceptuando los *transwell* de Corning (Costar, Corning Incorporated, NY, USA). RPMI-1640 y *Buffer* Salino con Fosfato (PBS) fueron obtenidos del Laboratorio Microvet (Buenos Aires, ARG). DMEM-F12 obtenido de Invitrogen *Life Technologies* (Grand Island, NY, USA), Suero Fetal Bovino (SFB) y penicilina/estreptomicina fueron compradas a Invitrogen Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Heparina Sódica 5000 U/ml del laboratorio Veinfar (Buenos Aires, ARG)

**Soluciones:**

- Solución T10: NaCl 8%, KCl 2%, $NaH_2PO_4$ 0,05%, $NaHCO_3$ 1%, Glucosa 1%, Agua destilada csp 100 ml final. pH 7,4-7,6.
- Solución Percoll 100: Percoll 90% y solución T10 10%.
- Solución Percoll 50: solución Percoll 100 50%, solución T1 40 % y SFB 10%.
- Solución Percoll 40: solución Percoll 100 40%, solución T1 50 % y SFB 10%.

- Buffer Percoll: EDTA 0,2%, NaCl 9%, SFB 5% y solución T1 hasta 2 ml.
- Buffer HBSS: NaCl (8000 mg/l), KCl (400 mg/l), $KH_2PO_4$ (60 mg/ml), Glucosa/ml), Rojo Fenol (10 mg/ml), $Na_2HPO_4$ (48 mg/ml), $MgSO_4$ (98 mg/ml) y $CaCl_2$ (140 mg/ml).
- Buffer MACS: PBS 1%, BSA 0,5 %, EDTA 2mM, suero humano 10%.
- Tris-*Buffer* Salino (TBS): 50 mM de Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH: 7,6.
- Geles de poliacrilamida 10%:7,2 ml dH2O, 2 ml de 1% gelatina (Sigma), 6,64 ml de Bis-acrilamida, 4 ml de Tris (1,88 M), 100 µl 20% de SDS, 60 µl 10% de APS, 12 µl de TEMED.
- Gel concentrador: 11 ml dH2O, 2 ml Bis-acrilamida, 2 ml Tris (1,25 M), 100 µl 20% SDS, 75 µl 10% APS, 10 µl TEMED.
- 10X *Buffer* de corrida de Zimografía: 0,25 M Tris, 1,92 M Glicina (Fisher Scientific Limited), 1 l dH2O y pH a 8,3.
- 1X *Buffer* de corrida de Zimografía: Dilución 1:10 con dH2O y agregado 5 ml of 20% (p/v) SDS por 1 l.
- 4X *Sample buffer*: 0,25 M Tris en 10 ml de dH2O: 30% v/v glicerol (Sigma), 8% p/v SDS (Sigma), 1 % p/v azul de bromofenol (Sigma) (0,01% p/v)(pH 6,8).
- *Buffer* de Renaturalización: 12,5 ml de Triton X-100 en 1l de dH2O.
- 10X *Developing Buffer*: 60,57 g de Tris, 116,88 g NaCl, 5,55 g CaCl2 en 1 l dH2O (pH 7,8), 2 ml Brij 35 (Sigma) (0,2% p/v).
- Solución de coloración: 5 g Coomassie Blue R-250 (Bio-Rad) (0,5% p/v), 50 ml metanol (Fisher ScientificLimited) (5% v/v), 100 ml ácido acético (Fisher ScientificLimited) (10% v/v) en850 ml dH2O.
- FACS: 2% SFB en SF

# RESULTADOS

# CAPÍTULO 1

# Efectos del VIP sobre células trofoblásticas y su impacto en el perfil funcional de los monocitos

## Modulación del perfil fenotípico y funcional de los monocitos por las células trofoblásticas

Teniendo en cuenta que desde el inicio de la gestación hay un reclutamiento activo de monocitos (Mo) hacia la interfase temprana, y que las células trofoblásticas (Tb) modulan su perfil de activación de modo de mantener la homeostasis inmunológica, nos preguntamos si VIP tiene efecto en este reclutamiento de manera directa o indirecta. Para ello se realizaron cultivos en placas tipo *transwell* donde se evaluó la migración de Mo de sangre periférica de voluntarios sanos hacia el medio de cultivo en presencia de VIP (10 y 100 nM) y a los medios condicionados (MC) de las Tb pretratadas o no con VIP que los llamamos MC (VIP 10 nM) y MC (VIP 100 nM). Además, se evaluó por RT-PCR en las células Tb la expresión de quimioquinas relevantes para la atracción de Mo y el efecto del VIP. Los resultados se muestran en la Figura 1.

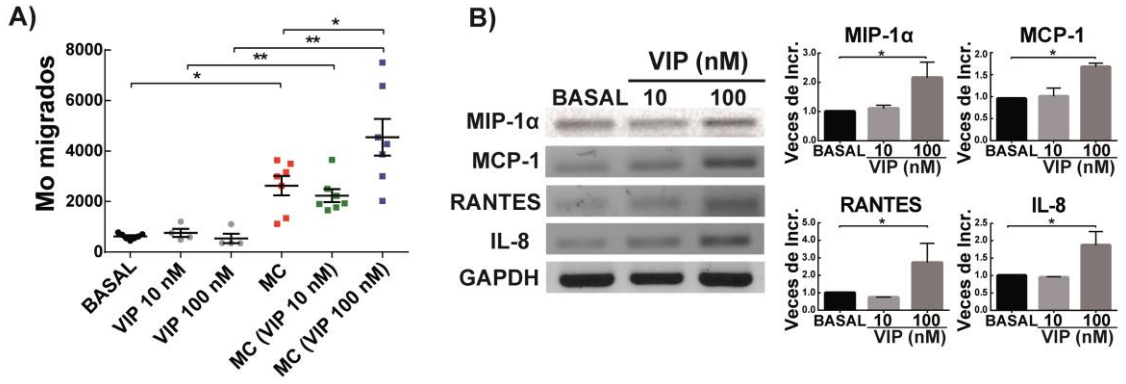



**Figura 1: Migración de Mo hacia el medio condicionado de Tb y expresión de quimioquinas atractantes de Mo.** A) Se sembraron 200.000 Mo de sangre periférica de voluntarios sanos en la cámara superior del *transwell* de poro de 5 µm. En la cámara inferior: Medio DMEM-F12 2% SFB (BASAL), Medio con VIP (10 y 100 nM) y MC de Tb o MC

de Tb pretratadas con VIP (10 y 100 nM). Los datos están expresados como media ± ES de la cantidad de Mo migrados a la cámara inferior de los distintos experimentos mostrados. * P<0,05, ** P<0,01; Mann-Whitney. B) Las Tb cultivadas en DMEM-F12 10% SFB en ausencia o presencia de VIP (10 y 100 nM), se cosecharon y se midió la expresión de quimioquinas atractantes de Mo (MIP-1α, MCP-1, RANTES e IL-8) por RT-PCR. Los datos están expresados en veces de incremento (veces de incr.) X ± ES de al menos 4 experimentos con distintos dadores. * P<0,05; Mann-Whitney.

Si bien el VIP *per se* no tiene función quimioatractante, el MC de Tb sí lo hace y cuando las células Tb fueron pretratadas en presencia de VIP 100 nM, la migración fue mayor aún. Este incremento en la migración con el MC (VIP 100 nM) puede estar asociado al aumento de la expresión observada en MCP-1/CCL2, MIP-1α/CCL3, RANTES/CCL5 e IL-8/CXCL8 en las Tb preincubadas con VIP 100 nM.

Para confirmar lo observado en la expresión de Mirna, se midió la producción de IL-8 y MCP-1 por la técnica de ELISA. La exacerbada producción de IL-8 (12,7± 1,3 ng/ml) no mostró variaciones por el tratamiento con VIP. Por el contrario, VIP 100 nM incrementó significativamente la producción y secreción de MCP-1 de 0,97± 0,10 a 1,6± 0,10 ng/ml. Al analizar la síntesis de RANTES por citometría de flujo se observó que el VIP también incrementó dicha producción en un 31,7 % (medido como IFM).

Como vimos que efectivamente las células Tb aumentan la migración de los Mo y que el VIP participa en dicho reclutamiento, decidimos evaluar el estado de activación de los mismos. Para ello, Mo aislados de voluntarios sanos como se describió en materiales y métodos fueron incubados en DMEM-F12 2% SFB: i- en ausencia o presencia de VIP, ii- en contacto con el MC o MC (VIP) de las Tb y iii- en co-cultivo directo con las células Tb en ausencia o presencia de VIP. Luego de 20h de incubación, las células se recolectaron y se analizó la expresión de HLA-DR, CD86 Y CD40 en la población CD14+ por citometría de flujo. Los resultados se grafican en la Figura 2.

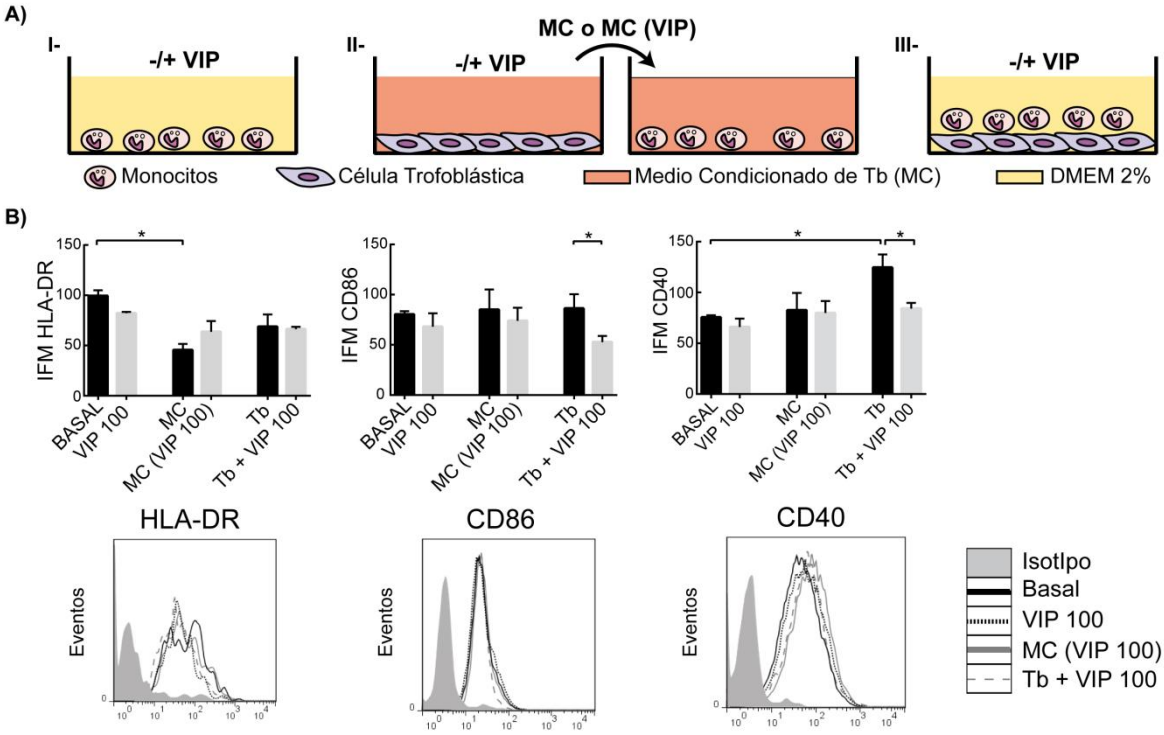



**Figura 2: Expresión de marcadores de activación en Mo y su modulación por los diferentes cultivos.** A) Esquema de los 3 diseños experimentales *in vitro*: I- Se incubaron Mo en DMEM-F12 2% SFB en ausencia o presencia de VIP 100 nM, II- Mo tratados con el MC de Tb normal o preincubadas en VIP 100 nM (MC (VIP 100)) y III- co-cultivo de Mo con Tb en ausencia o presencia de VIP 100 nM. B) Luego de 20 h de incubación se cosecharon las células y se midió por citometría de flujo los marcadores de activación (HLA-DR, CD86 Y CD40) sobre la población CD14 positiva. Los datos están expresados como la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la población CD14 positiva y se representan la X ± ES de 5 experimentos. * P<0,05, por Mann-Whitney. Se muestran histogramas representativos.

La expresión de los marcadores de activación no muestra grandes cambios con el MC y sus variantes, pero sí en respuesta al co-cultivo. Cuando se co-cultivaron en presencia de VIP solo, se observó una disminución en la expresión de CD86 y CD40.

A continuación evaluamos si los Mo presentan diferencias en marcadores anti-inflamatorios y/o pro-inflamatorios, ya que para una correcta placentación y crecimiento fetal se necesita que los Mo se diferencien a macrófagos (MA) en un perfil predominantemente alternativo o M2. Se midieron los marcadores anti-inflamatorios IL-10 y CD39 y pro-inflamatorios IL-12 y TNF-α en la población CD14+ por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 3.

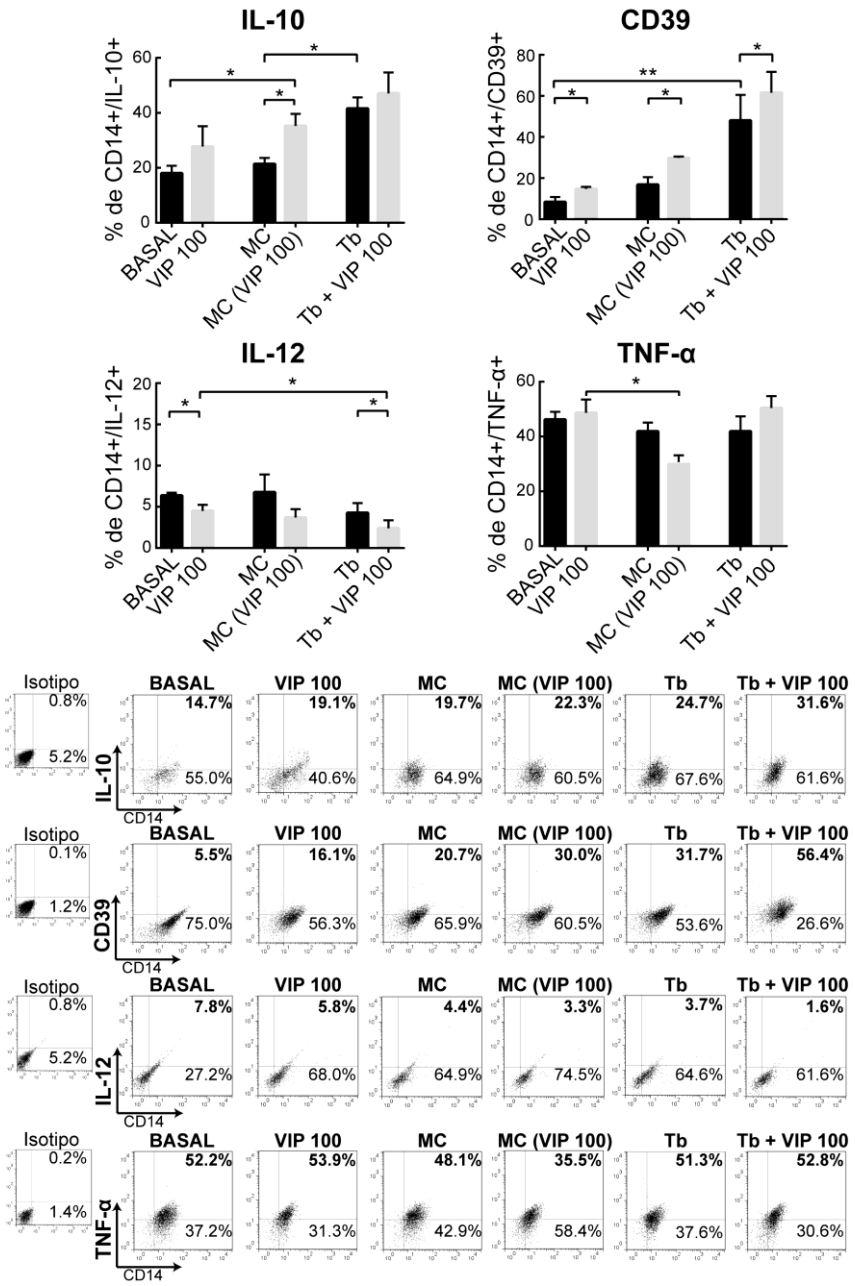



**Fig. 3: Expresión de marcadores anti- y pro-inflamatorios en Mo y su modulación por los diferentes cultivos.** Se usaron los mismos diseños experimentales *in vitro* que en la figura 2: I- Se incubaron Mo en DMEM-F12 2% SFB en ausencia o presencia de VIP 100 nM, II- Mo tratados con el MC de Tb normal o pretratados con VIP 100 nM (MC (VIP 100)) y III- co-cultivo de Mo con Tb en ausencia o presencia de VIP 100 nM. Luego de 20 h se cosecharon las células y se marcaron las moléculas de superficie CD14 y CD39 y luego la marcación intracitoplasmática para IL-10, IL-12 y TNF-α con sus respectivos controles de marcación. Los resultados se expresan como la media ± ES del % de las células doble positivas para CD14 y el marcador medido de al menos 7 experimentos. * P<0,05, ** P<0,01; Mann-Whitney. Se muestran *dot plots* representativos.

Los resultados sugieren que la línea celular Tb de primer trimestre Swan 71 libera factores solubles que modulan el perfil de las células CD14 aumentando los marcadores anti-inflamatorios (IL-10 y CD39)

y disminuyendo las citoquinas pro-inflamatoria (IL-12 y TNF-$\alpha$) o sin cambiar este perfil en algunas condiciones. En el co-cultivo, la modulación sobre los marcadores medidos fue aún más marcada.

Para corroborar los efectos observados del MC en la línea Swan 71 se utilizó otra línea celular Tb de primer trimestre HTR8/SVNeo. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

| | CD14+ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **HLA-DR-IFM** | **CD86-IFM** | **CD40-IFM** | **%CD39** |
| **BASAL** | 94,6±8,4 | 91,2±20,1 | 78,3±1,8 | 11,4±0,80 |
| **VIP 100 nM** | 82,2±12,2 | 64,2±12,2 | 55,1±7,0 | 18,6±0,90 * |
| **MC** | 47,3±16,4 * | 83,5±6,7 | 67,8±22,9 | 21,8±1,0 * |
| **MC (VIP 100 nM)** | 57,7±20,4 | 70,3±4,1 | 57,1±19,6 | 29,9±4,1 **, # |

**Tabla 1: Expresión de marcadores superficiales en Mo y su modulación por los MC de HTR-8/SVneo**. Se aislaron Mo de sangre periférica de voluntarios sanos como se describió en Materiales y Métodos. Los MC provienen de las línea HTR-8/SVneo cultivadas en DMEM-F12 2% SFB en ausencia o presencia VIP 100 nM (MC VIP 100 nM). Los Mo fueron incubados 20 h con VIP o los MC y las células se cosecharon y midieron los marcadores de activación: HLA-DR, CD86 y CD40 y el marcador anti-inflamatorio CD39 por citometría de flujo en la población CD14+. Los resultados se expresan como la media ± ES de IFM o % de las células doble positivas para CD39, de al menos 3 experimentos. * P<0,05 vs. BASAL, ** P<0,01 vs. BASAL y # P<0,05 vs. MC; Mann-Whitney.

Los resultados con la línea HTR-8/SVneo fueron consistentes con lo observado con la línea Swan 71. Estos resultados sustentaron que las células trofoblásticas de primer trimestre no solo reclutan a los Mo, sino que están produciendo mediadores solubles que logran polarizar a las células CD14 hacia un perfil anti-inflamatorio. Además, teniendo en cuenta que las células Tb de placenta humana expresan VIP [162] y en particular que las células Swan 71 y las BeWo derivadas de trofoblasto humano expresan y secretan este péptido[101], hipotetizamos que uno de los factores presentes en el MC podría ser el VIP, participando en Mo en una disminución en IL-12, aumento de CD39 y una tendencia al incremento en IL-10.

## Fagocitosis de células apoptóticas por células CD14+. Mecanismos involucrados y modulación por células trofoblásticas

En condiciones de homeostasis tisular, las células apoptóticas son rápidamente removidas por células fagocíticas para prevenir procesos de necrosis celular y la consecuente respuesta pro-inflamatoria. Como se mencionó previamente, durante la etapa de implantación embrionaria, invasión trofoblástica de la decidua y remodelación vascular, ocurren procesos de apoptosis de células musculares, endoteliales, trofoblásticas entre otras, y su rápida remoción en condiciones inmunosupresoras para favorecer la homeostasis y evitar consecuencias deletéreas para el embarazo. Como observamos una tendencia al incremento de IL-10 en presencia de VIP y un aumento significativo por el MC (VIP 100) en Mo, nos preguntamos si el VIP y/o los distintos MC afectan la fagocitosis de cuerpos apoptóticos. Las células fagocíticas fueron enfrentadas a células apoptóticas (Tb o neutrófilos), previamente marcados con CFSE y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 4.

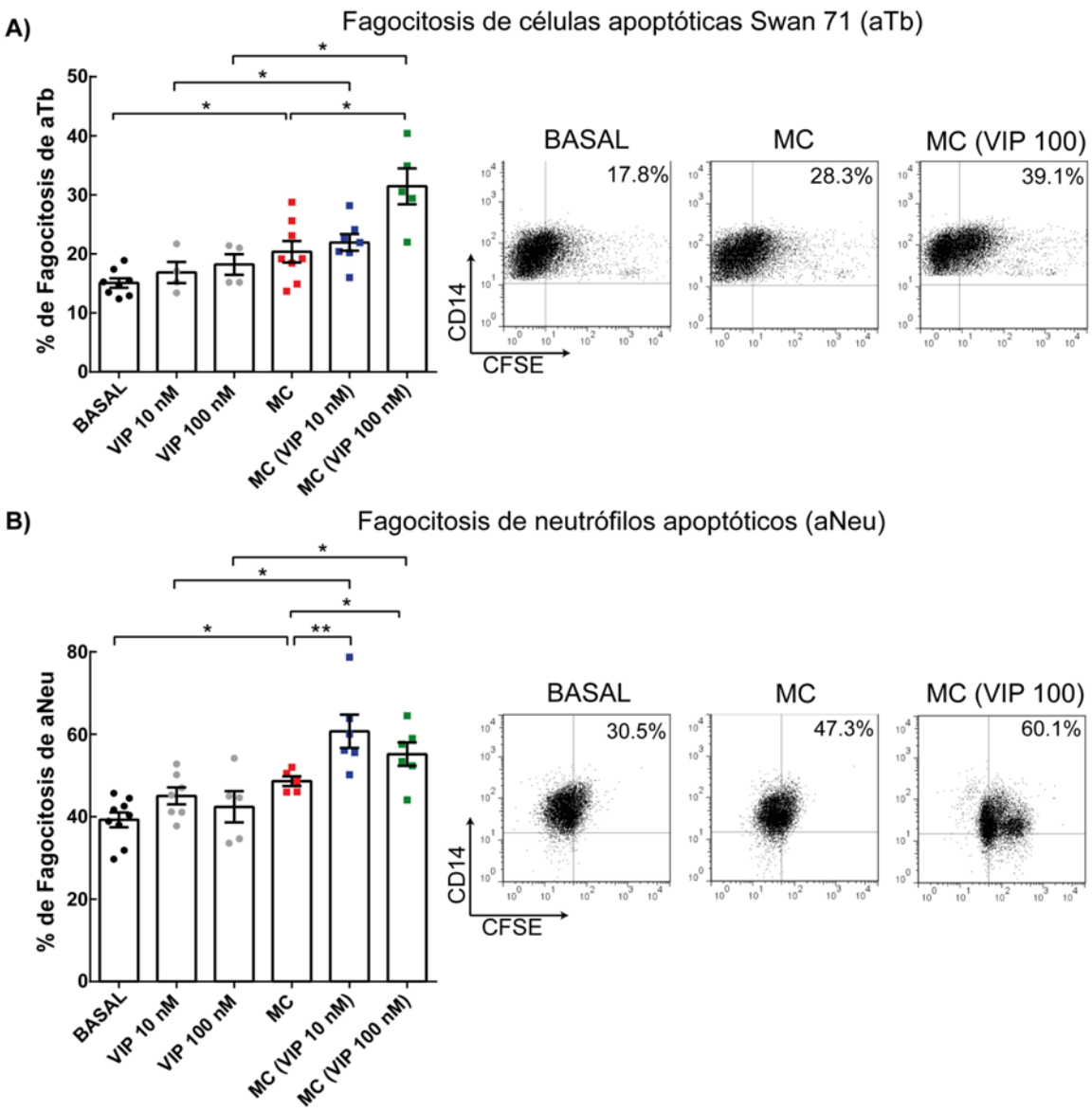



**Figura 4: Fagocitosis de células apoptóticas por fagocitos profesionales. Efecto de VIP y los MC de Tb.** Los Mo se incubaron por 20 h en DMEM-F12 2% SFB ± VIP (10 y 100 nM) o los MC de Tb sin tratar o pre-tratadas con VIP (10 y 100 nM). Las células fagocíticas fueron enfrentadas a células apoptóticas. A) Células Swan 71 apoptóticas (aTb) inducidas a apoptosis 16 h con camptotecina (3 μM) (50 % de apoptosis), luego se cultivaron con fagocitos en una relación 3:1 por 2 h. B) Los neutrófilos apoptóticos (aNeu) autólogos se obtuvieron por apoptosis espontánea (50-60%). Se enfrentaron a las células fagocíticas en una relación 10:1 por un tiempo de 45 min. Los resultados se expresan como la media ± ES del % de las células doble positivas para CD14/CFSE de al menos 7 experimentos. * P<0,05, ** P<0,01; Mann-Whitney. Se muestran *dot plots* representativos.

Si bien el VIP no incrementó la fagocitosis de células apoptóticas, sí lo hizo el MC de Tb y aún más cuando fueron incubados con el MC (VIP 100 nM), en ambos modelos de fagocitosis. Los Mo en condiciones basales enfrentados a distintas células apoptóticas tuvieron distinto porcentaje de fagocitosis. Esta diferencia observada entre los basales

podría atribuirse a una expresión diferencial de señales *find me* e *eat me* en los cuerpos apoptóticos. Además, el control de fagocitosis a 4 °C reveló solo un 2,1±0,20 % de células doble positivas, indicando un mínimo componente de interacciones inespecíficas con las células apoptóticas.

La integrina αvβ3 es una proteína involucrada en numerosos procesos que tienen lugar en la interfase temprana como invasión trofoblástica, angiogénesis, remodelamiento vascular y fagocitosis de cuerpos apoptóticos[140,183–185]. Sobre esta base decidimos evaluar si dicha molécula está involucrada en los diseños estudiados: Por citometría de flujo se midió la expresión de dicha integrina y por microscopía confocal la localización como se muestra en la Figura 5.

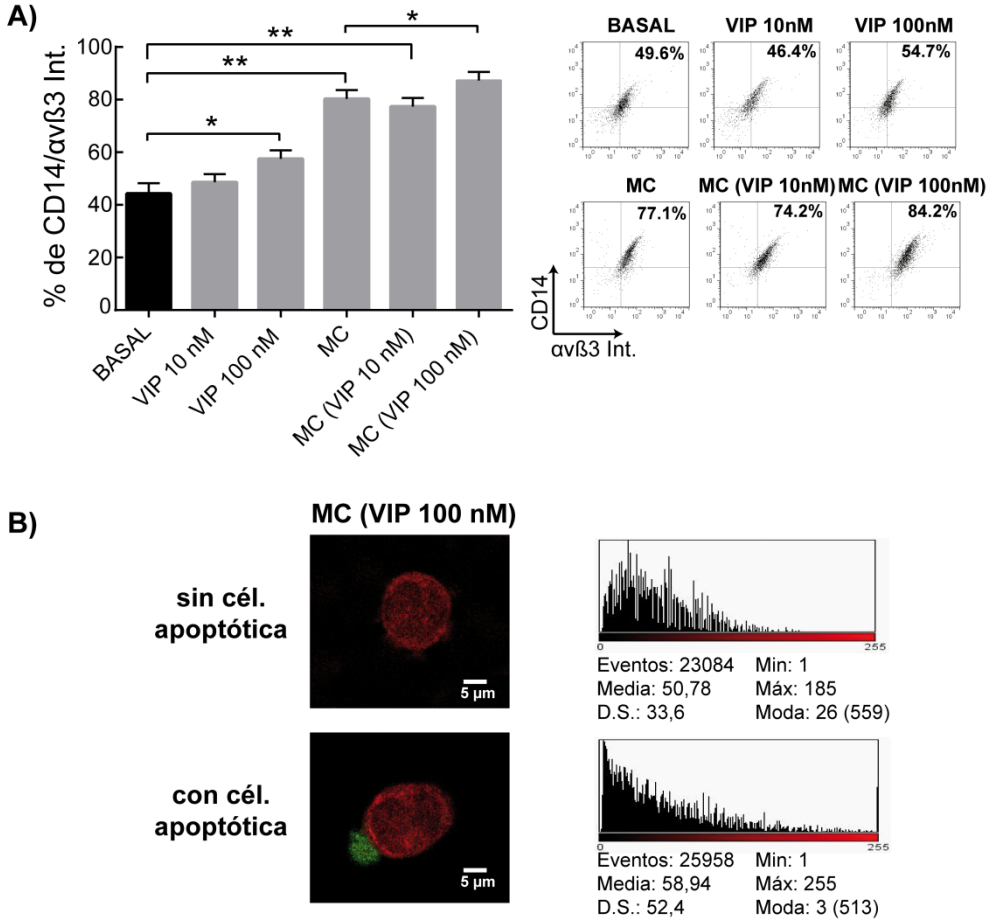



**Figura 5: Expresión y localización de la Integrina αvβ3 y su modulación por el VIP y los MC de Tb**. Se aislaron Mo de sangre periférica de voluntarios sanos como se describió en Materiales y Métodos. Luego de adherirse por 1-2 h se lavaron las células no adherentes y se incubaron por 20 h con DMEM-F12 2% SFB ± VIP (10 y 100 nM) y los MC de Tb obtenidas una vez tratadas ± VIP (10 y 100 nM). A) Las células fagocíticas fueron cosechadas y la expresión de la integrina analizada por citometría de flujo. Los resultados se expresan como

la media ± ES del % de las células doble positivas para CD14/αvβ3 integrina de al menos 3 experimentos. * P<0,05, ** P<0,01; Mann-Whitney. Se muestran *dot plots* representativos. B) Los fagocitos luego de la incubación con MC (VIP 100 nM) fueron marcados para evaluar la integrina αvβ3 por confocal. Se muestran microfotografías de las células CD14+ positivas para la integrina (rojo) en ausencia o presencia de células apoptóticas (verde). Al lado se muestra una cuantificación de la fluorescencia de la integrina en la membrana de los fagocitos obtenidas del programa Image J.

Los resultados demuestran que la integrina αvβ3 se expresa en las células fagocíticas CD14+ y que su expresión aumentó por VIP 100 nM y por el MC de Tb. El mayor incremento de la expresión de esta proteína se alcanzó en aquellas células que habían sido incubadas con el MC (VIP 100 nM). Además, la integrina presentó una distribución homogénea en la membrana del fagocito en ausencia de células apoptóticas, mientras que en presencia de cuerpos apoptóticos se relocalizó en puntos de contacto con este, así mismo generando un aumento en el desvío estándar (D.S.) del brillo (pérdida de distribución homogénea) como se observa en la microfotografía.

La integrina αvβ3 tiene múltiples ligandos, uno de ellos es la Trombospondina 1 (TSP-1) con un papel relevante en la interfase materno-fetal[186,187]. En ese marco nos preguntamos si las células Tb están produciendo TSP-1, si ésta es regulada por VIP y si participa en la fagocitosis de células apoptóticas. Para la medición de la TSP-1 se cultivaron las células Swan 71 en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de VIP, se cosecharon y analizó la expresión de la TSP-1 por RT-qPCR. Además, para ver si TSP-1 está involucrada en la remoción de células apoptóticas se realizó el ensayo de fagocitosis en presencia de un anticuerpo neutralizante de TSP-1 y los resultados se muestran en la Figura 6.

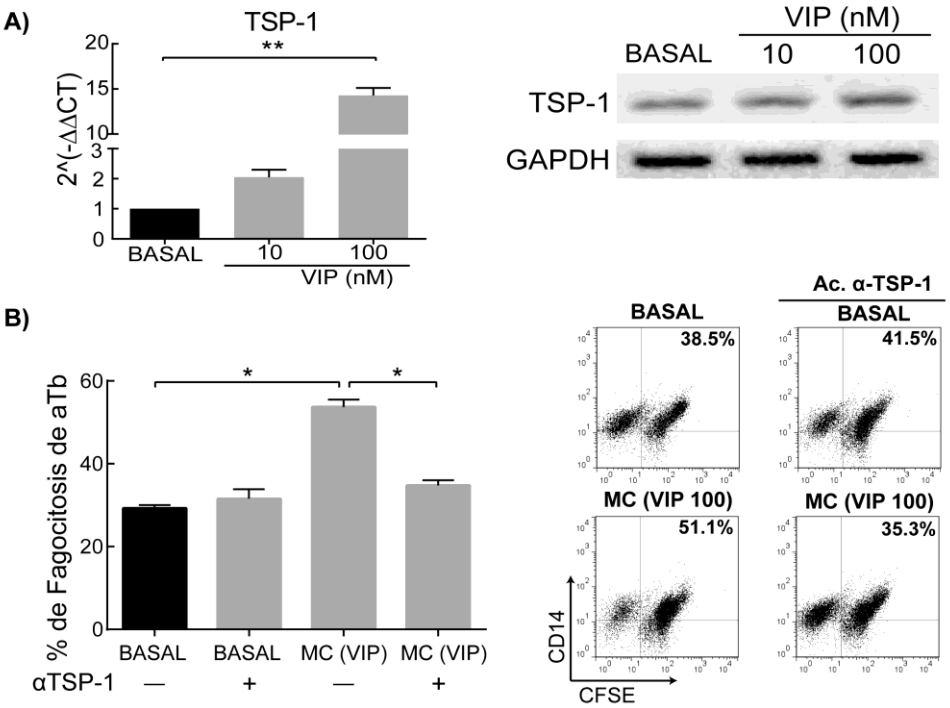



**Figura 6: Expresión de TSP-1 en Swan 71, su modulación por VIP. Ensayo de inmunobloqueo de TSP-1 en la fagocitosis por células CD14 positivas**. A) Las células Swan 71 fueron cultivadas en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de VIP (10 y 100 nM). Se cosecharon a las 24 h y se analizó la expresión de TSP-1 por RT-qPCR. Los resultados se expresan como la media ± ES de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ de 5 ensayos. ** P<0,01; Mann-Whitney. Se muestra un gel representativo. B) Los fagocitos y las Swan 71 apoptóticas se obtuvieron como previamente. El anticuerpo anti-TSP-1 se agregó en el medio de cultivo de las células apoptóticas y los fagocitos 15 min previos al enfrentamiento. Luego de 2 h en presencia del anticuerpo se analizó el porcentaje de fagocitosis como % de dobles positivas CD14/CFSE. Los resultados se expresan como la media ± ES de las células dobles positivas CD14/CFSE de al menos 3 experimentos. * P<0,05; Mann-Whitney. Se muestran *dot plots* representativos.

Las células Tb expresan TSP-1 y su expresión aumentó en forma dependiente de la concentración de VIP. La concentración de VIP que dio la máxima expresión de TSP-1 coincidió con la que indujo mayor expresión de la integrina αvβ3 en las células fagocíticas. El ensayo de inmunobloqueo de TSP-1 reveló que esta proteína está involucrada en la formación de la sinapsis fagocítica para la remoción de células apoptóticas. Además, cuando se realizó el mismo ensayo con un anticuerpo anti-MFG-E8, proteína involucrada en el portal de fagocitosis que también es ligando de la integrina αvβ3, nuevamente se inhibió significativamente la fagocitosis inducida por el MC (VIP 100 nM) de 52,9±2,3 a 39,5±2,3 en presencia del anticuerpo. Estos

resultados sugieren que el mecanismo TSP-1-integrina αvβ3 participa en el *clearance* de células apoptóticas por fagocitosis en la interfase materno-placentaria.

## Silenciamiento del VIP endógeno en las células trofoblásticas y su efecto sobre las células CD14+

Para corroborar el efecto del VIP endógeno en las células Tb silenciamos su expresión mediante un siRNA específico. La línea Swan 71 fue transfectada con lipofectamina RNAimax y los respectivos siRNA scramble (Scrl) o siVIP. A las 72 h se observó una reducción mayor al 50% en la producción de la proteína por Western Blot. Las células deficientes en la síntesis de VIP se emplearon para estudiar la interacción con los Mo midiendo la expresión de los marcadores IL-10, CD39, IL-12, CD16 y CD86 en la población CD14 por citometría de flujo. El medio condicionado de las células trofoblásticas deficientes en VIP se realizó como se describió previamente. Los resultados se muestran en la Figura 7.

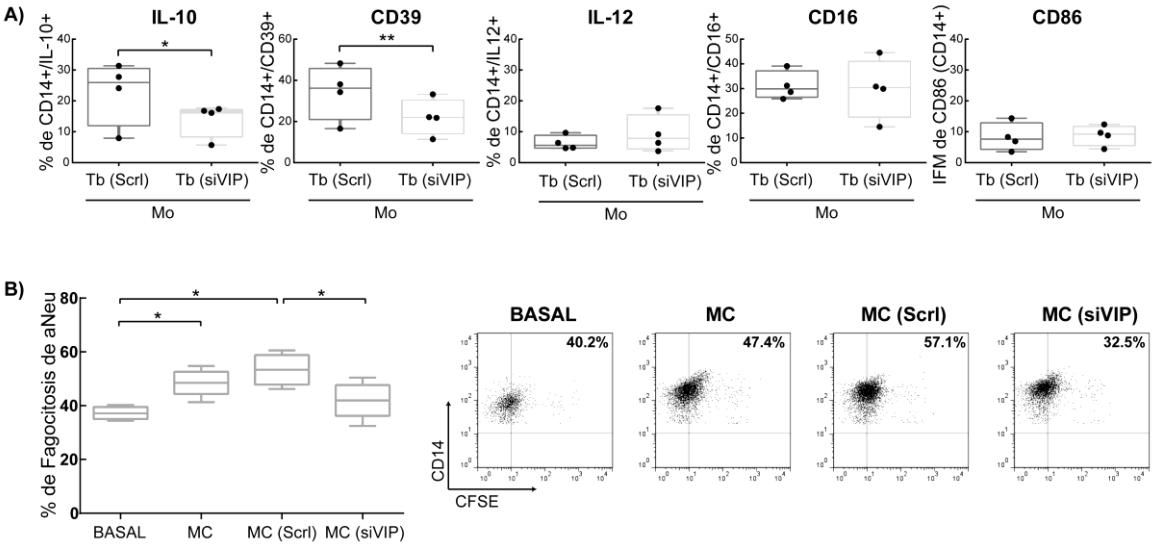



**Figura 7: Silenciamiento del VIP endógeno en las células Swan 71 y su efecto en el perfil de activación y fagocitosis en células CD14+**. A) Mo aislados de voluntarios sanos como se mencionó previamente se co-cultivaron con células Swan 71 transfectadas con Scrl o siVIP en DMEM-F12 10% SFB 72 h luego de su transfección. Después de 24 h de co-cultivo se recuperaron los Mo y se analizaron marcadores de perfil por citometría de flujo. Se

representan los resultados como la media± ES del % de doble positivas de los experimentos mostrados. *P<0,05, ** P<0,01; Mann-Whitney. B) Los fagocitos fueron pretratados 20 h con DMEM-F12 10% SFB, MC, MC (Scrl) o MC (siVIP) y los neutrófilos apoptóticos se obtuvieron como previamente. Luego de 45 min se determinó el % de fagocitosis como % de células CD14/CFSE. Los resultados se expresan como la media ± ES de las células CD14/CFSE de al menos 5 experimentos. * P<0,05; Mann-Whitney. Se muestran *dot plots* representativos.

Se observó que los Mo co-cultivadas con las células Swan 71 deficientes en VIP presentaban una reducción en la expresión de los marcadores anti-inflamatorios IL-10 y CD39 mientras que no estaban modificados los marcadores asociados a un perfil pro-inflamatorio como IL-12, CD86 y CD16. Además, el ensayo de fagocitosis de células apoptóticas reveló que aquellas células que fueron cultivadas 20 h con los MC de las células Tb silenciadas en la expresión de VIP, presentaban una reducida fagocitosis de células apoptóticas comparadas con aquellas transfectadas con el siRNA Scrl usadas como control.

En conjunto, estos resultados indican que el VIP modula el perfil fenotípico de los Mo y su función fagocítica de cuerpos apoptóticos en forma directa o a través de su efecto en las células trofoblásticas. Los efectos observados son consistentes con la activación de mecanismos parácrinos o autócrinos sobre las células trofoblásticas de primer trimestre que favorecen el reclutamiento de Mo, su polarización hacia un perfil anti-inflamatorio e inducen la remoción de células apoptóticas por un mecanismo dependiente de TSP-1-Integrina αvβ3.

# CAPÍTULO 2
# Efectos del VIP y los MC de células trofoblásticas sobre macrófagos

## 1- Efectos sobre macrófagos diferenciados con GM-CSF

Los macrófagos (MA) son células plásticas que cambian su perfil fenotípico y funcional dependiendo de los estímulos del micro-ambiente en que son activados. Los MA pueden ser diferenciados *in vitro* a partir de Mo de sangre periférica. Cuando el estímulo de diferenciación es el factor de crecimiento GM-CSF su perfil de activación adquiere ciertas características de un perfil M1, mientras que cuando se diferencian con M-CSF se observa un perfil comparable al perfil alternativo o M2[72,73]. Basados en que las células trofoblásticas sintetizan y liberan numerosos factores que modulan la función de los macrófagos en la interfase materno-fetal, evaluamos si los MA diferenciados con GM-CSF modifican su perfil fenotípico y funcional al ser incubados con VIP o con los MC de Tb. Para ello, los Mo aislados de voluntarios sanos se diferenciaron por 5 días con GM-CSF en RPMI 10% SFB y luego fueron incubados con VIP 100 nM o los MC de Tb por 20 h.

### 1.1- Perfil de activación de los MA

Se analizaron los marcadores moleculares: CD80, CD86, CD40, IL-10 e IL-12 en la población CD14+ por citometría de flujo como se describió y profundizó en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 8.

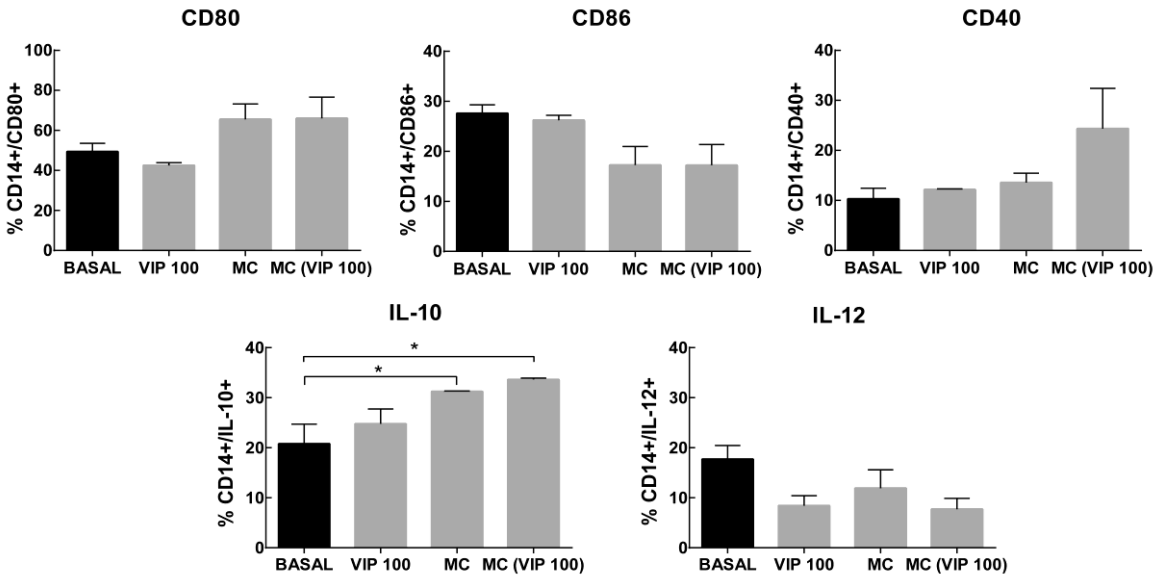



**Figura 8: Perfil funcional de MA diferenciados con GM-CSF y su regulación por VIP y los MC de células Tb**. Los Mo aislados de PBMCs se diferenciaron por 5 días en RPMI 10% SFB con GM-CSF (100 ng/ml). Luego se incubaron por 20 h con DMEM-F12 2% SFB ± VIP (100 nM) o MC de Tb pretradadas o no con VIP 100 nM. Las células se cosecharon y se realizaron marcaciones de superficie con CD14, CD80, CD86 y CD40 e intracitoplasmática IL-10 e IL-12, se analizaron por citometría de flujo. Se representa la media ± ES del % de doble positivas de 6 experimentos independientes. *P<0,05; Mann-Whitney.

No se observaron cambios en la expresión de las moléculas coestimulatorias y de activación, CD80, CD86 y CD40, respectivamente. Por otro lado, sí se observó un aumento significativo en la citoquina anti-inflamatoria IL-10 por los distintos MC de Tb y una tendencia a la disminución en la citoquina pro-inflamatoria IL-12.

## 1.2 Fagocitosis de cuerpos apoptóticos

Se decidió evaluar fagocitosis de cuerpos apoptóticos por MA (GM-CSF) empleando células trofoblásticas inducidas a apoptosis con camptotecina y marcadas con CFSE (aTb). Los MA (GM-CSF) fueron incubados como se describió previamente con VIP o los distintos MC de Tb y se los enfrentó con aTb en una relación 1:2. Los resultados se muestran en la Figura 9.

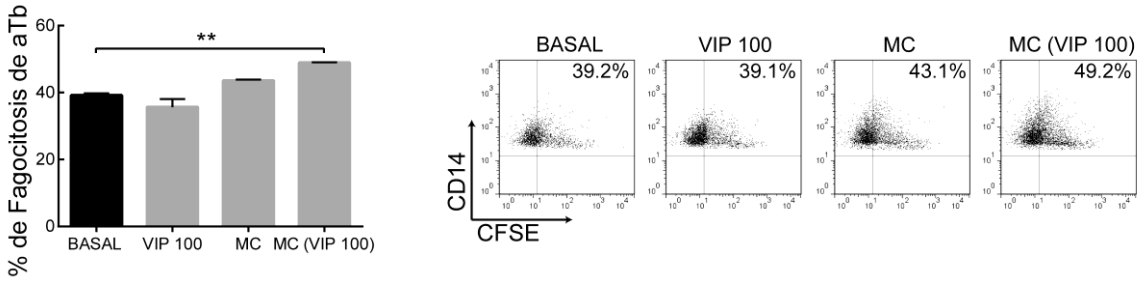



**Figura 9: Fagocitosis de células apoptóticas por MA (GM-CSF) y su regulación por VIP y MC de células Tb**. Los MA y las células Swan 71 apoptóticas (CFSE+) se obtuvieron como se describe en materiales y métodos. Después de 2 h de cultivo en una relación MA-aTb 1:2, se determinó el % de fagocitosis expresado como la media ± ES del % de dobles positivas CD14/CFSE de al menos 5 experimentos independientes. ** P<0,01; Mann-Whitney. Se muestran *dot plots* representativos.

La fagocitosis de aTb por parte de los MA (GM-CSF) es el doble comparado con Mo no diferenciados, mostrado en la figura 3. Aun así, el MC (VIP 100 nM) incrementó la capacidad de los MA (GM-CSF) de fagocitar cuerpos apoptóticos.

## 1.3- Producción de mediadores de reparación tisular

Durante la formación de la interfase materno-placentaria tiene lugar una intensa apoptosis de células de músculo liso vascular, endoteliales, trofoblásticas, entre otras, las cuales son rápidamente removidas por fagocitos profesionales como los macrófagos que, a su vez, contribuyen con liberación de factores de reparación tisular[74,131]. Para analizar la producción de estos factores, los MA (GM-CSF) fueron estudiados en un ensayo de cierre de la herida sobre la línea Swan 71. Los resultados se muestran en la Figura 10.

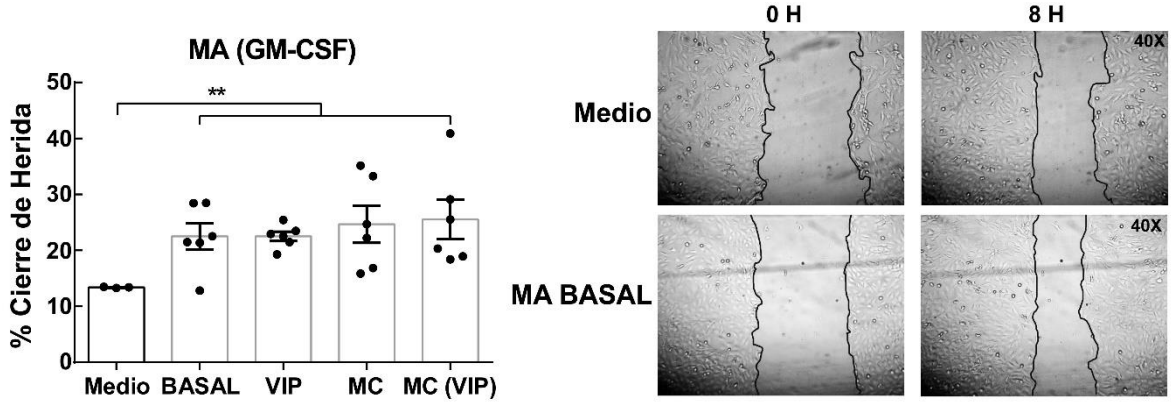



**Figura 10: Ensayo de cierre de la herida y efecto de los MA (GM-CSF) tratados con VIP y los MC de Tb**. Los MA se obtuvieron como se describe en Materiales y Métodos.

Luego de su diferenciación con GM-CSF se los estimuló con VIP 100 nM, MC o MC (VIP 100) por 20 h. Los SN se tomaron y colocaron en el ensayo de la herida sobre las células Tb Swan 71 y a las 8 h se evaluó el % de cierre de la misma. Los resultados se expresan como la media ± ES del % de cierre de herida de 6 experimentos. ** P<0,01; Mann-Whitney. En el panel derecho se muestran microfotografías representativas a tiempo 0 y 8 h en presencia de DMEM F-12 2% SFB y MA BASAL (40X).

Los MA (GM-CSF) condicionados con VIP o con los distintos MC no aumentaron la capacidad de cierre de la herida con respecto a MA (GM-CSF) sin condicionar. Si bien los mediadores liberados al sobrenadante indujeron un aumento con respecto al medio con 2% SFB, no se vieron diferencias en la velocidad de cierre de la herida entre las distintas condiciones de estímulo con VIP o MC.

Los Mo son reclutados y diferenciados en un ambiente regulado por el trofoblasto y se propone que durante su condicionamiento con estas células, los Mo presentan una ventana de plasticidad que en los MA ya diferenciados no se observa. Es por eso que evaluamos si los Mo y los MA (GM-CSF) presentan diferencias en la liberación de mediadores solubles que ayuden a la reparación tisular, y si esto se ve representado en el ensayo del cierre de la herida de manera dependiente del VIP. Los resultados se muestran en la Figura 11.

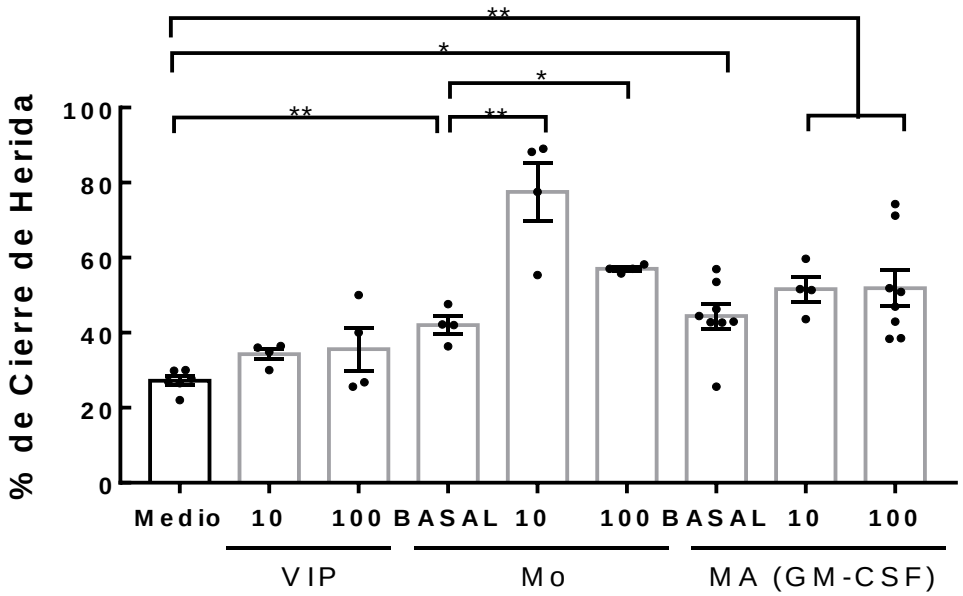



**Figura 11: Efecto de los Mo y MA (GM-CSF) condicionados con VIP en el ensayo de cierre de herida**. Los Mo y MA (GM-CSF) se obtuvieron como previamente se describió. Luego ambas células se estimularon con 10 o 100 nM de VIP por 20 h. Las células Tb Swan

71 se cultivaron con los sobrenadantes durante 8 h y se evaluó el % de cierre. Los resultados se expresan como la media ± ES del % de cierre de la herida de al menos 4 experimentos. * P<0,05 y ** P<0,01; Mann-Whitney.

Tanto los Mo como los MA (GM-CSF) sin condicionar con VIP presentan similar capacidad de cierre de la herida y mayor que el VIP solo. Los Mo tratados con VIP 10 y 100 nM fueron capaces de aumentar el cierre de la herida, a diferencia de los MA (GM-CSF) Este resultado sugiere un rol predominante de los Mo en la reparación tisular durante su diferenciación, y que el VIP podría ser uno de los factores que favorece este efecto.

Estos resultados en conjunto sugieren que el MC y aún más el MC (VIP 100 nM) promueven un aumento en marcadores y funciones asociados a un perfil de activación alternativo o M2. Este perfil está caracterizado por aumento de la producción de IL-10 y la fagocitosis de cuerpos apoptóticos en los MA diferenciados con GM-CSF, y que en funciones como la reparación tisular los Mo tendrían una mayor plasticidad para ser modulados por el VIP.

## 2- Diferencias entre MA (M-CSF) y MA (GM-CSF)

Teniendo en cuenta que los MA que se encuentran en la decidua normal expresan un perfil alternativo M2 predominante, decidimos evaluar si los MA diferenciados *in vitro* con M-CSF presentan características similares a los MA de la placenta, y su modulación por VIP y los MC de células Tb. El protocolo de diferenciación fue similar al del factor GM-CSF, se empleó M-CSF durante 5 d en RPMI 10% y luego 20 h con VIP o los MC de Tb.

## 2.1- Expresión diferencial de marcadores

### 2.1.i- Factores de transcripción

El gen *Kruppel like factor 4* (KLF-4) es un factor de transcripción maestro involucrado en numerosos procesos como remodelamiento tisular, angiogénesis, proliferación y en especial asociado a un MA con fenotipo M2[76,77]. Por otro lado, el factor de transcripción

*Interferon regulatory factor 5* (IRF-5) es utilizado para definir el tipo de activación del MA. Este factor de transcripción está involucrado en la respuesta M1 de los MA y en procesos de división celular, apoptosis y modula la respuesta pro-inflamatoria del MA[78]. Es por esto que decidimos evaluar si estos marcadores están diferencialmente expresados dependiendo de la diferenciación y los diferentes estímulos recibidos post diferenciación. Los MA diferenciados, luego de los estímulos del VIP y los MC de Tb, se cosecharon y se midió la expresión de estos genes por RT-PCR. Los resultados se muestran en la Figura 12.

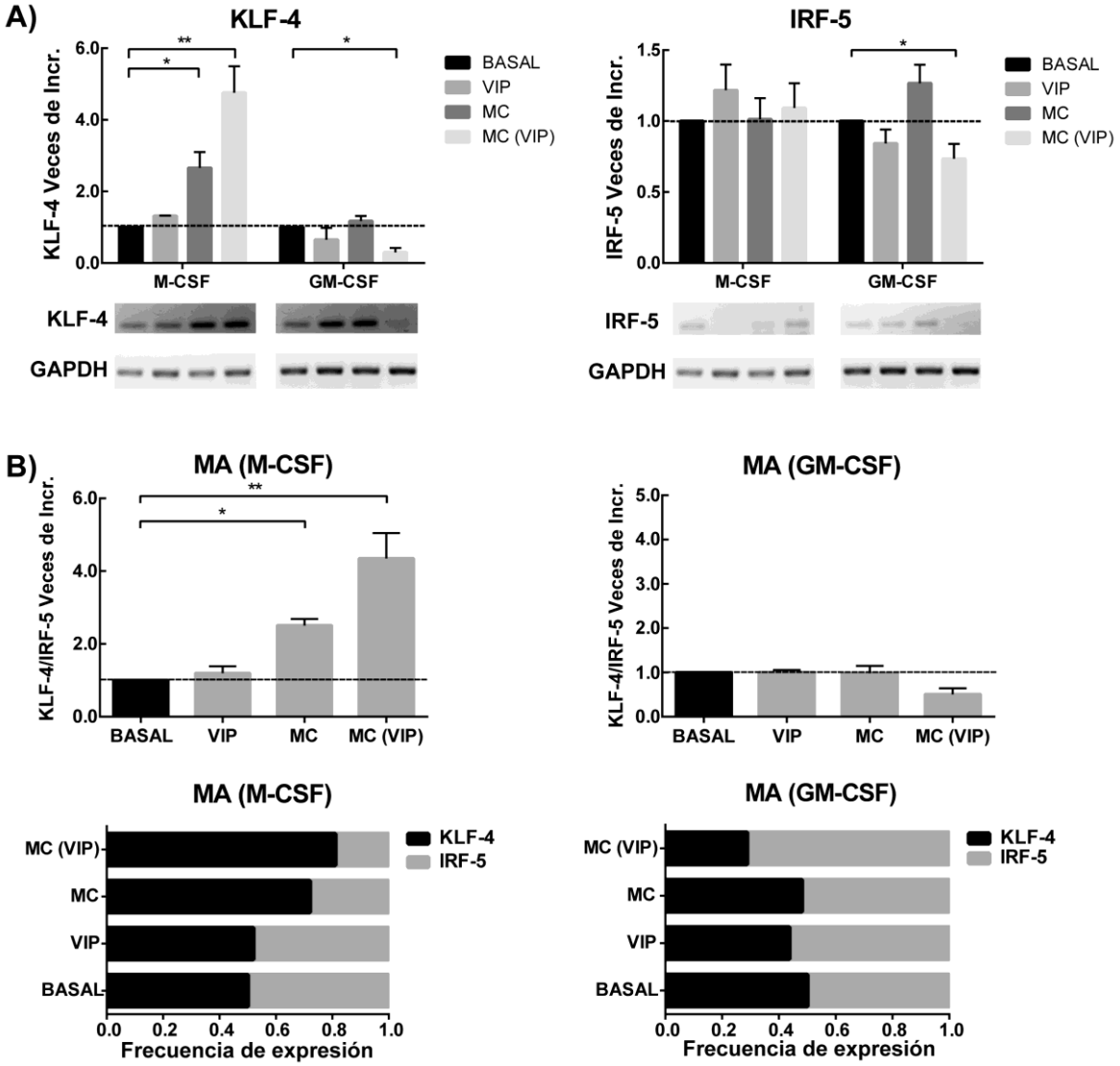



**Figura 12: Expresión de factores de transcripción KLF-4 e IRF-5 en MA diferenciados por M-CSF y GM-CSF**. Los MA (M-CSF y GM-CSF) se obtuvieron como se describió en materiales y métodos. Luego ambas células se estimularon con 100 nM de VIP o los distintos MC de Tb, por 20 h. Se cosecharon las células y se midió por RT-PCR la

expresión de KLF-4 e IRF-5. A) Los resultados se expresan como la media ± ES de veces de incremento en la expresión de los factores de transcripción (KLF-4 e IRF-5) de al menos 4 experimentos. * P<0,05 y ** P<0,01, por ANOVA de un factor y Dunn's post test. B). Los resultados se expresan como la media ± ES de la relación KLF-4/IRF-5 de al menos 4 experimentos. * P<0,05 y ** P<0,01, por ANOVA de un factor y Dunn's post test. Se muestra el gráfico de frecuencia de expresión de ambos genes.

Los MA (M-CSF) al ser estimulados por los MC de Tb, aumentaron la expresión del factor de transcripción KLF-4 mientras que no se observaron cambios en el gen IRF-5. Por otro lado, los MA (GM-CSF) demostraron cambios en la expresión de los genes solo cuando fueron estimulados con el MC (VIP), tanto para KLF-4 como IRF-5, disminuyendo su expresión. La relación KLF-4/IRF-5 aumentó en los MA (M-CSF) estimulados con MC y aún más en los estimulados con el MC (VIP), mientras que dicha relación no cambió en los MA (GM-CSF).

Estos resultados sugieren que los MA (M-CSF) condicionados con MC de Tb cambiaron la expresión de marcadores hacia un perfil asociado al M2. Por otro lado, en los MA (GM-CSF) si bien disminuye la expresión del factor de transcripción KLF-4, también lo hace IRF-5. Estos resultados sugieren que los MA (GM-CSF) estarían en un estado de activación intermedio entre M1 y M2, aunque se necesita una exploración más exhaustiva de los marcadores que se modifican frente a estos estímulos para concluir respecto de esta modulación.

### 2.1.ii- Expresión de VEGF-A

Se ha propuesto que la expresión de VEGF por los MA se asocia a un perfil de activación M2[72,188]. Es por eso que evaluamos por RT-PCR su expresión en los MA diferenciados por M-CSF y GM-CSF. Los resultados se muestran en la Figura 13.

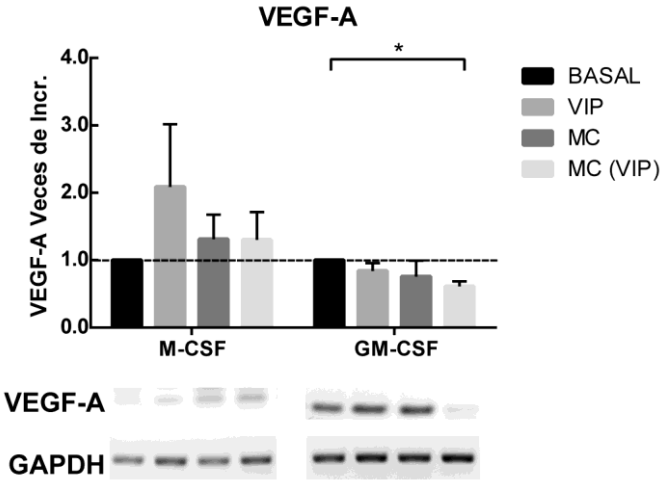



**Figura 13: Expresión de VEGF-A en MA diferenciados por M-CSF y GM-CSF**. Los MA (M-CSF y GM-CSF) se obtuvieron como previamente se mencionó y profundizó en Materiales y Métodos. Luego ambas poblaciones celulares se estimularon con 100 nM de VIP o los distintos MC de Tb, por 20 h. Se cosecharon las células y se midió por RT-PCR la expresión de VEGF. Los resultados se expresan como la media ± ES de veces de incremento de la expresión del gen de al menos 4 experimentos. * P<0,05 y ** P<0,01, por ANOVA, post test de Dan. Se muestran geles representativos.

En los MA (M-CSF) no se observaron cambios en la expresión de este gen pro-angiogénico por ninguno de los estímulos. Por otro lado, en los MA (GM-CSF) solo se observó una disminución de VEGF cuando fueron tratados con MC (VIP).

## 2.2- Producción de IL-10

En los sobrenadantes de los MA (M-CSF) y MA (GM-CSF) se evaluó la producción de la citoquina IL-10 por ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 14.

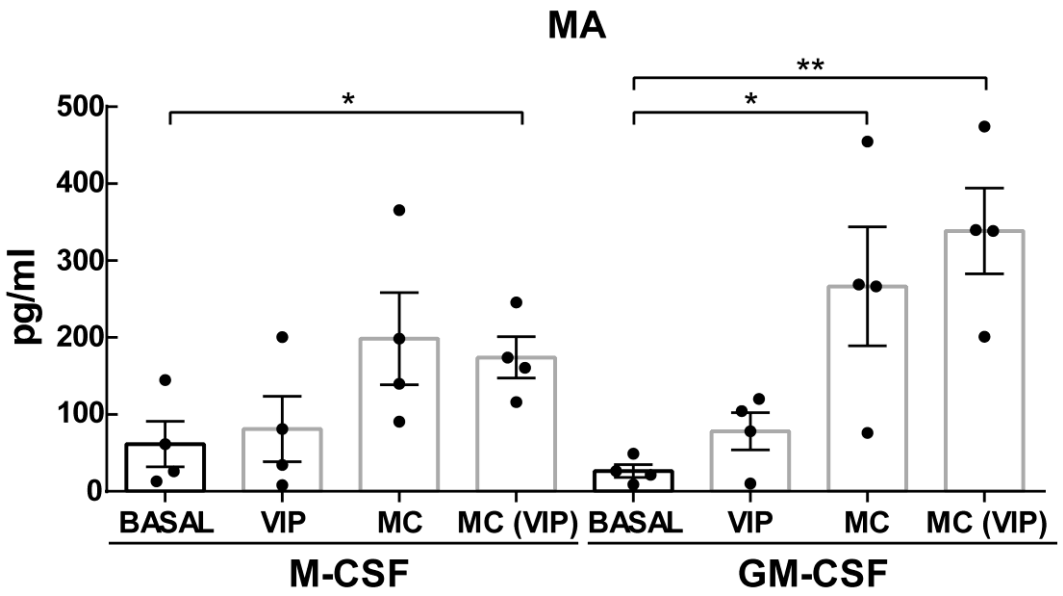



**Figura 14: Producción de IL-10 por MA diferenciados por M-CSF y GM-CSF**. En los sobrenadantes de los MA M-CSF y GM-CSF, estimulados con 100 nM de VIP o los distintos MC de Tb por 20 h, se cuantificó la producción de IL-10 por ELISA. Los resultados se expresan como la media ± ES de pg/ml. * P<0,05 y **P<0,01; ANOVA, post test de Dunn.

En los MA (M-CSF) se observó una tendencia al incremento en la producción y liberación de IL-10 cuando fueron estimulados con los MC de Tb y un aumento significativo cuando fueron estimulados con el MC (VIP). En paralelo, cuando los monocitos de los mismos dadores fueron diferenciados a MA (GM-CSF) por el MC y en especial por el MC (VIP) aumentó la secreción de IL-10 en valores mayores que los alcanzados por los MA (M-CSF) (P<0,01).

Estos resultados sugieren que si bien los MA (M-CSF) se comportan como MA de perfil de activación M2, los MA (GM-CSF) condicionados con el estímulo del CM (VIP) de Tb adquieren un estado intermedio entre M1 y M2, gran productor de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, con capacidad fagocítica de cuerpos apoptóticos y con producción de factores de reparación tisular, todas características descriptas para los macrófagos presentes en la decidua en el embarazo normal.

# CAPÍTULO 3
# Detección y estudio del VIP en placentas humanas de primer trimestre y en leucocitos maternos

## Expresión de VIP en placentas humanas de primer trimestre. Papel en la migración de células trofoblásticas

En el día 15 post-concepción la capa de células citotrofoblásticas alcanza la zona más externa y multinucleada de la placenta, el sinciciotrofoblasto. Este último ha invadido el endometrio decidualizado materno. A partir de ese momento, las células trofoblásticas extravellosas (EVT) se desprenden de las columnas para invadir distintas estructuras en el endometrio y adaptarlo para dar lugar a la placentación y el crecimiento fetal. La posibilidad de acceder a estas muestras de placentas de primer trimestre, en el marco de una colaboración con el Profesor John Aplin de la Universidad de Manchester en el Reino Unido, nos dio la oportunidad de explorar distintos aspectos de la fisiología placentaria en relación al efecto del VIP como modulador de la función trofoblástica y de los leucocitos deciduales, como también investigar su posible papel como mediador endógeno. En primer lugar nos preguntamos si en placentas de 5-9 semanas de gestación, las células Tb expresan VIP y si la asociación de esta expresión con características funcionales de los fenotipos de células trofoblásticas como la migración o invasividad. La obtención y estudio de las muestras está comprendido y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Manchester y se dispone del consentimiento de las pacientes. Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica sobre dichas muestras como se indicó en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 15.

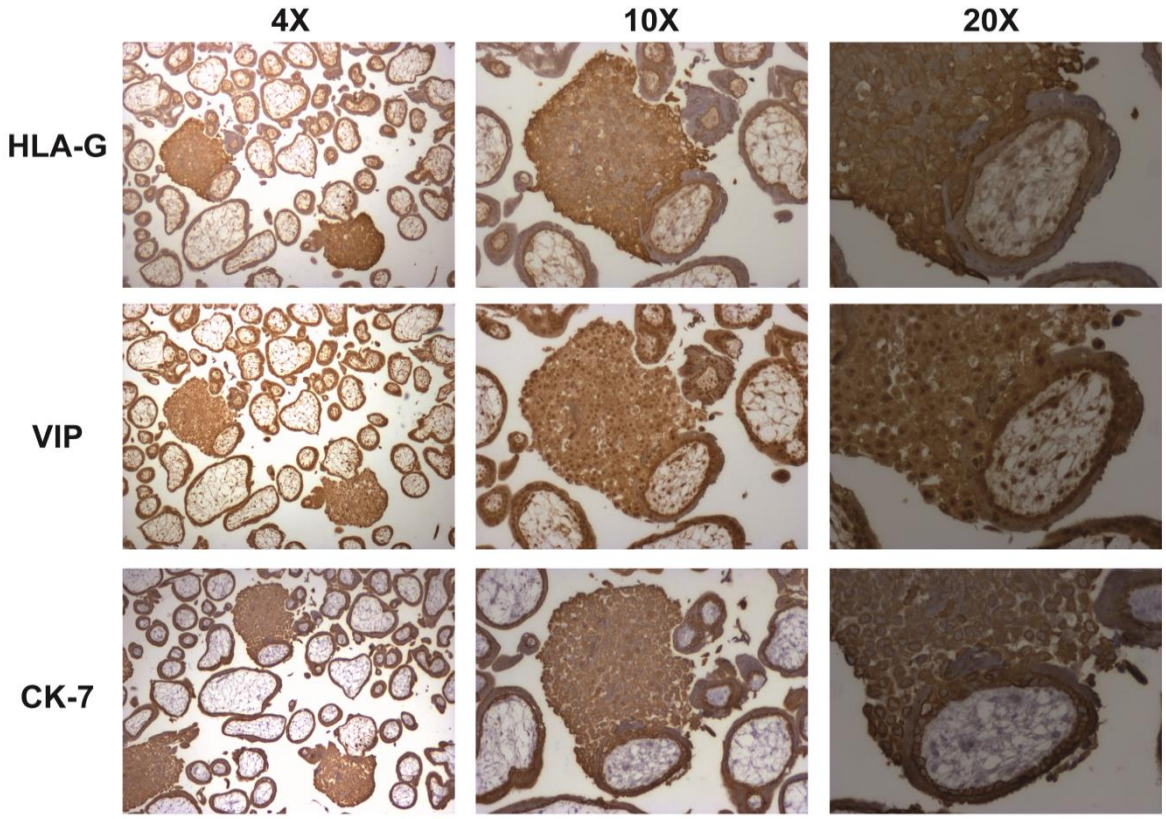



**Figura 15: Inmunomarcación de HLA-G, CK-7 y VIP en placentas humanas entre 5-9 semanas de gestación**. Las muestras se procesaron y marcaron como se describió previamente en Materiales y Métodos. Para la marcación se usaron anticuerpos α-HLA-G (1/100) y α-citoqueratina 7 (CK-7) y α-VIP 1/200 en cortes seriados de 5 µm de distancia. Las fotografías ilustran lo obtenido en al menos 8 placentas. El color marrón indica la marca específica del anticuerpo y se realizó una tinción de contraste con Hematoxilina para los núcleos.

Las células Tb se identificaron con el marcador CK-7. Se pudo corroborar que tanto el sinciciotrofoblasto como el citotrofoblasto expresó VIP y además, las células de las columnas vellosas que son HLA-G positivas también lo fueron para VIP. Estas últimas, están constituidas por las EVT que se desprenderán de la placenta, disminuyendo su proliferación, pero que adquieren gran capacidad migratoria e invasiva en el endometrio decidualizado. Es por esto que nos preguntamos si el VIP está involucrado en la migración e invasión de las células EVT: Se aislaron pequeños explantos de placenta de primer trimestre y se colocaron en una gota de colágeno I en DMEM-F12 10% SFB. Aquellos explantos que se adhirieron al colágeno se incubaron con distintas concentraciones de VIP y se midió el área de

migración e invasión de células Tb a la cual se le llama área de *outgrowth*. Los resultados se muestran en la Figura 16.

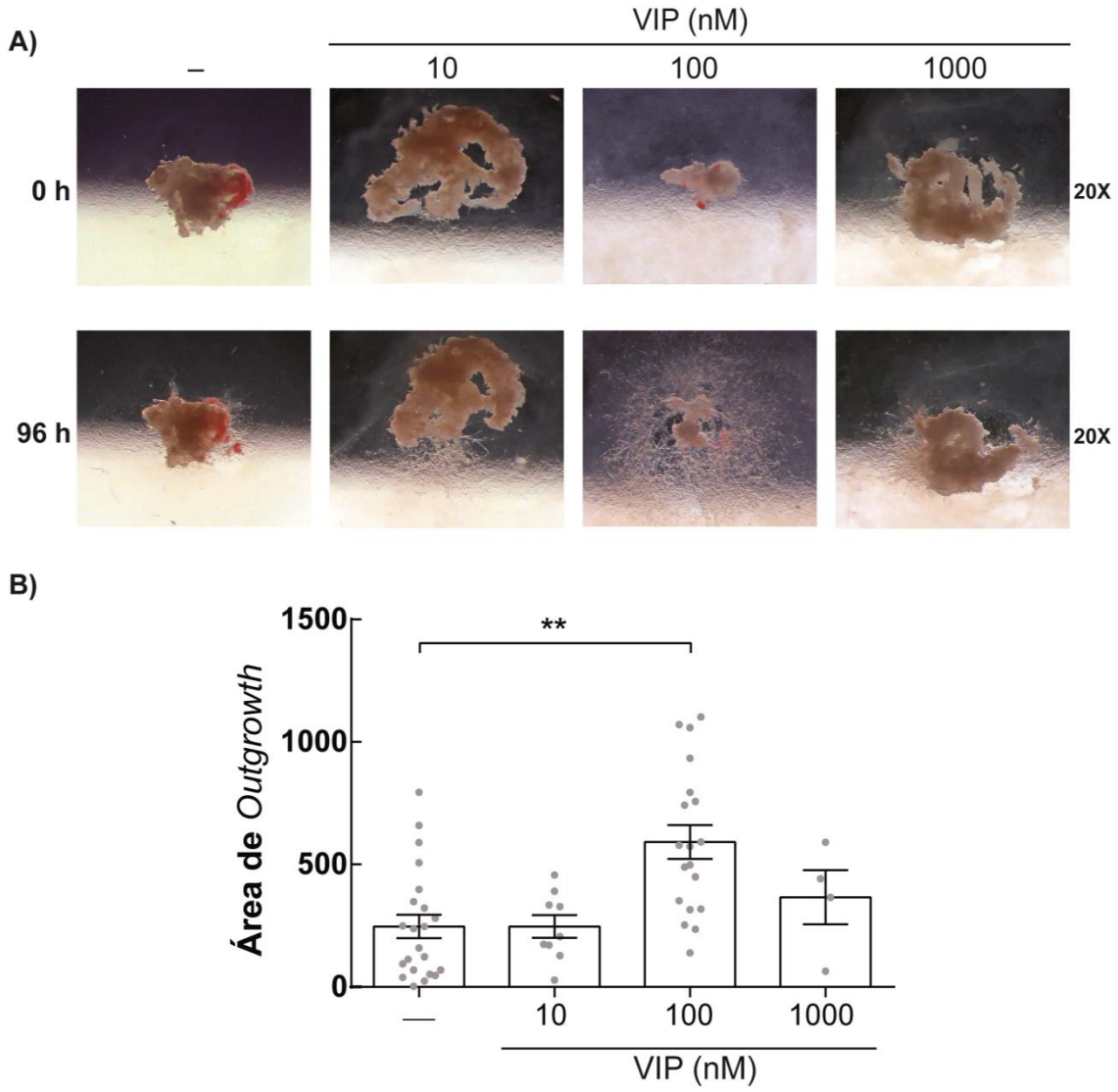



**Figura 16: Efectos del VIP en la migración de células EVT en placentas de primer trimestre**. A) Explantos aislados y colocados en la gota de colágeno I se los dejó crecer hasta 96 h en DMEM-F12 10% SFB en presencia o no de concentraciones de VIP (10, 100 y 1000 nM). Se muestran fotografías de al menos 14 placentas diferentes. B) Los datos se representan como la media ± ES del área de *outgrowth* del número de explantos mostrados. ** P<0,01; ANOVA Kruskal-Wallis, Dunn's post-test.

Los resultados mostraron como el VIP en una concentración de 100 nM aumentó significativamente el área de *outgrowth* de las células EVT. Para comprobar el efecto específico del VIP, evaluamos si en presencia de un anticuerpo neutralizante α-VIP se revertía el aumento del outgrowth y si además la vía de señalización de PKA estaba involucrada en dicho efecto. Se realizó el mismo experimento en

presencia del anticuerpo α-VIP y con el inhibidor de PKA, H89. Los resultados se muestran en la Figura 17.

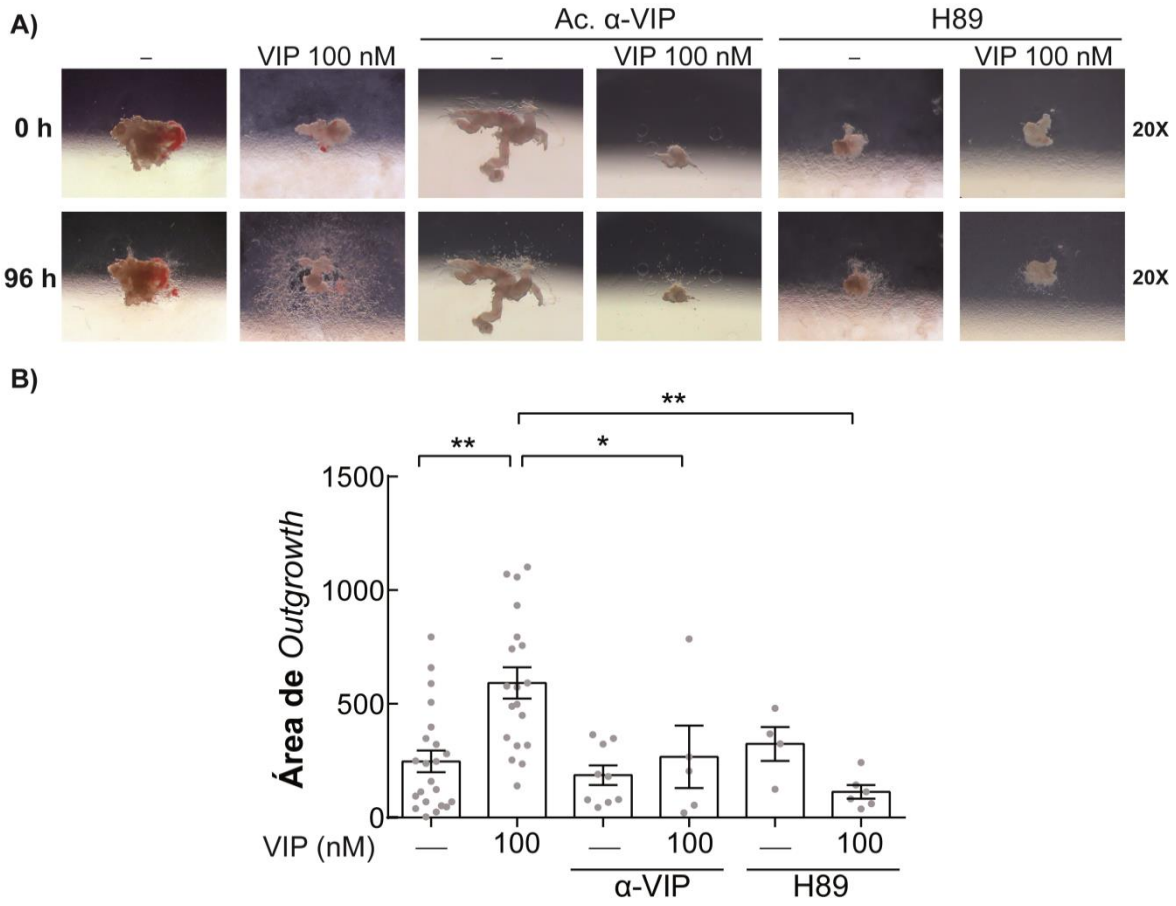



**Figura 17: Efectos del bloqueo del VIP y la vía de PKA en la migración de células EVT de placentas de primer trimestre**. A) Aquellos explantos aislados y colocados en la gota de colágeno I se los cultivó hasta 96 h en DMEM-F12 10% SFB en ausencia o presencia de VIP (100 nM), anticuerpo α-VIP (± VIP 100 nM) y H89 (± VIP 100 nM). Se muestran fotografías de al menos 14 placentas diferentes. B) Los datos están expresados como la media ± ES del área de *outgrowth* de los explantos mostrados. * P<0,05, ** P<0,01, por ANOVA Kruskal-Wallis, post test de Dunn.

Los resultados fueron concluyentes: VIP 100 nM aumentó el área de *outgrowth* en los explantos. Si bien ni el anticuerpo α-VIP, ni el tratamiento con H89 disminuyeron dicha área por sí mismos, inhibieron el efecto del VIP 100 nM sobre el crecimiento del área de *outgrowth*.

A fin de comprobar si aquellas células que están migrando son EVT y a su vez expresan VIP, se realizó el mismo experimento con

explantos incubados en condiciones basales en DMEM-F12 10% SFB hasta 96 h de cultivo. Luego se marcó con anticuerpo α-integrina αvβ3 y α-HLA-G (marcador fenotípico de células EVT), α-IL-10 como marcador anti-inflamatorio y α-VIP. Se analizaron los marcadores por inmunofluorescencia y la estructura de los explantos por microscopía de campo claro. Los resultados se muestran en la Figura 18.

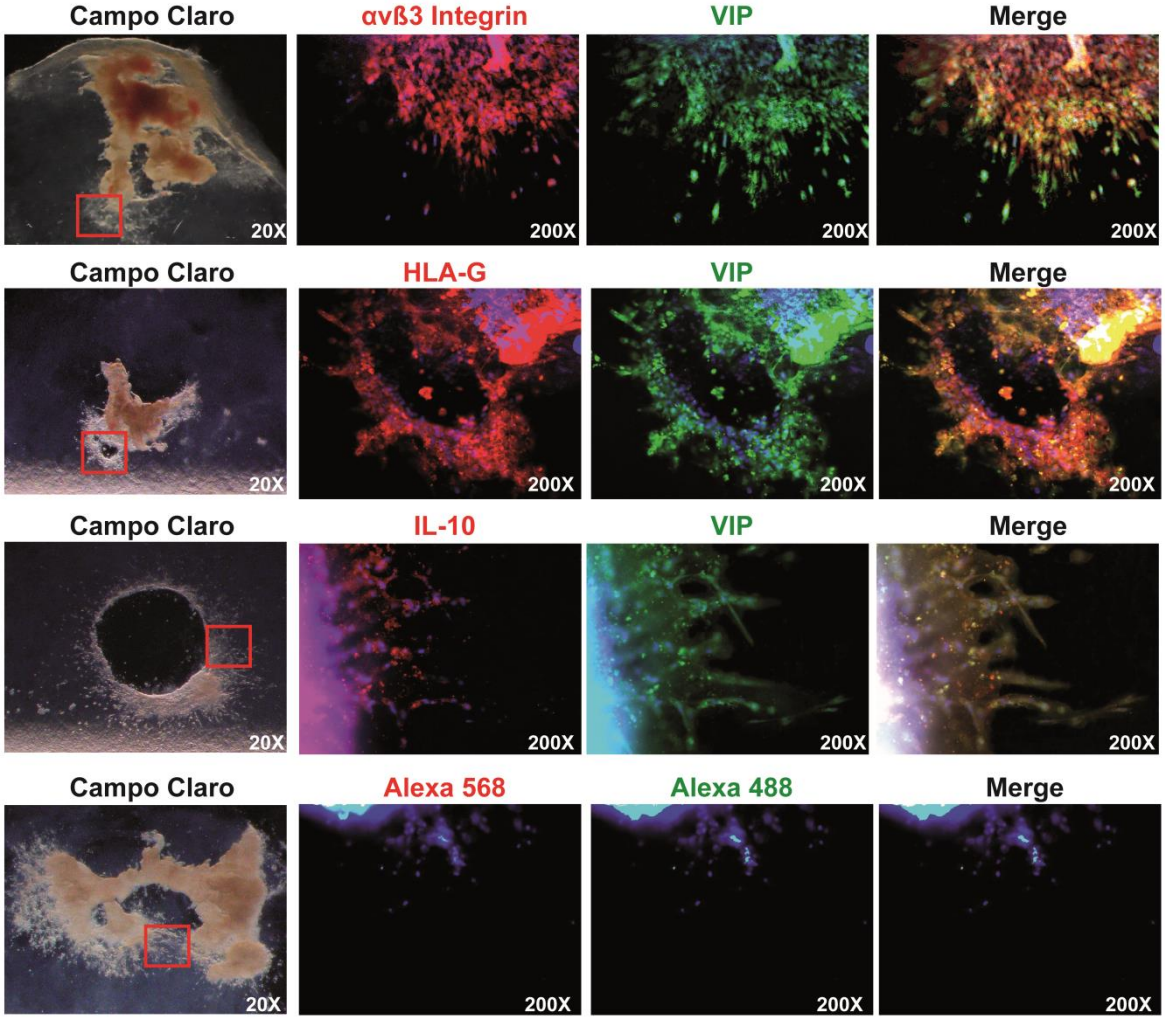



Figura 18: **Inmunomarcación de la integrina αvβ3, HLA-G, IL-10 y de VIP en los explantos de placentas de primer trimestre**. Los explantos aislados y colocados en la gota de colágeno I se dejaron crecer hasta 96 h en DMEM-F12 10% SFB. Luego se marcaron con anticuerpos anti-integrina αvβ3, HLA-G e IL-10 en rojo y anti-VIP en verde, y los núcleos fueron marcados con DAPI en azul. Se tomaron microfotografías con un microscopio Olympus con apotómetro. Se muestran microfotografías de una placenta de 6 semanas, representativas de 3 experimentos con resultados similares.

Las células que se desprenden del explanto y conforman parte del *outgrowth* son αvβ3 y HLA-G positivas, marcas características de las

células EVT. A su vez, esas células co-expresaron VIP. Notablemente, las células de características invasivas también expresan IL-10 y co-expresaron VIP.

Debido a que las células con características invasivas expresan proteínas de remodelación de la matriz extracelular, y frente a la dificultad de realizar ensayos de transfección y *array* en las muestras de placenta, decidimos evaluar la expresión de genes en otra línea celular Tb, BeWo, silenciadas o no en la expresión de VIP con un siRNA específico o un control (Scrl). Los resultados se muestran en la Figura 19.

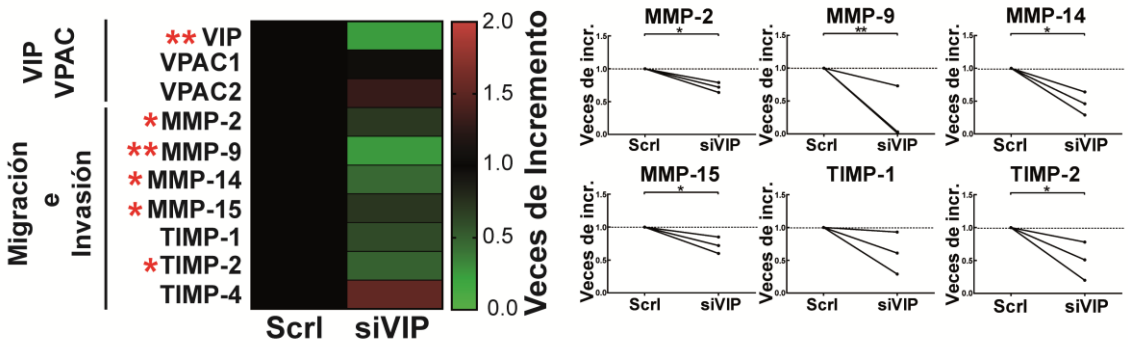



**Figura 19: Array de genes en la línea celular BeWo transfectadas con secuencia scramble (Scrl) o siRNA de VIP (siVIP)**. Una vez que la línea celular BeWo fue transfectada con una secuencia scramble (Scrl) o siRNA de VIP (siVIP), las células se cosecharon y midió la expresión de genes por RT-qPCR. A la izquierda se muestra un Heat Map donde en rojo se muestran los genes sobreexpresados y en verde los genes con expresión disminuida, cuando fueron transfectadas con siVIP. Los resultados se muestran como la media de veces de inducción de 3 experimentos distintos. Se realizó un T-test apareado. *P<0,05, **P<0,01. A la derecha se muestran gráficos representativos de las MMPs y algunos TIMP.

El experimento de silenciamiento de VIP en la línea BeWo demostró que efectivamente la expresión de VIP está disminuida pero no así la expresión de sus receptores. Cuando estudiamos genes involucrados en la migración e invasión de las células Tb observamos:

- una importante reducción en la expresión de las MMPs: -2, -9, -14 y -15 las cuales están ampliamente expresadas en la interfase materna fetal en etapas tempranas de la gestación.

- en el caso de los inhibidores de MMPs (TIMPs), en las células tratadas con siVIP presentaron una disminución en la expresión de TIMP-2 y una tendencia en TIMP-1. Por otro lado, no se observaron cambios para la expresión de TIMP-4 mientras que TIMP-3 no se expresa bajo estas condiciones.

Los resultados del *array* de genes demuestran que el VIP endógeno está principalmente interviniendo en la expresión de los genes que favorecen a la invasión regulando a las MMPs y algunos de sus inhibidores.

En conjunto estos resultados demuestran que las células Tb de primer trimestre (sinciciotrofoblasto y citotroblasto velloso y extravelloso) expresan VIP. Que el VIP favorece la migración e invasión de las células Tb a través de la vía de PKA y que aquellas células que expresan VIP tienen un fenotipo invasivo al co-expresar integrina αvβ3 y HLA-G, además expresan IL-10.

Con respecto a los resultados de pérdida de función del VIP en células trofoblásticas humanas transfectadas se puede concluir que el VIP endógeno favorece la expresión de genes involucrados en la invasión celular.

## Rol de las células EVT VIP+ en la remodelación vascular, glandular y modulación del micro-ambiente.

La nutrición hemocorial de la placenta empieza a partir de la semana 12-13 de gestación, para esto se requieren numerosos procesos que involucran la migración de las células Tb hacia distintas estructuras del útero, como los vasos y las glándulas, y la remodelación por medio de estas. A las células EVT se las clasificaron según el lugar donde migran en el endometrio decidualizado y su función. Se ha propuesto que las células Tb extravellosas glandulares (gEVTb), migran hacia las glándulas maternas donde las remodelan y toman

los nutrientes de estas mismas para el mantenimiento de la placenta hasta establecerse la nutrición hemotrófica. Las células Tb extravellosas endovasculares (vEVTb), por otra parte, migran por el lumen de las arterias espiraladas maternas y forman tapones para disminuir el flujo sanguíneo para favorecer su remodelación. Por último, las células Tb extravellosas intersticiales (iEVTb), migran por el estroma contactando las células maternas como leucocitos, células musculares y endoteliales de los vasos. Este proceso, favorece la remodelación, y junto a la contribución de las células Tb vellosas modifican el micro-ambiente de la interfase materno-placentaria tal que favorezca el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y una correcta gestación. Fallas en las EVT pueden llevar a patologías como la restricción en el crecimiento intra-uterino (o IUGR, del inglés *intra uterine growth restriction*). Dichas fallas se originan en el período de placentación pero se detectan a partir del segundo trimestre [170]. Teniendo en cuenta que en esta patología se ve una deficiente migración de las EVT, poca remodelación vascular, y por otro lado vimos que el VIP está involucrado en la migración de las EVT, decidimos estudiar si las células EVT que remodelan las arterias expresan VIP. Para esto, se usaron secciones de decidua remanente en las muestra de primer trimestre donde las células EVT invadieron y remodelaron los vasos sanguíneos. Se realizaron marcaciones que aseguran si el vaso está siendo remodelado por las células Tb o no por la técnica de inmunohistoquímica. Los resultados se muestran en la Figura 20.

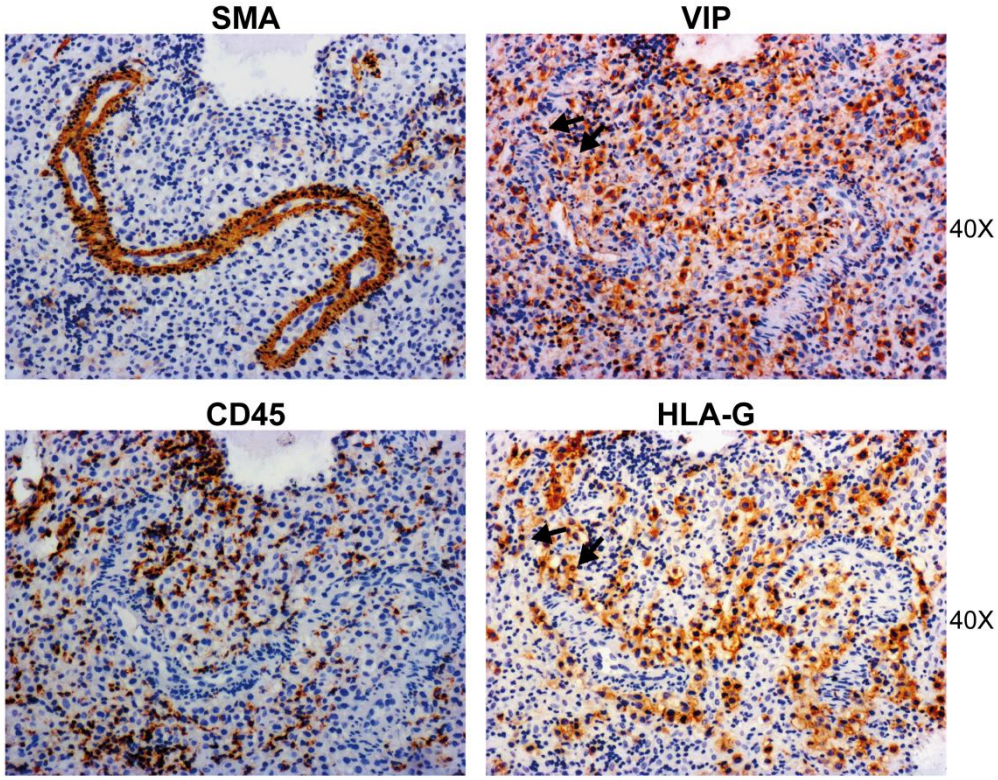



**Figura 20: Inmunomarcación de una arteria espiralada materna en proceso incipiente de remodelación**. Las muestras se procesaron y marcaron como se describió previamente en Materiales y Métodos. Para la marcación se usaron anticuerpos: α-SMA (*smooth muscle actin*, 1/200) para las células musculares de los vasos, α-CD45 (1/200) para los leucocitos infiltrantes, α-HLA-G (1/100) para las células EVT y α-VIP (1/200) en cortes seriados de 5 µm de distancia. Las fotografías ilustran lo obtenido en al menos 4 deciduas. El color marrón es la marca específica del anticuerpo y se realizó una tinción con Hematoxilina de Harris como contraste. Las flechas negras muestran algunas de las células HLA-G/VIP positivas que están irrumpiendo entre las células endoteliales de la arteria.

En esta arteria espiralada se pudo observar un incipiente proceso de remodelación. Se puede observar que las células musculares vasculares (SMA) no fueron irrumpidas y los leucocitos (CD45+) si bien estaban en contacto con la arteria aún no la infiltraron. Se observan células doble positivas: HLA-G y VIP. Estas corresponderían a las células iEVTb alrededor de la arteria espiralada, así como una pequeña disrupción en las células endoteliales (señalado por las flechas negras).

Para un estudio más profundo en la remodelación de los vasos sanguíneos maternos, se realizaron inmunomarcaciones de fluorescencia y utilizando los marcadores de remodelación antes

mencionados sumado el CD31 (PECAM) para las células endoteliales. Los resultados se muestran en la Figura 21.

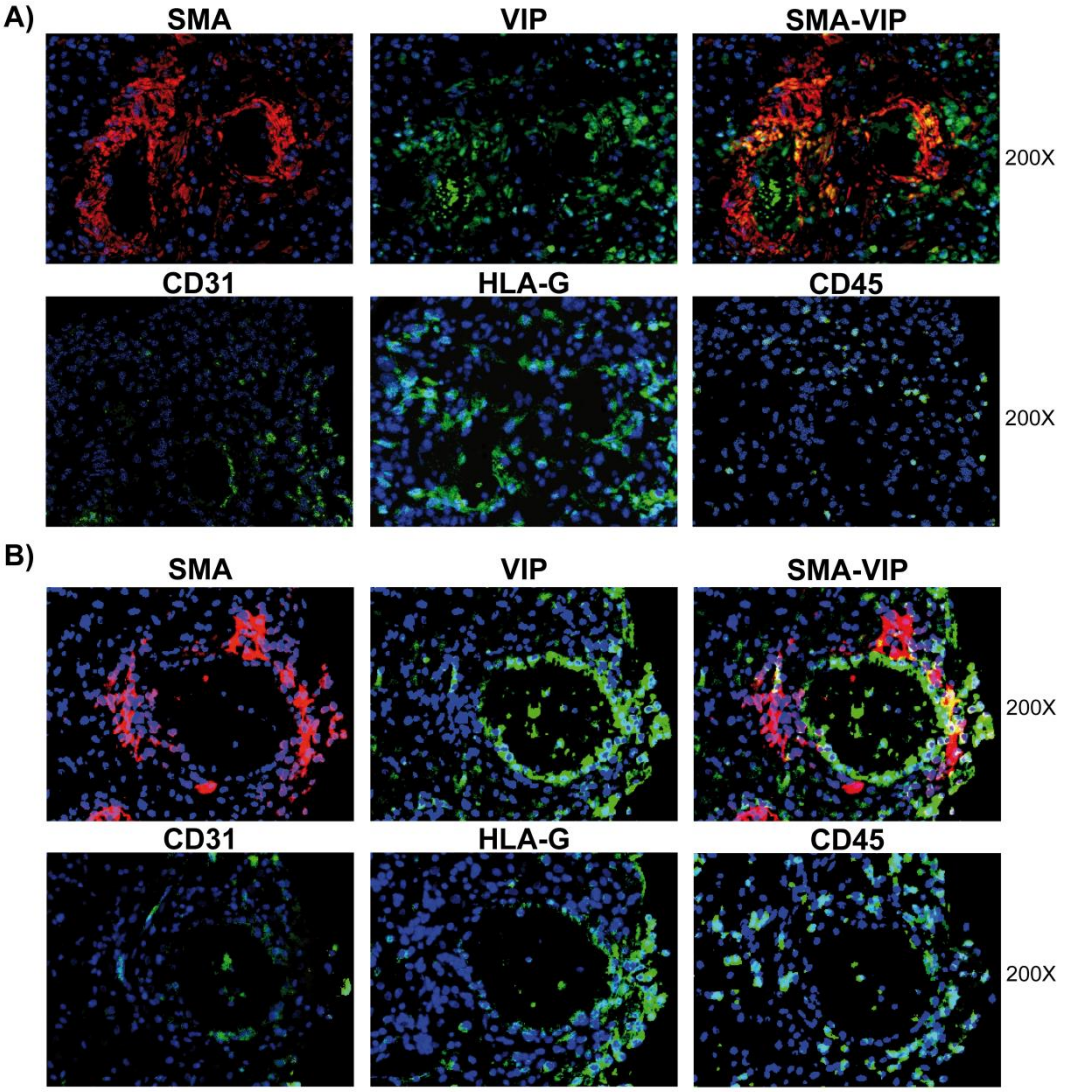



**Figura 21: Inmunomarcación de vasos maternos en proceso de remodelado temprana y tardíamente.** Las muestras se procesaron y marcaron como se describió previamente en Materiales y Métodos. Para la marcación se usaron anticuerpos: α-SMA (1/200) y α-CD31 (1/200) para las células musculares y endoteliales de los vasos, respectivamente. Anticuerpos α-CD45 (1/200) para los leucocitos infiltrantes, α-HLA-G (1/100) para las células Tb y α-VIP (1/500) en cortes seriados de 5 µm de distancia. Las microfotografías son representativas de 8 deciduas y fueron obtenidas en el microscopio con apotómetro. A) Arteria siendo remodelada tempranamente y B) Arteria remodelada tardía.

En estas microfotografías se pudo corroborar que aquellas células vEVT que expresan HLA-G y estaban por dentro de los vasos conformando el tapón que se observa hasta que las arterias se remodelan y empieza la nutrición hemocorial. Además, las células iEVT que irrumpen entre las células musculares, efectivamente

producen VIP. Por último, en las arterias remodeladas tardíamente se pudo observar cómo aquellas células EVT reemplazan a las células endoteliales maternas y recubren el vaso conformando un nuevo endotelio sin células musculares vasculares para favorecer un mayor calibre del vaso, contribuyendo así a un flujo sanguíneo mayor y más lento hacia la placenta.

Estos resultados revelan que las células EVT que están remodelando los vasos sanguíneos maternos, vEVT e iEVT, son células productoras de VIP.

Luego nos preguntamos si las gEVT también expresan VIP. Para ello nos focalizamos en la remodelación glandular utilizando los mismos marcadores para evaluar la remodelación arterial sumados CD14 y CD56 para detectar los macrófagos y NK deciduales, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 22.

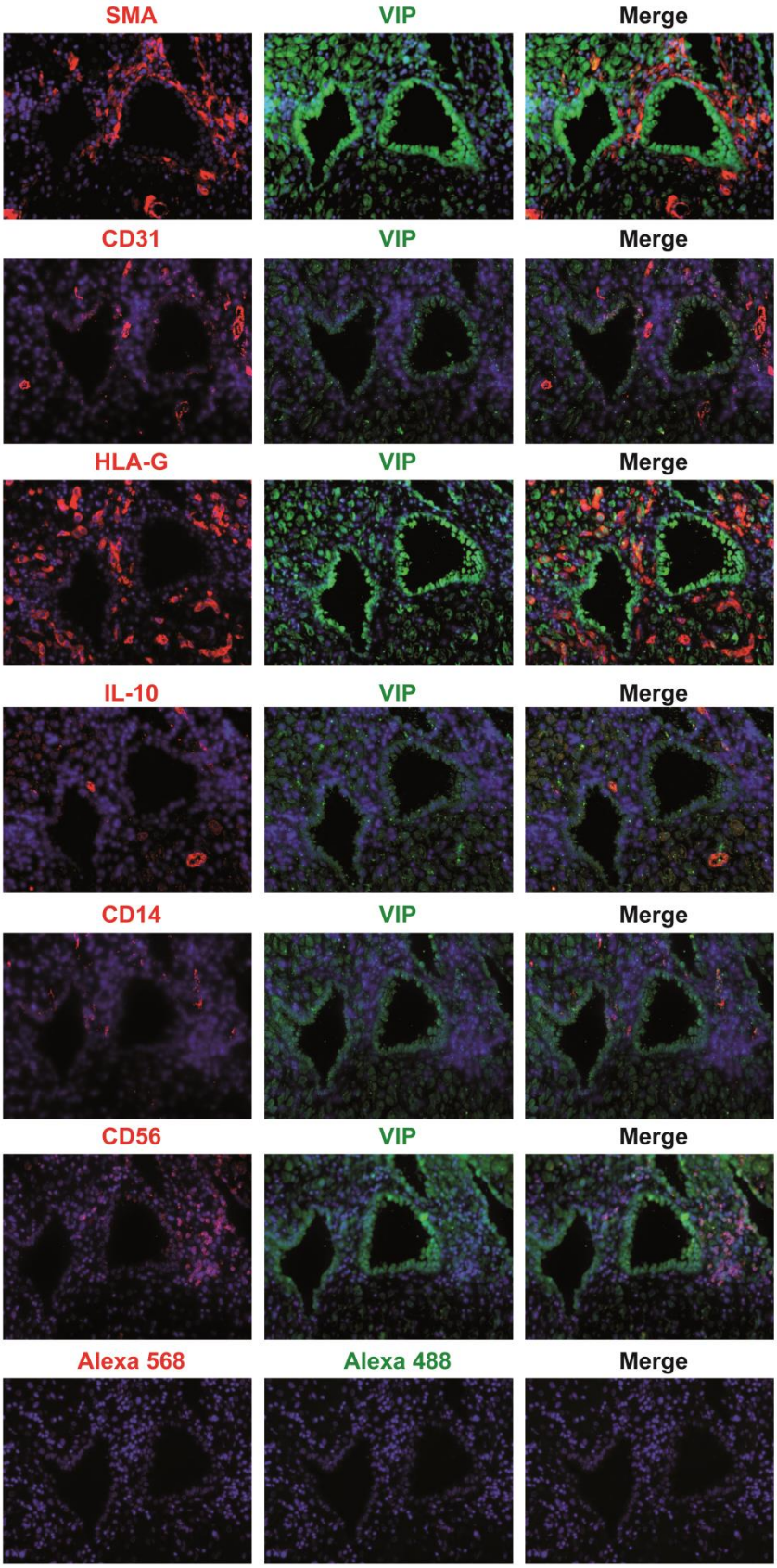



**Fig. 22: Inmunomarcación de glándulas maternas en proceso de remodelado.** Las muestras se procesaron y marcaron como se describió previamente en materiales y métodos. Para la marcación se usaron anticuerpos: α-SMA (1/200) y α-CD31 (1/200) para

las células musculares y endoteliales de los vasos, respectivamente. Anticuerpos α-CD14 y α-CD56 (1/200) para los macrófagos y NK maternas infiltrantes, α-IL-10 (1/100) como marcador anti-inflamatorio, α-HLA-G (1/100) para las células EVT y α-VIP (1/500) en cortes seriados de 5 µm de distancia. Se muestra la marcación de los anticuerpos secundarios Alexa 568 (1/500) y Alexa 488 (1/500) como control (última fila). Las microfotografías son representativas de al menos 8 deciduas analizadas en el microscopio con apotómetro.

A través de inmunomarcación se evidenció que aquellas células EVT cercanas a las glándulas también expresan VIP. Además, se pudo ver una alta producción de VIP en las células glandulares sugiriendo ser una fuente adicional de producción de VIP en la interfase materno-placentaria. Por otra parte, se comprobó un reclutamiento de células inmunes, en especial NK y Mo y/o MA, que ayudarían a la remodelación de las glándulas. Más aún, las células NK se encontraron próximas a los pequeños capilares cercanos a las glándulas indicando un reclutamiento activo. Cuando evaluamos la producción de IL-10, pudimos ver algunas células positivas para la citoquina que se corresponderían principalmente con células Tb.

Como la remodelación de las arterias espiraladas y de las glándulas es un proceso intrincado que debe ocurrir en un ambiente controlado para que la tasa de apoptosis-fagocitosis-recambio mantenga la homeostasis tisular, decidimos evaluar si el VIP contribuye al control del mismo.

Para esto, los sobrenadantes de los explantos cultivados en ausencia o presencia de VIP (10 y 100 nM) se analizaron por el ensayo de BioPlex de 27 citoquinas humanas como se especificó en materiales y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23.

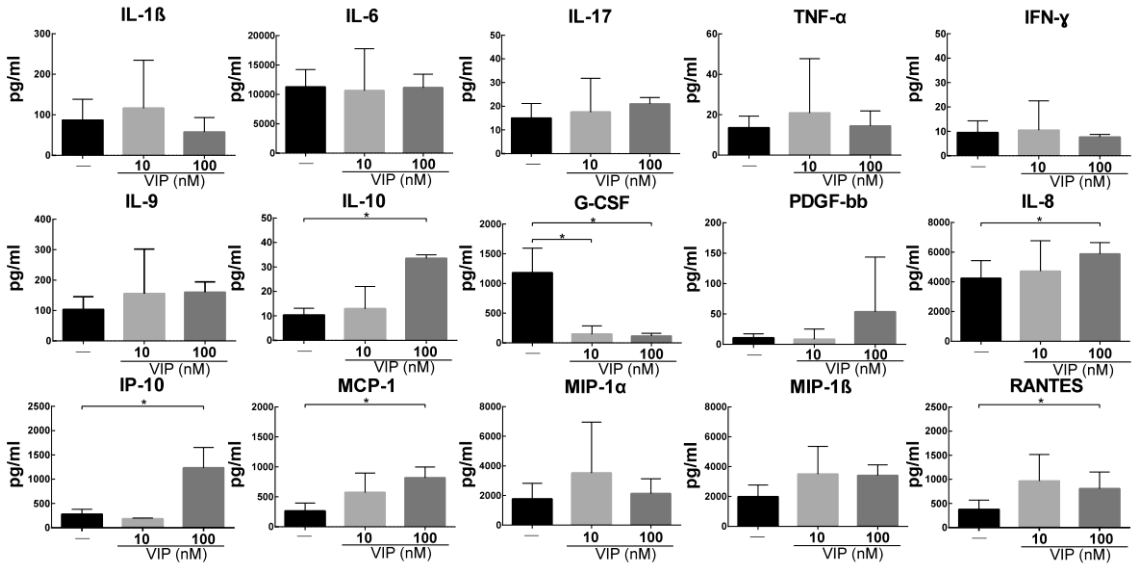



**Figura 23: Ensayo *multiplex* en placentas de primer trimestre y la modulación por VIP**. Explantos aislados y colocados en la gota de colágeno I se los cultivó hasta 96 h en DMEM-F12 10% SFB en ausencia o presencia de VIP (10 y 100 nM), Al sobrenadante recolectado se le realizó el ensayo de *multiplex* por duplicado. Los resultados se expresan como la media ± ES de pg/ml de al menos 5 experimentos distintos. Se muestran todos aquellos mediadores que estuvieron por arriba del límite de detección. * P<0,05; Mann-Whitney.

El ensayo reveló que las células Tb de primer trimestre generaron un micro-ambiente donde solo algunos marcadores pro-inflamatorios están elevados como IL-1β e IL-6, que a su vez se les adjudican roles pro-implantatorios. Producen IL-9, algunos factores de crecimiento como G-CSF y son altas productoras de quimioquinas como IL-8, MCP-1, MIP-1α/β, IP-10 y RANTES. Sorprendentemente, en aquellos explantos tratados con VIP 100 nM no se moduló la secreción de citoquinas pro-inflamatorias pero sí se incrementó la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. A su vez, VIP produjo una disminución marcada de G-CSF involucrado en la generación y sobrevida de los neutrófilos. Además, VIP incrementó las quimioquinas, principalmente IL-8, MCP-1, IP-10 y RANTES, claves como atrayentes de Mo.

Para confirmar el rol del VIP sobre las células Tb, se realizaron experimentos en presencia del anticuerpo neutralizante de VIP (± VIP 100 nM) y del inhibidor de PKA, H89 (± VIP 100 nM). Se hizo el

ensayo para determinar citoquinas y se muestra un experimento representativo en la Figura 24.

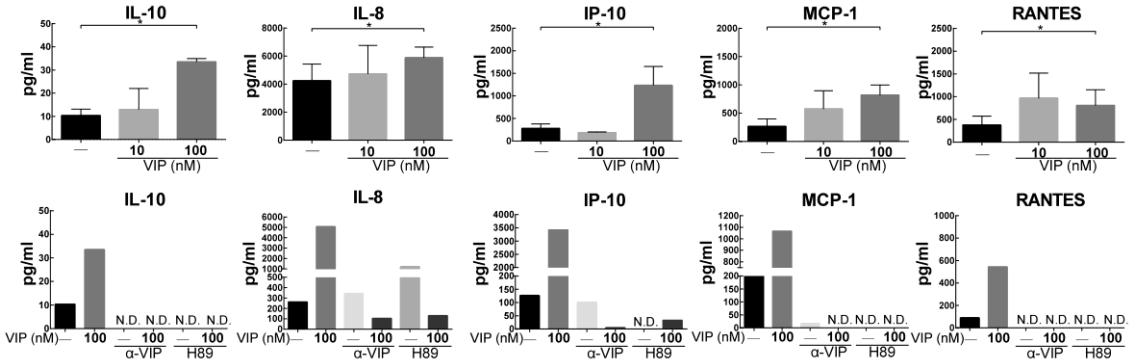



**Figura 24: Ensayo multiplex en placentas de primer trimestre en muestras con déficit de VIP o inhibición de su señalización**. Explantos aislados y colocados en la gota de colágeno I se cultivaron hasta 96 h en DMEM-F12 10% SFB en ausencia o presencia de VIP 100 nM. Al sobrenadante recolectado se le realizó el ensayo de *multiplex* por duplicado. Los resultados se expresan como la media ± ES de pg/ml en un ensayo representativo.

La incubación tanto con el Ac neutralizante de VIP (± VIP 100 nM) como con H89 (± VIP 100 nM) disminuyó aquellos mediadores que aumentaron por el VIP y en algunos mediadores se observó una pérdida total en la secreción de los mismos.

Todos estos resultados demuestran que las células Tb vellosas y extravellosas producen VIP, y son consistentes con su papel en la migración, remodelación vascular y glandular y la modulación del micro-ambiente inmune. Este último tiene características de perfil inflamatorio controlado con un reclutamiento activo de leucocitos, en particular Mo y NK. Vimos también que el silenciamiento de VIP disminuye la migración del trofoblasto y se pierde la producción de algunos de los marcadores importantes y requeridos para la formación de la interfase materno-placentaria. En conjunto estos resultados avalan el papel del VIP en distintos procesos en etapas tempranas de la gestación.

## Rol del VIP en las poblaciones leucocitarias más abundantes en la interfase materno-fetal durante el primer trimestre: NK y macrófagos deciduales

Los leucocitos maternos tienen un rol clave en la formación de la interfase materno-fetal. Durante el primer trimestre, el 70% de los leucocitos son NK deciduales (dNK) que participan en la remodelación de las arterias espiraladas. La segunda población más abundante son los macrófagos deciduales (dMA), los cuales se mantienen constantes a lo largo de todo el embarazo y están involucrados en diversas funciones como piezas claves en el control homeostático.

En primer lugar, decidimos investigar el efecto modulador de VIP en las células dNK, y para ello evaluamos la expresión de los receptores de VIP así como su capacidad de producir MMPs en respuesta al VIP. Se aislaron las células CD56+ a partir de deciduas de primer trimestre y se cultivaron por 24 h en RPMI libre de SFB. Las células se usaron para mediciones de expresión de genes y los sobrenadantes para ensayos de multiplex. Los resultados se muestran en la Figura 25.

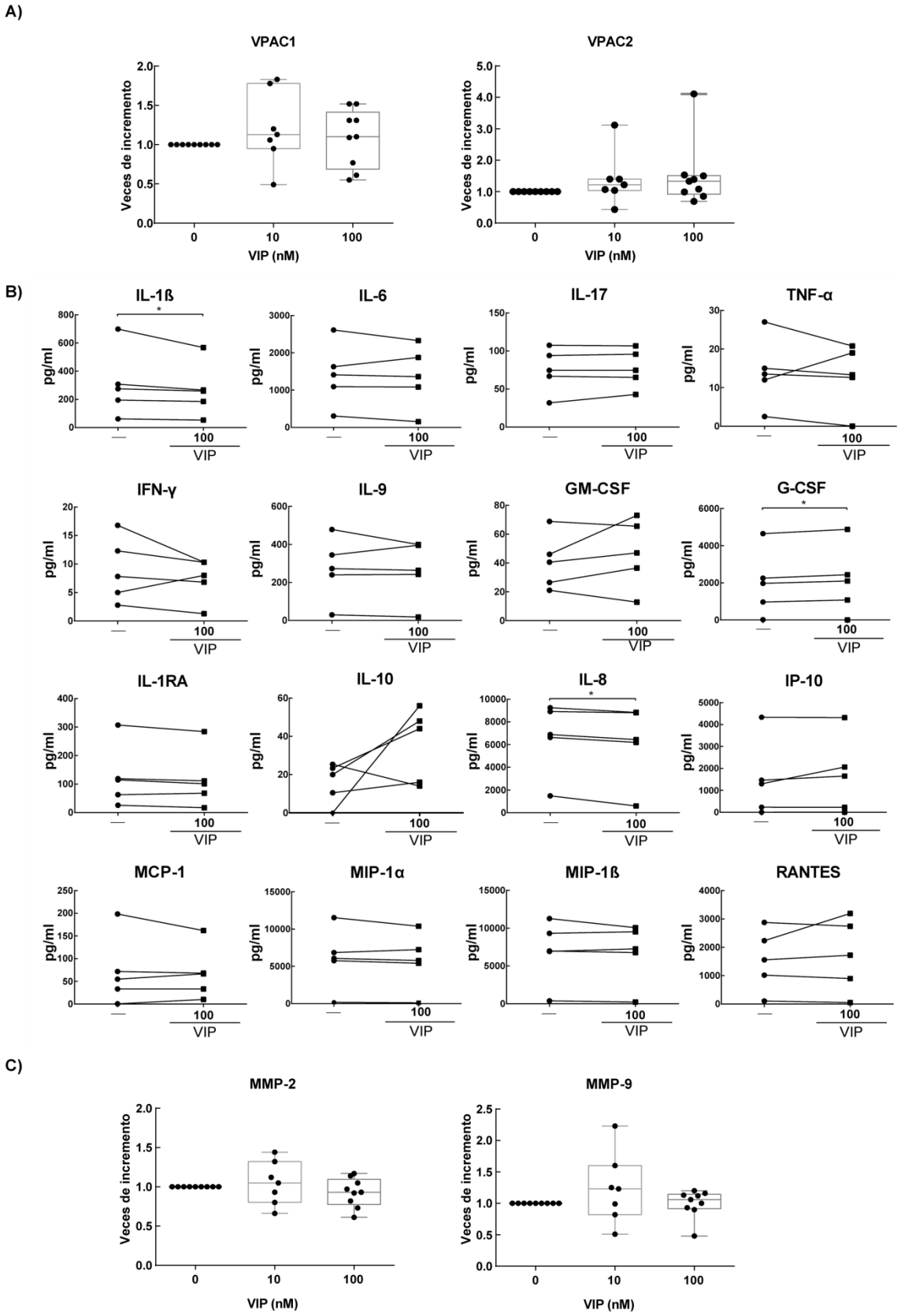



**Figura 25: Caracterización del sistema VPAC, ensayo multiplex y análisis de MMPs en dNK de primer trimestre y la modulación por VIP**. A partir de muestras de decidua de primer trimestre se realizó digestión enzimática y luego por selección positiva con CD56 se purificaron los dNK. Se incubaron por 24 h en RPMI sin SFB en ausencia o presencia de

VIP 100 nM y luego se cosecharon las células como se describió en materiales y métodos para ensayos de expresión de genes por RT-qPCR y los sobrenadantes para ensayos de multiplex. A) Se midió la expresión de los receptores de VIP por RT-qPCR en presencia de distintas concentraciones de VIP (0, 10 y 100 nM) y los resultados se expresaron como media ± ES de veces de cambio de los experimentos mostrados. B) Los sobrenadantes recolectados se analizaron por multiplex por duplicados. Los resultados se expresan como la media ± ES de pg/ml de los experimentos mostrados. Se muestran todos aquellos mediadores que estuvieron por arriba del límite de detección. * P<0,05, Mann-Whitney. C) Se procedió como se describió en el punto A pero se evaluó la expresión génica de las MMPs 2 y 9. Los resultados se expresaron como media ± ES de veces de cambio de los experimentos mostrados.

Las dNK expresan ambos receptores de VIP y su expresión no se modula por distintas concentraciones de VIP. Cuando se estudió el micro-ambiente que estas generarían, se observa que expresan altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1β, IL-6 e IL-17, y bajos de TNF-α e IFN-γ. Además, producen IL-9 y los factores de crecimiento GM- y G-CSF, quimioquinas como IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1α/β y RANTES. Asimismo, producen IL-1RA e IL-10.

El VIP 100 nM disminuyó la expresión de la citoquina pro-inflamatoria IL-1β y la quimioquina IL-8 y a pesar de la baja producción, una tendencia a la disminución de IFN-γ. Por otro lado, aumentó la secreción de G-CSF y se observa una tendencia al incremento en IL-10. Cuando se estudió la expresión de las MMP-2 y -9 por RT-qPCR se observó que son expresadas pero no modificadas por el VIP.

En segundo lugar nos enfocamos en la siguiente población abundante de leucocitos maternos y que mantiene niveles constantes, los dMA.

Evaluamos la expresión de los receptores de alta afinidad de VIP, VPAC1 y VPAC2 en los MA aislados de la decidua de las muestras obtenidas previamente. Los dMA se incubaron con VIP 100 nM y se analizó la expresión de los receptores por RT-qPCR. Los resultados se muestran en la Figura 26.

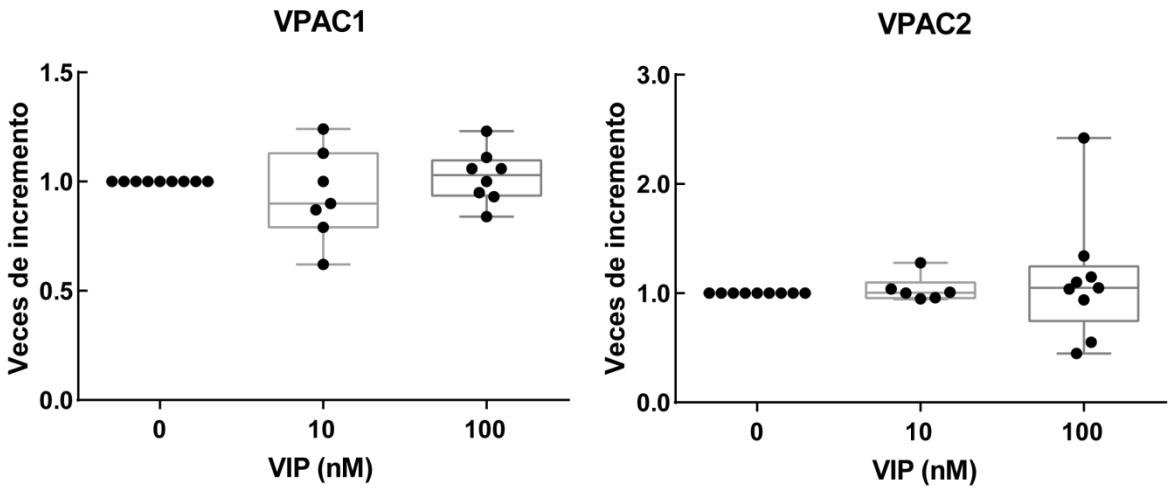



**Figura 26: Expresión de los receptores de VIP en dMA y su modulación por diferentes concentraciones de VIP**. A partir de las muestras de decidua, se realizó digestión enzimática y luego por selección positiva con anticuerpo α-CD14 acoplado a perlas magnéticas se purificaron los dMA. Se incubaron por 24 h en RPMI sin SFB en ausencia o presencia de VIP (10 y 100 nM) y luego se cosecharon y se extrajo el ARN como se describió en materiales y métodos. Se estudió la expresión de los receptores de VIP por RT-qPCR. Los resultados se muestran como media ± ES de veces de incremento de los experimentos mostrados.

Los dMA expresan ambos receptores de alta afinidad de VIP, pero no se observó su modulación por el VIP. Para probar la funcionalidad de dichos receptores, los sobrenadantes de dMA cultivados durante 24 h en RPMI sin SFB en ausencia o presencia de VIP se utilizaron en el ensayo de multiplex y se estudió el micro-ambiente que estos generaban en ambas condiciones. Los resultados se muestran en la Figura 27.

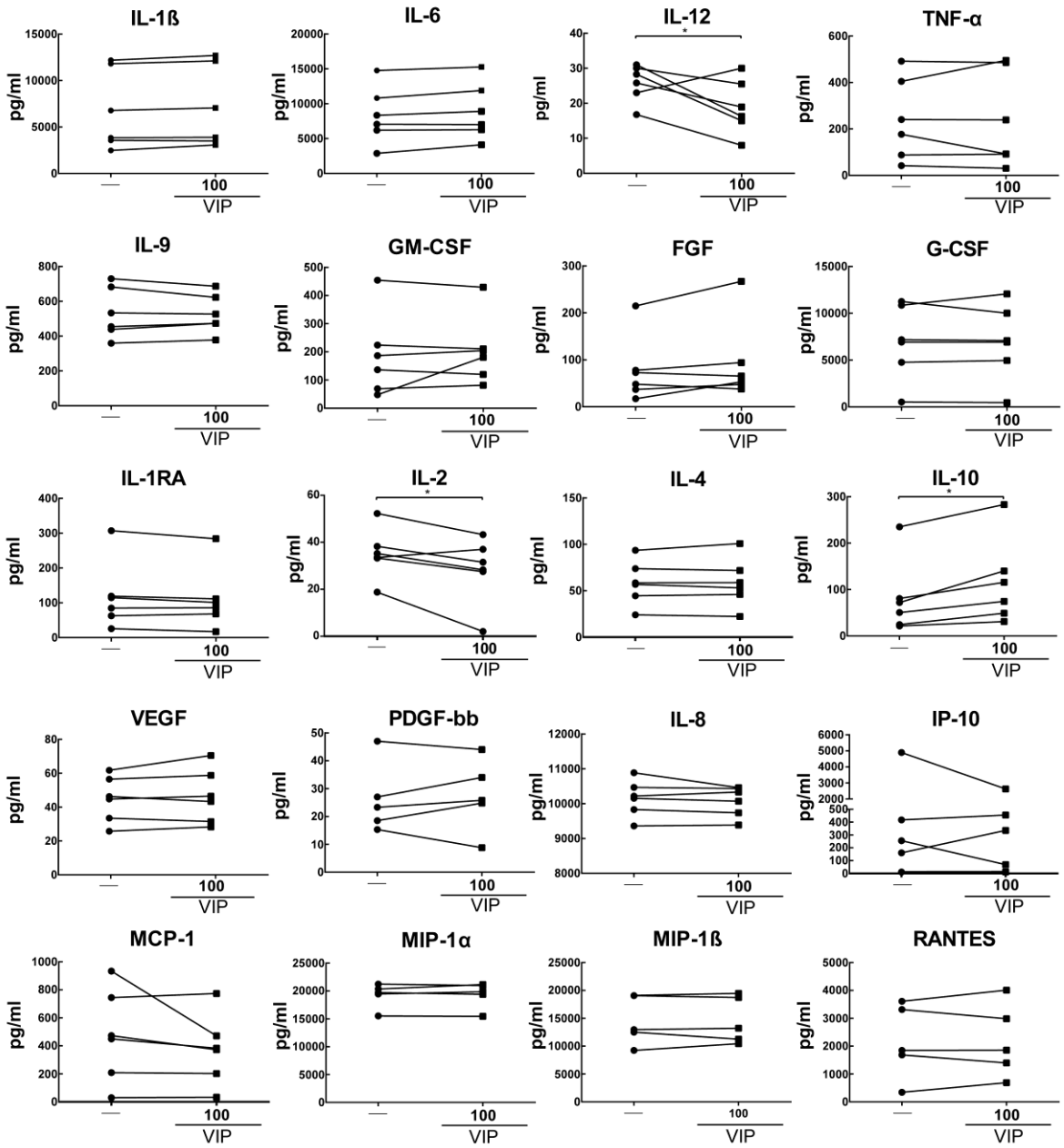



**Figura 27: Ensayo multiplex en dMA de primer trimestre y la modulación por VIP**. A partir de las muestras de decidua, se realizó digestión enzimática y luego por selección positiva con perlas magnéticas conjugadas con α-CD14 se purificaron los dMA. Se incubaron por 24 h en RPMI sin SFB en ausencia o presencia de VIP 100 nM y luego se cosecharon como se describió en materiales y métodos. Los sobrenadantes recolectados se analizaron mediante ensayos de multiplex por duplicados. Los resultados se expresan como la media ± ES de pg/ml de al menos 5 experimentos realizados en forma independientes. Se muestran todos aquellos mediadores que estuvieron por arriba del límite de detección. * P<0,05; Mann-Whitney.

El ensayo de multiplex reveló que los dMA CD14+ no responden de manera similar a los MA diferenciados a partir de Mo y activados a un perfil de activación M2 *in vitro.* Estos dMA aislados en el primer trimestre de la gestación, caracterizado por un perfil pro-inflamatorio,

son productores de mediadores pro-inflamatorios como IL-1β e IL-6 y bajo TNF-α e IL-12, de quimioquinas como IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1α/β y RANTES. Además producen mediadores anti-inflamatorios como IL-10, IL-1RA, factores de crecimiento como FGF, GM- y G-CSF, factores pro-angiogénicos: VEGF y PDGF-bb. Por otro lado, producen citoquinas como IL-2, IL-4 e IL-9. Cuando se estudió el rol del VIP en estos macrófagos, se observó que disminuye la producción de IL-12 e IL-2 mientras que aumenta la producción de IL-10; sugiriendo que el VIP estaría contribuyendo en el control del micro-ambiente pro-inflamatorio de la interfase. Esto provocaría, por ejemplo, una disminución en la respuesta T efectora favoreciendo un perfil de linfocitos T reguladores.

Los leucocitos maternos tienen un rol relevante en la remodelación de las arterias espiraladas, las cuales pierden capas celulares y hay un intenso recambio celular. Por este motivo se decidió evaluar el rol de los dMA en la expresión de las MMP-2 y -9, su modulación por VIP por RT-qPCR y su actividad gelatinolítica por zimografía. Los resultados se muestran en la Figura 28.

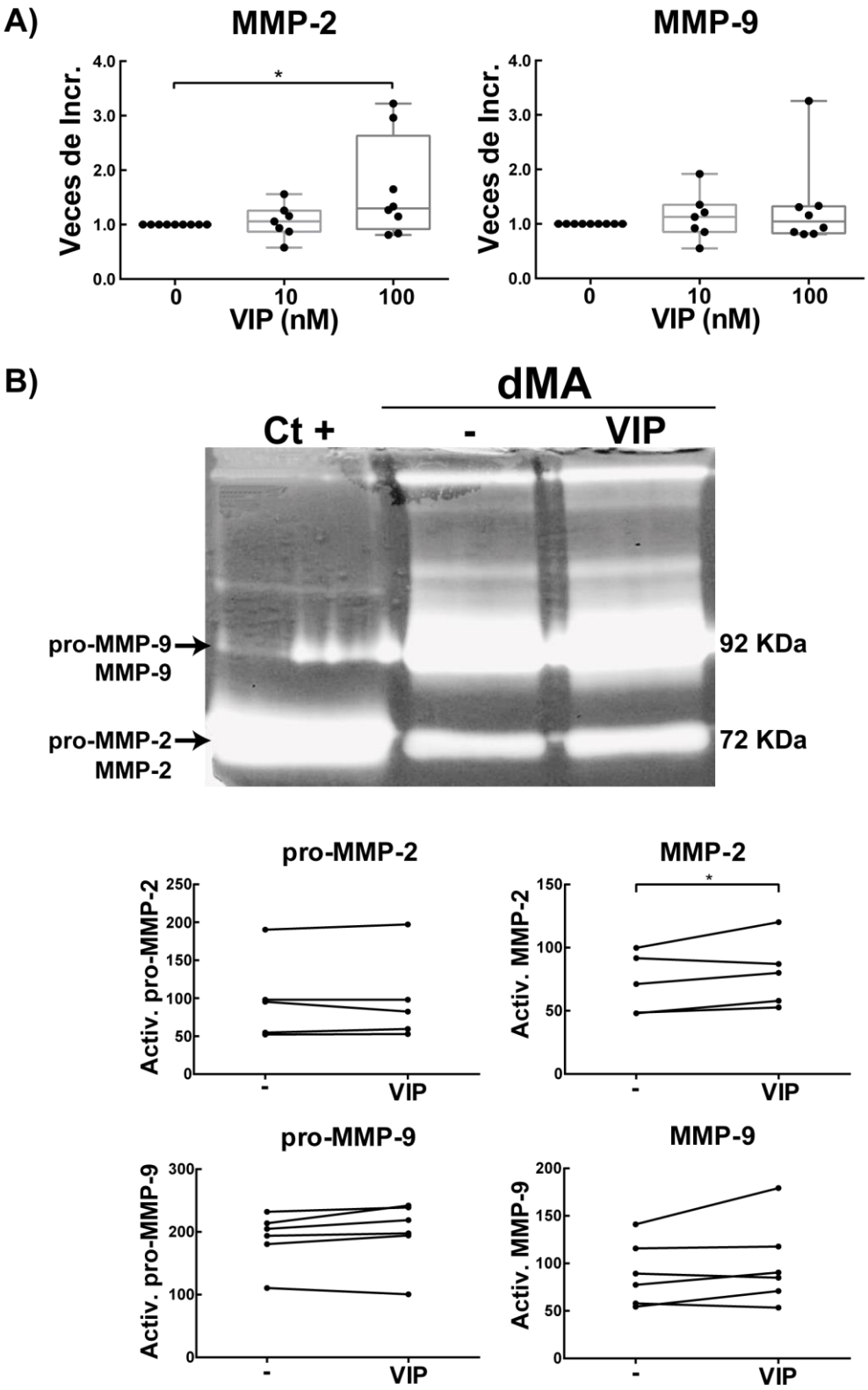



**Figura 28: Expresión y actividad de las MMP-2 y MMP-9 en dMA y su modulación por VIP**. En las muestras obtenidas se separó la decidua, se realizó digestión enzimática y luego por selección positiva con CD14 se purificaron los dMA. A) Se incubaron por 24 h en RPMI sin SFB en ausencia o presencia de VIP (10 y 100 nM) y luego se cosecharon y se extrajo el RNA como se describió en materiales y métodos. Se midió la expresión de las MMPs por RT-qPCR y los resultados se expresaron como media± ES de veces de cambio de los experimentos mostrados. *P<0,05, Mann-Whitney B) La actividad gelatinolítica de las MMPs se evaluó

como se describió en materiales y métodos en sobrenadantes de dMA tratados o no por 48 h con VIP 100 nM. Como control positivo (Ct+), se usó el sobrenadante de la línea celular BeWo. Se muestra un gel representativo y a continuación se muestra la cuantificación de las pro-MMPs y MMPs. Los resultados se expresaron como media± ES de la actividad enzimática de 6 experimentos. *P<0,05, Mann-Whitney.

Los resultados muestran que los dMA expresan 2 MMPs características de la remodelación y que el VIP pudo aumentar la MMP-2. La MMP-2 una vez activada puede clivar a la MMP-9[20,21,118].

Estos resultados en conjunto sugieren que el VIP tiene un importante rol en el control de la homeostasis de la interfase materno-placentaria durante el primer trimestre de gestación. Los resultados son consistentes con un efecto modulador del VIP sobre la función de las células Tb tal que liberen mediadores que 'eduquen' a los leucocitos residentes y provoquen una mayor atracción de leucocitos, en especial monocitos. Si bien se observa un micro-ambiente más asociado a uno pro-inflamatorio durante esta etapa, se ve que es controlado ya que el VIP produce un incremento de IL-10 en las células Tb y dMA y una disminución en IL-1β y -8 en la población leucocitaria más abundante en la interfase.

# CAPÍTULO 4

# Efecto del VIP y los macrófagos en procesos asociados a angiogénesis

## Efecto de VIP en la formación de túbulos por células endoteliales

La remodelación y regeneración de nuevas estructuras vasculares requieren un balance de procesos de angiogénesis y una respuesta dinámicamente coordinada frente a estímulos del micro-ambiente extracelular. Las células endoteliales responden a los estímulos inducidos por las células Tb a través del balance formación/destrucción de nuevos vasos. Contando con la línea celular endotelial de la microvasculatura de útero humano, HUtMvEC, decidimos evaluar la expresión del sistema de VIP/VPAC en estas células y si es modulado por el micro-ambiente de explantos de placentas de primer trimestre. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

| HUtMvEC | BASAL (UA) | Explanto de placenta (UA) | Relación PUMA | PPLR |
|---|---|---|---|---|
| **VIP** | 61,875 | 47,738 | -1,467 | 0,1561 |
| **VPAC1** | 158,359 | 129,608 | -1,454 | 0,4282 |
| **VPAC2** | 92,919 | 90,275 | -1,141 | 0,4884 |

**Tabla 2: Expresión del sistema VIP/VPAC y su modulación por sobrenadantes de explantos de placenta en células HUtMvEC**. Las células HUtMvEC se cultivaron en una relación 1:1 DMEM-F12/EBM-2 o sobrenadante de explanto de placenta/EBM-2 por 24 h. Se cosecharon, se extrajo el ARN y se hizo un *genome array*. La intensidad de expresión está expresada como unidades arbitrarias (UA). Se utilizó la relación del algoritmo *positional update and matching algorithm* (PUMA) para ver el cambio de expresión del BASAL frente al tratamiento. Los valores PPLR representan la confianza en los cambios, PPLR >0,9 o <0,1 indica una sobreexpresión o disminución de la expresión, respectivamente.

Las células endoteliales demostraron expresar un sistema VIP/VPAC que no se moduló por el micro-ambiente generado por las células Tb.

Nos preguntamos el rol del VIP en la formación de túbulos en un cultivo 3D con geltrex. Para esto cultivamos las células con distintas concentraciones de VIP durante 8 h y se midió la formación de túbulos. Los resultados se muestran en la Figura 29.

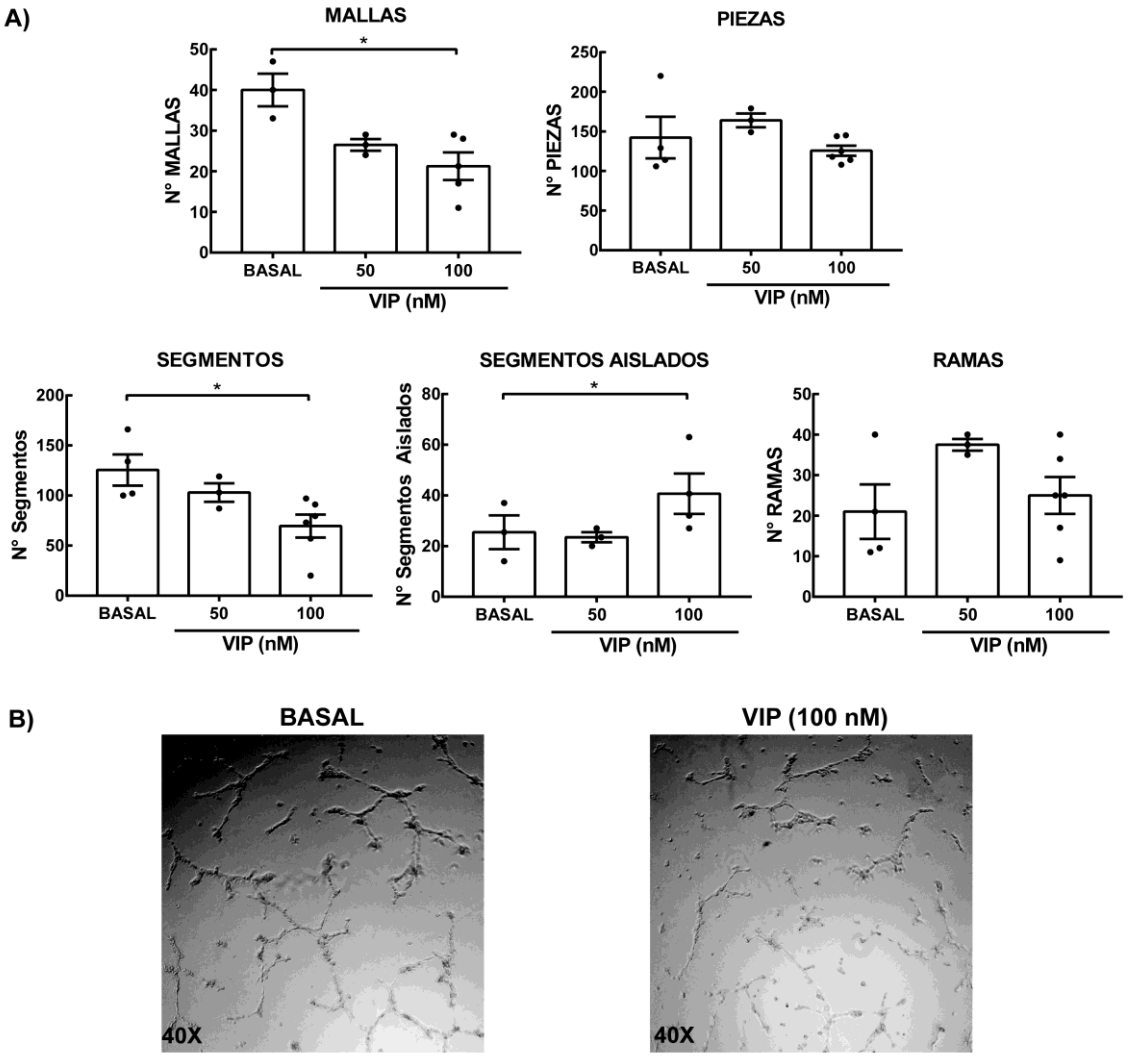



**Figura 29: Efectos del VIP en la formación de túbulos en las células HUtMvEC**. Las células endoteliales se cultivaron en ausencia o presencia de VIP (50 y 100 nM) durante 8 h en una matriz de geltrex. Se tomaron microfotografías de los distintos campos y se analizaron las fotografías por el *plugin Angiogenesis Analyzer* de ImageJ. A) Se graficaron las mallas y piezas (segmentos + segmentos aislados + ramas) que formaron los túbulos. Los resultados se expresan como la media de cada condición ± ES de al menos 3 experimentos distintos. *P<0,05. T-test apareado. B) Se muestran 2 microfotografías BASAL y con VIP 100 nM representativas.

Los resultados mostraron que el VIP 100 nM disminuyó la formación de mallas (polígonos de túbulos interconectados entre sí como se mostró en la Figura 2 de materiales y métodos). Además, si bien la

cantidad de piezas no cambiaron, cuando fueron cultivados con VIP sí disminuyeron los segmentos mientras que aumentó la cantidad de segmentos aislados.

Los MA tienen un rol protagónico en el remodelamiento de la matriz extracelular y vascular, es por eso que no preguntamos el efecto tienen los sobrenadantes de los MA (GM-CSF) cultivados con VIP, por un lado; el efecto de los distintos MC de Tb. Los resultados también se compararon con el efecto de los dMA aislados de placentas de primer trimestre tratados o no con VIP. Los resultados se muestran en la Figura 30.

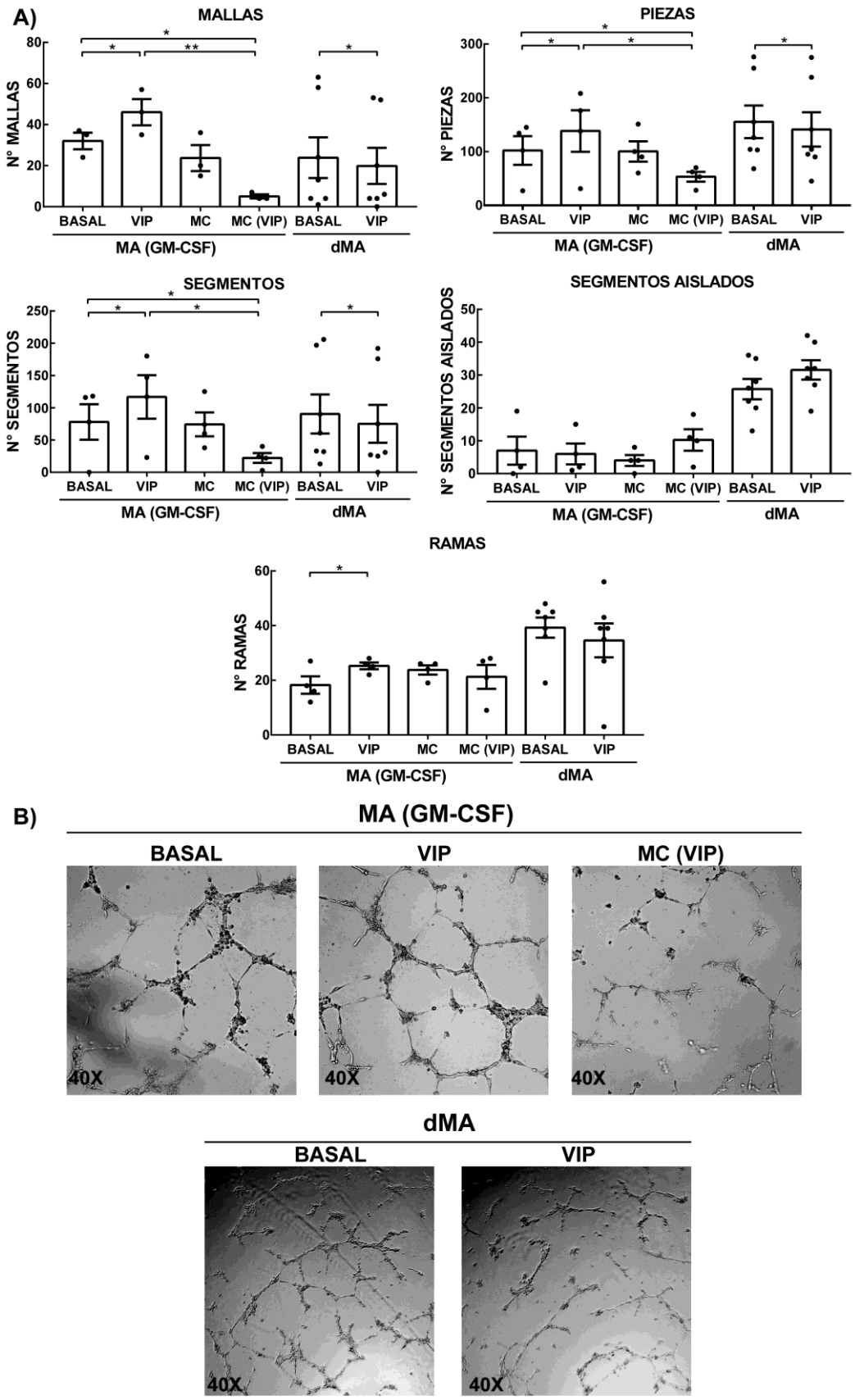



**Figura 30: Efectos de los sobrenadantes de MA (GM-CSF) condicionados con VIP o con células trofoblásticas y de los dMA condicionados por el VIP en la formación de túbulos**. Las células HUtMvEC se cultivaron en una relación 1:1 DMEM-F12

2%/sobrenadantes de MA (GM-CSF) ±VIP y los MC de Tb y de dMA ± VIP, durante 8 h en una matriz de geltrex. Se tomaron microfotografías de los distintos campos y se analizaron las fotografías por el *plugin Angiogenesis Analyzer* de ImageJ. A) Se graficaron las mallas y piezas (segmentos + segmentos aislados + ramas) que formaron los túbulos. Los resultados se expresan como la media de cada condición ± ES de al menos 3 experimentos distintos. *P<0,05 y **P<0,01. T-test apareado. B) Se muestran microfotografías representativas de GM-CSF y dMA.

De los resultados se puede concluir que los MA (GM-CSF) condicionados con VIP tienen la capacidad de incrementar la formación de túbulos (mallas, piezas, segmentos y ramas). Por otro lado, tanto los MA condicionados in vitro por las células Tb en presencia de VIP (CM (VIP)) como aquellos dMA aislados de placentas de primer trimestre (condicionados in vivo) y tratados con VIP liberan proteínas que desfavorecen la formación de túbulos. Estos últimos producen una disminución significativa en las mallas, piezas y segmentos de los túbulos.

La disminución de túbulos en los MA (GM-CSF) cultivados con MC (VIP) puede estar atribuido a la disminución en la expresión de VEGF-A mostrado en el capítulo 2 sección 2.1.ii. Es por eso que decidimos evaluar la expresión de diferentes genes involucrados en la angiogénesis en las muestras de dMA. Los resultados se muestran en la Figura 31.

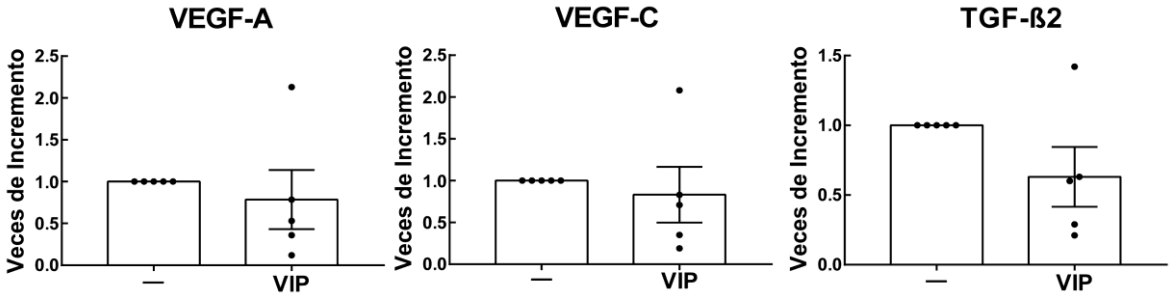



**Figura 31: Expresión de genes angiogénicos en dMA y el efecto de VIP**. Los dMA que fueron cultivados o no con VIP 100 nM durante 24 h se cosecharon y extrajo el ARN. Por RT-qPCR se midió la expresión de VEGF-A, VEGF-C y TGF-β2. Los resultados se expresan como la media ± ES de las veces de incremento de los genes de 5 experimentos distintos.

Los resultados mostraron una tendencia de disminución en los 3 genes medidos.

En conjunto estos resultados muestran que el VIP disminuye procesos asociados a angiogénesis en las HUtMvEC y permiten sugerir que en un ambiente regulado por el trofoblasto, las células Tb 'educan' a los MA de tal manera que liberan mediadores que aumentan el número de segmentos aislados y por ende disminuyen la de túbulos de las células endoteliales. Esta disminución en la formación de túbulos podría estar afectada por la disminución en VEGF-A y VEGF-C y TGF-β2, entre otros.

# DISCUSIÓN

El VIP es un péptido pleiotrópico que modula funciones del sistema nervioso central y autonómico, de la musculatura lisa vascular, la función secretoria exocrina, la respuesta inmune, el crecimiento embrionario. Esta característica, sumado al hecho que el VIP se sintetiza en la placenta, en particular en células trofoblásticas, nos interesó especialmente para explorar su participación como regulador local en la interfase materno-fetal, en particular en la etapa de placentación. Es así que este estudio se realizó a distintos niveles, con los principales resultados que se resumen a continuación:

1- **Efectos del VIP sobre células Tb y su impacto en el perfil funcional de los monocitos**. Las células Tb reclutan a Mo y los activan hacia un perfil anti-inflamatorio productores de IL-10 y que realizan esferocitosis por un mecanismo que involucra TSP-1 y la integrina αvβ3. Estos efectos se ven incrementados cuando las células Tb se pre-incuban con VIP. Si las células Tb son silenciadas en la expresión de VIP, tanto el perfil anti-inflamatorio como la esferocitosis en las células CD14+ se pierde, indicando la implicancia del VIP o mecanismos mediados por éste en los efectos.

2- **Efectos del VIP y los MC de células Tb sobre MA**. Los Mo que se diferencian con el factor de crecimiento GM-CSF (perfil de activación M1), al ser incubados con el MC de las células Tb pre-tratadas con VIP adquieren funciones de un MA con perfil M2, se incrementa la producción y secreción de IL-10 y la esferocitosis. El MC de las células Tb pre-tratadas con VIP induce en los MA (GM-CSF) un estado de activación intermedio entre M1 y M2, a diferencia de aquellos Mo que se diferencian con M-CSF (perfil de activación M2).

3- **Detección y efectos del VIP en placentas humanas de primer trimestre y en leucocitos maternos**. Las células trofoblásticas vellosas y las de las columnas (EVT) expresan VIP. El VIP aumenta la migración de las EVT y éstas células son las que

remodelan las arterias espiraladas y las glándulas. Además, el VIP aumenta la producción de quimioquinas e IL-10 y disminuye la de G-CSF en las EVT. En paralelo, el VIP en las células dNK disminuye IL-1β e IL-8 y en dMA disminuye IL-2, IL-12 y aumenta IL-10 y la expresión y actividad de MMP-2.

4- **Efecto del VIP y los macrófagos en procesos asociados a angiogénesis**. El VIP disminuye la angiogénesis en células epiteliales de la microvasculatura uterina. Además, tanto los MA (GM-CSF) tratados con el MC de Tb pre-tratadas con VIP y los dMA tratados con VIP disminuyen la formación de túbulos.

En los diseños *in vitro* con Mo humanos y líneas celulares trofoblásticas, vimos que el MC de Tb aumentó la migración de Mo, tal como habían descripto otros autores [189,190]. En estos diseños observamos que el VIP *per se* no tuvo un efecto directo en la migración de los Mo. En cambio, cuando las células Tb fueron cultivadas en presencia de VIP 100 nM, la migración fue aún mayor que con Tb solas. Dicho incremento en la migración con el MC (VIP 100 nM) se asocia con un aumento de la expresión del RNAm de MCP-1/CCL2, MIP-1α/CCL3, RANTES/CCL5 e IL-8/CXCL8 inducido por VIP. Además, el mismo efecto se observó en la producción de MCP-1 y RANTES, mientras que al evaluar la secreción de IL-8 por ELISA no se observaron cambios. Esto último puede deberse a la alta producción basal de esta proteína en células trofoblásticas, con niveles tan elevados que este estímulo no alcance para modificarlos. Vale destacar que las quimioquinas IL-8, MCP-1 y RANTES no solo atraen Mo sino también NK, linfocitos T y en menor medida a neutrófilos, todas poblaciones leucocitarias que se encuentran en la interfase en distintos estadios del embarazo y para las que se ha propuesto un papel en el desarrollo de la gestación [189].

Al estudiar el estado de activación de los Mo en los diseños *in vitro*, observamos que ni el VIP ni los MC de Tb modificaron la expresión de las moléculas de activación HLA-DR, CD86 o CD40. Por otro lado, VIP aumentó la producción de CD39, una ectonucleotidasa cuyo producto, adenosina, está asociado a la inducción de un perfil M2[112,191] y disminuyó la citoquina pro-inflamatoria IL-12 asociada a un perfil M1 en la gestación temprana[191,60,46]. Los MC de Tb, en especial el MC (VIP 100) aumentaron la expresión de CD39 y la citoquina anti-inflamatoria IL-10 mientras que no cambiaron o en algunos casos hubo reducción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-12 y TNF-α. Cuando estas células se co-cultivaron con las Tb en diseños que permiten el contacto célula-célula, las diferencias fueron más marcadas. Estos resultados en conjunto sugieren que si bien las células Tb secretan mediadores que modulan el fenotipo de los Mo, el contacto célula-célula puede intensificarlos. Con el objetivo de explorar mecanismos autocrinos y paracrinos del VIP endógeno realizamos ensayos de silenciamiento en las células trofoblásticas con siRNA de VIP y control. Los resultados nos permiten concluir que uno de los factores secretados por las células trofoblástica es VIP, o bien que el VIP de origen trofoblástico media la producción de otros factores liberados por dichas células, ya que al co-cultivar las células CD14+ con las Tb deficientes en este péptido, se observó una marcada reducción en los mediadores anti-inflamatorios (IL-10 y CD39), mientras que no cambiaron los marcadores de perfil pro-inflamatorio (IL-12, CD16 y CD86)[177]. Estos resultados se asemejan a los informados por (Carrión *et al.*, 2016) en que al tratar con VIP a los MA diferenciados a partir de Mo de sangre periférica, aumentan marcadores anti-inflamatorios y se reduce la expresión de algunos marcadores pro-inflamatorios.

La citoquina IL-10 es una de las proteínas anti-inflamatorias más importante en el desarrollo de un micro-ambiente inmunosupresor requerido durante la gestación. Los niveles de IL-10 se incrementan

durante el primer trimestre de la gestación y disminuyen recién al finalizar el tercer trimestre[193]. Esta citoquina inhibe la producción o los efectos de algunos mediadores pro-inflamatorios como INF-γ, TNF-α, IL-2, MMP-9, GM-CSF y las proteínas inducidas por la activación de receptores de tipo toll como el TLR-4, del inglés *toll like receptor* 4 [193,194]. El mantenimiento de una respuesta anti-inflamatoria que favorezca la homeostasis tisular es clave en la etapa de implantación e invasión. De esta forma el sistema inmune contrarresta o modula los mecanismos de inflamación asociados a la injuria, transformación vascular y la alta tasa de apoptosis que supone el período post-implantatorio y de placentación. De hecho, las células apoptóticas, si no son removidas rápidamente por células fagocíticas profesionales, entran en necrosis y generan un estallido pro-inflamatorio. Este efecto deletéreo para el embarazo se ha visto en biopsias de abortos con menor producción de IL-10[193]. Las células fagocíticas CD14+ representan un 20-30% de la población leucocitaria en la decidua. Son células centrales en la remoción de cuerpos apoptóticos y contribuyen con la producción de IL-10, TGF-β u otros mediadores al mantenimiento de un ambiente inmunosupresor en la interfase materno-placentaria. Cuando evaluamos la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (Tb o neutrófilos) en los Mo tratados con VIP o los distintos MC de Tb, observamos que si bien el VIP no fue suficiente para aumentar dicha fagocitosis, sí lo fue el MC de las Tb y aún más cuando previamente habían sido cultivadas con VIP, en ambos modelos. Nuevamente, como se refirió antes respecto de los marcadores, el aumento de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos inducido por el MC involucra mecanismos mediados por VIP, ya que al silenciar VIP en las células Tb (siVIP) se observó una pérdida del efecto mientras que la fagocitosis sí tuvo lugar en células que se transfectaron con la secuencia Scrl usadas como control [177].

Sobre la base que el estímulo con VIP produce cambios en el secretoma de las Tb, investigamos uno de los posibles mecanismos por los cuales el VIP y el tratamiento con el MC (VIP 100) podría aumentar la fagocitosis de cuerpos apoptóticos o esferocitosis. Las Tb incrementaron la expresión de la proteína de entrecruzamiento TSP-1 en forma dependiente de la concentración de VIP. En paralelo, el MC (VIP 100) incrementó en los fagocitos CD14+ la expresión de uno de los receptores de TSP-1, la integrina αvβ3. Estos efectos fueron consistentes con lo informado sobre la alta expresión de esta integrina en la interfase materno-fetal y con la capacidad de los fagocitos profesionales de remover cuerpos apoptóticos. Además, la integrina αvβ3 se vio localizada homogéneamente en la membrana de las células fagocíticas aisladas, en cambio, cuando se las encontró en contacto con células trofoblásticas apoptóticas la fluorescencia se vio concentrada en la proximidad de éstas últimas. Si bien se han descripto numerosos ligandos para la integrina αvβ3 en la interfase materno-fetal, en nuestros diseños *in vitro* confirmamos que la interacción de la integrina αvβ3 con TSP-1 tiene un papel en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos ya que con un anticuerpo neutralizante de TSP-1 o con un anticuerpo neutralizante de otro ligando de esta integrina, MFG-E8, no se observó esferocitosis.

La formación de un puente en la sinapsis fagocítica entre TSP-1 y la integrina αvβ3, modulado por factores inducidos en las células trofoblásticas por el VIP como mostramos en este trabajo, adquiere especial relevancia en el marco de ciertas complicaciones del embarazo con exacerbación de la respuesta inflamatoria. De hecho, este mecanismo podría estar involucrado en el desarrollo de patologías como la preeclampsia donde se observan bajos niveles de TSP-1 en circulación[186], mayor tasa de apoptosis celular[195], mayor porcentaje de MA en la placenta en un perfil de activación M1[195,170] y marcada reducción en los niveles de IL-10[193].

Teniendo en cuenta que los Mo son reclutados a la interfase y allí se diferencian a MA en un micro-ambiente regulado por las Tb, el siguiente paso fue evaluar el efecto del VIP y los MC sobre los MA (GM-CSF). Estas células no presentaron cambios en los marcadores de activación CD80, CD86 y CD40, pero sí un incremento en la producción y secreción de IL-10 sin modificar IL-12 cuando se estimularon con los MC de Tb. En paralelo, el MC (VIP 100) incrementó la esferocitosis. Cuando analizamos la capacidad de reparación tisular de estos MA mediante el ensayo de cierre de la herida, vimos que ninguno de los estímulos cambió la cinética de este proceso. Es interesante destacar que, en cambio, los estudios con diferentes concentraciones de VIP sobre los Mo mostraron que estos últimos secretan mayor cantidad de mediadores que aceleran la migración de las células Tb (cierre de la herida) comparado con los MA (GM-CSF). Estas observaciones sugieren que, en procesos de reparación tisular en la interfase, los Mo durante su diferenciación a MA tendrían un papel más relevante que los MA ya diferenciados. Este hallazgo adquiere mayor impacto si se tiene en cuenta, por un lado, lo informado acerca del muy alto y sostenido reclutamiento de monocitos a la interfase temprana[189,46,42] y, por otro lado, la observación mencionada antes en este trabajo acerca del VIP como inductor de la síntesis de quimioquinas en células trofoblásticas, con un notable aumento sobre la migración de los Mo en los experimentos con transwells.

Como la diferenciación de los Mo a MA con GM-CSF está asociada a un fenotipo semejante al de activación clásica o M1, decidimos estudiar qué ocurría si, como contraparte, se los diferenciaba a un perfil M2 usando M-CSF. Para ello analizamos la expresión del factor KLF-4 asociado a un perfil M2 (regulador y reparador) (Liao et al., 2011; Wang et al., 2017) y de IRF-5 asociado al perfil M1 (Hedl et al., 2016). Vimos que en los MA (M-CSF) se incrementa la expresión del factor KLF-4 mientras que no cambia la expresión de IRF-5 ni

VEGF bajo ninguno de los estímulos. Por otro lado, los MA (GM-CSF) solo presentaron disminución de la expresión de KLF-4, IRF-5 y VEGF cuando se estimularon con el MC (VIP 100). Al analizar los niveles secretados de IL-10 se observó que en ambos, MA (GM-CSF) y MA (M-CSF), el MC (VIP 100) incrementó la expresión de IL-10. Asimismo, en los MA (GM-CSF) también vimos un aumento de IL-10 con el MC. Estos resultados sugieren que los MA (GM-CSF) condicionados por factores de las células trofoblásticas, incluido el VIP, expresan una plasticidad funcional que los mantendría en un estado intermedio entre M1 y M2, más adecuado para las demandas dinámicas de la interfase que un perfil totalmente M2[63,196].

Es muy interesante notar que estos resultados obtenidos con Mo de sangre periférica diferenciados *in vitro* y empleando diseños de co-cultivo, son similares a los obtenidos en los dMA aislados de placentas de primer trimestre. Efectivamente, mostramos que los dMA expresan ambos receptores de VIP y responden al estímulo con este péptido liberando mediadores pro-inflamatorios como IL-1β e IL-6 (pro-implantatorias) y bajos niveles de TNF-α e IL-12. Vimos que además producen quimioquinas como IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1α/β y RANTES. Asimismo, estas células producen mediadores anti-inflamatorios como IL-10, IL-1RA; factores de crecimiento como FGF, GM-CSF y G-CSF y factores pro-angiogénicos como VEGF y PDGF-bb en baja cantidad. Por otro lado, producen citoquinas como IL-2, IL-4 e IL-9. En este trabajo mostramos que el VIP disminuyó la producción de IL-12 e IL-2 mientras que aumentó la producción de IL-10 en dMA. Esta observación sugiere que VIP actuando directamente sobre los dMA puede contribuir en el control del micro-ambiente pro-inflamatorio de la interfase. Tal efecto puede asociarse, por ejemplo, a una disminución en la respuesta T efectora favoreciendo un perfil de linfocitos T reguladores, como se ha informado en otros modelos y usando diversos diseños experimentales [193,197,198].

Otro punto a destacar es que se ha atribuido para los dMA un posible rol en la remodelación de la MEC en la interfase temprana ya que producen MMP-2 y MMP-9[63]. Consistente con un efecto modulador del VIP a este nivel, observamos un aumento en la expresión y actividad de la MMP-2 inducido por VIP en los dMA. Es interesante la diferencia observada entre dMA y dNK en este efecto. Los resultados indican que el VIP solo modula la expresión y actividad de MMP-2 en dMA y no en dNK, observación que permite sostener que los dMA son un blanco más efectivo para los efectos del VIP como regulador de la remodelación en la interfase.

La similitud entre los MA (GM-CSF) tratados con MC (VIP) *in vitro* y los dMA cultivados *ex vivo* con VIP también se observa en la angiogénesis. Ambos provocan una disminución en la formación de túbulos (mallas y piezas) por las EC de la microvasculatura uterina. En el caso de los MA (GM-CSF) la disminución de la angiogénesis se asocia con la disminución que observamos en la expresión de VEGF-A (capítulo 2), entre otros factores involucrados. En línea con este hallazgo, la disminución de la angiogénesis observada con VIP en los dMA podría atribuirse a una tendencia a la diminución que detectamos en la expresión de los genes VEGF-A, VEGF-C y TGF-β, entre otros, cuando los dMA se trataron con VIP. Los resultados son consistentes con un efecto del VIP para controlar los procesos de angiogénesis en la interfase materno-fetal, actuando como un freno; los mecanismos serían directos sobre los dMA, como también a través del condicionamiento de las células trofoblásticas y su acción sobre los dMA. Durante la placentación tienen un lugar fundamental los procesos de angiogénesis y vasculogénesis y tanto las células Tb, dMA, CD como las dNK intervienen en dichos procesos[127,128,119]. La regulación por factores locales de estos procesos es esencial en un embarazo normal: tanto la angiogénesis deficiente[132] como exacerbada[199] subyacen a patologías como RCIU y placenta acreta, respectivamente. Nuestros resultados sugieren que el VIP

puede ser uno de los factores de síntesis local que regule y mantenga un balance adecuado de dichos procesos.

Si bien las células dNK expresan los receptores VPAC1 y VPAC2, el VIP solo provocó disminución de IL-1β e IL-8, mientras que incrementó los niveles de G-CSF. Además, estas mismas al ser cultivadas con VIP demostraron una tendencia al incremento en IL-10 y una tendencia a la disminución de IFN-γ, los cuales están asociados a la función de remodelación de vasos, angiogénesis y favorecen la migración de EVT[82,200]. Durante el primer trimestre las dNK son los leucocitos más representados en la interfase y luego disminuyen cuando se completa la placentación. Por otro lado, patologías como PE o RCIU se asocian a un mayor número de estas células en la interfase materno-fetal y con una respuesta no controlada [201–203]. Teniendo en cuenta esta información, nuestros resultados con VIP sobre células dNK indican un posible papel en el control de la función dNK que aportaría al mantenimiento de la homeostasis tisular.

Tanto las células dNK como los dMA producen quimioquinas relevantes en la invasión del trofoblasto, entre las cuales se cuentan IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 [82,204,133]. En las células dNK disminuye la secreción de IL-8 mientras que no cambia el resto del panel de quimioquinas en estas células ni en dMA. El incremento de IL-10 en dMA y la tendencia al incremento en las dNK al incubarse con VIP y más aún que tanto las EVT como el sinciciotrofoblasto expresan receptores para IL-10[193,205] sugiere un rol relevante de dicha proteína en la interfase, y también sobre la células Tb. Esta compleja red de interacciones o 'diálogo' entre células Tb y células inmunes es necesaria para establecer y mantener la homeostasis en la interfase materno-fetal.

Por último, el abordaje *ex vivo* empleando placentas de primer trimestre humano nos permitió validar muchas de las observaciones

realizadas en diseños de co-cultivos *in vitro* y ampliar de esta forma el impacto de este trabajo. Previamente se había demostrado por inmunohistoquímica la expresión de VIP en placentas de primero y tercer trimestre, aunque no se había identificado su posible localización diferencial en las distintas poblaciones de células trofoblásticas[162]. En este trabajo demostramos que las células citotrofoblásticas (CK-7+) y en especial las células de las columnas donde se concentran las células EVT (HLA-G+) son positivas para la inmunomarcación con VIP. Estas últimas tienen justamente el fenotipo celular asociado a la migración en el endometrio materno e invasión de las Ae y las glándulas en las distintas etapas de la gestación temprana. Nuestros resultados demuestran por primera vez que las EVT son VIP+, y más interesante aún desde el punto de vista funcional, indican que este péptido está involucrado en la migración de las mismas por una vía de señalización intracelular que involucra a la PKA. Estos resultados son consistentes con observaciones previas del laboratorio donde demostramos que VIP aumenta la migración e invasión a través de los receptores VPAC y la vía de señalización PKA/CRE en las células trofoblásticas Swan 71 y HTR8/SVNeo [177]. La expresión de VIP pudimos detectarla en los distintos fenotipos funcionales de EVT, evaluados según su localización o no en la luz de los vasos, por ejemplo, sugiriendo nuevamente que la función de las EVT puede ser regulada por el VIP y que la falta del mismo podría llevar a la pérdida de algunas funciones de las EVT. La inclusión de un anticuerpo neutralizante del VIP en los ensayos *ex vivo* con explantos de placentas de primer trimestre, como también usando un inhibidor de PKA, se pudo revertir el efecto observado en la migración e invasión de las células trofoblásticas. El impacto de esta observación realizada en los explantos pudo complementarse y extenderse con los resultados obtenidos al estudiar genes involucrados en la remodelación de la MEC: en células Tb deficientes de VIP por silenciamiento con un siRNA, observamos una disminución

significativa en la expresión del RNAm de MMPs y TIMP2 con una tendencia a la disminución en TIMP1. Fallas en la migración e invasión de las EVT y la deficiente producción de MMPs y TIMPs están asociados en patologías como la PE y RCIU[170,21,28,144,206].

Las células Tb de primer trimestre en cultivo mantienen un microambiente donde solo algunos marcadores pro-inflamatorios están elevados como IL-1β e IL-6, a los cuales a su vez se les adjudican roles pro-implantatorios. Vimos que estas células producen IL-9, algunos factores de crecimiento como G-CSF y son altas productoras de quimioquinas como IL-8, MCP-1, MIP-1α/β, IP-10 y RANTES. En cuanto al efecto del VIP sobre los explantos *ex vivo*, en línea con los experimentos *in vitro* con las líneas celulares, el VIP incrementó el panel de citoquinas mencionadas exceptuando MIP-1α y MIP-1β. En aquellos explantos tratados con VIP 100 nM se incrementó la de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 y no aumentó la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. A su vez, VIP produjo una disminución marcada de G-CSF. Es interesante este efecto, ya que el G-CSF está fuertemente asociado al desarrollo y sobrevida de los neutrófilos y la disminución de su expresión inducida por VIP en las células trofoblásticas es consistente con trabajos previos donde informamos acerca de la capacidad de las células trofoblásticas de desactivar a los neutrófilos por mecanismos mediados por VIP[207].

Los resultados obtenidos en este trabajo empleando diseños de co-cultivo con las distintas líneas trofoblásticas y leucocitos, y confirmados en gran parte en diseños *ex vivo* con explantos de placentas de primer trimestre, fuertemente sugieren que el VIP participa en la funcionalidad de las EVT, en su capacidad de migrar e invadir el estroma decidual, como un potente modulador del microambiente inmunológico y como regulador de la angiogénesis. VIP moduló la función de las células inmunes en diseños *in vitro* y *ex vivo*, en particular de los Mo, MA, dMA y dNK. Estos efectos del VIP se

dan en el marco de un condicionamiento de las células trofoblásticas o por acciones directas del péptido sobre poblaciones leucocitarias presentes en el útero en la interfase temprana y en la etapa de placentación.

Los resultados de este trabajo constituyen un conjunto de evidencias a nivel celular y molecular para fundamentar el alcance del VIP como un marcador de la función trofoblástica en etapas tempranas de la gestación. También aportan evidencias para el eventual análisis del VIP y sus receptores como candidatos para desarrollos terapéuticos en complicaciones del embarazo asociadas a fallas en la placentación profunda con exacerbación de la respuesta inflamatoria.

# REFERENCIAS


1. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ, Implantation N. Implantation and the survival of early pregnancy. N Engl J Med. 2001;345: 1400–1408. doi:10.1056/NEJMra000763
2. Jarvis GE. Early embryo mortality in natural human reproduction: What the data say. F1000Research. 2016;5: 2765. doi:10.12688/f1000research.8937.2
3. Nora L. Yranzo. Inmunobiología del embarazo: mecanismos celulares y moleculares involucrados en el mantenimiento de la unidad maternofetal. Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. 1999. p. 614.
4. Loke Y. Human trophoblast development. 1°. Cambridge University; 1995.
5. Vanina A. Fontana. Citoquinas: el lenguaje del diálogo materno-embrionario. Quim Viva. Buenos Aires; 2008;7: 80–102. Available: http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v7n2/fontana.html
6. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. Reprod Biol Endocrinol. 2007;5: 6. doi:10.1186/1477-7827-5-6
7. Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. Nat Rev Immunol. 2006;6: 584–94. doi:10.1038/nri1897
8. Fitzgerald JS, Germeyer A, Huppertz B, Jeschke U, Kn??fler M, Moser G, et al. Governing the Invasive Trophoblast: Current Aspects on Intra- and Extracellular Regulation. Am J Reprod Immunol. 2010;63: 492–505. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00824.x
9. Aplin J. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. Reprod Biomed Online. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK; 2006;13: 833–839. doi:10.1016/S1472-6483(10)61032-2
10. Ross. Aparato Genital Femenino. 5°. Panamericana, editor. 2007.
11. Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. Reprod Biol Endocrinol. 2004;2: 48. doi:10.1186/1477-7827-2-48
12. Aplin JD, Ruane PT. Embryo–epithelium interactions during implantation at a glance. J Cell Sci. 2017;130: 15–22. doi:10.1242/jcs.175943
13. Bilinski MJ, Thorne JG, Oh MJ, Leonard S, Murrant C, Tayade C, et al. Uterine NK cells in murine pregnancy. Reprod Biomed Online. 2008;16: 218–26. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284876
14. Mavoungou E. Interactions between natural killer cells, cortisol and prolactin in malaria during pregnancy. Clin Med Res. 2006;4: 33–41. doi:10.3121/cmr.4.1.33
15. Xu G, Guimond M-J, Chakraborty C, Lala PK. Control of proliferation, migration, and invasiveness of human extravillous trophoblast by decorin, a decidual product. Biol Reprod. 2002;67: 681–9. doi:10.1095/biolreprod67.2.681
16. Yong HEJ, Kokkinos MI, Kalionis B, Davies JE, Murthi P. Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation. 2016;10: 310–321.
17. Dasilva-arnold S, James JL, Al-khan A, Zamudio S, Illsley NP. Differentiation

of fi rst trimester cytotrophoblast to extravillous trophoblast involves an epithelial e mesenchymal transition. Placenta. Elsevier Ltd; 2015; 1–7. doi:10.1016/j.placenta.2015.10.013

18. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial – mesenchymal transition. Nat Publ Gr. Nature Publishing Group; 2014;15: 178–196. doi:10.1038/nrm3758

19. Racca AC, Camolotto SA, Ridano ME, Bocco JL, Genti-Raimondi S, Panzetta-Dutari GM. Krüppel-Like Factor 6 Expression Changes during Trophoblast Syncytialization and Transactivates ßhCG and PSG Placental Genes. Wang H, editor. PLoS One. 2011;6: e22438. doi:10.1371/journal.pone.0022438

20. Bischof P, Meisser a, Campana a. Control of MMP-9 expression at the maternal-fetal interface. J Reprod Immunol. 2002;55: 3–10.

21. Zhang X, Wang HM, Lin HY, Liu GY, Li QL, Zhu C. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPS) and their inhibitors (TIMPS) during mouse peri-implantation: role of nitric oxide. Placenta. 2004;25: 243–252. doi:10.1016/j.placenta.2003.08.014

22. Harris LK, Smith SD, Keogh RJ, Jones RL, Baker PN, Knöfler M, et al. Trophoblast- and vascular smooth muscle cell-derived MMP-12 mediates elastolysis during uterine spiral artery remodeling. Am J Pathol. 2010;177: 2103–15. doi:10.2353/ajpath.2010.100182

23. Anacker J, Segerer SE, Hagemann C, Feix S, Kapp M, Bausch R, et al. Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases. Mol Hum Reprod. 2011;17: 637–652. doi:10.1093/molehr/gar033

24. Harris LK, Aplin JD. Vascular Remodeling and Extracellular Matrix Breakdown in the Uterine Spiral Arteries During Pregnancy. Reprod Sci. 2007;14: 28–34. doi:10.1177/1933719107309588

25. Sueoka K, Shiokawa S, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M, Yoshimura Y. Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation. Fertil Steril. 1997;67: 799–811. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130881

26. Spessotto P, Bulla R, Danussi C, Radillo O, Cervi M, Monami G, et al. EMILIN1 represents a major stromal element determining human trophoblast invasion of the uterine wall. J Cell Sci. 2006;119: 4574–4584. doi:10.1242/jcs.03232

27. Choudhury RH, Dunk CE, Lye SJ, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Extravillous Trophoblast and Endothelial Cell Crosstalk Mediates Leukocyte Infiltration to the Early Remodeling Decidual Spiral Arteriole Wall. 2017; doi:10.4049/jimmunol.1601175

28. Weiss G, Sundl M, Glasner A, Huppertz B, Moser G. The trophoblast plug during early pregnancy: a deeper insight. Histochem Cell Biol. Springer Berlin Heidelberg; 2016;146: 749–756. doi:10.1007/s00418-016-1474-z

29. Aplin JD, Straszewski-Chavez SL, Kalionis B, Dunk C, Morrish D, Forbes K, et al. Trophoblast differentiation: progenitor cells, fusion and migration -- a workshop report. Placenta. 2006;27 Suppl A: S141-3. doi:10.1016/j.placenta.2006.01.011

30. Moser G, Gauster M, Orendi K, Glasner A, Theuerkauf R, Huppertz B. Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. Hum Reprod. 2010;25: 1127–1136. doi:10.1093/humrep/deq035

31. Ramhorst R, Grasso E, Paparini D, Hauk V, Gallino L, Calo G, et al. Decoding

the chemokine network that links leukocytes with decidual cells and the trophoblast during early implantation. Cell Adh Migr. 2016;10: 197–207. doi:10.1080/19336918.2015.1135285

32. Gregori S, Amodio G, Quattrone F, Panina-Bordignon P. HLA-G orchestrates the early interaction of human trophoblasts with the maternal niche. Front Immunol. 2015;6: 1–8. doi:10.3389/fimmu.2015.00128

33. Singh H, Aplin JD. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. J Anat. 2009;215: 3–13. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.01034.x

34. Fowden AL, Forhead AJ, Coan PM, Burton GJ. The placenta and intrauterine programming. J Neuroendocrinol. 2008;20: 439–50. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01663.x

35. Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim YM, Straszewski-Chavez SL, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. J Immunol. 2004;173: 4286–4296. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383557

36. Racicot K, Kwon J-Y, Aldo P, Silasi M, Mor G. Understanding the Complexity of the Immune System during Pregnancy. Am J Reprod Immunol. 2014;72: 107–116. Available: http://doi.wiley.com/10.1111/aji.12289

37. Fainboim-Geffner. Introducción a la Inmunología. sexta. 2011.

38. Vermeulen M. Inmunidad mediada por linfocitos T. In: Fainboim-Geffner, editor. Introducción a la Inmunología Humana. 6°. 2011.

39. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Tolerance, suppression and the fetal allograft. J Mol Med (Berl). 2005;83: 88–96. doi:10.1007/s00109-004-0608-2

40. BILLINGHAM RE, BRENT L, MEDAWAR PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature. 1953;172: 603–606. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13099277

41. Kinder JM, Stelzer IA, Arck PC, Way SS. Immunological implications of pregnancy-induced microchimerism. Nat Rev Immunol. Nature Publishing Group; 2017;17: 483–494. doi:10.1038/nri.2017.38

42. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. Am J Reprod Immunol. 2010;63: 425–433. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x

43. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. Ann N Y Acad Sci. 2011;1221: 80–87. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x

44. Mor G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. Ann N Y Acad Sci. 2008;1127: 121–8. doi:10.1196/annals.1434.006

45. Peng B, Koga K, Cardenas I, Aldo P, Mor G. Phagocytosis of apoptotic trophoblast cells by human endometrial endothelial cells induces proinflammatory cytokine production. Am J Reprod Immunol. 2010;64: 12–19. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00815.x

46. Fest S, Aldo PB, Abrahams VM, Visintin I, Alvero A, Chen R, et al. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. Am J Reprod Immunol. 2007;57: 55–66. doi:10.1111/j.1600-0897.2006.00446.x

47. Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-

placental "graft": ten ways to support a child for nine months. Curr Opin Immunol. 2000;12: 731–7. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102780

48. Bulmer JN, Longfellow M, Ritson A. Leukocytes and resident blood cells in endometrium. Ann N Y Acad Sci. 1991;622: 57–68. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2064208

49. Cook CH, Bickerstaff A a, Wang J-J, Nadasdy T, Della Pelle P, Colvin RB, et al. Spontaneous renal allograft acceptance associated with "regulatory" dendritic cells and IDO. J Immunol. 2008;180: 3103–3112. Available: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2365502%7B&%7Dtool=pmcentrez%7B&%7Drendertype=abstract

50. Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. Placenta. 2005;26: 540–7. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15993703

51. Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. Immunol Rev. 2011;241: 20–38. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x

52. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. J Exp Med. 2003;198: 1201–1212. doi:10.1084/jem.20030305

53. Le Bouteiller P. Human Decidual NK Cells: Unique and Tightly Regulated Effector Functions in Healthy and Pathogen-Infected Pregnancies. Front Immunol. 2013;4: 404. doi:10.3389/fimmu.2013.00404

54. Tang MX, Hu XH, Liu ZZ, Kwak-Kim J, Liao AH. What are the roles of macrophages and monocytes in human pregnancy? J Reprod Immunol. Elsevier Ireland Ltd; 2015;112: 73–80. doi:10.1016/j.jri.2015.08.001

55. Houser BL. Decidual macrophages and their roles at the maternal-fetal interface. Yale J Biol Med. 2012;85: 105–118. Available: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3313525%7B&%7Dtool=pmcentrez%7B&%7Drendertype=abstract

56. Saito S, Nakashima A, Shima T IM, Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M, Saito S, Nakashima A, Shima T IM. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. Am J Reprod Immunol. 2010;63(6):601-: 601–610. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x

57. Burt TD. Fetal Regulatory T Cells and Peripheral Immune Tolerance In Utero: Implications for Development and Disease. Am J Reprod Immunol. 2013;69: 346–358. doi:10.1111/aji.12083

58. Leber A, Teles A, Zenclussen AC. Regulatory T cells and their role in pregnancy. Am J Reprod Immunol. 2010;63: 445–59. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00821.x

59. Laskarin G, Kämmerer U, Rukavina D, Thomson AW, Fernandez N, Blois SM. Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. Am J Reprod Immunol. 2007;58: 255–67. doi:10.1111/j.1600-0897.2007.00511.x

60. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol. 2008;8: 958–69. doi:10.1038/nri2448

61. Brancato SK, Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. Am J Pathol. Elsevier Inc.; 2011;178: 19–25. doi:10.1016/j.ajpath.2010.08.003

62. Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology; 2009;174: 1959–71. doi:10.2353/ajpath.2009.080995

63. Lash GE, Pitman H, Morgan HL, Innes BA, Agwu CN, Bulmer JN. Decidual macrophages: key regulators of vascular remodeling in human pregnancy. J Leukoc Biol. 2016;100: 315–25. doi:10.1189/jlb.1A0815-351R

64. Renaud S, Graham C. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. Immunol Invest. 2008;37: 535–64.

65. Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. Am J Reprod Immunol. 2004;51: 275–82. doi:10.1111/j.1600-0897.2004.00156.x

66. Hunt JS. Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. J Reprod Immunol. 1989;16: 1–17. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2689644

67. Svensson J, Jenmalm MC, Matussek A, Geffers R, Berg G, Ernerudh J. Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. J Immunol. 2011;187: 3671–3682. doi:10.4049/jimmunol.1100130

68. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. [Internet]. Annual review of immunology. 2015. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112220

69. Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. J Innate Immun. 2014;6: 716–26. doi:10.1159/000364945

70. Pitman H, Innes BA, Robson SC, Bulmer JN, Lash GE. Altered expression of interleukin-6, interleukin-8 and their receptors in decidua of women with sporadic miscarriage. Hum Reprod. 2013;28: 2075–2086. doi:10.1093/humrep/det233

71. Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. Reprod Biol Endocrinol RB{&}E. 2003;1: 119. doi:10.1186/1477-7827-1-119

72. Zhang Y-H, He M, Wang Y, Liao A-H. Modulators of the Balance between M1 and M2 Macrophages during Pregnancy. Front Immunol. 2017;8: 1–12. doi:10.3389/fimmu.2017.00120

73. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. Front Immunol. 2014;5: 1–9. doi:10.3389/fimmu.2014.00614

74. Li M, Piao L, Chen CP, Wu X, Yeh CC, Masch R, et al. Modulation of Decidual Macrophage Polarization by Macrophage Colony-Stimulating Factor Derived from First-Trimester Decidual Cells: Implication in Preeclampsia. Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology; 2016;186: 1258–1266. doi:10.1016/j.ajpath.2015.12.021

75. Heikkinen J, Möttönen M, Komi J, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. Clin Exp Immunol. 2003;131: 498–505. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02092.x

76. Wang K, Zhou W, Cai Q, Cheng J, Cai R, Xing R. SUMOylation of KLF4 promotes IL-4 induced macrophage M2 polarization. Cell Cycle. 2017;16: 374–381. doi:10.1080/15384101.2016.1269045

77. Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, et al. Kr{ü}ppel-like

factor 4 regulates macrophage polarization. J Clin Invest. 2011;121: 2736–2749. doi:10.1172/JCI45444

78. Hedl M, Yan J, Abraham C. IRF5 and IRF5 Disease-Risk Variants Increase Glycolysis and Human M1 Macrophage Polarization by Regulating Proximal Signaling and Akt2 Activation. Cell Rep. 2016;16: 2442–55. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.060

79. Zhang J, Chen Z, Smith GN, Croy BA. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? Cell Mol Immunol. 2010;8: 1–11. doi:10.1038/cmi.2010.38

80. Robson A, Harris LK, Innes BA, Lash GE, Aljunaidy MM, Aplin JD, et al. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. FASEB J. 2012;26: 4876–4885. doi:10.1096/fj.12-210310

81. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells : a unique innate immunoregulatory role for the CD56 bright subset. 2017;97: 3146–3152.

82. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. Nat Med. 2006;12: 1065–1074. doi:10.1038/nm1452

83. King A, Balendran IN, Wooding P, Carter NP, Loket YW. CD3-Leukocytes Present in the Human Uterus During Early Placentation : Phenotypic and Morphologic Characterization of the CD56 ++ Population. 1991;1: 169–190.

84. Parham P. NK Cells and Trophoblasts. J Exp Med. 2004;200: 951–955. doi:10.1084/jem.20041783

85. Santoni A, Carlino C, Gismondi A. Uterine NK cell development, migration and function. Reprod Biomed Online. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK; 2008;16: 202–210. doi:10.1016/S1472-6483(10)60575-5

86. Zhang C, Zhang J, Tian Z. The regulatory effect of natural killer cells: do "NK-reg cells" exist? Cell Mol Immunol. 2006;3: 241–254.

87. Le Bouteiller P, Pizzato N, Barakonyi A SC. HLA-G, pre-eclampsia, immunity and vascular events. J Reprod Immunol. 2003;59: 219–34.

88. Sabatté J, Maggini J, Nahmod K, Amaral MM, Martínez D, Salamone G, et al. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. Cytokine Growth Factor Rev. 2007;18: 5–17. doi:10.1016/j.cytogfr.2007.01.002

89. Salamone G, Fraccaroli L, Gori S, Grasso E, Paparini D, Geffner J, et al. Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells. Hum Reprod. 2012;27: 2598–606. doi:10.1093/humrep/des208

90. Lee JY, Lee M, Lee SK. Role of endometrial immune cells in implantation. Clin Exp Reprod Med. 2011;38: 119–125. doi:10.5653/cerm.2011.38.3.119

91. Pollard JW. Uterine DCs are essential for pregnancy. J Clin Invest. 2008;118: 3832–3835. doi:10.1172/JCI37733

92. Plaks V, Birnberg T, Berkutzki T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V, et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. Analysis. 2008;118: 3954–3965. doi:10.1172/JCI36682DS1

93. Blois SM, Klapp BF, Barrientos G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. J Reprod Immunol. Elsevier Ireland Ltd; 2011;88: 86–92. doi:10.1016/j.jri.2010.11.002

94. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, de Saint-Vis B, Dezutter-Dambuyant C, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. Adv Exp Med Biol. 1997;417: 21–5. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9286332

95. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubeau M, Dai X-M, et al. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. Nat Immunol. 2006;7: 265–73. doi:10.1038/ni1307

96. Dakic A, Wu L. Hemopoietic precursors and development of dendritic cell populations. Leuk Lymphoma. 2003;44: 1469–75. doi:10.3109/10428190309178766

97. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93: 2588–92. Available: http://www.pnas.org/content/93/6/2588.short

98. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998;392: 245–52. doi:10.1038/32588

99. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. Immunobiology. 2006;211: 609–18. doi:10.1016/j.imbio.2006.05.025

100. Kupiec-Weglinski JW, Austyn JM, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues. J Exp Med. 1988;167: 632–45. Available: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2188851&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

101. Fraccaroli L, Grasso E, Hauk V, Paparini D, Soczewski E, Mor G, et al. VIP boosts regulatory T cell induction by trophoblast cells in an in vitro model of trophoblast?maternal leukocyte interaction. J Leukoc Biol. 2015;98. doi:10.1189/jlb.1A1014-492RR

102. Nagler-Anderson C, Bhan AK, Podolsky DK, Terhorst C. Control freaks: immune regulatory cells. Nat Immunol. 2004;5: 119–22. doi:10.1038/ni0204-119

103. Hill JA CB. Maternal immunological aspects of pregnancy success and failure. J Reprod Fertil Suppl. 2000;55: 1–7.

104. Chaouat G, Dubanchet S, Ledée N. Cytokines: Important for implantation? J Assist Reprod Genet. 2007;24: 491–505. doi:10.1007/s10815-007-9142-9

105. Ramhorst R, Roca V, Larocca L, Fraccaroli L, Alfieri J PLC, Ramhorst R, Roca V, Larocca L, Fraccaroli L, Alfieri J, et al. An immunopharmacological view on the maternal-fetal early interaction under physiological and pathological conditions. Inflammatory mediators involved in normal and pathological pregnancies. Research S. 2008.

106. Lee YK, Mukasa R, Hatton RD, Weaver CT. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. Curr Opin Immunol. 2009;21: 274–280. doi:10.1016/j.coi.2009.05.021

107. Bansal AS. Joining the immunological dots in recurrent miscarriage. Am J Reprod Immunol. 2010;64: 307–315. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00864.x

108. Tilburgs T, Schonkeren D, Eikmans M, Nagtzaam NM, Datema G, Swings GM, et al. Human decidual tissue contains differentiated CD8+ effector-memory T cells with unique properties. J Immunol. 2010;185: 4470–4477.

doi:10.4049/jimmunol.0903597

109. Santoni A, Zingoni A, Cerboni C, Gismondi A. Natural killer (NK) cells from killers to regulators: distinct features between peripheral blood and decidual NK cells. Am J Reprod Immunol. 2007;58: 280–8. doi:10.1111/j.1600-0897.2007.00513.x

110. Chorny A, Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells that prevent acute graft-versus-host disease while maintaining the graft-versus-tumor response. Blood. 2006;107: 3787–94. Available: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1895782&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

111. Arruvito L, Payaslián F, Baz P, Podhorzer A, Billordo A, Pandolfi J, et al. Identification and clinical relevance of naturally occurring human CD8+HLA-DR+ regulatory T cells. J Immunol. 2014;193: 4469–4476. doi:10.4049/jimmunol.1401490

112. Svensson-Arvelund J, Mehta RB, Lindau R, Mirrasekhian E, Rodriguez-Martinez H, Berg G, et al. The human fetal placenta promotes tolerance against the semiallogeneic fetus by inducing regulatory T cells and homeostatic M2 macrophages. J Immunol. 2015;194: 1534–44. doi:10.4049/jimmunol.1401536

113. Teles A, Thuere C, Wafula PO, El-Mousleh T, Zenclussen ML, Zenclussen AC. Origin of Foxp3(+) cells during pregnancy. Am J Clin Exp Immunol. 2013;2: 222–33. Available: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3808935&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

114. Mahnke K, Knop J, Enk AH. Induction of tolerogenic DCs: "you are what you eat". Trends Immunol. 2003;24: 646–51. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644138

115. Zhou W-H, Du M-R, Dong L, Yu J, Li D-J. Chemokine CXCL12 promotes the cross-talk between trophoblasts and decidual stromal cells in human first-trimester pregnancy. Hum Reprod. 2008;23: 2669–2679. doi:10.1093/humrep/den308

116. Bulmer JN, Innes BA, Levey J, Robson SC, Lash GE. The role of vascular smooth muscle cell apoptosis and migration during uterine spiral artery remodeling in normal human pregnancy. FASEB J. 2012;26: 2975–2985. doi:10.1096/fj.12-203679

117. Zucker S, Doshi K, Cao J, Brook S, York N. MEASUREMENT OF MATRIX METALLOPROTEINASES ( MMP S ) AND TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASES ( TIMP ) IN BLOOD AND URINE : POTENTIAL CLINICAL APPLICATIONS Health Science Center , State University of New York at Stony. In: Makowski G, editor. Advances in clinical chemistry. ELSEVIER. Academic Press; 2004. pp. 38–74.

118. Naruse K, Lash GE, Innes BA, Otun HA, Searle RF, Robson SC, et al. Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy. Hum Reprod. 2008;24: 553–561. doi:10.1093/humrep/den408

119. Harris LK, Harris LK. IFPA Gabor Than Award lecture: Transformation of the spiral arteries in human pregnancy: key events in the remodelling timeline. Placenta. 2011;32 Suppl 2: 154–8. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167598

120. Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE. Extravillous trophoblast and decidual

natural killer cells: a remodelling partnership. 2012;18: 458–471. doi:10.1093/humupd/dms015

121. Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE, James JL. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. Reproduction. 2010;140: 803–813. doi:10.1530/REP-10-0294

122. Rahat B, Sharma R, Bagga R, Hamid A, Kaur J. Imbalance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preeclampsia and gestational trophoblastic diseases. Reproduction. 2016;152: 11–22. doi:10.1530/REP-16-0060

123. Segond N, Degrelle S a, Berndt S, Clouqueur E, Rouault C, Saubamea B, et al. Transcriptome analysis of PPARγ target genes reveals the involvement of lysyl oxidase in human placental cytotrophoblast invasion. PLoS One. 2013;8: e79413. doi:10.1371/journal.pone.0079413

124. Repeke CE, Ferreira SB, Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, et al. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. Bone. Elsevier Inc.; 2010;46: 1122–1130. doi:10.1016/j.bone.2009.12.030

125. Meng X, Yang J, Zhang K, An G, Kong J, Jiang F, et al. Regulatory T cells prevent angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E knockout mice. Hypertension. 2014;64: 875–882. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03950

126. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature. 1997;386: 671–674. doi:10.1038/386671a0

127. Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG. Nonclassic Endogenous Novel Regulators of Angiogenesis. Pharmacol Rev. 2007;59: 185–205. doi:10.1124/pr.59.2.3

128. Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MPJ, Donners MMPC. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. Angiogenesis. 2014;17: 109–18. doi:10.1007/s10456-013-9381-6

129. Kwak-Kim J, Yang KM, Gilman-Sachs A. Recurrent pregnancy loss: a disease of inflammation and coagulation. J Obstet Gynaecol Res. 2009;35: 609–622. doi:10.1111/j.1447-0756.2009.01079.x

130. Redman C, Sargent I. Immunology of pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2010;63: 534–43.

131. Brown MB, von Chamier M, Allam AB, Reyes L. M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. Front Immunol. 2014;5: 606. doi:10.3389/fimmu.2014.00606

132. Girardi G, Yarilin D, Thurman JM, Holers VM, Salmon JE, Holers M, et al. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. J Exp Med. 2006;203: 2165–2175. doi:10.1084/jem.20061022

133. Pérez Leirós C, Ramhorst R. Tolerance Induction at the Early Maternal-Placental Interface Through Selective Cell Recruitment and Targeting by Immune Polypeptides. Am J Reprod Immunol. 2013;69: 359–368. doi:10.1111/aji.12087

134. Schutters K, Kusters DHM, Chatrou MLL, Montero-Melendez T, Donners M, Deckers NM, et al. Cell surface-expressed phosphatidylserine as therapeutic target to enhance phagocytosis of apoptotic cells. Cell Death Differ. Nature

Publishing Group; 2012;20: 49–56. doi:10.1038/cdd.2012.107

135. Ravichandran KS. Beginnings of a Good Apoptotic Meal: The Find-Me and Eat-Me Signaling Pathways. Immunity. 2011;35: 445–455. doi:10.1016/j.immuni.2011.09.004

136. Freeman SA, Grinstein S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. Immunol Rev. 2014;262: 193–215. doi:10.1111/imr.12212

137. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Nature. 1990;343: 170–3. doi:10.1038/343170a0

138. Ortiz-Masià D, Díez I, Calatayud S, Hernández C, Cosín-Roger J, Hinojosa J, et al. Induction of CD36 and thrombospondin-1 in macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process. PLoS One. 2012;7: e48535. doi:10.1371/journal.pone.0048535

139. Pelling A, Veraitch F, Chu C, Mason C, Horton M. Mechanical dynamics of single cells during early apoptosis. Pelling AE1, Veraitch FS, Chu CP, Mason C, Horton MA. Cell Motil Cytoskeleton. 2009;66: 409–22. doi:10.1002/cm.20391

140. Stern M, Savill J, Haslett C. Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. Am J Pathol. 1996;149: 911–21.

141. Dupuy AG, Caron E. Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts. J Cell Sci. 2008;121: 1773–83. doi:10.1242/jcs.018036

142. Tóth B, Garabuczi E, Sarang Z, Vereb G, Vámosi G, Aeschlimann D, et al. Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. J Immunol. 2009;182: 2084–92. doi:10.4049/jimmunol.0803444

143. Chung T, Park M, Kim H, Choi H, Ha K. Integrin αVβ3 and αVβ5 are required for leukemia inhibitory factor-mediated the adhesion of trophoblast cells to the endometrial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2016;469: 936–40. doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.103

144. Lala PK, Nandi P. Mechanisms of trophoblast migration , endometrial angiogenesis in preeclampsia : The role of decorin. Cell Adh Migr. Taylor & Francis; 2016;10: 111–125. doi:10.1080/19336918.2015.1106669

145. Rosignoli F, Torroba M, Juarranz Y, García-Gómez M, Martinez C, Gomariz RP, et al. VIP and tolerance induction in autoimmunity. Ann N Y Acad Sci. 2006;1070: 525–30. doi:10.1196/annals.1317.073

146. Fraccaroli L, Alfieri J, Larocca L, Calafat M, Roca V, Lombardi E, et al. VIP modulates the pro-inflammatory maternal response, inducing tolerance to trophoblast cells. Br J Pharmacol. 2009;156: 116–26. doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00055.x

147. Spong CY, Lee SJ, McCune SK, Gibney G, Abebe DT, Alvero R, et al. Maternal regulation of embryonic growth: the role of vasoactive intestinal peptide. Endocrinology. 1999;140: 917–24. doi:10.1210/endo.140.2.6481

148. Gervasini C, Mottadelli F, Ciccone R, Castronovo P, Milani D, Scarano G, et al. High frequency of copy number imbalances in Rubinstein-Taybi patients negative to CREBBP mutational analysis. Eur J Hum Genet. Nature Publishing Group; 2010;18: 768–775. doi:10.1038/ejhg.2010.1

149. Schwartz CJ, Kimberg D V., Sheerin HE, Field M, Said SI. Vasoactive

intestinal peptide stimulation of adenylate cyclase and active electrolyte secretion in intestinal mucosa. J Clin Invest. 1974;54: 536–544. doi:10.1172/JCI107790

150. Waschek J. VIP and PACAP: neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair. Br J Pharmacol. 2013;169: 512–523. doi:10.1111/bph.12181

151. Said SI. The discovery of VIP: initially looked for in the lung, isolated from intestine, and identified as a neuropeptide. Peptides. 2007;28: 1620–1621. doi:10.1016/j.peptides.2007.06.007

152. Bell LA, Bell K a, McQuiston a R. Acetylcholine release in mouse hippocampal CA1 preferentially activates inhibitory-selective interneurons via α4β2* nicotinic receptor activation. Front Cell Neurosci. 2015;9: 115. doi:10.3389/fncel.2015.00115

153. Valdehita A, Bajo AM, Fernández-martínez AB, Arenas MI, Vacas E, Valenzuela P, et al. Peptides Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide ( VIP ) receptors in human breast cancer. Peptides. Elsevier Inc.; 2010;31: 2035–2045. doi:10.1016/j.peptides.2010.07.024

154. Martinez C, Delgado M, Abad C, Gomariz RP, Ganea D, Leceta J. Regulation of VIP production and secretion by murine lymphocytes. J Neuroimmunol. 1999;93: 126–38. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10378876

155. Souza TML, Temerozo JR, Giestal-de-Araujo E, Bou-Habib DC. The effects of neurotrophins and the neuropeptides VIP and PACAP on HIV-1 infection: histories with opposite ends. Neuroimmunomodulation. 2014;21: 268–282. doi:10.1159/000357434

156. Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Gomariz RP, et al. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. J Mol Med (Berl). 2002;80: 16–24. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11862320

157. Pozo D, Anderson P, Gonzalez-Rey E. Induction of alloantigen-specific human T regulatory cells by vasoactive intestinal peptide. J Immunol. 2009;183: 4346–59. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734220

158. Rosignoli F, Goren NB, Pérez Leirós C. Alterations in Nitric Oxide Synthase Activity and Expression in Submandibular Glands of NOD Mice. Clin Immunol. 2001;101: 86–93. doi:10.1006/clim.2001.5097

159. Vanesa H, Mario C, Esteban G, Laura F, Daniel P, Rosanna R, et al. Neuroimmune Aspects of Sjogren's Syndrome: Role of VIP/VPAC System in Immune and Salivary Gland Epithelial Cell Function. Curr Pharm Des. 2014;20: 4760–4765. Available: http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=20&issue=29&spage=4760

160. Dimitriadis GK, Weickert MO, Randeva HS, Kaltsas G, Grossman A. Medical management of secretory syndromes related to gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. Endocr Relat Cancer. 2016;23: R423–R436. doi:10.1530/ERC-16-0200

161. Verma AK, Manohar M, Upparahalli Venkateshaiah S, Mishra A. Neuroendocrine cells derived chemokine vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in allergic diseases. Cytokine Growth Factor Rev. 2017; doi:10.1016/j.cytogfr.2017.09.002

162. Marzioni D, Fiore G, Giordano A, Nabissi M, Florio P, Verdenelli F, et al. Placental Expression of Substance P and Vasoactive Intestinal Peptide:

Evidence for a Local Effect on Hormone Release. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90: 2378–2383. doi:10.1210/jc.2004-1512

163. Grasso E, Gori S, Paparini D, Soczewski E, Fernández L, Gallino L, et al. VIP induces the decidualization program and conditions the immunoregulation of the implantation process. Mol Cell Endocrinol. 2017; doi:10.1016/j.mce.2017.07.006

164. Roca V, Calafat M, Larocca L, Ramhorst R, Farina M, Franchi AM, et al. Potential immunomodulatory role of VIP in the implantation sites of prediabetic nonobese diabetic mice. Reproduction. 2009;138: 733–42. doi:10.1530/REP-09-0171

165. Larocca L, Calafat M, Roca V, Franchi AM, Leirós CP. VIP limits LPS-induced nitric oxide production through IL-10 in NOD mice macrophages. Int Immunopharmacol. 2007;7: 1343–9. doi:10.1016/j.intimp.2007.05.017

166. Larocca L, Hauk V, Calafat M, Roca V, Fraccaroli L, Franchi A, et al. Modulation of macrophage inflammatory profile in pregnant nonobese diabetic (NOD) mice. Mol Cell Endocrinol. 2011;333: 112–8. doi:10.1016/j.mce.2010.11.035

167. Gallino L, Calo G, Hauk V, Fraccaroli L, Grasso E, Vermeulen M, et al. VIP treatment prevents embryo resorption by modulating efferocytosis and activation profile of maternal macrophages in the CBAxDBA resorption prone model. Sci Rep. 2016;6: 18633. doi:10.1038/srep18633

168. Calo G, Sabbione F, Vota D, Paparini D, Ramhorst R, Trevani A, et al. Trophoblast cells inhibit neutrophil extracellular trap formation and enhance apoptosis through vasoactive intestinal peptide-mediated pathways. Hum Reprod. 2017;32. doi:10.1093/humrep/dew292

169. Abumaree MH, Stone PR, Chamley LW. The effects of apoptotic, deported human placental trophoblast on macrophages: possible consequences for pregnancy. J Reprod Immunol. 2006;72: 33–45. doi:10.1016/j.jri.2006.03.001

170. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. Hypertension. 2008;51: 970–5. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107607

171. Huppertz B, Weiss G, Moser G. Trophoblast invasion and oxygenation of the placenta: measurements versus presumptions. J Reprod Immunol. Elsevier Ireland Ltd; 2014;101–102: 74–9. doi:10.1016/j.jri.2013.04.003

172. Marder W, Knight JS, Kaplan MJ, Somers EC, Zhang X, O'Dell AA, et al. Placental histology and neutrophil extracellular traps in lupus and pre-eclampsia pregnancies. Lupus Sci Med. 2016;3: e000134. doi:10.1136/lupus-2015-000134

173. Black R, Laxminarayan R, Temmerman M, Walker N. Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 2): Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health [Internet]. Third Edit. Black R, Laxminarayan R, Temmerman M, Walker N, editors. Disease Control Priorities. The World Bank; 2016. doi:10.1596/978-1-4648-0348-2

174. Karolinski A, Mercer R, Micone P, Ocampo C, Mazzoni A, Fontana O, et al. The epidemiology of life-threatening complications associated with reproductive process in public hospitals in Argentina. BJOG An Int J Obstet Gynaecol. 2013;120: 1685–1694. doi:10.1111/1471-0528.12395

175. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Alvero AB, Aldo PB, Ma Y, Guller S, et al. The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71. Placenta. 2009;30: 939–48.

doi:10.1016/j.placenta.2009.08.007

176. Pattillo RA, Gey GO. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. Cancer Res. 1968;28: 1231–6. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4299001

177. Vota D, Paparini D, Hauk V, Toro A, Merech F, Varone C, et al. Vasoactive Intestinal Peptide modulates trophoblast-derived cell line function and interaction with phagocytic cells through autocrine pathways. Sci Rep. 2016;6. doi:10.1038/srep26364

178. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). J Exp Med. 1996;184: 1101–9. Available: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192798&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

179. Paparini D, Gori S, Grasso E, Scordo W, Calo G, P?rez Leir?s C, et al. Acetylcholine contributes to control the physiological inflammatory response during the peri-implantation period. Acta Physiol (Oxf). 2015;214: 237–47. doi:10.1111/apha.12494

180. Li C, Wong W. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection. Proc Natl Acad Sci. 2001;98: 31–36. doi:10.1073/pnas.011404098

181. Liu X, Milo M, Lawrence ND, Rattray M. A tractable probabilistic model for Affymetrix probe-level analysis across multiple chips. Bioinformatics. 2005;21: 3637–3644. doi:10.1093/bioinformatics/bti583

182. Pearson RD, Liu X, Sanguinetti G, Milo M, Lawrence ND, Rattray M. puma: a Bioconductor package for propagating uncertainty in microarray analysis. BMC Bioinformatics. 2009;10: 211. doi:10.1186/1471-2105-10-211

183. Atkinson SJ, Ellison TS, Steri V, Gould E, Robinson SD. Redefining the role ( s ) of endothelial α v β 3-integrin in angiogenesis. 2014;42: 1590–1595. doi:10.1042/BST20140206

184. Sóñora C, Calo G, Fraccaroli L, Pérez-Leirós C, Hernández A, Ramhorst R. Tissue transglutaminase on trophoblast cells as a possible target of autoantibodies contributing to pregnancy complications in celiac patients. Am J Reprod Immunol. 2014;72: 485–95. doi:10.1111/aji.12290

185. Sarang Z, Joós G, Garabuczi É, Rühl R, Gregory CD, Szondy Z. Macrophages engulfing apoptotic cells produce nonclassical retinoids to enhance their phagocytic capacity. J Immunol. 2014;192: 5730–8. doi:10.4049/jimmunol.1400284

186. Stenczer B, Molvarec A, Szabó G, Szarka A, Fügedi G, Szijártó J, et al. Circulating levels of thrombospondin-1 are decreased in HELLP syndrome. Thromb Res. 2012;129: 470–473. doi:10.1016/j.thromres.2011.09.032

187. Ostankova Y V, Klimovskaya YS, Gorskaya OA, Kolobov A V, Kvetnoi IM, Selkov SA, et al. Expression of thrombospondin-1 gene mRNA and protein in the placenta in gestosis. Bull Exp Biol Med. 2011;151: 215–8. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238753

188. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhozhij S, et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. Blood. 2010;116: 829–840. doi:10.1182/blood-2009-12-257832

189. Abrahams VM, Visintin I, Aldo PB, Guller S, Romero R, Mor G. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells.

J Immunol. 2005;175: 8096–8104. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339547

190. Du M-R, Wang S-C, Li D-J. The integrative roles of chemokines at the maternal–fetal interface in early pregnancy. Cell Mol Immunol. 2014;11: 438–448. doi:10.1038/cmi.2014.68

191. Grasso E, Paparini D, Hauk V, Salamone G, Leiros CPCP, Ramhorst R. Differential Migration and Activation Profile of Monocytes after Trophoblast Interaction. PLoS One. 2014;9: 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0097147

192. Carri M, Selene P, Mart C, Juarranz Y, Gomariz RP, Estrada-Capetillo L, et al. VIP impairs acquisition of the macrophage proinflammatory polarization profile. J Leukoc Biol. 2016;100: 1385–1393. doi:10.1189/jlb.3A0116-032RR

193. Thaxton JE, Sharma S. Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy. Am J Reprod Immunol. 2010;63: 482–491. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00810.x

194. Ng THS, Britton GJ, Hill E V, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. Front Immunol. 2013;4: 129. doi:10.3389/fimmu.2013.00129

195. Hutter S, Heublein S, Knabl J, Andergassen U, Vrekoussis T, Makrigiannakis A, et al. Macrophages: are they involved in endometriosis, abortion and preeclampsia and how? J Nippon Med Sch. 2013;80: 97–103. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23657062

196. Houser BL, Tilburgs T, Hill J, Nicotra ML, Strominger JL. Two unique human decidual macrophage populations. J Immunol. 2011;186: 2633–2642. doi:10.4049/jimmunol.1003153

197. Horwitz D a, Zheng SG, Wang J, Gray JD. Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg. Eur J Immunol. 2008;38: 912–915. doi:10.1002/eji.200738109

198. Ramhorst R, Fraccaroli L, Aldo P, Alvero AB, Cardenas I, Leirós CP, et al. Modulation and recruitment of inducible regulatory T cells by first trimester trophoblast cells. Am J Reprod Immunol. 2012;67: 17–27. doi:10.1111/j.1600-0897.2011.01056.x

199. Tseng J-J, Chou M-M. Differential expression of growth-, angiogenesis- and invasion-related factors in the development of placenta accreta. Taiwan J Obstet Gynecol. Taiwan Association of Obstetric & Gynecology; 2006;45: 100–106. doi:10.1016/S1028-4559(09)60205-9

200. Jabrane-Ferrat N, Siewiera J. The up side of Decidual Natural killer cells. Immunology. 2013; doi:10.1111/imm.12218

201. Karimi K, Blois SM, Arck PC. The upside of natural killers. Nat Med. 2008;14: 1184–5. doi:10.1038/nm1108-1184

202. Sharkey AM, Xiong S, Kennedy PR, Gardner L, Farrell LE, Chazara O, et al. Tissue-Specific Education of Decidual NK Cells. J Immunol. 2015;195: 3026–32. doi:10.4049/jimmunol.1501229

203. Fraser R, Whitley GSJ, Thilaganathan B, Cartwright JE. Decidual natural killer cells regulate vessel stability: implications for impaired spiral artery remodelling. J Reprod Immunol. 2015;110: 54–60. doi:10.1016/j.jri.2015.04.003

204. Zhang J, Dunk C, Croy AB, Lye SJ. To serve and to protect : the role of decidual innate immune cells on human pregnancy. 2016; 249–265. doi:10.1007/s00441-015-2315-4

205. Kumar A, Begum N, Prasad S, Agarwal S, Sharma S. IL-10, TNF-α & IFN-γ: potential early biomarkers for preeclampsia. Cell Immunol. Elsevier Inc.; 2013;283: 70–74. doi:10.1016/j.cellimm.2013.06.012

206. Avenue G. Placental Origins of Preeclampsia. 2008; 970–975. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107607

207. Calo G, Sabbione F, Vota D, Paparini D, Ramhorst R, Trevani A, et al. Trophoblast cells inhibit neutrophil extracellular trap formation and enhance apoptosis through vasoactive intestinal peptide-mediated pathways. Hum Reprod. 2016; 1–10. doi:10.1093/humrep/dew292

## Los resultados mostrados se publicaron parcialmente en:

## Revistas:

1.Vota, D.; Paparini, D.; Hauk, V.; Toro, A.; Merech, F.; Varone, C.; Ramhorst, R. & Pérez Leirós, C. Vasoactive Intestinal Peptide modulates trophoblast-derived cell line function and interaction with phagocytic cells through autocrine pathways. Scientific Reports. 2016 May. 23;6:26364. DOI: 10.1038/srep26364.

2. Ramhorst, R.; Grasso, E.; Paparini, D.; Hauk, V.; Gallino, L.; Calo, G.; Vota, D. & Pérez Leirós, C. Decoding the chemokine network that links leukocytes with decidual cells and the trophoblast during early implantation. Cell Adhesion and Migration. 2016,Mar 3; 10(1-2):197-207. DOI: 10.1080/19336918.2015.1135285

# 3. Paparini, D.; Grasso E, Calo G, Vota D, Hauk V, Ramhorst R & Perez Leiros C. Trophoblast cells primed with VIP enhance monocyte migration and apoptotic cell clearance through αvβ3 integrin portal formation in a model of maternal-placental interaction. Molecular Human Reproduction. 2015, Dec. 21(12):930-41. DOI: 10.1093/molehr/gav059.

---

## Congresos

1. **Paparini, D.**; Choudhury, R.; Finn-Sell, S.; Karolczack-Bayatti, M.; Vota, D.; Hauk, V.; Ramhorst, R.; Aplin, JD & Pérez Leirós, C. **Role of VIP in trophoblast invasion, vascular remodeling and immunomodulation during early pregnancy**. 23rd International Federation of Placenta Associations (IFPA) Meeting. Manchester, United Kingdom. Conference Paper in Placenta 57:267. September 2017. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.07.146. (Poster)
2. **Paparini, D.**; Vota, D.; Grasso, E.; Hauk, V.; Calo, G.; Ramhorst, R. & Pérez Leirós, C.. **VIP promotes apoptotic cell phagocytosis by monocytes/macrophages through αvβ3 integrin-**

**thrombospondin portal fotmation and enhanced trophoblast migration in a model of maternal-placental interface.** II French-Argentinean Immunoly (FAIC-SAI). Buenos Aires. Argentina. November 2015. (e-Poster)

3. **Paparini, D.**; Grasso, E.; Calo, G.; Vota, D.; Lauricella, A.M.; Quintana, I.; Ramhorst, R. & Pérez Leirós, C. **VIP enhances apoptotic cell phagocytosis by monocytes/macrophages in an *in vitro* model of immune-trophoblast interaction**. VI Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta (SLIMP) and V Latin American Symposium on Reproductive Immunology (LASRI). Mar del Plata. Argentina. April 2015, Conference Paper in Placenta 04/2015; 36(4):495. DOI: 10.1016/j.placenta.2015.01.468. (Poster).
4. **Paparini, D**.; Grasso, E.; Calo, G.; Vota, D. Ramhorst, R. & Pérez Leirós, C. **VIP enhances trophoblast cell-mediated monocyte migration, phagocytosis and M2 phenotype expresión.** Póster. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI), del 19 al 22 de noviembre de 2014. Buenos Aires, Argentina. Revista: Medicina online.
5. Paparini, D.; Grasso, E.; Calo, G.; Barbano Weingrill, R.; Correa, S.; Bevilacqua, E.; Ramhorst, R. & Pérez Leirós, C.. Functional profile of Monocytes/Macrophages in the interaction with trophoblast cells and their modulation by VIP. Póster. Sociedad Argentina de Inmunología, del 7 al 9 de noviembre de 2013. Córdoba. Argentina.