



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Regulación metabólica en la interfase materno-fetal: rol del péptido intestinal vasoactivo e impacto en la interacción inmune-trofoblasto

Tesis presentada para optar al título de Doctora
de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. Fátima Isabel Merech

Directora de tesis: Dra. Claudia Pérez Leirós

Directora adjunta: Dra. Daiana Vota

Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunofarmacología, IQIBICEN-
Universidad de Buenos Aires-CONICET

Buenos Aires, 2023

A Cali y a Dai, por ser maravillosas personas, y especialmente por ser maravillosas directoras. Gracias Cali por estar siempre al pie del cañón, por buscar la manera de que que todo sea posible, y por encontrar las palabras justas para decirme. Gracias Dai por toda la paciencia infinita que me tuviste desde el primer día y por siempre entenderme un poco más allá de las palabras. Gracias a ambas por la confianza, por su calidez humana, por la energía y la dedicación, por todo el trabajo invertido, por darme la oportunidad de aprender de ustedes y por encontrar siempre la manera de ayudarme a crecer.

A todo el VIP team, por recibirme en el laboratorio con los brazos abiertos desde siempre, por dar no una mano sino las dos en todo momento, por ser un grupo que acompaña en conjunto y siempre va para adelante. Sin ustedes esta Tesis no sería lo que es. Gracias por compartir conmigo, por ayudarme en todo el proceso, por enseñarme, escucharme, y bancarme en algunos momentos que no fueron fáciles. A Lizita por su amistad versátil, por siempre con Lau hacerme reír aunque trate de concentrarme, y por avanzar en este camino casi a la par. A Vane por su energía y la garra que le pone a todo, y por las incontables veces que me brindó su ayuda. A Sole por encerrarse conmigo un montón de horas en el flujo a procesar muestras, por enseñarme un montón y siempre prestar el oído para escuchar. A Dani por la alegría que siempre lleva consigo a donde vaya, y por regalarme el famoso mate y bombilla que tantas risas nos dio. A Guille por ponerse siempre al hombro trámites, papeleos y burocracia que siempre son necesarios para avanzar en conjunto y a casi todos nos cuestan. A Esteban por ser nuestro técnico personal y además sacarnos unas fotos hermosas! A Rochy por lograr absolutamente todo lo que se propone. Sin el dúo dinámico Cali-Rochy todo el VIP team no tendría la energía que tiene. A Lu, por ser quien me trajo al laboratorio allá por el 2014, y por traer cosas ricas caseras. A los más chicos, que ya no son ni tan nuevos ni tan chicos, a Bren por siempre darlo todo con mucho compromiso y ayudar en todo lo que se necesita, a Lari, Anita e Lña, que siempre traen buena energía y diversión al lab, y que cada tanto les agarra el ataque de limpieza (como a Dai).

Al CONICET, por el financiamiento y por darme la oportunidad de desarrollar mi doctorado, a la UBA, en especial a toda la comunidad de la FCEyN, por ser mi casa de estudios y en definitiva casi mi segunda casa. Al IQUBICEN, al Departamento de Química Biológica, a todo el equipo de no docentes y Bedelía, y a todas las personas que integran los grupos de investigación que trabajan allí, que nos han ayudado incontables veces, nos han prestado reactivos y equipos, y sin las cuales todo este trabajo no hubiera sido posible.

A todas las entidades que han financiado los proyectos que permitieron desarrollar este trabajo.

Al Dr. Gil Mor por cedernos gentilmente las líneas celulares utilizadas en esta Tesis.

Al Dr. James Waschek por habernos proporcionado los ratones VIP KO y también al Bioterio de FCEyN, a Zaira y a Martín, por todo el trabajo que implican los ensayos in vivo.

Al Hemocentro de Buenos Aires y especialmente a Alejandra, que proporcionaron las muestras de sangre.

Al grupo de Espectrometría de Masas Bioanalítica del CIBION, especialmente a María Eugenia Monge por abrirme las puertas de su Laboratorio, a Mariela Videla y a Mariela García por todo el trabajo en la parte técnica en el equipo y el análisis de datos. A Nico, a Gaby y a Maxi por ofrecer y ayudar siempre con buena onda.

A los grupos de investigación del IFIBYNE, por permitirme realizar los ensayos de radiactividad y utilizar el contador de centelleo, y por brindar opciones siempre que hubo algún problema en el Pabellón II.

A los Biologxs in da jaus, por acompañarnos mututamente desde hace años y darnos apoyo moral en todo el camino de esta carrera que a veces es frustrante, y porque gracias a eso conocí a grandes personas y grandes amigos.

A mis amigos de la primaria y de la secundaria, con quienes aunque la vida nos haya llevado por caminos muy distintos, son todxs personas absolutamente entrañables y no importa si no nos vemos durante mucho tiempo, somos como hermanxs.

Al team Mar del Plata y a lxs hadxs, que se ensamblaron de un modo mágico en el momento justo, por generar un nuevo espacio de crecimiento y de contención infinita donde el tiempo, el espacio y los vínculos pasan de otra manera.

A Axel que me acompañó y me acompaña en todos los procesos día a día (de la Tesis y de la vida), que me bancó, me escuchó y me ayudó discutiendo resultados y practicando posters. Gracias por tratar siempre de sacarme una sonrisa en los momentos duros pese a todo, darme abrazos infinitamente contenedores, y gracias por elegir crecer conmigo.

A mi mamá y a Javi, a mi papá, a mis abuelos, a mis hermanos, a Mari y Jo, por la generosidad, por hacerme saber que siempre están, por ayudarme en momentos duros, por habilitarme lugares súper interesantes. Y por darme aliento y creer en que siempre voy a poder ser mejor profesional y sobre todo mejor persona.

Regulación metabólica en la interfase materno-fetal: rol del péptido intestinal vasoactivo e impacto en la interacción inmune-trofoblasto

Las células trofoblásticas con sus distintos fenotipos despliegan una adaptabilidad funcional indispensable para el desarrollo de la placenta y el crecimiento fetal. Las células citotrofoblásticas, en particular, tienen un papel central en la placentación al integrar señales metabólicas e inmunológicas para el mantenimiento de la homeostasis. En esa etapa, coordinan el reclutamiento y diferenciación de células inmunes maternas como monocitos y macrófagos favoreciendo un microambiente antiinflamatorio. Una función deficiente de las células trofoblásticas se asocia con complicaciones gestacionales como la preeclampsia y la restricción del crecimiento fetal, ambas con altas tasas de morbimortalidad materna y perinatal, como también vinculadas a mayor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas en la vida adulta. Entre los factores que participan en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica desde etapas tempranas, describimos al péptido intestinal vasoactivo (VIP), sintetizado y liberado por células trofoblásticas. Sobre esta base, el objetivo de este trabajo fue profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan el metabolismo de la célula trofoblástica con especial foco en el papel del VIP, y cómo dicho metabolismo impacta en la función placentaria y en el fenotipo funcional y metabólico de monocitos y macrófagos maternos. Para abordar los distintos objetivos específicos, se emplearon diseños *in vitro* con líneas celulares trofoblásticas humanas de primer trimestre; un modelo de interacción inmune-trofoblástica con monocitos aislados de sangre periférica de dadoras sanas; y un modelo *in vivo* de gestación en ratones deficientes en VIP. Nuestros resultados muestran que el VIP promueve la migración de células trofoblásticas, y en el efecto intervienen tanto la glucólisis como la fosforilación oxidativa. VIP regula el metabolismo celular, induciendo un aumento rápido en la incorporación de glucosa a través de la activación de las vías de PKA, MAPK y PI3K y del sensor de nutrientes mTOR, acompañado por un aumento en la expresión del transportador de glucosa GLUT1 y sin cambios en GLUT3. El bloqueo de mTOR con rapamicina disminuyó la expresión endógena de VIP. A su vez, se observó que VIP induce la incorporación rápida de aminoácidos -con aumento del transportador SNAT1 y sin cambios en SNAT2. VIP indujo la incorporación de ácidos grasos de cadena larga y gotas lipídicas neutras citoplasmáticas a tiempos más largos, sin cambios en la funcionalidad mitocondrial. El silenciamiento transiente de VIP en las células trofoblásticas resultó en una menor incorporación de glucosa y menor expresión de *mTOR*. Consistente con estas observaciones, el modelo de gestación murina deficiente en VIP presentó menor peso fetal para la edad gestacional sin cambios en el peso de la placenta, aunque se vio asociado a una desregulación de la incorporación de glucosa y del transporte hacia el feto, así como de la expresión de *glut1* y *mTOR*, tanto en la placenta como en los tejidos fetales. Ensayos *ex vivo* incubando explantos de placentas *wild type* con antagonista del receptor de

VIP mostraron una disminución en la capacidad de incorporación de glucosa y aminoácidos. En el modelo *in vitro* de interacción inmune-trofoblástica, el medio condicionado de células trofoblásticas de primer trimestre indujo una reprogramación metabólica de monocitos y macrófagos, en especial frente al estímulo de LPS: se observó menor incorporación de glucosa, y mayor incorporación de ácidos grasos, paralelamente con una reducida respuesta proinflamatoria. La incubación de células trofoblásticas con medios condicionados de macrófagos de perfil inflamatorio las mantuvo en un estado metabólico de quiescencia, en línea con lo observado frente a la estimulación con el metabolito itaconato. Los resultados de esta tesis señalan al VIP como regulador del metabolismo placentario con implicancias en el crecimiento fetal y en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica, y aportan al conocimiento de mecanismos de reprogramación inmunometabólica de monocitos y macrófagos en el contexto de la gestación temprana.

Palabras claves: placenta, trofoblasto, metabolismo, glucosa, Péptido Intestinal Vasoactivo, macrófago, inmunometabolismo

Metabolic regulation in the maternal-fetal interface: role of vasoactive intestinal peptide and impact on the immune-trophoblast interaction

Trophoblast cells with distinct phenotypes show a functional adaptability that is crucial to placental development and fetal growth. The cytotrophoblast cells play a central role on placentation since they integrate metabolic and immunological signals to maintain placental homeostasis. During placentation, these cells coordinate the recruitment and differentiation of maternal immune cells as monocytes and macrophages, favoring a tolerogenic microenvironment. An aberrant function of trophoblast cells can lead to pregnancy complications as preeclampsia and fetal growth restriction, which are associated to high rates of maternal morbidity and mortality and with increased risk of developing metabolic diseases in adult life. We described the vasoactive intestinal peptide (VIP) among the factors participating in the maintenance of immunological homeostasis from early stages. VIP is synthesized and secreted by trophoblast cells. Taking these into account, our aim was to deepen into the mechanisms regulating trophoblast cell metabolism with special focus on VIP, and how trophoblast cell metabolism impact on placental function and metabolic profile of maternal monocytes and macrophages. We employed different approaches using *in vitro* models with human-derived trophoblast cell lines, an immune-trophoblast interaction model using peripheral monocytes from healthy donors, and a gestational VIP-deficient murine model.

Our results show that VIP promotes migration of cytotrophoblast cells via glycolysis and oxidative phosphorylation. VIP modulates trophoblast metabolism inducing rapid glucose uptake through PKA, MAPK and PI3K pathways, as well as mTOR nutrient sensor pathway, which was accompanied by an upregulation of GLUT1 but not GLUT3 glucose transporter. The blockade of mTOR with rapamycin lead to a reduced VIP expression. Moreover, VIP induced rapid amino acid uptake with SNAT1 upregulation and with no changes in SNAT2, as well as long chain fatty acid uptake and lipid droplet storage accumulation at long times, without changes in mitochondrial function. Silencing VIP with a siRNA showed less glucose incorporation along with less mTOR expression. Consistently, VIP-deficient murine model showed fetal growth impairment with no changes in placental weight, along with a dysregulated glucose uptake, transport to the fetus and *glut1* and *mtor* expression, both in placental and fetal tissues. *Ex vivo* incubation of *wild type* explants with VIP receptor antagonist showed a decreased glucose and amino acid uptake. Immune-trophoblast interaction model showed that trophoblast-conditioned media induced monocytes and macrophages metabolic rewiring, and specially versus LPS stimuli: cells displayed less glucose uptake, with increased long chain fatty acid uptake, in parallel with an attenuated proinflammatory response. Proinflammatory M1 macrophage-conditioned media induced a quiescent metabolic state, in line with the response to itaconate stimulation.

The results of this thesis point out to VIP as a placental metabolism regulator impacting in fetal growth and immune homeostasis maintenance, contributing to reveal the mechanisms of metabolic reprogramming of monocytes and macrophages in early gestation.

Keywords: placenta, trophoblast, metabolism, glucose, Vasoactive Intestinal Peptide, macrophage, immunometabolism

PUBLICACIONES

Parte de los resultados de esta Tesis fueron publicados en las siguientes revistas:

1. **Fátima Merech**, Vanesa Hauk, Daniel Papparini, Laura Fernandez, Zaira Naguila, Rosanna Ramhorst, James Waschek, Claudia Pérez Leirós*, Daiana Vota*. *Growth impairment, increased placental glucose uptake and altered transplacental transport in VIP deficient pregnancies: maternal vs. placental contributions*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021 Oct 1;1867(10):166207. doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166207. * contribución idéntica
2. **Merech F**, Soczewski E, Hauk V, Papparini D, Ramhorst R, Vota D*, Perez Leiros C*. *Vasoactive Intestinal Peptide induces glucose and neutral amino acid uptake through mTOR signalling in human trophoblast cells*. *Scientific Reports* 9, 17152, doi: 10.1038/s41598-019-53676-3, 2019. * contribución idéntica
3. Vanesa Hauk, Daiana Vota, Lucila Gallino, Guillermina Calo, Daniel Papparini, **Fátima Merech**, Federico Ochoa, Elsa Zotta, Rosanna Ramhorst, James Waschek, Claudia Pérez Leirós. *Trophoblast VIP-deficiency entails immune homeostasis loss and adverse pregnancy outcome in mice*. *FASEB J*. 2019 Feb;33(2):1801-1810. doi: 10.1096/fj.201800592RR. Epub 2018 Sep 11.
4. Vota D; Papparini 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* 6:26364, doi: 10.1038/srep26364, 2016.

Otras publicaciones en las cuales participé durante el período del doctorado:

5. Diego Kafer, Agostina Marquez, **Fátima Merech**, Vanesa Hauk, Daniel Papparini, Rosanna Ramhorst, Claudia Pérez Leirós, Cybele Garcia, Daiana Vota. *Targeting first trimester trophoblast cell metabolism modulates its susceptibility to Zika virus infection*. *J. Cell Biol*. 1– 12, Feb 2023, <https://doi.org/10.1002/jcp.30970>.
6. Lucila Gallino; Vanesa Hauk; Lara Castagnola; Daiana Vota; Natalia Pascuali; Fernanda Parborell; Maria May; Vanina Fontana; **Fatima Merech**; Zaira Naguila; James Waschek; Claudia Perez Leirós; Rosanna Ramhorst. *Vasoactive Intestinal Peptide deficiency promotes ovarian dysfunction associated to a proinflammatory microenvironment reminiscent of premature aging*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2023 Feb;1869(2):166585. doi: 10.1016/j.bbadis.2022.166585. Epub 2022 Nov 22
7. Vanesa Hauk, Luciana D'Eramo, Guillermina Calo, **Fátima Merech**, Luciana Doga, Brenda Lara, Laura Gliosca, Carla Massone, Susana Molgatini, Rosanna Ramhorst, Aldo Squassi, Claudia Pérez Leirós. *Gingival crevicular fluid from pregnant women impairs trophoblast cell function and trophoblast-neutrophil interaction*. *Am J Reprod Immunol* 2022 may 5, doi: 10.1111/aji.13558
8. Daiana Vota, María Torti, Daniel Papparini, Federico Giovannoni, **Fatima Merech**, Vanesa Hauk, Guillermina Calo, Rosanna Ramhorst, Cybele García, Claudia Pérez Leirós. *Zika virus infection of first trimester trophoblast cells affects cell migration, metabolism, and immune homeostasis control*. *J. Cell Biol*. Epub 2020 Dec 10. 2021 Jul;236(7):4913-4925. doi: 10.1002/jcp.30203.
9. Daniel E. Papparini, Esteban N. Grasso, Laura del C. Fernandez, **Fátima Merech**, Rodrigo Weingrill-Barbano, Simone Correa-Silva, Gustavo Izbizky, José I. Abasolo, Vanesa Hauk, Rosanna Ramhorst, Estela Bevilacqua, Claudia Pérez Leirós. *Decidual factors and vasoactive intestinal peptide guide monocytes to higher migration, efferocytosis and wound healing in term human pregnancy*. *Acta Physiologica*. Accepted Author Manuscript e13579. <https://doi.org/10.1111/apha.13579>
10. Soledad Gori, Elizabeth Soczewski, Laura Fernández, Esteban Grasso, Lucila Gallino, **Fátima Merech**, Ana Colado, Mercedes Borge, Claudia Perez Leiros, Gabriela Salamone, Rosanna Ramhorst. *Decidualization process induces maternal monocytes to tolerogenic IL-10-producing dendritic cells (DC-10)*. *Front Immunol*. 2020 Aug 18;11:1571. doi: 10.3389/fimmu.2020.01571. eCollection 2020.

ABREVIATURAS

2-DG	2-Deoxy-D-glucosa
2-NBDG	2-Deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose
¹⁴ C-MeAIB	[¹⁴ C]-ácido metilaminoisobutírico
ACOD1	Aconitato deshidrogenasa-1
CD	Células dendríticas
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
COX	Ciclooxigenasa
CPAp	Células presentadoras de antígeno profesionales
CTB	Citotrofoblasto
cTb	Células trofoblásticas
CTBv	Citotrofoblasto vellosos
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DCFH-DA	Diclorofluoresceína diacetato
dMØ	Macrófagos deciduales
dg	Día de gestación
EC	Células endoteliales
ECAR	Tasa de acidificación extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EIV	Espacios intervellosos
EMT	Transición epitelio-mesenquimática
EPC	Cono ectoplacentario
ETC	Cadena de transporte de electrones
EVT	Citotrofoblasto extraveloso
EVTeg	Citotrofoblasto endoglandular
EVTev	Citotrofoblasto endovascular
EVTi	Citotrofoblasto intersticial
FABP	Proteínas de unión a ácidos grasos
FAO	Oxidación de ácidos grasos
FAS	Síntesis de ácidos grasos
FAT/CD36	Traslocasa de ácidos grasos
FATP	Proteína transportadora de ácidos grasos de cadena larga
Flo	Floretin
FOSFOX	Forforilación oxidativa
G-6-P	Glucosa-6-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GLUT	Transportador facilitador de glucosa
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
hCG	Hormona coriónica humana
HK	Hexoquinasa
HTR-8	Línea celular HTR-8/SVneo
IDH1	Isocitrato deshidrogenasa-1
IFM	Intensidad de fluorescencia media
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleuquina
INF-γ	Interferón-γ
LCFAs	Ácidos grasos de cadena larga
LCPUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
lepR	Receptor de leptina

LIF	Factor inhibidor de la leucemia
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocitos T
MB	Membrana basal
MCI	Macizo celular interno
MC-M1	Medio condicionado de macrófagos M1
M-CSF	Factor estimulante de colonias Macrófagos
MC-Tb	Medio condicionado de células citotrofoblásticas
MCT	Transportador de monocarboxilatos
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteasas
MMV	Membrana microvellosa
Mo	Monocitos
MØ	Macrófagos
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
NK	Células <i>natural killer</i>
ON	Óxido nítrico
P ₄	Progesterona
PACAP	P olipéptido de la adenilato ciclasa de la pituitaria
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Preeclampsia
PKM2	Fosfofructoquinasa-2
PPARs	Receptores activados por proliferadores peroxisomales
PPP	Vía de las pentosas fosfato
PS	Penicilina-Estreptomicina
RCF	Restricción del crecimiento fetal
ROS	Especies reactivas del oxígeno
Rote	Rotenona
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos
RSA	Abortos recurrentes espontáneos
SDH	Succinato deshidrogenasa
SF	Solución fisiológica
SFB	Suero fetal bovino
siVIP	siRNA de VIP
SNAT	Transportador de aminoácidos neutros acoplados a sodio
STB	Sinciotrofoblasto
Tamb	Temperatura ambiente
TAMs	Macrófagos asociados a tumores
Tb	Trofoblasto
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
TGC	Células trofoblásticas gigantes
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
Treg	Linfocitos T regulatorios
UA	Unidades arbitrarias
uNK	Células <i>natural killer</i> uterinas
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo
VSMC	Células vasculares del músculo liso

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. <i>Generación de la interfase materno-fetal.....</i>	15
1.1.1. <i>Implantación</i>	15
1.1.2. <i>Placentación.....</i>	17
1.1.3. <i>Gestación en ratones.....</i>	20
1.2. <i>Control de la inflamación y participación de las células inmunes en la interfase materno-fetal.....</i>	23
1.2.1. <i>Poblaciones leucocitarias en la interfase</i>	25
1.2.2. <i>Interacción entre macrófagos y células trofoblásticas.....</i>	30
1.3. <i>Metabolismo y transporte de nutrientes</i>	31
1.3.1. <i>Metabolismo de la célula trofoblástica.....</i>	33
1.3.2. <i>Transporte de nutrientes a través de la placenta</i>	37
1.3.3. <i>Inmunometabolismo en monocitos y macrófagos.....</i>	38
1.4. <i>Moléculas implicadas en la regulación del metabolismo. Impacto en la placentación y complicaciones gestacionales</i>	42
1.4.1. <i>Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP).....</i>	44
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
3.1. <i>Líneas celulares</i>	51
3.1.1. <i>Mantenimiento, repique y criopreservación</i>	51
3.1.2. <i>Sembrado y tratamientos.....</i>	52
3.1.3. <i>Medios condicionados.....</i>	52
3.2. <i>Animales y modelos murinos</i>	52
3.2.1. <i>Cepas.....</i>	52
3.2.2. <i>Mantenimiento y ensayos.....</i>	53
3.2.3. <i>Pesos fetales y aislamiento de placentas</i>	53
3.2.4. <i>Genotipificación</i>	53
3.3. <i>Monocitos de sangre periférica humana</i>	54
3.3.1. <i>Obtención de PBMCs a partir de buffy coats de sangre periférica.....</i>	54
3.3.2. <i>Aislamiento de monocitos a partir de PBMCs</i>	54
3.3.3. <i>Sembrado, tratamientos y diferenciación de monocitos a macrófagos para ensayos de metabolismo y evaluación de perfiles funcionales.....</i>	55
3.3.4. <i>Diferenciación y obtención de medios condicionados de macrófagos M1.....</i>	55
3.4. <i>Silenciamiento de VIP.....</i>	56
3.5. <i>Ensayos metabólicos in vitro.....</i>	56
3.5.1. <i>Incorporación de glucosa</i>	56

3.5.2. Medición de lactato	58
3.5.3. Transporte transcelular de glucosa.....	58
3.5.4. Incorporación de aminoácidos neutros acoplados a sodio por sistema A.....	59
3.5.5. Incorporación de ácidos grasos de cadena larga	59
3.5.6. Acumulación de gotas lipídicas neutras citoplasmáticas.....	60
3.5.7. Determinación de función mitocondrial.....	60
3.5.8. Incorporación de glucosa y aminoácidos del sistema A en explantos murinos ex vivo.....	60
3.6. Transporte in vivo de glucosa en modelos murinos	61
3.7. Análisis de ácidos carboxílicos mediante un abordaje semidirigido de metabolómica	62
3.8. Seahorse: Ensayo de estrés glucolítico.....	63
3.9. Viabilidad celular por calceína	64
3.10. Ensayo de migración	64
3.11. Análisis de expresión de ARNm	64
3.11.1. Extracción de ARN.....	65
3.11.2. Obtención de ADNc y ensayos de RT-qPCR	65
3.12. Obtención de proteínas y western blotting.....	66
3.13. ELISA.....	68
3.14. Análisis de expresión de proteínas por citometría de flujo	68
3.15. ROS totales.....	69
3.16. Análisis estadístico	69
4. RESULTADOS	70
4.1. CAPÍTULO I -ROL DE VIP EN EL METABOLISMO DE LA CÉLULA CITOTROFOBLÁSTICA	71
4.1.1. VIP induce la rápida incorporación de glucosa y la expresión de los transportadores GLUT1 y GLUT3 en líneas celulares citotrofoblásticas	72
4.1.2. La incorporación de glucosa inducida por VIP está mediada por la señalización de PKA, MAPK, PI3K y mTOR.....	75
4.1.3. VIP induce la incorporación de aminoácidos por el Sistema A de transportadores de aminoácidos neutros acoplados al sodio (SNAT)	76
4.1.4. Relevancia de VIP endógeno en la incorporación de nutrientes y regulación cruzada entre VIP y el sensor de nutrientes mTOR.....	78
4.1.5. VIP estimula la utilización de glucosa por vía glucolítica y la fosforilación oxidativa para acelerar la migración de células trofoblásticas sin modular la producción de lactato.....	80
4.1.6. Detección de ácidos orgánicos intermediarios de glucólisis o TCA en líneas celulares citotrofoblásticas	83

4.1.7. VIP induce la incorporación de ácidos grasos de cadena larga, la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas y tiende a reducir los niveles de ROS celular	85
4.1.8. Perfil de respuesta citotrofoblástica en RPMI-1640 y DMEM-F12.....	90
4.1.9. Efecto de VIP sobre el transporte de glucosa a través de una monocapa de células trofoblásticas	92
4.1.10. Efecto in vivo de VIP sobre la regulación del transporte de nutrientes a través de la placenta y su impacto sobre el crecimiento fetal.....	93
4.2. CAPÍTULO II -INTERACCIÓN INMUNE-TROFOBLÁSTICA	103
4.2.1. El medio condicionado de células citotrofoblásticas modela el perfil metabólico de monocitos CD14+	104
4.2.2. El medio condicionado de células citotrofoblásticas modela el perfil metabólico de macrófagos CD14+.....	108
4.2.3. El medio condicionado de macrófagos M1 reduce la incorporación de glucosa y la expresión de citoquinas proinflamatorias en células citotrofoblásticas.....	111
4.2.4. El metabolito derivado del TCA itaconato evoca una respuesta metabólica similar a la inducida por MC-M1 en células citotrofoblásticas de primer trimestre	113
5. DISCUSIÓN	115
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

1. INTRODUCCIÓN

La gestación humana es un proceso ineficiente que comprende una secuencia coordinada de eventos complejos y finamente regulados para que un embarazo llegue a término sin complicaciones. Se estima que entre un 40% y un 60% de embarazos se pierden entre la fertilización y el nacimiento¹. La placenta es el único órgano transitorio en el humano, es altamente dinámico y funciona como un órgano de metabolismo, sosteniendo sus propias demandas energéticas y las demandas fetales. Tiene la función de proporcionar nutrientes y oxígeno para el desarrollo placentario y fetal, regular el crecimiento intrauterino, eliminar desechos, así como sintetizar y/o metabolizar factores diversos involucrados en la interacción materno-fetal²⁻⁴. En el útero gestante tiene lugar una remodelación vascular e infiltración leucocitaria con altos niveles de liberación de citoquinas en un período extremadamente corto de tiempo. Para que estos procesos sean exitosos, es necesaria la interacción coordinada y continua entre el trofoblasto invasivo fetal y la decidua materna^{3,5,6}. Deficiencias en los mecanismos de regulación en la placentación se asocian con fallas reproductivas y complicaciones en el embarazo, con altas tasas de morbilidad y mortalidad materna y neonatal, y que en muchos casos no pueden detectarse a tiempo, por lo que comprender los mecanismos involucrados supone un gran aporte a la detección temprana de estas patologías y su posible intervención.

1.1. Generación de la interfase materno-fetal

1.1.1. Implantación

En condiciones fisiológicas, para que el embarazo se produzca, deben ocurrir una serie de eventos secuenciales: la ovulación, la copulación, la fecundación y finalmente una implantación exitosa. Para este último proceso se requiere un blastocisto competente para implantarse, un endometrio receptivo y un *diálogo* sincronizado entre ambos.

El blastocisto que llega a la cavidad uterina ha atravesado distintos procesos de división y diferenciación celular a partir del cigoto, mientras migra por las trompas de Falopio, y al día 6 post fertilización (dpf) está conformado por dos tipos celulares definidos: un macizo celular interno (MCI) que dará lugar a las estructuras embrionarias, y los blastómeros externos, que se compactan originando el trofoectodermo que permite la implantación y formará luego las estructuras extraembrionarias, incluyendo la placenta y las membranas amnióticas. El blastocisto adquiere competencia al perder la zona pelúcida (*hatching*) por digestión de la matriz glicoproteica por la enzima estripsina y orientarse próximo al epitelio uterino (*rolling*)^{7,8}.

La receptividad endometrial delimita un período conocido como “ventana de implantación” que ocurre entre 6 y 10 días después de la ovulación, en la cual el epitelio endometrial adquiere ligandos y receptores de adhesión (integrinas, oligosacáridos, cadherinas), se modifican morfológicamente los pinópodos (protrusiones que favorecen la interacción) y se pierden componentes inhibitorios, como las mucinas con propiedades anti-adherentes^{7,9}.

A partir del dpf 10 las células del estroma endometrial experimentan cambios morfológicos y funcionales, proceso denominado decidualización, que en los humanos ocurre cíclicamente independientemente de las señales del blastocisto¹⁰. Estos cambios implican la remodelación vascular, la infiltración de leucocitos maternos (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfocitos T y células *natural killer* uterinas), el estrés reticular en las células del estroma endometrial que produce respuesta a proteínas mal plegadas habilitando la expansión del retículo endoplasmático y la síntesis de factores, entre ellos la síntesis y secreción de prolactina^{7,11}.

La implantación propiamente dicha es el proceso por el cual el blastocisto penetra el epitelio e invade el endometrio, proceso que dura aproximadamente 7 días (Fig. 1). Una vez que el blastocisto entra en contacto con el epitelio uterino, el trofoectodermo se denomina trofoblasto (Tb). En esta instancia se diferencian dos capas celulares: el **citotrofoblasto (CTB)** primitivo, en contacto con el MCI, es la capa interna formada por células mononucleadas; el **sinciotrofoblasto (STB)** es la capa externa no proliferativa formada por células multinucleadas que deriva de la diferenciación y fusión de células CTB^{8,12}. En el proceso de implantación pueden identificarse tres etapas:

-Aposición: Es la adhesión inicial del blastocisto al epitelio endometrial. Las vellosidades del STB formado se interdigitan con los pinópodos de la superficie uterina. Las membranas plasmáticas de las células trofoblásticas y de las células epiteliales uterinas se encuentran yuxtapuestas y separadas por una mínima distancia.

-Adhesión estable: Caracterizada por un aumento en la interacción física entre trofoblasto y epitelio uterino. Es el resultado de los cambios moleculares en la superficie del trofoblasto y endometrio, donde las integrinas expresadas por el trofoblasto cumplirían un rol fundamental⁷.

-Invasión: El STB penetra el epitelio uterino invadiendo el endometrio, donde ocurre una fuerte remodelación en el sitio de implantación. En esta etapa las proteasas tienen un rol fundamental, producidas tanto por la decidua como por el trofoblasto y rigurosamente controladas por inhibidores^{6,13}.

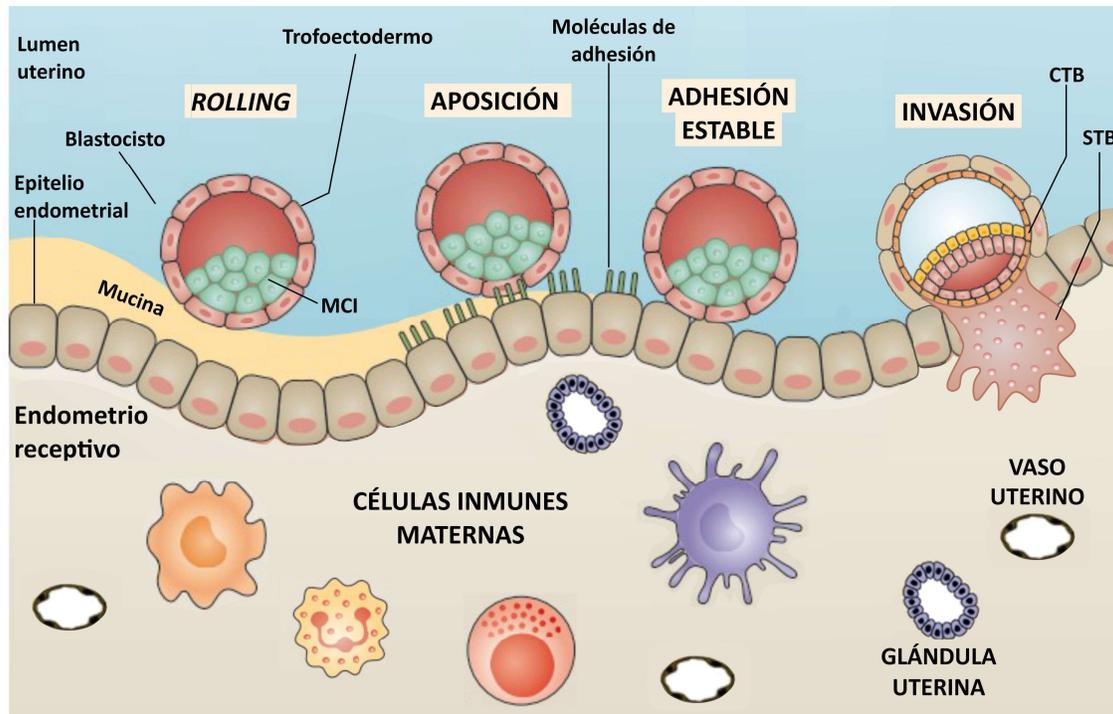


Figura 1 | Etapas de la implantación del blastocisto. Rolling, aposición, adhesión estable, e invasión. CTB: Citotrofoblasto, MCI: Macizo celular interno, STB: Sinciotrofoblasto. Modificado de *Mor et al. Nat. Rev. Immunol. (2017)*⁶.

1.1.2. Placentación

La placentación temprana es crítica para obtener la capacidad placentaria óptima, y depende de la extensiva remodelación de la vasculatura uterina para facilitar el intercambio de nutrientes y desechos entre la madre y el feto^{2,14}.

Una vez que el trofoblasto se ha implantado en el endometrio, el STB continúa invadiéndolo y ocurre una profunda reorganización del STB que recubre a todo el embrión. Al mismo tiempo, las CTB comienzan a penetrar a través del STB hasta atravesar la masa completa, entrando en contacto con la decidua y formando los troncos de las vellosidades primarias de anclaje. Entre la segunda y la tercera semana de gestación quedan conformados dos tipos de células CTB: el **citotrofoblasto veloso (CTBv)** queda recubriendo al embrión por debajo del STB y en los extremos de las vellosidades prolifera dando las columnas citotrofoblásticas de **citotrofoblasto extraveloso (EVT)**, que pasa por una transición epitelio-mesenquimática (EMT) desprendiéndose de las columnas y adquiriendo un fenotipo invasivo^{7,12,15,16} (Fig. 2).

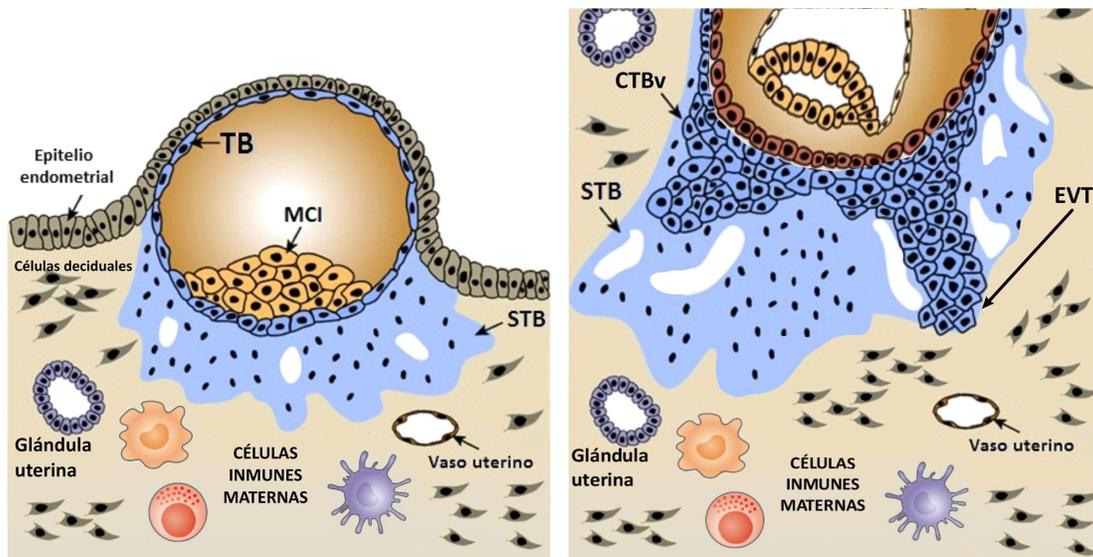


Figura 2 | Formación de las vellosidades de anclaje y formación del citotrofoblasto extraveloso. CTB: Citotrofoblasto, CTBv: Citotrofoblasto veloso, EVT: Citotrofoblasto extraveloso, MCI: Macizo celular interno, STB: Sincitiotrofoblasto, TB: Trofoblasto. Modificado de Knöfler et al. *Frontiers in Genetics* (2013)¹⁷.

La capacidad invasiva de las EVT es dependiente de la secreción de metaloproteasas (MMP) en especial la 2, 9, 12, 14 y 15 que son expresadas sólo por esta subpoblación de CTB¹⁸. Además, estas células poseen otros marcadores moleculares que las identifican como invasivas: integrina $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha \nu \beta 3$, HLA-G, citoqueratina 7, vimentina, entre otros^{16,19}. Las EVT que pierden el contacto invadiendo el estroma decidual y el primer tercio del miometrio se denominan **EVT intersticiales (EVTi)**. Las EVTi migran por el estroma haciendo contacto con células maternas como leucocitos, células musculares y células endoteliales de los vasos. Al mismo tiempo, se diferencia otro tipo celular específico, las **EVT endovasculares (EVTev)** que migran a los vasos maternos donde desplazan, disocian y sustituyen las capas musculares y endoteliales de las arterias, formando un canal de diámetro considerablemente mayor respecto a la arteria inicial, y estableciendo una conexión directa entre las arterias maternas y los espacios intervallosos (EIV)¹⁷. Hasta las 10-12 semanas, las EVTev se acumulan en el lumen formando tapones que no permiten el flujo de sangre hacia el feto^{20,21} (Fig. 3). A partir la semana 12, dicha remodelación habilitará un gran flujo de sangre por estos conductos de baja resistencia. Aún existe controversia sobre si las EVT invaden el lumen de las arterias desde el endometrio por penetración (EVTi por intravasación)²², ó si las EVTev son un subtipo de EVT que alcanzan el lumen desde las columnas por extravasación, aunque la mayoría de los autores coinciden en esta segunda teoría. En paralelo, las **EVT endoglandulares (EVTeg)** invaden el epitelio glandular y lo reemplazan, estableciendo también una conexión directa, pero sin la formación de tapones^{23,24}. De este modo, durante el primer trimestre en que la sangre materna no

alcanza aún los EIV, éstos contienen plasma, secreciones de las células estromales endometriales y secreciones de las glándulas uterinas, por lo que la nutrición del embrión se denomina histiotrófica. Los nutrientes y los desechos se transportan a través de las vellosidades, atravesando el STB, el CTBv y el endotelio de los capilares fetales.

Las células trofoblásticas (cTb) poseen funciones secretorias, regulando parácrinamente a otros tipos celulares así como autócrinamente a sí mismas. Diversos factores, trofoblásticos y endometriales, han sido descritos como mediadores durante el proceso de implantación e invasión, como la interleuquina-6 (IL-6), el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la interleuquina-11 (IL-11), la interleuquina-1 β (IL-1 β), la interleuquina-8 (IL-8), las prostaglandinas y el factor de crecimiento epidermal (EGF), entre otros^{25,26}. La progesterona (P₄) desempeña un papel fundamental, participando de la decidualización, la diferenciación de CTB a STB y la inmunosupresión materna ante los antígenos fetales. Durante la implantación, el STB también secreta hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG), que mantiene al cuerpo lúteo e induce la secreción de P₄. Entre la sexta y octava semana de gestación, cuando la producción luteal cae, la placenta es la principal fuente de esta hormona²⁷.

A principios del segundo trimestre, los tapones se disuelven permitiendo el flujo directo de sangre materna que entra en contacto con el STB en los EIV, estableciéndose la nutrición hemotrófica²⁸.

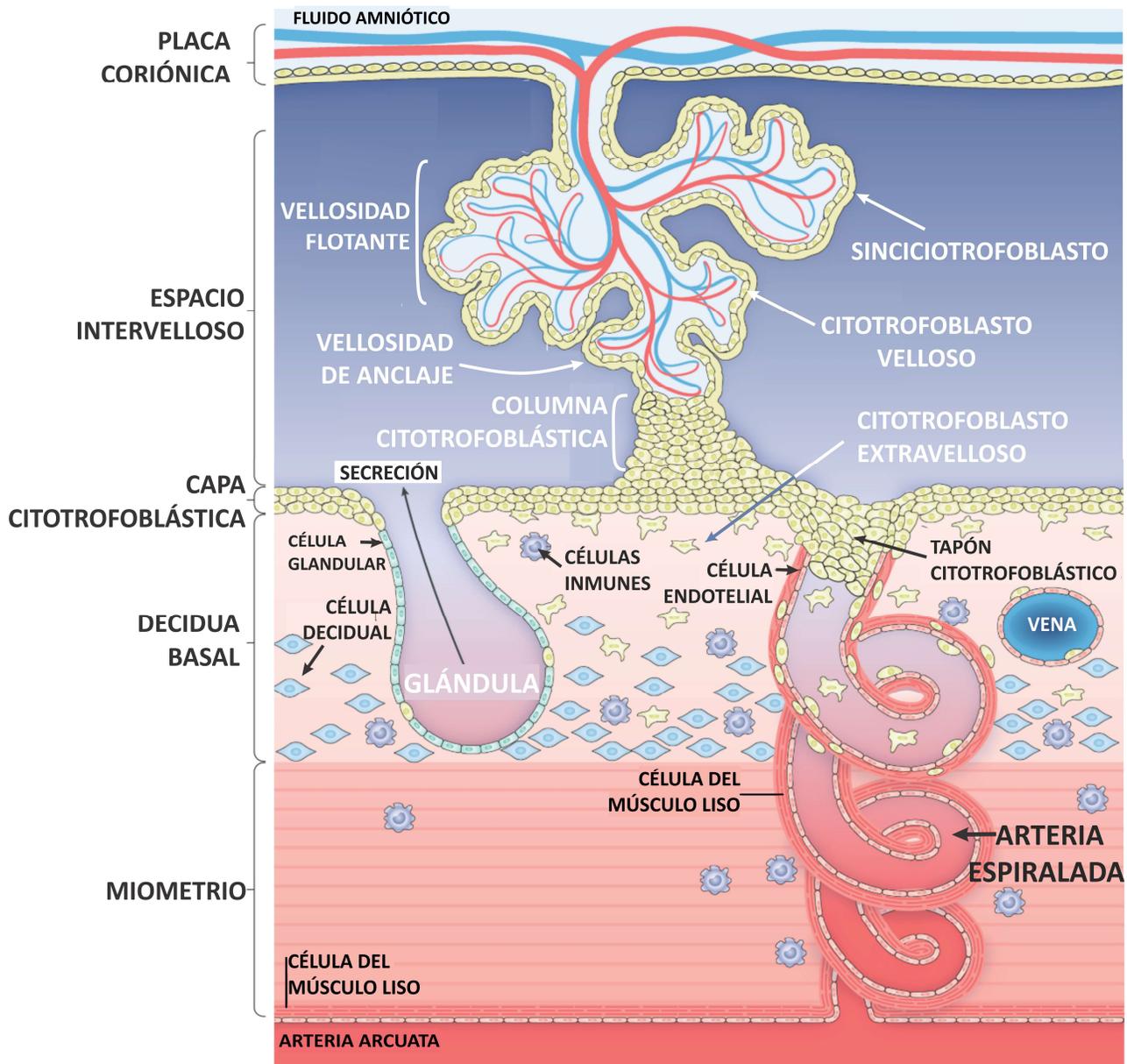


Figura 3 | Placentación a finales del primer trimestre de gestación humana. Modificada de *Aplin et al. Nat. Rev. End. (2020)*⁷.

1.1.3. Gestación en ratones

Si bien la formación de la placenta en humanos y ratones difiere en algunos aspectos, las estructuras y los mecanismos moleculares tienen numerosas similitudes²⁹. Los ratones, al igual que los humanos, presentan una placentación hemocorial³⁰. Dependiendo de la cepa utilizada, el período de gestación dura entre 19 y 21 días a partir de la cópula, y la camada varía entre 6 y 14 crías. Anatómicamente, el útero del ratón tiene dos cuernos conectados a la vagina por el cérvix. En sus extremos se encuentran los ovarios con los respectivos oviductos³¹. Los blastocistos entran en el

cuerno uterino y pierden la zona pelúcida, avanzan hasta alcanzar el segmento medio, se diseminan uniformemente y se implantan.

Durante la implantación, al día de gestación (dg) 4.5, las células más externas del trofoectodermo se diferencian a células trofoblásticas gigantes (TGC), una capa simple de células que anclan la placenta a la decidua, y son las más similares a las EVT humanas^{29,32} (Fig. 4). Del lado opuesto del trofoectodermo se diferencian otros dos tipos celulares: el ectodermo extrembrionario, que finalmente forma el laberinto (comparable a las vellosidades con capilares fetales, CTBv y STB en humanos), y el cono ectoplacentario (EPC), de donde más adelante se diferenciarán las nuevas TGC³³. La capa celular derivada del EPC que sostiene al laberinto se denomina espongiotrofoblasto, y se lo asemeja con las columnas de CTB humanas. En ratones, a diferencia de los humanos, la invasión es menos profunda, los vasos pierden la capa de músculo liso pero no se remodelan completamente. Cuando la placenta se encuentra formada, la separación estructural entre los capilares fetales y los sinusoides maternos se encuentra conformada por una capa trilaminar: una bicapa de sincicio rodeando al endotelio de los vasos, y una capa de células mononucleares (Fig. 4), por lo que el intercambio de nutrientes y desechos debe atravesar las 4 capas entre la sangre materna y la fetal, a diferencia humano en la que debe atravesar 3²⁹. Pese a esta pequeña diferencia, los mecanismos moleculares y características funcionales son similares, lo que sostiene el uso del modelo para estudiar la incorporación de nutrientes y el transporte transplacentario³⁴⁻³⁶.

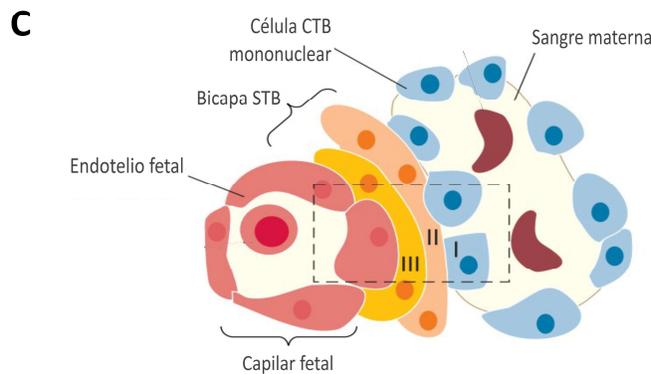
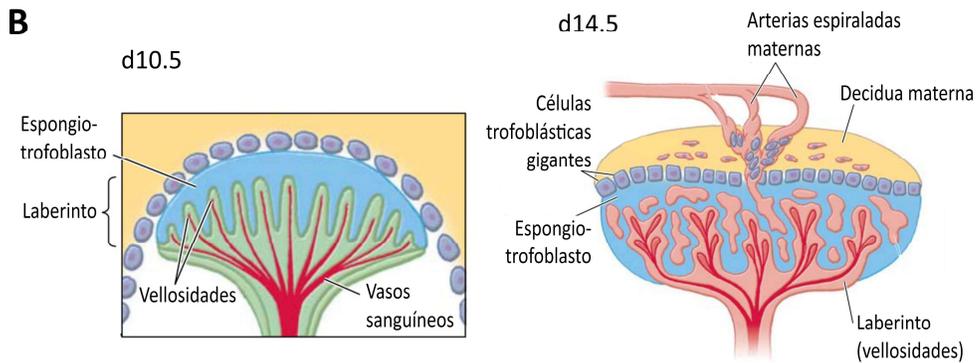
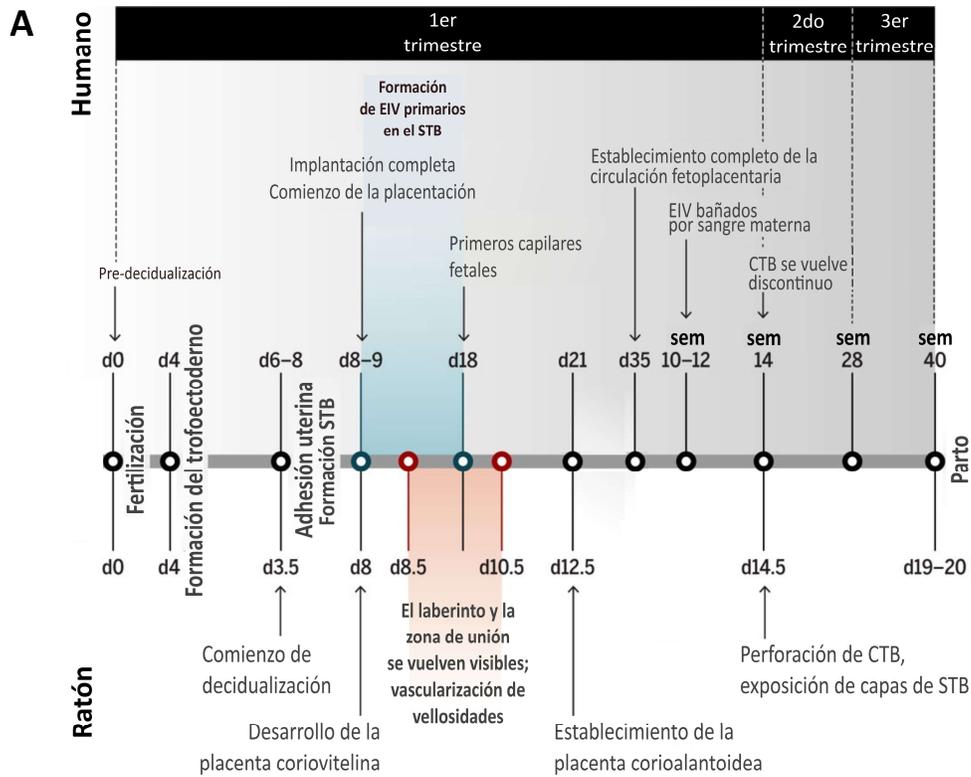


Figura 4 | Preñez humana vs. murina. (A) Línea de tiempo comparativa entre preñez humana y murina. (B) Placentación y tipos celulares en la interfase materno-fetal murina. (C) Capas y tipos celulares presentes en las vellosidades murinas. CTB: Citotrofoblasto, EIV: Espacios intervellósos, STB: Sincitiotrofoblasto. Modificado de *Ander et al. Sci Imm. (2019)*³⁷ y *Watson et al. Physiol. (2005)*²⁹.

1.2. Control de la inflamación y participación de las células inmunes en la interfase materno-fetal

El sistema inmunitario evolucionó para proteger a los organismos multicelulares contra agentes patógenos. La diversidad de potenciales agentes patógenos requiere que el organismo disponga de una gama de mecanismos de reconocimiento y destrucción para combatirlos. Para lograr esto, los vertebrados han adquirido en la evolución una red compleja y dinámica de células, moléculas y vías en la que se pueden distinguir dos tipos de mecanismos efectores de la respuesta inmune: la respuesta innata y la adaptativa³⁸.

La inmunidad innata funciona como una primera línea de defensa muy rápida, erradicando una infección naciente, evitando la diseminación de los patógenos, y orientando el perfil de la respuesta adaptativa. La inmunidad innata consta de receptores que reconocen estructuras químicas comunes (patrones) de muchos agentes patógenos, así como moléculas o compuestos liberados durante el daño celular/tisular; y mecanismos de defensa celulares y bioquímicos que incluyen barreras físicas y químicas.

La inmunidad adaptativa demora más en activarse, pero es específica para estructuras moleculares, conocidas como antígenos, presentes en cada microorganismo en particular. Las respuestas adaptativas comprenden un sistema de células y señales químicas complejo e interconectado que culmina los procesos iniciados durante la respuesta inmunitaria innata.

Desde el punto de vista inmunológico, 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. Las moléculas CMH son glicoproteínas que se expresan en la superficie celular, cuya función principal es presentar péptidos antigénicos dando inicio a una respuesta inmune adaptativa. A pesar de ello, las células fetales ocupan las estructuras del útero y el sistema inmune materno no genera una reacción de rechazo. Por muchos años se creyó que una implantación exitosa y posterior desarrollo del feto ocurrían solo como resultado de una supresión del sistema inmune materno a lo largo del embarazo. Hoy en día se sabe que la respuesta inmunológica durante el embarazo es singular y dinámica, está permanentemente modulada por diversos mecanismos y factores, y no se encuentra suprimida, sino más bien todo lo contrario, es absolutamente necesaria para facilitar y proteger el embarazo^{6,30,39}.

Mor y colaboradores han propuesto que el embarazo consta de tres fases inmunológicas, caracterizadas por procesos distintos y cada una con un perfil de respuesta inmune y mediadores particulares^{5,6,40}. De esta manera, podemos identificar 3 etapas: una primera fase proinflamatoria controlada, que va desde la implantación hasta el comienzo del segundo trimestre, una segunda etapa antiinflamatoria y de tolerancia inmunológica durante el segundo y parte del tercer trimestre que permite el crecimiento fetal, y una tercera fase donde hay una respuesta proinflamatoria asociada al parto (Fig. 5).

La implantación e invasión del blastocisto y la placentación involucran un activo proceso de ruptura y reestructuración de la decidua. Aquí, distintas células invaden y mueren en el marco de un ambiente inflamatorio que activa la reparación tisular y la remoción de cuerpos apoptóticos y restos celulares. El reconocimiento de este daño tisular es necesario para que ocurra la correcta activación del sistema inmune adaptativo. El sitio de implantación se caracteriza por la presencia de moléculas derivadas de las células estromales endometriales y de los leucocitos presentes en la decidua como IL-6, IL-8, IL-15, GM-CSF (del inglés *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), TNF- α , entre otras⁴¹.

La segunda fase del embarazo comienza hacia finales del primer trimestre. Los factores presentes en la interfase favorecen un *switch* hacia un estado antiinflamatorio y tolerogénico que permite el crecimiento y desarrollo fetal. Si este cambio no es regulado correctamente, la pérdida de la homeostasis y la continuación de la inflamación puede llevar a complicaciones gestacionales como abortos espontáneos, entre otras⁵.

Hacia el final del tercer trimestre, un ambiente inflamatorio con un gran flujo de células inmunes al miometrio es crucial para promover la contracción del útero, el nacimiento del bebé y la separación de la placenta.

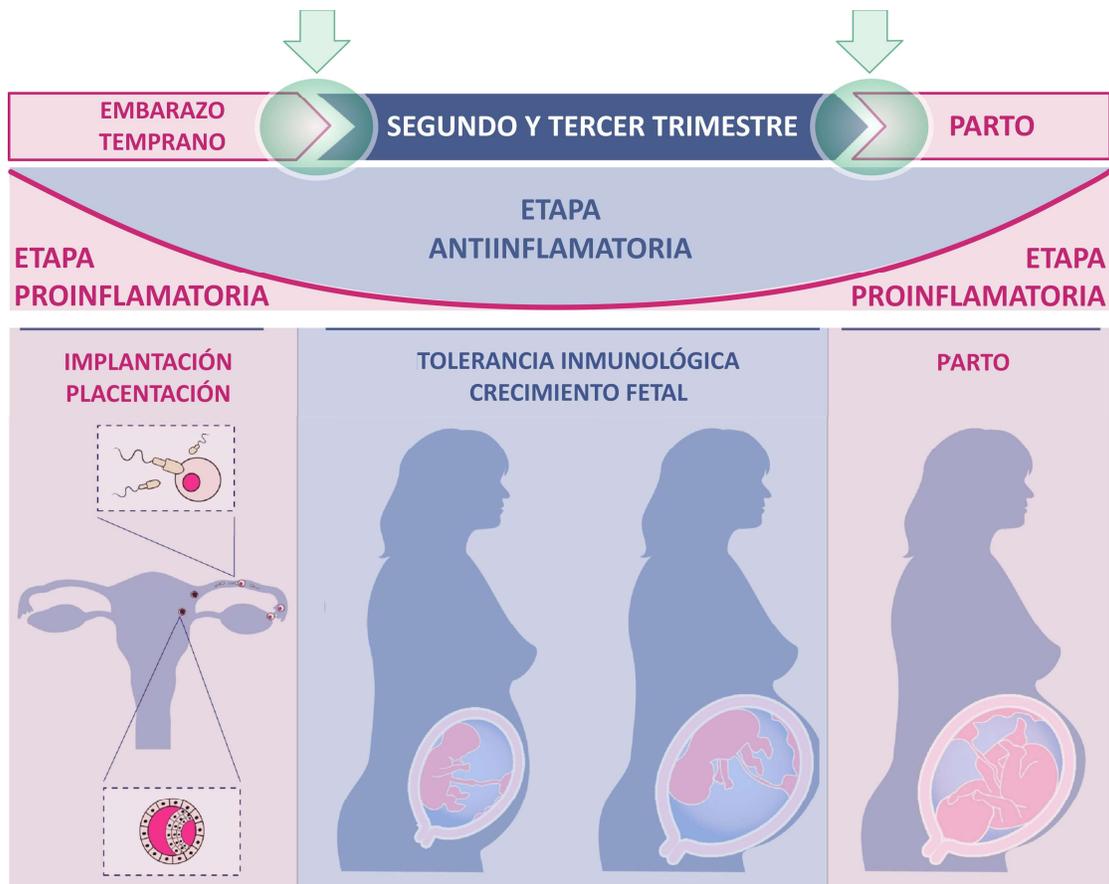


Figura 5 | Fases inmunológicas del embarazo. La fase inicial se caracteriza por un perfil proinflamatorio requerido durante la implantación e invasión del trofoblasto, una segunda fase antiinflamatoria durante el crecimiento y desarrollo fetal y una última fase proinflamatoria necesaria para el parto. Modificado de *Pfaller et al. Allergy (2021)*⁴².

1.2.1. Poblaciones leucocitarias en la interfase

La decidua post-implantación es rica en diversas poblaciones leucocitarias, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. Durante el embarazo temprano, los leucocitos representan el 30% de las células de la decidua materna. Las principales poblaciones leucocitarias presentes en la decidua son las células *natural killer* (NK), los monocitos (Mo) y macrófagos ($M\emptyset$), las células dendríticas (CD), los linfocitos T (LT), y en menor porcentaje los linfocitos B y los neutrófilos⁴³ (Fig. 6).

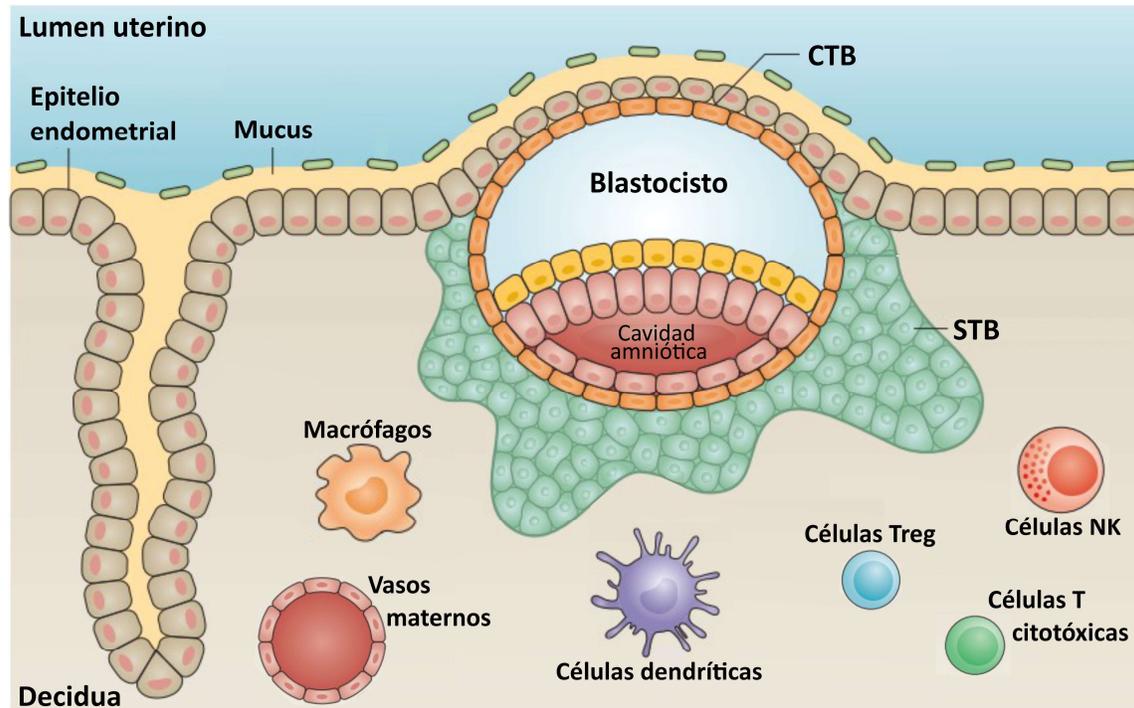


Figura 6 | Poblaciones leucitarias en la interfase materno-placentaria. Las etapas tempranas del embarazo se caracterizan por la presencia de células asesinas naturales (NK), macrófagos (M ϕ), células dendríticas (CD), células T CD8⁺ (CT) y células T regulatorias (Treg). Los neutrófilos se encuentran en la decidua durante la ventana de implantación, y luego en etapas más avanzadas del embarazo. CTB: Citotrofoblasto, STB: Sinciotrofoblasto. Modificado de Mor et al. *Nat. Rev. Immunol.* (2017)⁶.

Las células **NK deciduals (dNK)** alcanzan a ser el 70% de los leucocitos maternos presentes en la decidua, y aunque aún su origen no está esclarecido, se sabe que proliferan y se diferencian *in útero*⁴⁴. Estas células poseen un fenotipo característico distinto de las de sangre periférica (que son altamente citotóxicas): expresan bajas cantidades de CD16 y altas cantidades de CD56 (CD16⁻CD56^{bright}) y expresan receptores inhibitorios como CD94/NKG2A y KIR que reconocen a sus respectivos ligandos HLA-G, HLA-F, HLA-E y HLA-C sobre las células trofoblásticas por lo que tienen limitada su citotoxicidad. Además, tienen una gran capacidad de producción de citoquinas, quimioquinas y factores angiogénicos⁴⁵. Las dNK se acumulan alrededor de las glándulas y vasos endometriales participando de la remodelación, la angiogénesis y la invasión trofoblástica, que asegura el flujo sanguíneo suficiente para el desarrollo fetal⁴⁶.

Las **células dendríticas (CD)** representan alrededor de un 2% de los leucocitos de la decidua en la interfase temprana. Estas células son presentadoras de antígeno profesionales (CPAp) y activan linfocitos T naïve poniendo en marcha la respuesta inmune adaptativa, por lo que son cruciales para el establecimiento de la tolerancia inmunológica^{6,47}. Son células altamente plásticas, y dependiendo

de las señales que reciben en el tejido donde son activadas se inducirá la diferenciación de los linfocitos T naïve hacia distintos perfiles: T helper 1, 2, 17 (Th1, Th2, Th17) ó T regulatorias (Treg). Las CD de la decidua tienen un estado de activación semi-tolerogénico liberando grandes cantidades de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β , la molécula IDO entre otros, favoreciendo así un ambiente inmunosupresor y una mayor inducción de células Treg^{48,49}. De este modo las CDs no sólo participan de la inducción de tolerancia por presentación antigénica, sino también por la liberación de citoquinas antiinflamatorias y el reclutamiento de otros tipos celulares como dNK⁴⁸. Recientemente, trabajos de nuestro laboratorio mostraron que la decidualización es un factor condicionante para la diferenciación de monocitos maternos a un subconjunto único y especial de células dendríticas tolerogénicas, las DC-10, favoreciendo el microambiente antiinflamatorio durante el embarazo⁵⁰.

Los **linfocitos T** y B son los principales actores de la respuesta inmune adaptativa. Durante el primer trimestre de embarazo, las células T representan menos de un 10% de los leucocitos deciduales, y a medida que progresa el embarazo este porcentaje aumenta hasta un 40-50% a término⁴³. Las citoquinas específicas presentes en el microambiente en donde las células T CD4+ naïve sean activadas por las CD, es lo que condiciona su función efectora: Th1, Th2, Th17 o Treg, siendo estas últimas el fenotipo de linfocitos T más relevante en la gestación por su función inmunosupresora, impidiendo la activación de las T efectoras en el embarazo normal⁴⁸. Existen numerosos estudios en modelos murinos que demostraron la relevancia de las células Treg durante la gestación^{51,52}.

En la interfase materno-fetal, la respuesta proinflamatoria/Th1 acompaña la invasión trofoblástica y la remodelación de tejidos durante el periodo periimplantatorio, el cambio hacia una respuesta antiinflamatoria/Treg se asocia a la segunda etapa que acompaña la tolerancia inmunológica materna⁶, y el desbalance de la relación Th17/Treg es un rasgo característico en casos de aborto espontáneo recurrente (RSA) y preeclampsia (PE)⁵³.

Los **neutrófilos** son una de las principales células del sistema inmune innato. Tienen una corta vida media y poseen numerosos mecanismos efectores antibacterianos. Si bien los neutrófilos no se presentan en grandes cantidades hasta el momento del parto, recientemente se ha descrito una subpoblación proangiogénica que se encuentra en baja proporción y tendría un papel fisiológico en la transformación vascular en el segundo trimestre del embarazo⁵⁴.

Los **macrófagos (M ϕ)** son células de la inmunidad innata, son altamente plásticas y están involucradas en diversos procesos como la defensa ante la entrada de patógenos por distintos

mecanismos, el mantenimiento de la homeostasis inmunológica en los distintos tejidos, la angiogénesis, y la reparación y remodelación tisular. Los MØ son considerados fagocitos profesionales por su alta capacidad de fagocitar desde bacterias hasta células apoptóticas (proceso denominado eferocitosis), y son CPAs presentando antígenos a las células T. Se intentó clasificar a los perfiles de activación de los MØ como M1/M2 siguiendo la nomenclatura Th1/Th2. Sin embargo, en la actualidad se conoce que la plasticidad funcional del MØ se manifiesta en un espectro funcional con una gama de perfiles que puede adoptar dependiendo de los estímulos que reciba, y dentro de este espectro se pueden identificar tres perfiles principales: perfil clásico con funciones proinflamatorias, perfil regulatorio con fagocitosis de cuerpos apoptóticos, y perfil de reparación tisular^{55,56} (Fig. 7).

-Perfil inflamatorio: En caso de presencia de patógenos como bacterias y virus, o en casos de señales de injuria tisular estéril, los MØ secretan citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α , quimioquinas como IL-8 que inducen el reclutamiento de neutrófilos, óxido nítrico (ON) y otros factores que llevarán a la neutralización y/o remoción del patógeno^{55,57}.

-Perfil regulatorio: La fagocitosis de cuerpos apoptóticos y eliminación de *debris* celular que se generan durante la remodelación de los tejidos produce un perfil de activación antiinflamatorio/inmunorregulador liberando localmente mediadores inmunosupresores como IL-10, PGE2, TGF- β , IDO entre otros⁵⁵.

-Perfil de reparación tisular: La liberación de citoquinas como IL-4 ó IL-13 durante una injuria tisular, produce una activación celular con la liberación de Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), VEGF, TGF- β 1, que colaboran en la proliferación celular, en la formación de tejido de granulación y en la angiogénesis⁵⁸. En modelos murinos, la L-arginina es derivada a ornitina, que favorece la síntesis de poliaminas para la remodelación, sin embargo en humanos este mecanismo aún se encuentra en discusión⁵⁹. El fenotipo de estos macrófagos se modifica conforme se resuelve la injuria tisular⁶⁰.

A nivel general y para facilitar su estudio, se continúa utilizando la nomenclatura M1 para perfiles proinflamatorios, caracterizados por la expresión de marcadores como CD80, CD86, CD32, y la liberación de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-8 entre otros; mientras que a los perfiles antiinflamatorios, regulatorios y de reparación tisular se los engloba en un perfil M2 caracterizados por la expresión de CD163, CD206, CD209, y la liberación de IL-10 y TGF- β , entre otros.

Los M \emptyset pueden ser diferenciados *in vitro* a partir de Mo de sangre periférica. Cuando el estímulo de diferenciación es el GM-CSF, su perfil de activación adquiere algunas características del perfil M1, mientras que cuando se diferencian con M-CSF (del inglés *macrophage colony-stimulating factor*) se observan marcadores similares al de un perfil alternativo o M2^{61,62}, y hay reportes que muestran que en embarazos normales predomina la presencia de M-CSF, mientras que en embarazos con complicaciones se observan niveles más elevados de GM-CSF⁶³.

Durante la formación de la interfase materno-fetal, Mo maternos circulantes son reclutados hacia la decidua donde se diferencian a M \emptyset deciduales (dM \emptyset). Los dM \emptyset representan entre un 20% y un 30% de los leucocitos en la interfase. Inicialmente, hay predominio de perfiles M1, pero a medida que el trofoblasto invade la decidua, la población de M \emptyset se transforma en una población M1/M2 hasta finales del primer trimestre, donde adquiere un perfil principalmente M2. Hacia el final del embarazo y para el momento del parto, hay nuevamente un predominio de perfiles M1. Los dM \emptyset son fundamentales durante todo el embarazo, y llevan adelante una variedad de procesos que contribuyen a un ambiente antiinflamatorio y tolerogénico, la regulación de la invasión Tb, la remodelación de los vasos sanguíneos y los tejidos conectivos uterinos, la protección del feto frente a infecciones intrauterinas y, hacia finales del embarazo, el inicio del parto^{43,45,62,64,65}.

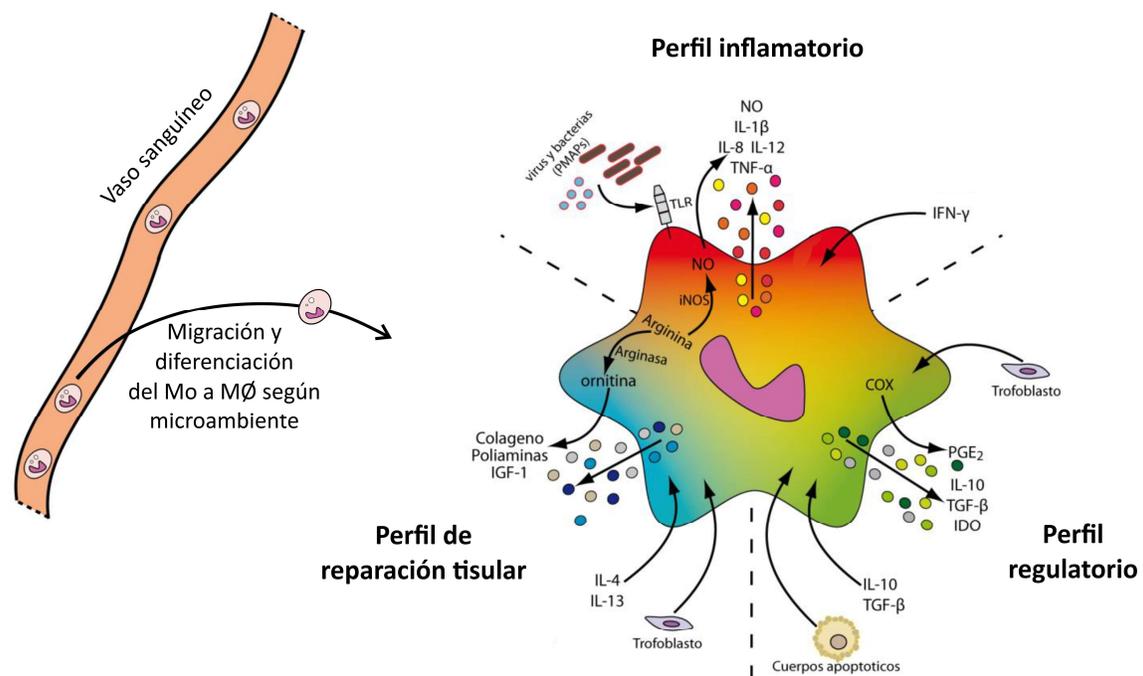


Figura 7 | Perfiles de activación de los macrófagos. El M \emptyset puede adoptar un perfil inflamatorio, regulatorio o de reparación tisular dependiendo los estímulos que recibe y el entorno que lo rodea. Las acciones que realiza dependerán del perfil que adopte. Modificada de Grasso, Tesis doctoral (2016)⁶⁶.

1.2.2. Interacción entre macrófagos y células trofoblásticas

El éxito del embarazo depende en gran medida de la remodelación de las arterias maternas que habilite el flujo correcto de sangre hacia el segundo trimestre. Para que este proceso pueda ser llevado adelante correctamente, es fundamental el *diálogo* coordinado entre las cTb que invaden la decidua y las arterias, y las células inmunes maternas que regulan estos procesos, remodelan la vasculatura y contribuyen a la tolerancia inmunológica^{2,67}. Al igual que las células inmunes, las cTb expresan receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (RRP), así como receptores de citoquinas, de manera que sensan el ambiente que las rodea y son capaces de reconocer la presencia de bacterias, virus, células muertas, tejido dañado y otras señales celulares, respondiendo a su vez con la producción y secreción de citoquinas, quimioquinas y otros factores^{68,69}. Por esto, las cTb se han propuesto como *orquestadoras* de la respuesta inmune materna en la interfase, *educando* a los leucocitos maternos y modulando sus perfiles^{6,70}.

Durante el proceso de implantación del blastocisto e invasión del trofoblasto, ocurre una injuria tisular estéril y liberación de señales por daño celular (DAMPs, del inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*). En respuesta a este proceso, tanto el estroma endometrial como células inmunes infiltradas producen y liberan citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-15, GM-CSF, CXCL1, CCL8, CCL4 y TNF- α , entre otras, que promueven la inflamación y reclutan a otras células inmunes⁴¹.

Las cTb que invaden la decidua secretan constitutivamente citoquinas como CXCL12, IL-8, TGF- β , CCL2, entre otras, que colaboran con la infiltración de leucocitos periféricos en el tejido (Mo, NK, LT, Treg y neutrófilos), y a su vez secretan citoquinas capaces de modular la diferenciación de los leucocitos reclutados, como IL-10 y M-CSF que induce un perfil del tipo M2 en los Mo. Estos presentan una ventana de plasticidad durante su etapa de diferenciación mayor que un M \emptyset ya diferenciado^{6,65}. A su vez, la fagocitosis de células apoptóticas por los dM \emptyset , o eferocitosis, favorece la liberación de mediadores antiinflamatorios como IL-10 y TGF- β que promueven la homeostasis inmunológica y la disminución de la inflamación. De este modo, la población de dM \emptyset que inicialmente es mayoritariamente M1, se transforma en una población M1/M2 hacia finales del primer trimestre/primer etapa del segundo trimestre^{71,72}. Este balance y proporción entre M1/M2 es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica ya que un aumento en la población M1 y una disminución en la población M2 resulta en un ambiente inflamatorio exacerbado y pérdida de la homeostasis que se encuentra asociado a complicaciones en el embarazo⁶². Al mismo tiempo, diversos trabajos con estudios *in vitro* muestran que perfiles M1 tienen un efecto inhibitorio

sobre la invasión cTb, mientras que perfiles M2 la inducen⁷²⁻⁷⁴. Otros trabajos *in vitro* muestran no solo que factores trofoblásticos inducen el reclutamiento de Mo y MØ que responden secretando citoquinas pro-implantatorias y antiinflamatorias, sino que la pre-incubación con estos factores o el co-cultivo con cTb modula la respuesta de estos MØ a estímulos proinflamatorios como LPS de *E. coli*^{70,75}.

Durante el proceso de remodelación vascular, las arterias espiraladas son ensanchadas para formar vasos de gran flujo y de baja resistencia que carecen de control vasomotor. Este cambio radical en la arquitectura de los vasos involucra la pérdida de células endoteliales (EC) y células vasculares del músculo liso (VSMC) y la degradación de la matriz extracelular (MEC). Las VSMC son reemplazadas por las células EVTev⁷⁶. Aunque aún no hay consenso al respecto, Smith y colaboradores han propuesto que la remodelación ocurre en dos etapas: una primera etapa independiente de las EVTev, en donde los dMØ y las dNK secretan metaloproteinasas (MMP) 2 y 9 degradando la MEC, lo que permite su infiltración en las arterias espiraladas maternas, y una segunda etapa donde las EVTev son reclutadas y reemplazan a las células endoteliales⁷⁶.

Las MMPs son también secretadas por las EVT, participan en los procesos de invasión y placentación y están reguladas bajo un control estricto a diferentes niveles. Su transcripción es baja, está finamente regulada tanto positiva como negativamente por citoquinas y factores de crecimiento; una vez sintetizadas deben ser clivadas para ser funcionales, y en la interfase también se expresan y se encuentran reguladas las proteínas TIMPs que inhiben a las MMPs⁷⁷.

La formación de nuevos vasos sanguíneos es crítica para el éxito del embarazo. Diversos trabajos muestran que los dMØ que adquieren un perfil de tipo M2 participan en la angiogénesis y la formación de túbulos, liberando factores proangiogénicos como VEGF-A y FGF-2 (en inglés *Basic Fibroblast Growth Factor*), e interleuquinas como IL-10, TGF-β, IL-6, TNF-α, mientras que en presencia de factores liberados específicamente por perfiles M1 estos procesos se encuentran inhibidos^{62,72}.

1.3. Metabolismo y transporte de nutrientes

Una de las principales funciones de la placenta radica en asegurar el suministro de nutrientes para sostener el crecimiento del feto. La placenta como órgano tiene una tasa metabólica extraordinariamente alta con un alto consumo de oxígeno, y adapta su fenotipo metabólico integrando las señales maternas y fetales para mantener el desarrollo intrauterino. Una fina

regulación del metabolismo de la placenta es fundamental, ya que está directamente relacionado con los procesos celulares. Numerosos trabajos muestran una asociación entre alteraciones metabólicas y complicaciones gestacionales^{2,4,78-80}.

Durante muchos años, el concepto de metabolismo de la placenta se presentó asociado principalmente a la capacidad del STB para incorporar nutrientes, metabolizarlos y transportarlos hacia los capilares fetales ó utilizarlos como precursores en la síntesis de mediadores, sobre todo en etapas avanzadas del embarazo⁴. Sin embargo, la relevancia del metabolismo del CTBv que da origen y sostiene al STB, y que se dispone como una capa continua de células mononucleares hasta finales del primer trimestre y luego se torna discontinua hasta el parto, se consideraba prácticamente insignificante, por lo que se dispone de vasta información sobre el transporte de nutrientes en STB mientras es más escasa respecto al CTB.

Más recientemente se han publicado trabajos que muestran que el rol del CTB en el metabolismo de la placenta es fundamental y sería aún mayor que el del STB^{81,82}. Más aún, teniendo en cuenta las dificultades para el estudio de la placenta en estadios tempranos, prácticamente no ha sido estudiada la relevancia del metabolismo de las células EVT en el primer trimestre cuando invaden la decidua y el primer tercio del miometrio. En esa etapa remodelan las arterias formando los vasos necesarios para la correcta nutrición del feto y orquestan la respuesta inmunológica para el mantenimiento de la homeostasis, por lo tanto requieren una alta tasa de metabolismo capaz de sostener las demandas energéticas y la adquisición de su fenotipo invasivo.

Por otro lado, el concepto de inmunometabolismo surgió recientemente y revela la conexión estrecha entre procesos metabólicos e inmunológicos que definen la reprogramación metabólica de las células dentro de un tejido, el destino celular y la adquisición de perfiles de las distintas poblaciones inmunes^{83,84}. El enfoque de la placenta desde el punto de vista del Inmunometabolismo es novedoso y es una parte de los objetivos de esta Tesis, ya que podría explicar mecanismos de la interacción inmune-trofoblástica, y contribuir a modelar la comunicación célula-célula entre cTb y leucocitos maternos mediada por metabolitos en condiciones de homeostasis inmunológica en la interfase.

Teniendo esto en cuenta, podemos identificar distintos abordajes del estudio del metabolismo de la placenta: el metabolismo a nivel celular de las células trofoblásticas, directamente asociado a las funciones específicas para la implantación, la placentación y la remodelación de tejidos; el metabolismo a nivel tisular centrado en la utilización de los distintos recursos y vías por células de la placenta, cuya regulación en última instancia habilitará la regulación del transporte de nutrientes desde los tejidos maternos hacia los capilares fetales; y el inmunometabolismo que enfoca

la homeostasis inmunológica en la placenta a partir de los metabolismos a nivel celular de las células inmunes y trofoblásticas en permanente interacción.

1.3.1. Metabolismo de la célula trofoblástica

La capacidad de incorporación de distintos nutrientes por las cTb depende de la cantidad, densidad, distribución y actividad de los transportadores específicos. La glucosa es el principal sustrato energético para las cTb. Diversos trabajos estiman que en gestación a término, de toda la glucosa incorporada por la placenta, entre un 30% y un 50% es oxidada por el tejido⁸⁵⁻⁸⁷. La glucosa es transportada principalmente mediante difusión facilitada a favor del gradiente de concentración por proteínas transportadoras específicas. GLUT1 y GLUT3 (SLC2A1 y SLC2A3) son consideradas como los principales miembros de la familia SLCA encargados de la regulación del transporte de glucosa en la placenta y se expresan tanto en STB como en CTB y otros tipos celulares, aunque recientemente se han identificado otros miembros⁸⁸⁻⁹⁰. En humanos GLUT1 se expresa en placenta durante todo el embarazo siendo mayor a término, mientras que GLUT3 se expresa principalmente en el primer trimestre y a medida que avanza el embarazo disminuye su expresión⁹⁰⁻⁹³. La expresión de ambos transportadores ha sido reportada en la línea celular de primer trimestre HTR-8/SVneo (HTR-8) (asimilable a EVT) y en las líneas de coriocarcinoma humano JAr, JEG-3 y BeWo, y en la primera el bloqueo de la incorporación de glucosa impacta sobre la viabilidad celular y su capacidad migratoria^{94,95}.

Una vez que la glucosa ingresa a la célula, es fosforilada en el carbono 6 por la enzima hexoquinasa (HK) dando glucosa-6-P (G-6-P) y tiene distintos destinos posibles. La G-6-P puede ser metabolizada por la vía de las pentosas fosfato (PPP) (Fig. 8), siendo la fuente exclusiva de regeneración de NADPH requerida para la reducción de glutatión que funciona como principal amortiguador de especies reactivas de oxígeno (ROS)^{80,96}. Por otro lado, la G-6-P puede ser metabolizada a Fructosa-6-P y continuar la oxidación vía glucólisis hasta dar piruvato, con la formación de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Fig. 8).

En la mayoría de los modelos donde el oxígeno no es limitante, el piruvato es principalmente transportado a la mitocondria, donde continúa su oxidación en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), mientras que en situaciones de hipoxia, el piruvato es metabolizado por la enzima LDH a lactato (Fig. 8). Sin embargo, aún en presencia de oxígeno -aunque sus niveles son menores en el microambiente implantatorio-, las cTb producen altas cantidades de lactato, proceso denominado glucólisis aeróbica (efecto Warburg), que fue inicialmente descrito para células tumorales, cuyo

metabolismo y fenotipo presenta características muy similares con las cTb especialmente en las etapas invasivas, si bien durante la placentación este evento está extremadamente regulado^{48,97}. Durante la primera etapa de la implantación, el blastocisto convierte un alto porcentaje de la glucosa incorporada a lactato, generando un pH ácido alrededor del blastocisto que facilita la degradación del epitelio endometrial^{97,98}. Durante el proceso de invasión y placentación, las células cTb siguen incorporando altas cantidades de glucosa y continúan metabolizando una alta proporción del piruvato a lactato, y este metabolito no sólo modula el pH del microambiente sino que se ha demostrado en modelos murinos y humanos que actúa como molécula de comunicación celular induciendo la angiogénesis, aumentando la permeabilidad vascular, y modulando el perfil de los dMØ hacia un perfil tolerogénico en presencia de oxígeno^{99,100}.

El piruvato que no es metabolizado a lactato es importado a la mitocondria, convertido a Acetil-CoA u oxalacetato e ingresa en el TCA proveyendo intermediarios para la generación de ATP por fosforilación oxidativa (FOSFOX). El TCA no solo metaboliza Acetil-CoA proveniente de la glucólisis, sino que la metabolización de otros nutrientes también genera intermediarios que son oxidados en el TCA.

La incorporación de aminoácidos es fundamental para la síntesis de proteínas, la fijación de carbono y el metabolismo oxidativo generando ATP, así como la generación de otras moléculas como el grupo hemo, las porfirinas y los nucleótidos, entre otros¹⁰¹. El sistema A de transporte de aminoácidos co-transporta aminoácidos pequeños no esenciales, entre ellos la glutamina, acoplados a Na⁺, mientras que el sistema L funciona como un intercambiador de aminoácidos no esenciales por esenciales. Los principales transportadores del sistema A en placenta son SNAT1, SNAT2 y SNAT4 (SLC38A1, SLC38A2 y SLC38A4), teniendo SNAT1 y 2 una cinética muy similar mientras que SNAT4 posee menor afinidad por aminoácidos neutros y también interactúa con aminoácidos catiónicos sin co-transporte de Na⁺¹⁰². Los principales transportadores del sistema L en placenta son el LAT1 y LAT2 (SLC7A5 y SLC7A8) aunque también se han reportado otras isoformas^{103,104}. Entre los aminoácidos no esenciales, la glutamina es un aminoácido muy relevante transportado por SNATs, que por glutaminólisis en la mitocondria genera α -cetoglutarato que es otro intermediario del TCA (Fig. 8). Además, es el principal sustrato para la formación de glutatión, que como se mencionó anteriormente, es reducido en la PPP generando el principal amortiguador de ROS. La expresión y la actividad de los transportadores de ambos sistemas se encuentran fuertemente asociados al crecimiento fetal tanto en humanos como en otros modelos animales^{105,106}.

La β -oxidación de ácidos grasos (FAO) es otra de las principales fuentes de energía proveyendo Acetil-CoA al TCA. Las cTb pueden incorporar ácidos grasos libres de cadena larga (LCFAs) provenientes de otras células liberados en forma no esterificada, o luego de que triglicéridos sean clivados por lipasas *in situ* generando las formas no esterificadas^{107,108}. Las cTb no sólo incorporan LCFAs para obtener energía, sino que estos son también precursores para fosfolípidos de membrana, pueden operar como señalizadores celulares activando receptores como PPAR- γ y también pueden ser almacenados en forma esterificada en gotas lipídicas citoplasmáticas. Además, las cTb son también productoras de mediadores lipídicos como prostaglandinas, eicosanoides y tromboxanos^{107,109–111}. Existen distintos tipos de transportadores y proteínas de unión a LCFAs, de los cuales la placenta expresa principalmente la translocasa FAT/CD36 que facilita la incorporación, las proteínas transportadoras FATP1, 2, 4 y 6, y las proteínas citosólicas de unión a ácidos grasos FABP1, 3, 4, 5 y 7 que se unen a los LCFAs una vez que se encuentran dentro de la célula y colaboran dirigiéndolas hacia diferentes destinos¹¹². Las proteínas transportadoras FATPs pueden presentar actividad acil-CoA sintetasa, activando directamente a los LCFAs en el ingreso a la célula al formar rápidamente acil-CoAs¹¹³.

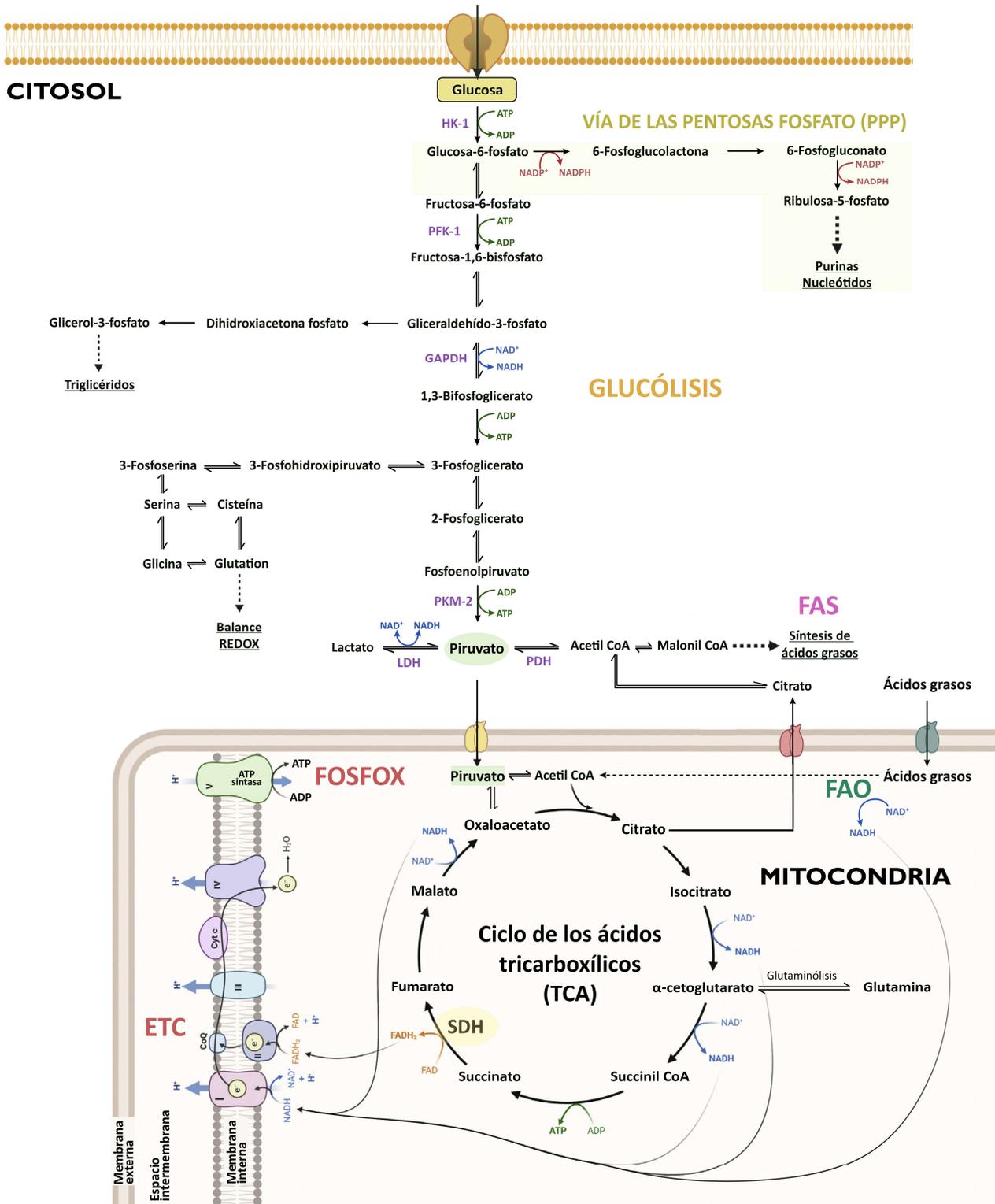


Figura 8 | Vías metabólicas principales. Se esquematizan las principales vías metabólicas descritas en cTb: la Glucólisis, la vía de las pentosas fosfato (PPP), el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), la β-oxidación de ácidos grasos (FAO), la síntesis de ácidos grasos (FAS), la cadena de transporte de electrones (ETC) y la fosforilación oxidativa (FOSFOX). GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, HK-1: Hexoquinasa, LDH: Lactato deshidrogenasa, PKM-2: Piruvato quinasa-2, PFK-1: Fosfofructoquinasa-1, SDH: Succinato deshidrogenasa. Modificado de Aye et al. *Am J Obstet Gynecol* (2022)⁸⁰.

Además de la obtención de ATP directa de la vía glucolítica, tanto la glucólisis, como el TCA, como la FAO resultan en la formación de intermediarios NADH y FADH₂ que donan sus electrones en la cadena de transporte de electrones (ETC) para la obtención de energía por FOSFOX.

Diversos trabajos muestran altos niveles de glucólisis y de FOSFOX en cTb, e incluso los niveles serían mayores en CTB comparado con STB. Mas aún, el CTB parece tener mayor plasticidad y mantener más constantes los niveles metabólicos frente a variaciones en los niveles de nutrientes y condiciones de estrés⁸¹.

La FOSFOX mitocondrial es una de las principales fuentes de ROS celular. Si bien niveles excesivos de ROS celular no son deseables ya que producen daño celular generalizado, concentraciones bajas y fisiológicas de ROS son fundamentales como señalizadores celulares que son responsables de diversos procesos en la placenta, como la expresión de citoquinas, la diferenciación celular y apoptosis, entre otros.

Los metabolitos intermediarios del TCA también funcionan como precursores biosintéticos, cuando un exceso de citrato es exportado hacia el citosol, puede ser metabolizado a Acetil-CoA y participar de la síntesis de ácidos grasos (FAS). Por otro lado, funcionan también como señalizadores celulares con roles asociados no solamente al metabolismo, por ejemplo en la acetilación de histonas, donde el Acetil-CoA es el sustrato limitante, siendo a su vez el lactato un inhibidor global de las desacetilasas de histonas, mientras que las sirtuinas, utilizan NAD⁺ como cofactor⁸⁰. Más aún, trabajos recientes muestran que metabolitos como el succinato pueden ser exportados fuera de la célula y señalizar vía receptores de membrana autócrina/parácrinamente, y en diversos trabajos se lo propone como una molécula de señalización proinflamatoria^{114,115}.

1.3.2. Transporte de nutrientes a través de la placenta

El STB es el epitelio de transporte que media el intercambio materno-fetal de gases, nutrientes y productos de desecho. Funciona también como el principal productor de hormonas en la placenta (estrógenos, progesterona, hCG, entre otros), integrando señales maternas y fetales para balancear el suministro y la demanda fetal²⁷.

La capacidad de transporte de nutrientes de la madre al feto es regulada por diversos factores: el suministro materno hasta los EIV (gradiente de concentración y flujo útero-placentario), la superficie y el espesor de intercambio, la abundancia y distribución de transportadores, el

metabolismo de las propias células de la placenta, y otros factores y estímulos externos. Como se mencionó anteriormente, estos factores dependen en primer lugar de la extensiva remodelación de la vasculatura materna que habilite el flujo de sangre necesario hasta los EIV, y además un regulado y coordinado metabolismo de las células de la placenta para un correcto intercambio^{2,92,101}. Alteraciones en la modulación de cualquiera de estos procesos, se encuentran asociadas a patologías en la gestación, como describiremos más adelante^{4,116}.

Los nutrientes son incorporados desde los EIV por la membrana microvellosa (MMV) del STB. Estos deben atravesar luego la membrana basal (MB), el CTBv y el endotelio de los capilares fetales para alcanzar la circulación fetal (ver Fig. 3). La baja permeabilidad de las membranas celulares y la escasa cantidad de canales paracelulares, resultan insuficientes para satisfacer las demandas fetales de los distintos nutrientes, por lo que la abundancia de transportadores es clave para este transporte, y se propone que la MB sería la limitante^{92,117}.

Además de los estudios en tejidos humanos *ex vivo*, diversos modelos han sido empleados para el estudio del transporte transcelular de nutrientes, entre ellos la línea celular de coriocarcinoma humano BeWo, debido a su capacidad de formar un sincicio y su distribución asimétrica de transportadores, más similar al STB^{117,118}. Como se mencionó anteriormente, la gestación en ratones posee muchas características similares a la gestación humana, lo que permite emplearlo como un buen modelo *in vivo*^{32,119–121}.

La compleja regulación del metabolismo celular citotrofoblástico para poder cumplir sus funciones y dar lugar a la regulación del transporte a través de la placenta, en conjunto con la creciente investigación que postula nuevos roles para los metabolitos como señalizadores y reguladores de vías no metabólicas, pone nuevamente de manifiesto la importancia de profundizar en el conocimiento de los mediadores que dirigen estos procesos, como describiremos más adelante.

1.3.3. Inmunometabolismo en monocitos y macrófagos

El inmunometabolismo surgió como campo recientemente y ha tenido una amplia expansión en los últimos años. Como se comentó anteriormente, el término inmunometabolismo resalta la conexión estrecha entre procesos inmunológicos y metabólicos que definen el destino celular de las distintas poblaciones inmunes⁸³.

Se han definido dos subcampos de esta disciplina: el inmunometabolismo a nivel tisular se enfoca en cómo las células inmunes instruyen a un tejido y al metabolismo sistémico para sostener las adaptaciones a desafíos ambientales, mientras que el inmunometabolismo celular se focaliza en

estudiar cómo la reprogramación metabólica sostiene los destinos celulares como la activación, proliferación y diferenciación hacia distintos perfiles^{84,122}. De este modo, las modificaciones en las vías metabólicas se encuentran estrechamente acopladas a las funciones efectoras y especialmente a la producción de conjuntos específicos de citoquinas¹²³.

La reprogramación metabólica en los MØ está siendo ampliamente estudiada, teniendo en cuenta que es una población con una altísima plasticidad funcional implicada en patologías inflamatorias crónicas, metabólicas, cardiovasculares, cáncer y, en especial nuestro interés, en gestación. Numerosos trabajos de los últimos años reportan su alta capacidad de reprogramación metabólica según el microentorno de inflamación estéril, infección, cáncer y obesidad, adquiriendo distintos rearrreglos en su metabolismo y diferentes estados de activación, polarizándose a perfiles M1/M2^{83,124–126}. Muchos trabajos han descrito diversos mecanismos utilizando como modelo MØ murinos, y si bien los MØ humanos comparten numerosas vías, estos han sido menos estudiados y algunas de ellas difieren entre ambos modelos, por lo que es un área que aún requiere extensa investigación¹²⁷.

A nivel general, los **MØ clásicamente activados o M1 (activados con LPS o LPS+IFN γ)** se caracterizan por tener una alta incorporación de glucosa, sostienen altos niveles de glucólisis y producción de lactato, incluso en presencia de oxígeno como se mencionó anteriormente (Fig. 9). El silenciamiento de GLUT1, un transportador esencial de glucosa en los MØ, resulta en una menor producción de citoquinas proinflamatorias. Poseen muy activa la vía PPP que aporta precursores para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos, y una alta generación de NADPH que es utilizado por la enzima NADPH oxidasa para la producción de ROS así como puede ser utilizado para producir glutatión reducido contra-balanceando los efectos oxidativos de la producción celular excesiva de ROS^{123,128}. En los MØ activados con LPS se observa también un aumento en la expresión de la enzima PKM2 (que convierte fosfoenolpiruvato a piruvato + ATP) en su forma monómero/dímero que puede translocarse al núcleo e interactuar con HIF-1 α , activando la transcripción de enzimas glucolíticas¹²⁹. En estas células el TCA se encuentra interrumpido en dos pasos: presenta una disminución en la expresión de la enzima isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) (que convierte citrato a α -cetoglutarato), provocando la acumulación de citrato con formación de NO, el aumento de FAS y una acumulación de succinato^{123,130}. El aumento de ATP por glucólisis y la disminución de ATP por FOSFOX termina resultando en una hiperpolarización de la membrana mitocondrial, que junto a la acumulación de succinato y la oxidación a fumarato por succinato deshidrogenasa (SDH), resulta en un transporte de electrones reverso en la ETC, que genera altos niveles de ROS y estabiliza HIF-1 α ^{131,132}. En conjunto, el aumento en la expresión de HIF-1 α , su estabilización, y su activación vía NF- κ B, aumentan la

transcripción de la citoquina pro-IL-1 β y su activación^{115,133} (Figura 9). En paralelo, la inducción de la enzima IRG1 (aconitato deshidrogenasa 1, ACOD1) deriva el citrato a itaconato, un metabolito con efecto antimicrobiano y antiinflamatorio que ha tomado especial relevancia en los últimos años¹³⁴, que inhibe a la enzima SDH (que es también el complejo II de la ETC y convierte el succinato en fumarato), y se propone que funcionaría como un *feedback* negativo disminuyendo la producción sostenida de IL-1 β a tiempos más largos, dado que otros inhibidores de la SDH han mostrado los mismos efectos¹²⁸. Por otro lado, la expresión del ARNm de la citoquina proinflamatoria TNF- α no sería dependiente de esta misma vía, pero cuando la glucólisis se encuentra activa, la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) es reclutada y no se une al ARNm de esta citoquina, habilitando su traducción.

Los **M \emptyset activados en perfil alternativo ó con IL-4 (perfil M2)** tienden a caracterizarse por un TCA intacto y una obtención de ATP y NADH mayoritariamente por FOSFOX, alimentada por FAO y también por glucólisis, dado que estos M \emptyset incorporan más glucosa que M \emptyset no activados, y la inhibición de la glucólisis con el inhibidor de hexoquinasa 2-DG, inhibe la activación y suprime tanto los perfiles inflamatorios como la adquisición de perfiles M2^{123,128} (Figura 9). La disponibilidad de ácidos grasos para FAO depende de la expresión de CD36 en membrana plasmática, así como de otros transportadores. Si bien la sobreexpresión del transportador FATP1 inhibe las respuestas proinflamatorias, el bloqueo de la FAO no impide en todos los modelos la adquisición de perfiles antiinflamatorios, por lo que el rol esencial de esta vía para la adquisición de este perfil aún es discutido¹²⁸.

En humanos se han descrito mecanismos similares en general, pero aún existen controversias sobre la expresión de arginasa-1 en Mo y M \emptyset , y sobre la producción de ON *in vitro*, y si bien en ambos modelos los perfiles M1 dependerían en bajos niveles de la FAO para alimentar la ETC, los M \emptyset humanos parecerían depender de este aporte aún menos que los murinos^{127,135}.

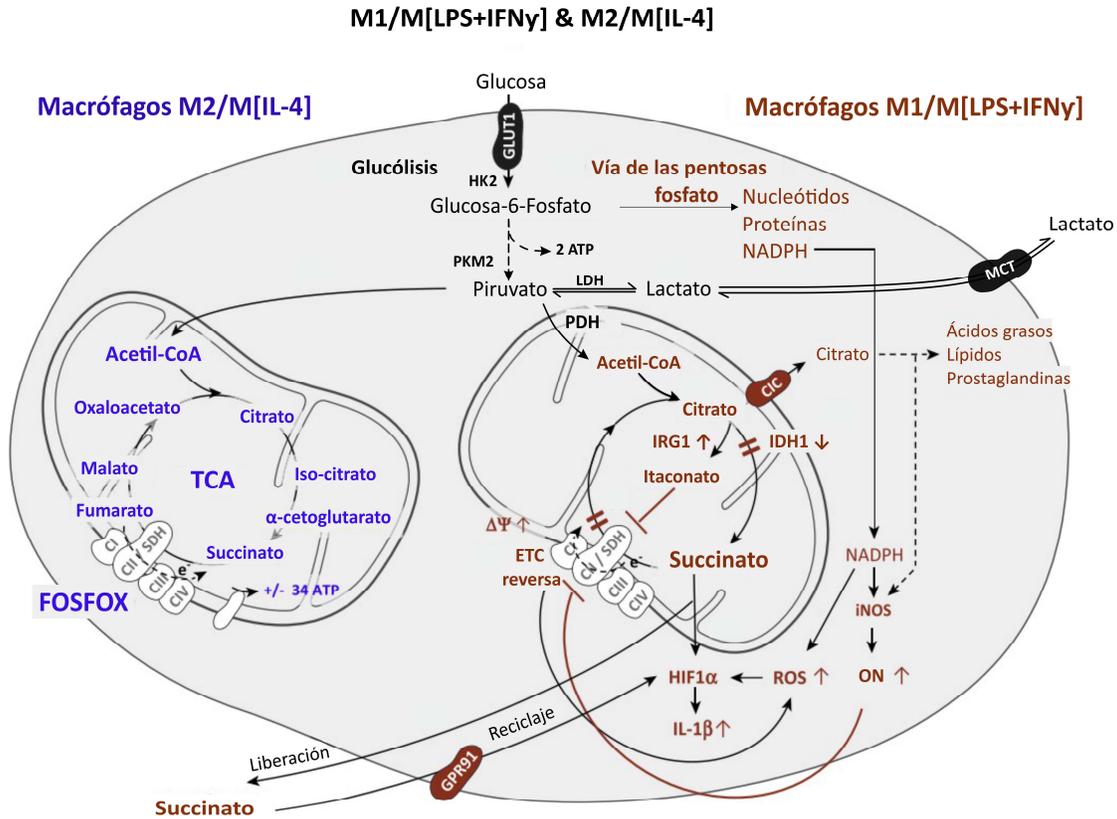


Figura 9 | Vías metabólicas en macrófagos M1 y M2. A nivel general, los macrófagos activados en un perfil inflamatorio M1 presentan una alta glucólisis, PPP y un TCA interrumpido con alta producción de succinato, IL-1 β , citrato e itaconato, mientras que los M2 activados en perfiles regulatorios poseen un TCA intacto con mayor producción de ATP por FOSFOX. Modificado de *Van den Bossche et al. Trends Imm. (2017)*¹²⁸.

Como se ha mencionado anteriormente, la adquisición de perfiles y los mecanismos y vías de reprogramación metabólica son muy diversas. En muchos casos varían en ensayos *in vitro* según los estímulos empleados, incluso en Mo¹³⁶, y en su mayoría no se corresponde *in vivo* con una clasificación taxativa M1/M2 por lo que cada caso debe ser estudiado en particular^{56,128,137}.

Hasta el momento, el inmunometabolismo en la interfase materno-fetal es un campo prácticamente no explorado en el mantenimiento de la homeostasis durante la placentación y en las complicaciones de la gestación asociadas a una respuesta inflamatoria exacerbada, aunque algunos autores mencionan la relevancia de su estudio y se han centrado en un inmunometabolismo más tisular en contextos de obesidad¹³⁸⁻¹⁴⁰.

1.4. Moléculas implicadas en la regulación del metabolismo. Impacto en la placentación y complicaciones gestacionales

Las patologías placentarias son numerosas y pueden estar relacionadas con una compleja diversidad de factores, desde factores de riesgo genéticos, desórdenes y enfermedades maternas preexistentes, hasta eventos de injuria externos¹⁴¹.

Como hemos mencionado en los apartados anteriores, la invasión insuficiente de EVT durante el proceso de placentación, fallas en la decidua materna en estadios tempranos, así como en pasos decisivos de la diferenciación trofoblástica y en el *diálogo* entre cTb y leucocitos maternos durante la remodelación de los tejidos uterinos, conduce en última instancia a placentas insuficientes como las que se observan en embarazos con PE y restricción del crecimiento fetal (RCF), que afectan entre un 3%-10% y un 3-7% de los embarazos respectivamente. Una invasión excesiva puede provocar el desarrollo de patologías como la placenta *accreta*^{4,12,72}.

La PE se define clínicamente como la aparición de hipertensión y proteinuria luego de las 20 semanas de gestación en mujeres previamente normotensas. Puede definirse PE temprana o tardía, dependiendo de si esto se observa antes o después de las 34 semanas. Se le ha dado especial atención a la PE temprana debido a la severidad de los casos. En este caso se observa, además, una invasión trofoblástica incompleta y defectuosa de las arterias espiraladas maternas, cambios en el flujo sanguíneo, y RCF¹². La RCF se define como una falla del feto para alcanzar su potencial de crecimiento, y se observa asociada a placentas con una superficie reducida, una invasión trofoblástica deficiente, una alta tasa de apoptosis en el tejido y niveles elevados de ROS^{4,142,143}. Estas complicaciones gestacionales se encuentran asociadas al aumento en el riesgo de complicaciones perinatales y morbilidad materna, y predispone al feto a desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares en la adultez^{3,4,78}. Sin embargo, la etiología aún no está esclarecida.

Tanto la PE como la RCF se encuentran asociadas a una excesiva producción de citoquinas proinflamatorias y una activación aberrante o desregulada de leucocitos maternos, entre ellos los MØ¹⁴⁴. Esto puede derivar en una hipoperfusión de la placenta, una persistente respuesta a moléculas vasoactivas, con el consecuente aumento del estrés oxidativo¹⁴⁵. La cantidad de MØ y el perfil adquirido está directamente relacionado con la disminución de la invasión trofoblástica observada en PE y RCF. Como se mencionó anteriormente, perfiles proinflamatorios se encuentran aumentados alrededor de las arterias espiraladas en estas patologías, mientras que la invasión trofoblástica se encuentra disminuida¹⁴⁶.

Una inflamación descontrolada junto a una invasión y remodelación deficiente, producen en última instancia diversos ajustes en el tejido tendientes a compensar la hipoxia y la disminución en la superficie de intercambio entre la madre y el feto^{147,148}. Los reportes de la expresión y actividad de transportadores de nutrientes así como su utilización por los tejidos maternos y fetales varían dependiendo de los modelos³⁴.

Se ha propuesto una correlación positiva entre la incorporación uteroplacentaria de glucosa y el consumo por la placenta⁸⁶. Los reportes muestran que alteraciones en la incorporación de glucosa, su metabolización y el transporte a través de la placenta estarían asociados a RCF con diferentes etiologías, aunque todavía hay resultados contradictorios¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Se ha informado también que en embarazos con PE se encuentran aumentadas algunas enzimas glucolíticas y disminuida la enzima citrato sintasa, proveyendo menos intermediarios para el TCA¹⁵². Hay más consenso sobre la actividad de los transportadores de aminoácidos, y distintos trabajos reportan su disminución en estas patologías^{116,153}.

El control de los procesos de apoptosis, diferenciación, invasión y remodelación de los tejidos están finamente regulados por factores maternos y fetales, entre ellos citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y hormonas. Entre ellos se encuentran factores como IL-6, LIF, la vía de insulina/IGF, entre otros².

Tanto la insulina como IGF1 han sido señalados como las principales señales extracelulares que promueven el crecimiento fetal mediante el aumento del transporte de glucosa y aminoácidos en las células trofoblásticas^{154,155}.

Entre los factores que integran estas señales y que regulan estos procesos, se destaca particularmente el rol del sensor de nutrientes mTOR (*mammalian target of rapamycin*). mTOR es una serina/treonina quinasa ubicua, y particularmente en la placenta sensa la disponibilidad de nutrientes maternos respondiendo a los requerimientos fetales, regula el metabolismo, la relación entre procesos anabólicos y catabólicos, la proliferación y el crecimiento celular^{4,156}. mTOR se encuentra presente en las células en dos complejos: mTORC1 asociado con la proteína raptor y mTORC2 asociado con la proteína rictor. mTORC1 es regulado por una gran cantidad de señales metabólicas, entre ellas hormonas y factores de crecimiento como insulina/IGF-1, y activa la vía de fosforilación de S6K y 4EBP1, mientras que mTORC2 responde a la señalización de insulina/PI3K y activa las vías de AKT, PKC, SGK1, regula el citoesqueleto de actina, la proliferación y el ciclo celular^{4,157}. La activación de mTOR por estos factores bloquea la autofagia, regula la transcripción de factores asociados al crecimiento, y entre ellos regula los transportadores y la actividad del sistema A

y L de transporte aminoácidos y la expresión del transportador de folato¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Diversos trabajos *in vitro* en líneas celulares trofoblásticas muestran que mTOR también regula el transporte de glucosa y la migración celular^{93,161}. Los intermediarios de la glucólisis o la relación AMP/ATP pueden señalar a través de las vías de AMPK (*AMP-activated protein kinase*)/mTOR modulando la fosforilación y la transcripción de factores dependiendo del estado energético de la célula⁸⁰.

La actividad tanto de mTORC1 como de mTORC2 ha sido ampliamente estudiada en distintos modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, y si bien los resultados varían dependiendo del modelo utilizado y las condiciones del embarazo, hay consenso en que su actividad se encuentra inhibida en embarazos con RCF, mientras los niveles totales de proteína parecen encontrarse aumentados^{156,162-164}.

Los PPARs son receptores de la familia de receptores esteroideos nucleares que regulan diversas funciones como la diferenciación celular, la homeostasis metabólica, la respuesta inflamatoria y la tolerancia inmunológica, y su desregulación se propone asociada a PE y RCF¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. La activación de los PPARs requiere de la heterodimerización con receptores de ácido retinoico RXRs, uniéndose luego a regiones promotoras en el ADN, y activando o reprimiendo la transcripción¹⁶⁸. Existen 3 isoformas bien caracterizadas: PPAR- α , PPAR- β/δ y PPAR- γ . Todas se encuentran en placenta pero poseen expresión en distintos tipos celulares: mientras PPAR- α y PPAR- β/δ se expresan en CTBv y STB, PPAR- γ se expresa también en EVT¹⁶⁹⁻¹⁷².

PPAR- α es un regulador del metabolismo de ácidos grasos, PPAR- β/δ está involucrado en la diferenciación y polarización celular y acumulación lipídica, mientras que PPAR- γ juega un rol central en la diferenciación celular, adipogénesis, inflamación, metabolismo glucolítico, sensibilización a la insulina e incorporación y acumulación de ácidos grasos^{173,174}. PPAR- γ puede ser activado por diversos ligandos naturales como los ácidos grasos poliinsaturados, incluyendo eicosanoides y lipoproteínas de baja densidad¹⁷⁵. Mientras PPAR- γ parece cumplir un rol fundamental en la diferenciación de CTBv a STB, su rol en las EVT aún es controvertido, pero trabajos en ratones reportan que la falta de PPAR- γ lleva a letalidad embrionaria debido a defectos en la implantación, y promovería la migración de EVT en otros modelos *in vitro*^{166,176}.

1.4.1. Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP)

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un péptido pleiotrópico de 28 aminoácidos perteneciente a una familia de neuropéptidos estructuralmente relacionados y hormonas que incluyen la secretina, el glucagón y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), entre otros, y fue inicialmente descrito como un neuropéptido^{177,178}.

VIP tiene diversas funciones en varios sistemas, entre ellas ha demostrado tener efecto vasodilatador^{179,180}, regula la sincronización del ciclo circadiano en sistema nervioso central de ratón^{181,182}, sostiene la supervivencia neuronal¹⁸³, estimula la diferenciación de células madre de médula ósea¹⁸⁴, modula la remodelación de los huesos¹⁸⁵, regula el crecimiento tumoral¹⁸⁶, y tiene potentes propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras¹⁸⁷.

Se han descrito dos receptores de alta afinidad, VPAC1 y VPAC2, y uno de menor afinidad PAC1. Estos receptores son compartidos con el péptido estrechamente relacionado PACAP, que se une con mayor afinidad al PAC1. VIP induce sus efectos a través de VPAC1/2 acoplados a proteína G, estimulando la actividad de la adenilciclase y la activación de PKA, y activando otras vías de señalización cruzada o río abajo que involucran PI3K, ERK, PKC, MAPK, JAK/STAT o inhibición de NF- κ B¹⁸⁸⁻¹⁹⁷.

En la interfase materno-fetal humana, VIP ha sido previamente detectado en decidua en placentas a término¹⁹⁸ y tanto su mensajero como la proteína se expresan en STB y CTB de primer y tercer trimestre^{7,199}, así como en la línea celular de coriocarcinoma humano JEG-3, en la que VIP estimula la síntesis de P₄ y hCG, siendo este último a través de AMPc/elementos de respuesta a AMPc (CRE)^{199,200}. El VIP se detecta en concentraciones de 2 a 15 pM en el suero de mujeres embarazadas y en la sangre del cordón umbilical²⁰¹. Se ha demostrado también que VIP contribuye a la quiescencia uterina post-implantatoria por efecto relajante de músculo liso vascular sobre las arterias uterinas²⁰². Además, se ha reportado la expresión de receptores VPAC en cerebelo de fetos desde las 15 semanas de gestación, sugiriendo un efecto de VIP sobre el desarrollo del sistema nervioso central²⁰³.

En modelos murinos de neurodesarrollo embrionario, previamente se ha propuesto una fuente materna de VIP en etapas tempranas de la gestación hasta el dg12^{204,205}. Además, los ratones VIP-/- (VIP KO) presentan un ciclo estral alterado con períodos más largos inter-gestacionales y la mitad de la descendencia en comparación con las hembras VIP+/+ (VIP WT)²⁰⁶. En embriones de ratón, receptores VPAC se expresan en tejido nervioso central, y VIP promueve el desarrollo cerebral y el crecimiento corporal; el tratamiento con antagonistas de VIP en ratonas preñadas produce fetos de tamaño reducido con microcefalia^{205,207,208} y se ha observado en fetos de madres deficientes en VIP un bajo peso corporal al nacer que se restituye luego de 5 días post-nacimiento²⁰⁹.

Trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron que en placentas de primer trimestre VIP se expresa en las columnas celulares así como en células EVT, y está involucrado en la invasión EVT y la remodelación de las arterias espiraladas maternas promoviendo un ambiente antiinflamatorio. Además, en explantos de placentas de primer trimestre, VIP aumenta la expansión EVT a través de la vía de PKA^{210,211}. También hemos demostrado que VIP y receptores VPACs se expresan en la línea

celular CTB humana de primer trimestre Swan 71^{212,213}, donde VIP induce su propia síntesis, a través de la activación de la vía PKA-CREB-CRE²¹⁴. Además, VIP induce la migración e invasión en estas células y en la línea celular similar a EVT, HTR-8/SVneo²¹⁴.

En modelos *in vitro*, el VIP desencadena la señalización de AMPc induciendo la expresión de marcadores de decidualización y quimioquinas, mientras que células decidualizadas con VIP favorecieron la implantación de embriones^{215,216}. Además, VIP contribuye con el reclutamiento de células Treg, y controla la respuesta proinflamatoria inicial²¹², lo que respalda su rol en la implantación.

En paralelo, desarrollamos un modelo de preñez murina en un entorno materno normal con cTb deficientes en VIP, donde observamos una disrupción de la interfase materno-fetal, con una función alterada de las cTb y menor expresión de MMP9 que resulta en la reducción de la capacidad migratoria e invasiva, y una menor expresión de factores proangiogénicos y antiinflamatorios. Los fetos presentaron menor peso fetal, y la inyección de VIP al dg6.5 restableció el crecimiento³².

En los últimos años se han reportado algunos trabajos que muestran una relación entre VIP y mTOR en sistema nervioso central^{217,218}. VIP ha sido asociado a metabolismo en diversos trabajos y modelos, tanto a nivel sistémico como a nivel celular, regulando la ingesta alimentaria, el peso y la incorporación de lípidos en el intestino^{219,220}, aumentando la utilización y oxidación de glucosa en la corteza cingulada anterior²²¹, regulando el metabolismo de glucógeno y ácido araquidónico en astrocitos²²², e induciendo la glucogenólisis y estimulando la lipólisis y liberación de ácidos grasos en hepatocitos de rata^{223,224}.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Proponemos que en la interfase materno-fetal el VIP autócrino/parácrino participa en la regulación del metabolismo de las células citotrofoblásticas de primer trimestre favoreciendo el transporte de nutrientes y la activación de vías metabólicas que gatillan funciones clave para la implantación y placentación. A su vez proponemos que el 'diálogo' de células citotrofoblásticas con monocitos y macrófagos maternos induce vías metabólicas asociadas a la adquisición de perfiles antiinflamatorios, los cuales son necesarios para las funciones de la placenta y el desarrollo fetal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta Tesis es investigar el rol del Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) en el metabolismo de las células citotrofoblásticas y la regulación del transporte de nutrientes en la placenta. Mediante modelos *in vitro* con líneas celulares citotrofoblásticas humanas, diseños *ex vivo* con sitios de implantación murinos y diseños *in vivo* en modelos murinos de gestación deficientes en VIP se espera aportar al conocimiento de los mecanismos por los cuales VIP modularía el metabolismo, el transporte de nutrientes y su implicancia en la gestación.

Teniendo en cuenta la interacción inmune-trofoblástica en la interfase y la relevancia de los mecanismos de regulación metabólica en el mantenimiento de la homeostasis en el útero gestante, proponemos investigar la reprogramación metabólica en monocitos y macrófagos en la interacción con células citotrofoblásticas, y lo mismo en células citotrofoblásticas, con especial foco en el efecto de factores y metabolitos liberados por éstas.

Objetivo específico 1:

Determinar el rol de VIP como factor modulador del transporte y metabolismo de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos en células citotrofoblásticas de primer trimestre (Swan 71 y BeWo), evaluando:

- La incorporación y metabolismo de los diversos nutrientes en células cTb estimuladas con distintas concentraciones de VIP (1-100 nM)
- La expresión de transportadores específicos de glucosa (GLUTs), aminoácidos neutros acoplados a Na⁺ (SNATs) y ácidos grasos libres (FATPs) en células cTb estimuladas con VIP
- Las vías metabólicas activas en cTb y cómo se modulan en respuesta a VIP
- El rol de VIP endógeno en células deficientes en la expresión del péptido por silenciamiento con siRNA y evaluando los parámetros anteriores

- Las vías de señalización involucradas en el efecto modulador de VIP así como el rol de factores como mTOR y PPAR- γ con función reportada en la regulación del metabolismo celular trofoblástico.
- El efecto de VIP sobre el transporte transcelular de glucosa a través de una monocapa de Tb.

Objetivo específico 2:

Analizar la participación de VIP en la regulación del metabolismo de la placenta y transporte de nutrientes hacia el feto utilizando un modelo murino *in vivo* de gestación deficiente en VIP a día de gestación 17.5 y evaluando:

- El transporte de nutrientes en explantos *wild type* incubados *ex vivo* con antagonista de receptores VPAC (50-100 nM)
- EL transporte *in vivo* de glucosa a través de la placenta y el impacto en el peso fetal
- La expresión de transportadores y factores involucrados en la regulación del metabolismo de la placenta y transporte de nutrientes
- Los efectos de la restauración de los niveles de VIP en la interfase materno-fetal mediante inyección al dg6.5 sobre la expresión de factores involucrados en metabolismo de placenta y transporte de nutrientes

Objetivo específico 3:

Evaluar la reprogramación metabólica de monocitos y macrófagos en su interacción con células trofoblásticas utilizando monocitos derivados de sangre periférica de voluntarios sanos y células citotrofoblásticas humanas de primer trimestre (Swan 71 y HTR-8), explorando:

- Las vías metabólicas que se activan en monocitos/macrófagos frente a factores solubles, incluidos eventuales metabolitos liberados por células citotrofoblásticas
- La reprogramación metabólica frente a estímulos inflamatorios como LPS *E. coli* en presencia de medio condicionado de células trofoblásticas
- El perfil fenotípico asociado a esos cambios metabólicos inducidos por la interacción con células citotrofoblásticas
- Las vías metabólicas que se activan en células citotrofoblásticas frente a diversos factores producidos por monocitos/macrófagos polarizados en distintos perfiles, en especial metabolitos liberados por éstos, y cómo impacta ese metabolismo en la interacción con dichas células.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

Se utilizaron tres líneas celulares trofoblásticas humanas:

- Swan 71, derivada de citotrofoblasto humano de 7 semanas e inmortalizada por transformación mediada por telomerasa (cedida por el Dr. Gil Mor, Mott Center for Human Growth and Development, EEUU)²²⁵. Esta línea celular presenta un fenotipo similar al trofoblasto extraveloso, dado que expresa y secreta citoquinas y factores de crecimiento, incluyendo IL-1 β , IL-6, IL-8 y VEGF, es resistente a la apoptosis mediada por el ligando Fas pero no a la mediada por el TNF- α , invade el matrigel y exhibe un bajo nivel de fusión espontánea²²⁶.

- HTR-8/SVneo (HTR-8), derivadas de células de vellosidades coriónicas humanas de primer trimestre transfectadas con un plásmido que contiene el gen del antígeno T grande del virus del simio 40 (SV40 Tag) (cedida por el Dr. Gil Mor, Mott Center for Human Growth and Development, EEUU)²²⁷.

- BeWo, derivan de coriocarcinoma humano por selección clonal (cedida por el Dr. Gil Mor, Mott Center for Human Growth and Development, EEUU)²²⁸.

3.1.1. Mantenimiento, repique y criopreservación

Las células se mantuvieron en medio humidificado a 37°C, con 5% CO₂ en Dulbecco's modified Eagle's medium and Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) (Life Technologies, California, EEUU) conteniendo HEPES 25mM y glutamina 2.5mM, y suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Internegocios, Mercedes, Buenos Aires) inactivado por calor y solución de penicilina 100 μ g/ml - estreptomycin 100 U/ml (PS) (Life Technologies, California, EEUU). Las tres líneas se cultivaron en DMEM-F12 10% SFB en botellas T25 y fueron chequeadas regularmente mediante PCR para confirmar que se encontraran libres de micoplasma (*primers*: F: 5' GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT 3', R: 5' TGCACCATCTGCTACTCTGTAAACCTC 3'). Para realizar los repiques, las líneas se trataron con 1 ml de TrypLE ó Tripsina 0.25% EDTA (Life Technologies, California, EEUU) por 5 min a 37°C y una vez cosechadas se recuperó un 10% de las mismas para ser cultivadas en medio fresco. Para la criopreservación de las células, el pellet obtenido por tratamiento con TrypLE/Tripsina se resuspendió en 1 ml de medio de congelación (10% DMSO en SFB), se traspasó a un criotubo y se enfrió gradualmente desde -20°C hasta N₂ líquido. Para el descongelamiento se retiraron los criotubos de N₂ líquido, se centrifugaron y las células se resuspendieron en 4 ml de DMEM-F12 10% SFB.

3.1.2. Sembrado y tratamientos

Células Swan 71, BeWo ó HTR-8 fueron cultivadas en DMEM-F12 10% SFB hasta adherencia ó por hasta 24hs dependiendo del ensayo. Luego el medio fue reemplazado por DMEM-F12 ó RPMI-1640 (Life Technologies, California, EEUU) según el ensayo, suplementados con PS y 2% SFB, y se añadieron los distintos estímulos.

VIP exógeno (Bachem, Bubendorf, Suiza) se añadió en concentración 1-100nM por 20min-24hs y LIF (MilliporeSigma, Massachusetts, EEUU) 50ng/ml por 20min. En los ensayos donde se inhibieron vías de señalización, se añadió 10 μ M H89 (inhibidor de PKA), 5 nM estaurosporina (STP, inhibidor de PKC), 50 μ M PD98059 (inhibidor de MEK), 10 μ M Ly294502 (inhibidor de PI3K) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU), o 100 nM de rapamicina (inhibidor de mTOR) (Cayman Chemical, Michigan, EEUU). Para la inhibición de p90 RSK, se utilizó el inhibidor BI-D1870 10 μ M (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EEUU). La glucólisis fue inhibida con 2-deoxiglucosa 10 mM (2-DG), y la fosforilación oxidativa con Rotenona 100nM (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU). El medio condicionado de MØ M1 (MC-M1) y el ácido itacónico 7.5 mM a pH 7.4 (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) fueron añadidos por 4-18hs.

3.1.3. Medios condicionados

Células Swan 71 ó HTR-8 (4×10^4 /pocillo) fueron cultivadas en 500 μ l de DMEM-F12 10% SFB por 24hs. A continuación, el medio fue reemplazado por DMEM-F12 ó RPMI-1640 (Life Technologies, California, EEUU) 2% SFB por 18 h. Los sobrenadantes fueron recolectados, centrifugados para eliminar restos celulares, y conservados a -20°C hasta su utilización.

3.2. Animales y modelos murinos

3.2.1 Cepas

Se emplearon ratones *wild type* (WT) C57BL/6, VIP +/- con *background* C57BL/6 (VIP HT) y VIP-/- con *background* C57BL/6 (VIP KO), cedidos por el Dr. James Waschek de la Universidad de California en Los Angeles (UCLA). Para la obtención de ratones VIP-/- por recombinación homóloga se generó un constructo recombinante conteniendo la porción 6.2-kb Pst I/Sph I 5'-del gen de VIP, un cassette de resistencia a neomicina (pPGK neo bpA) orientado inversamente, el fragmento 2.6-kb Sph I/EcoRI 3' del gen de VIP, y un cassette pIC19R/MC-1-TK de la timidina quinasa del herpesvirus. Este constructo fue introducido en células madre embrionarias. Clones homólogos recombinantes fueron identificados e inyectados en blastocistos C57BL/6, y que fueron finalmente implantados en hembras pseudo preñadas. Los ratones obtenidos fueron apareados con hembras C57BL/6 y fueron retrocruzados durante al menos doce generaciones¹⁸¹.

3.2.2. Mantenimiento y ensayos

Los ratones fueron criados y mantenidos en un ciclo de 12:12 h luz:oscuridad en las instalaciones de Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEyN, UBA). Se proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Hembras WT o VIP HT se aparearon con machos WT, VIP KO o VIP HT. Las cruzas WTxWT, WTxKO o HTxHT se refieren a la craza hembra x macho a lo largo de esta Tesis. Se utilizaron hembras de 3 a 6 meses de edad, debido a las dificultades de las hembras VIP HT para quedar preñadas, a pesar de la presencia de tapón vaginal. Las edades de las hembras se emparejaron para eliminar las diferencias entre los grupos. Las hembras se revisaron cada 24 h y fueron separadas una vez que se detectó el tapón vaginal. El día del tapón vaginal se consideró como dg 0.5. Las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical en dg14.5 o dg17.5. En los ensayos donde se realizó la inyección de VIP, las hembras fueron tratadas al dg6.5 con inyección de PBS o VIP intraperitoneal (2nmol/mouse) (Bachem, Bubendorf, Suiza). Se utilizaron hembras preñadas sanas y se excluyeron los animales que presentaban signos de enfermedades infecciosas o de otro tipo que alteraran su comportamiento social o apariencia física, así como inapetencia, postura encorvada, lesiones en la piel, mucosas y estructuras anexiales observadas por un técnico experto en el Bioterio. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con los protocolos estándar y fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Buenos Aires.

3.2.3. Pesos fetales y aislamiento de placentas

Después de sacrificar a las hembras preñadas en el dg14.5 o 17.5, se evaluó macroscópicamente el estado de los sitios. Se extrajeron los úteros completos, luego se diseccionaron los fetos del tejido uterino y se separaron las placentas. Los fetos y las placentas se pesaron individualmente y luego se procesaron como se describe luego para cada ensayo.

3.2.4. Genotipificación

Después de obtener los fetos y las placentas de cruzas HTxHT, se extirpó una porción mínima de la cola de cada feto, se colocó en un *buffer* de extracción de ADN alcalino (25 mM NaOH, 0,2 mM Na₂-EDTA 2H₂O) y se calentó durante 75 min a 95°C para el genotipado individual. La reacción se detuvo añadiendo 75 µl de *buffer* de neutralización (Tris-HCl 40 mM). Las muestras de ADN se analizaron mediante PCR de triple *primer* como se describió anteriormente (omVIPFS-: TTA CCT GAT TCG TTT GCC AAT GAG TGA C; omVIPF4+: TTT CAA GGT GTG GGG CTA GAG ACA TAC A; ONEO 10-: GGC CCG GAG ATG AGG AAG AGG AGA ACA G)¹⁸¹.

3.3. Monocitos de sangre periférica humana

Se obtuvieron muestras de sangre (*buffy coats*, concentrados de leucocitos y plaquetas generados por centrifugación de las bolsas de sangre entera) de voluntarias sanas en edad fértil de la Fundación Hemocentro Buenos Aires. En todos los casos, las muestras fueron obtenidas siguiendo las guías y regulaciones internacionales con consentimiento informado. Todo el estudio contó con la aprobación del Comité de Ética de SAIC y del Hemocentro Buenos Aires.

3.3.1 Obtención de PBMCs a partir de buffy coats de sangre periférica

Se aislaron las células mononucleares totales (PBMCs, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) utilizando un gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Illinois, EEUU). Para esto, la sangre fue diluida al medio con solución fisiológica estéril y se centrifugó a 210g durante 15 min para descartar el plasma rico en plaquetas. Se recompuso el volumen inicial de la muestra con solución fisiológica estéril y se sembró sobre un colchón de Ficoll-Paque PLUS 1,077 g/cm³ formando un sistema bifásico. Se centrifugó a 483g por 30 minutos a 25°C y se recuperó el halo correspondiente a los PBMCs en la interfase. Las células se lavaron dos veces con solución fisiológica estéril (483g durante 10 min a 25°C) y se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado con 10% SFB para realizar el recuento celular con solución de Turk. En todos los casos, el grado de contaminación con células polimorfonucleares fue menor al 5%.

3.3.2. Aislamiento de monocitos a partir de PBMCs

Los PBMCs se lavaron y resuspendieron a razón de 50×10^6 células/ml en 2 ml de solución de Tyrode libre de calcio y magnesio suplementada con EDTA 0,2% y se incubaron a 37°C por 45 minutos. Durante la incubación, la osmolaridad del medio fue gradualmente incrementada desde 290 a 360 osmol/litro por adición de cloruro de sodio. Se sembraron en frío y cuidadosamente con pipeta Pasteur dos fracciones de Percoll (GE Healthcare, Illinois, EEUU) preformadas: 50% al fondo, seguida de 40%. Luego, la solución de PBMCs fue sembrada en la parte superior y se centrifugó a 620g por 50 min a 4°C. Se recuperó la fracción de monocitos cuidadosamente con pipeta Pasteur y se lavaron con solución fisiológica estéril dos veces a 210g durante 10 min para eliminar los restos de Percoll. La pureza fue analizada por citometría de flujo y se utilizaron las muestras luego de confirmar un grado de contaminación de linfocitos del 20% como máximo. Las células viables fueron cuantificadas con tinción con solución de Turk, y utilizadas en los distintos ensayos.

3.3.3. Sembrado, tratamientos y diferenciación de monocitos a macrófagos para ensayos de metabolismo y evaluación de perfiles funcionales

Los Mo obtenidos luego de la purificación por colchón de Ficoll y gradiente de Percoll (Fig. 10) fueron estimulados con LPS 100ng/ml (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) por 20min en RPMI-1640 2% SFB suplementado con PS, MC-Tb, ó MC-Tb+LPS 100ng/ml ó adheridos en placa de 48 pocillos (4×10^5 /pocillo) en RPMI-1640 sin suero por 40-60min y luego estimulados por 18hs con los mismos estímulos para realizar los ensayos de metabolismo que se describen más adelante.

Para obtener MØ M0, los Mo luego de la adherencia fueron estimulados con M-CSF 50 ng/ml (Miltenyi Biotec, Alemania) durante 5 días en RPMI-1640 suplementado con PS y 10% SFB (Fig. 10). Las células fueron despegadas con EDTA 2mM suplementado con 2% SFB en frío y estimuladas por 20 min/18hs y luego despegadas, para realizar los ensayos de metabolismo ó la evaluación de los perfiles funcionales por citometría. Los sobrenadantes fueron recolectados, centrifugados para eliminar restos celulares, y conservados a -20°C hasta su utilización para la determinación de IL-1 β y IL-10 por ELISA. Una alícuota de los sobrenadantes de macrófagos fue utilizada para la medición de la producción de lactato luego de la incubación con los diferentes estímulos por 18hs.

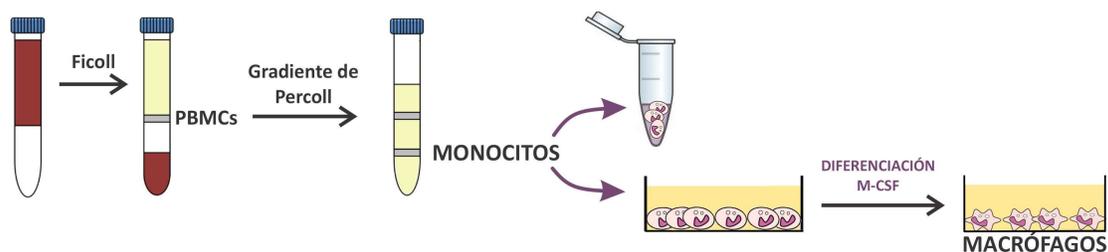


Figura 10 | Esquema de purificación y diferenciación de monocitos humanos de sangre periférica.

3.3.4. Diferenciación y obtención de medios condicionados de macrófagos M1

Para obtener MØ de perfil M1, Los Mo (4×10^5 /pocillo) fueron adheridos en placas de 48 pocillos e incubados 5 días en RPMI-1640 10% SFB + GM-CSF 50 ng/ml (Miltenyi Biotec, Alemania), y luego se cambió el medio por medio nuevo RPMI-1640 10% SFB con 50 ng/ml de GM-CSF + LPS 100 ng/ml (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) por 2 días más. Para obtener el medio condicionado de MØ M1 (MC-M1), luego de los 7 días de diferenciación, los MØ M1 fueron lavados exhaustivamente con PBS estéril, y se reemplazó el medio por RPMI-1640 2% SFB por 18hs. Los sobrenadantes fueron recolectados, centrifugados para eliminar restos celulares, y conservados a -20°C hasta su utilización.

3.4. Silenciamiento de VIP

Para evaluar la relevancia de VIP endógeno en las células trofoblásticas, se realizó un silenciamiento de la expresión del péptido por transfección con un siRNA de VIP o un siRNA sin gen target como control (scrbl) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EEUU). Células Swan 71 o BeWo (4×10^4 /pocillo) fueron cultivadas en placas de poliestireno de 24 pocillos en 500 μ l de DMEM-F12 10% SFB. Al alcanzar 80% de confluencia, se retiró el medio y se incubaron en Opti-MEM[®], medio comercial con bajo suero empleado para transfecciones, (Life Technologies, California, EEUU) por 3 hs. Los complejos 50–100 nM siRNA VIP:Lipofectamine RNAimax (Life Technologies, California, EEUU) se realizaron en Opti-MEM[®] y se incubaron durante los 15 min previos a ser añadidos sobre el cultivo celular en forma de goteo. Luego de 24 hs se adicionaron 500 μ l de DMEM-F12 10% SFB durante 24 hs y a continuación el mismo fue cambiado por medio 2 % SFB por otras 24 hs. Para corroborar la disminución de la expresión de VIP endógeno luego de las transfecciones, se obtuvieron proteínas totales de las células silenciadas y su control scrbl y se realizaron ensayos de *western blotting* (Fig. 11) -metodología detallada más adelante- o se confirmó la disminución por citometría de flujo como en *Paparini et al (2019)*²¹⁰.

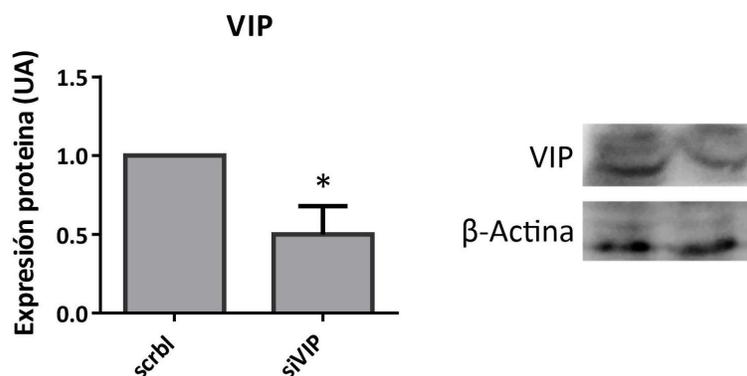


Figura 11 | Disminución de la expresión de VIP endógeno luego de la transfección con siRNA en línea celular Swan 71. Células Swan 71 fueron cultivadas y tratadas como se describe en el cuerpo del texto. En el panel izquierdo se observa la expresión proteica de VIP (n=3). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba t de Student, *p<0.05. En el panel derecho se observan las líneas correspondientes a VIP y β -Actina. Las transferencias se realizaron en las mismas condiciones experimentales.

3.5. Ensayos metabólicos in vitro

3.5.1. Incorporación de glucosa

Para estudiar el transporte de glucosa por células trofoblásticas humanas, se realizaron ensayos de incorporación de 2-Deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose (2-

NBDG, Molecular Probes, Oregón, EEUU), análogo fluorescente de la glucosa que emite a 542 nm cuando es excitado a 467 nm.

Células Swan 71 o BeWo (3×10^4 /pocillo) fueron cultivadas en placas de 24 pocillos en 500 μ l de DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. Para los ensayos de caracterización de la incorporación, las células se lavaron con PBS frío y se incubaron 5 min en medio DMEM-F12 sin glucosa. Se utilizó el análogo 2-NBDG 100 μ M, añadido durante 2–90min ó 10min con glucosa fría 0.5-5mM a 37°C, 5% de CO₂ en oscuridad.

Para los ensayos de estimulaciones rápidas, las células se incubaron en medio DMEM-F12 sin glucosa con los estímulos durante 10 minutos antes de añadir la sonda fluorescente 2-NBDG durante otros 10 min. Para los ensayos con inhibidores de las vías de señalización, éstos se añadieron durante 20 min antes de los estímulos. Para los ensayos con estimulaciones largas, las células fueron incubadas en DMEM-F12 2% SFB ó RPMI-1640 2% SFB con los estímulos por 4-24hs dependiendo del ensayo y el estímulo. En estos casos o para las células silenciadas para VIP, éstas se incubaron en medio DMEM-F12 sin glucosa durante 5 min y se añadió 2-NBDG 100 μ M durante 10 min a 37°C, 5% CO₂. Las células se lavaron con PBS frío dos veces, se despegaron con TrypLE/Tripsina y se resuspendieron en SFB 2% en PBS a 4°C para análisis por citometría de flujo. Todos los ensayos se llevaron a cabo en paralelo con 1 mM del inhibidor del transporte de glucosa Floretin (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU). La incorporación específica de glucosa se calculó restando la incorporación en presencia de Floretin de la incorporación total.

Para la evaluación de la incorporación de glucosa en Mo/MØ purificados y estimulados por 20min, las células fueron inicialmente incubadas con anticuerpo anti-CD14 PE (Becton Dickinson, San José, CA, EEUU) durante 20 min a temperatura ambiente (Tamb). Luego fueron lavadas con PBS e incubadas por 3 min en RPMI-1640 sin glucosa y se añadió 2-NBDG por 10 min. Se lavaron con PBS frío dos veces y se analizaron por citometría de flujo. Para las células estimuladas por 18hs, luego de la adherencia y estimulación por 18hs se levantaron con EDTA 2mM en PBS suplementado con 2% SFB, se incubaron con anticuerpo anti-CD14 durante 20 min a Tamb y se realizó el ensayo de incorporación al igual que para estímulos de 20min. Los ensayos fueron repetidos en ausencia de incubación con anti-CD14 seleccionando la población por morfología.

Los datos se adquirieron en un citómetro® FACS Aria II ó Accuri 6C Plus (Becton Dickinson, San José, CA, EEUU) y se analizaron con el software FlowJo (<http://www.flowjo.com/>).

Para la microscopía de fluorescencia, las células Swan 71 o BeWo fueron cultivadas en presencia/ausencia de 50nM VIP (Bachem, Bubendorf, Suiza) en iguales condiciones, luego se

incubaron con 2-NBDG 100 μM durante 3 min en DMEM-F12 sin glucosa, y se tomaron fotografías inmediatamente (Olympus, Tokio, Japón).

3.5.2. Medición de lactato

Células Swan 71 (4×10^4 /pocillo) fueron cultivadas en placas de 24 pocillos en 500 μl de DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. Se reemplazó el medio por DMEM-F12 2% SFB con/sin los estímulos por 24 ó 48hs. Para la medición en MØ, luego de la diferenciación de MØ M0 M-CSF, estos fueron incubados por 18h con los estímulos. Para cuantificar la producción de L-lactato se utilizó el Accutrend Plus System según manual (Roche Diagnostics) como en *Kay et al 2007* y *Cascone et al 2018*^{229,230}. El equipo consta de un lector que mide sobre tiras reactivas específicas, el cambio colorimétrico a 657 nm de un reactivo cromoénico tras la oxidación catalizada de L-lactato por L-lactato deshidrogenasa. La enzima y reactivos se encuentran en las tiras donde se deposita una gota del medio que contiene al metabolito. Para la producción de L-lactato por los MØ incubados con MC-Tb, se cuantificó en paralelo el L-lactato del MC-Tb solo y éste fue restado al total cuantificado en el pocillo.

3.5.3. Transporte transcelular de glucosa

Células trofoblásticas humanas BeWo (5×10^4) fueron resuspendidas en 400 μl DMEM-F12 10% SFB, sembradas sobre *transwells* de poliestireno (PET) de 6,5 mm de diámetro y poro de 0,4 μm colocado en una placa de 24 pocillos e incubadas en medio humidificado a 37°C con 5% CO₂. La formación de la monocapa se puede monitorear debido a que dadas las propiedades ópticas de los *transwells* de PET estos permiten la visualización de las células. Al alcanzar 100% de confluencia, se retiró el medio de cultivo de los compartimentos superior (reservorio donador) e inferior (reservorio aceptor) y se realizó un lavado con SF en ambos reservorios. Se añadieron 400 μl de DMEM-F12 0,5 % BSA sin glucosa y sin SFB en ambos compartimentos y se incubó por 15 min en medio humidificado a 37°C con 5% CO₂ en presencia/ausencia de VIP 50 nM. Se retiró el medio, se colocó el *transwell* en un nuevo *well* conteniendo 400 μl de DMEM-F12 0,5 % BSA sin glucosa y se añadieron 400 μl de DMEM-F12 conteniendo 5mM de glucosa en el reservorio donador, en ausencia/presencia de estímulo VIP 50 nM (t_0). Se retiraron alícuotas de 20 μl del reservorio aceptor a los 15, 30, 60 y 90 min y se los conservó en una placa de 96 *wells* en hielo hasta finalizar los 90 min para realizar el ensayo de detección de glucosa. El ensayo fue repetido en presencia de Floretin 1 mM. La detección de la concentración de glucosa fue realizada mediante el ensayo estándar de hexoquinasa-glucosa-6 fosfato (Wiener Lab, Rosario, Argentina) adaptado a pequeños volúmenes de muestra. Se realizó una curva de calibración con un standard de concentración conocida (1g/dl) y como blanco se utilizaron 20 μl de DMEM-F12 sin glucosa. Se añadieron 200 μl de reactivo a cada pocillo, se incubó por 5 min a

37°C y se midió absorbancia a 505 nm en un lector de placas (BioRad, California, EEUU). Los valores de concentración de glucosa se obtuvieron por interpolación en la curva standard. El transporte transcelular mediado por transportadores se calculó como la diferencia entre el transporte de glucosa en ausencia y presencia de Floretin.

3.5.4. Incorporación de aminoácidos neutros acoplados a sodio por sistema A

Se llevó a cabo un ensayo de incorporación de ^{14}C -MeAIB ([^{14}C] acidometilaminoisobutírico) para evaluar la actividad del Sistema A. Células Swan 71 o BeWo (8×10^4 /pocillo) fueron cultivadas en placas de 12 pocillos en 500 μl de DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. Se agregaron los estímulos durante 20 min en DMEM-F12 2% SFB, luego las células se lavaron con *buffer* Tyrode con/sin Na^+ (suplementado con colina, para la incorporación no específica) (EMEVE, Buenos Aires, Argentina). Se añadió 0,3 μCi ^{14}C -MeAIB (PerkinElmer, Massachusetts, EEUU) en el *buffer* Tyrode correspondiente durante 8 min en cámara humidificada con 5 % de CO_2 a 37 °C, luego se realizó un lavado con *buffer* Tyrode frío sin Na^+ y se añadió 1 ml de agua destilada durante 1 hora a temperatura ambiente para lisar las células. Se mezcló el agua destilada conteniendo el ^{14}C -MeAIB con 3 ml de líquido de centelleo líquido (optiPhase HiSafe, Perkin Elmer, Massachusetts, EEUU) y se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman LS 6500, Fullerton, CA, EEUU). Usando estándares de ^{14}C -MeAIB, la incorporación se calculó como picomoles de ^{14}C -MeAIB por miligramo de proteína por minuto, relativizando cada tratamiento al contenido de proteína medido por Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EEUU). La actividad del sistema A se determinó restando la absorción en *buffer* Tyrode libre de Na^+ a la absorción en el *buffer* conteniendo Na^+ .

3.5.5. Incorporación de ácidos grasos de cadena larga

Células Swan 71 (3×10^4 /pocillo) fueron cultivadas en placas de 24 pocillos en 500 μl de DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. Se utilizó la sonda fluorescente BODIPY-FL C_{12} (Molecular Probes-Life Technologies, California, EEUU) previamente conjugada con BSA libre de ácidos grasos 0.1% en RPMI-1640 sin suero¹⁰⁷. Para la caracterización, la sonda fue incubada en distintas concentraciones (2.5-10 μM) y por distintos tiempos (5-20min). Para evaluar la incorporación frente a distintos estímulos, se añadieron los estímulos en DMEM-F12 ó RPMI-1640 2% SFB dependiendo del ensayo por distintos tiempos, luego se añadió la sonda fluorescente 5 μM por 10min, y las células fueron lavadas con BSA 0.2% en PBS y resuspendidas en SFB 2% en PBS a 4°C para análisis por citometría de flujo. Para la determinación de la incorporación en $\text{Mo}/\text{M}\emptyset$, estos fueron obtenidos y estimulados como se describió para los ensayos de incorporación de glucosa, se añadió BODIPY-FL C_{12} 5 μM previamente conjugada con BSA libre de ácidos grasos 0.1% en RPMI-1640 sin suero por 5min, se realizaron los lavados y se resuspendieron en SFB 2% en PBS a 4°C para análisis por

citometría de flujo. Los datos se adquirieron en un citómetro® FACS Aria II ó Accuri 6C Plus (Becton Dickinson, San José, CA, EEUU) y se analizaron con el software FlowJo (<http://www.flowjo.com/>).

3.5.6. Acumulación de gotas lipídicas neutras citoplasmáticas

Células Swan 71 (3×10^4 /pocillo) fueron cultivadas en placas de 24 pocillos en 500 μ l de DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia y Mo/MØ (4×10^5 /pocillo) fueron adheridos/diferenciados como se describió previamente. Se añadieron los estímulos en DMEM-F12 2% SFB ó RPMI-1640 2% SFB dependiendo del ensayo y el estímulo, y luego fueron incubados con la sonda fluorescente BODIPY 493/503 (Molecular Probes-Life Technologies, California, EEUU) en PBS por 15 min a 37° C y 5% CO₂. Las células se lavaron brevemente con PBS frío dos veces, fueron despegadas con TrypLE/Tripsina y resuspendidas en SFB al 2% en PBS para análisis por citometría de flujo. Los datos se adquirieron en un citómetro® FACS Aria II ó Accuri 6C Plus (Becton Dickinson, San José, CA, EEUU) y se analizaron con el software FlowJo (<http://www.flowjo.com/>).

3.5.7. Determinación de función mitocondrial

Células Swan 71 (3×10^4 /pocillo) fueron cultivadas en placas de 24 pocillos en 500 μ l de DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. Se añadieron los estímulos por distintos tiempos, luego las células fueron lavadas e incubadas por 30min a 37°C y 5% CO₂ con 250nM *MitoSpy Green* (BioLegend Inc, California, EEUU) y 250 nM *Mitotracker CMXRos* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) en DMEM-F12 sin suero para cuantificar la masa mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial respectivamente. Las sondas fueron convenientemente diluidas y pre-incubadas a 37°C antes de ser añadidas a los cultivos. Se lavaron las células con PBS, se despegaron con TrypLE/Tripsina y se resuspendieron en SFB 2% en PBS para análisis por citometría de flujo. Se calculó el *ratio Mitotracker CMXRos/MitoSpy Green* para comparar la funcionalidad mitocondrial entre tratamientos como en *Kafer et al 2023*²³¹.

3.5.8. Incorporación de glucosa y aminoácidos del sistema A en explantos murinos ex vivo

Los experimentos *ex vivo* se llevaron a cabo en ratones *wild type*. Después de la extracción de la placenta, cada placenta VIP+/+ se lavó exhaustivamente, se dividió en cuatro explantos similares y se pesó. Cada explanto se colocó en un pocillo de una placa de 24 pocillos con medio DMEM-F12 2% SFB a 37°C. Para la incorporación de glucosa, los explantos de dg14.5 se trataron o no con 50/100 nM de antagonista del receptor VPAC1/VPAC2 (H-9935, híbrido de neurotensina 6-11-VIP7-28, Bachem, Bubendorf, Suiza) durante 1 h en cámara humidificada con 5% CO₂ a 37°C. Se añadió 2-NBDG 200 μ M durante 10 min en DMEM sin glucosa, luego se lavaron, se incubaron en *buffer* RIPA frío y se homogeneizaron. La fluorescencia en sobrenadantes de tejido se midió en un lector de microplacas

FLUOstar Optima (BMG Labtech, Alemania). Paralelamente, los explantos de placenta se incubaron con 2-NBDG en presencia de 1mM de Floretin. La incorporación específica de 2-NBDG se determinó restando la fluorescencia medida en explantos incubados en presencia de Floretin. El contenido de 2-NBDG se estimó mediante interpolación de curva estándar y se relativizó a mg de proteína. Para la evaluación de la incorporación de aminoácidos con ^{14}C -MeAIB, se analizaron explantos de placentas en gd17.5 por su crecimiento fetal exponencial. Los explantos se incubaron en DMEM-F12 2% SFB a 37 °C, luego se trataron o no con antagonista de VIP 100 nM durante 1 h en cámara humidificada con 5% CO_2 a 37°C. Los explantos se lavaron con *buffer* Tyrode con/sin Na^+ (suplementado con colina, para el control de la incorporación no específica). Se añadió 0,3 μCi de ^{14}C -MeAIB en el *buffer* correspondiente durante 30 min en cámara humidificada con 5% CO_2 a 37 °C. Los explantos se lavaron con *buffer* Tyrode frío sin Na^+ y se añadió 1 mL de agua destilada a temperatura ambiente durante la noche. Se mezcló el agua destilada que contenía ^{14}C -MeAIB con líquido de centelleo (optiPhase HiSafe, Perkin Elmer, Massachusetts, EE. UU.) y se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman LS 6500, Fullerton, CA, EEUU). Utilizando estándares de ^{14}C -MeAIB, la incorporación se calculó como pmoles de ^{14}C -MeAIB por mg de placenta. La actividad del sistema A se determinó restando la absorción en el *buffer* Tyrode libre de Na^+ de la absorción en el *buffer* conteniendo Na^+ .

3.6. Transporte in vivo de glucosa en modelos murinos

Ratones hembras preñadas fueron inyectadas por vía intraperitoneal en el día dg17.5 con un bolo de 100 μl de 2-desoxi-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]-D-glucosa (2-NBDG) 3 mM (Molecular Probes, Oregón, EE. UU.) en solución salina y se les retiró la comida. Después de 90 min, los ratones preñados se anestesiaron con ketamina:xilazina (1:0,25) y se sacrificaron. Se empleó este tiempo de inyección en base a trabajos anteriores y a ensayos previos que mostraron que a que a tiempos más cortos la fluorescencia es detectada en el plasma pero indetectable dentro del tejido placentario/fetal.

Se obtuvieron placentas/fetos como se describió previamente, se colocaron en 0,5 o 1 ml de *buffer* RIPA frío respectivamente y se homogeneizaron con Ultra Turrax (IKA, Alemania). Los homogeneizados se centrifugaron a 12500g a 4°C durante 15 min y se usaron 200 μl de cada sobrenadante para la cuantificación de la fluorescencia en el lector de microplacas FLUOstar Optima (BMG Labtech, Alemania). La cantidad de 2-NBDG en muestras de tejido se estimó por interpolación en una curva estándar de sonda. Dado que los fetos VIP+/- de cruza WTxKO tienen un peso reducido en gd14.5/17.5 pero el peso de la placenta no varía, los valores de 2-NBDG medidos en nmol en el feto se normalizaron al peso de la placenta para los cálculos de incorporación placentaria total y

transporte transplacentario. La incorporación placentaria total se definió como la suma de la fluorescencia de 2-NBDG medida en la placenta y el feto normalizado al peso de la placenta (nmol de 2-NBDG en placenta + nmol de 2-NBDG en feto)/g de placenta), mientras que la fluorescencia determinada en la placenta sola representa la cantidad de 2-NBDG que fue incorporada por la placenta pero no fue transportada hacia el feto (nmol 2-NBDG placenta/g placenta). El transporte transplacentario se calculó como la fluorescencia determinada en el feto normalizado al peso de la placenta (nmol 2-NBDG feto/g placenta). La incorporación de glucosa fetal neta se calculó como nmol de 2-NBDG feto/g de feto (Fig. 12).

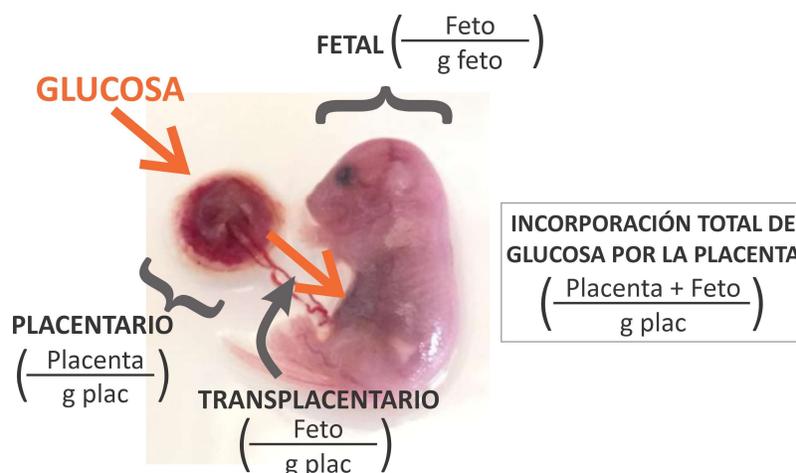


Figura 12 | Esquema de los cálculos realizados para el análisis del transporte in vivo de glucosa.

3.7. Análisis de ácidos carboxílicos mediante un abordaje semidirigido de metabolómica

En el marco de una colaboración con el laboratorio de Espectrometría de Masas Bioanalítica del CIBION, se desarrolló un método analítico por UPLC-ESI-QTOF-MS que permite la determinación simultánea de ácido cítrico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido succínico y ácido itacónico en el sistema *in vitro* de células trofoblásticas y en la interacción con monocitos/macrófagos. Para separar y detectar los metabolitos, se desarrolló un método de cromatografía en fase reversa utilizando una columna C18 HSS T3 y un gradiente de 16 minutos. Las fases móviles consistieron en (A) una solución acuosa 0,1 % (v/v) de ácido fórmico en 95% acetonitrilo / 5 % agua y (B) una solución acuosa 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. La temperatura de la columna fue de 30°C y las muestras se mantuvieron a 5°C durante el análisis. Los parámetros del espectrómetro de masas fueron optimizados para maximizar la relación señal/ruido y los datos se adquirieron en modo de ionización negativo. Empleando soluciones de estándares de los ácidos de interés, se evaluó la respuesta de cada analito en función de la concentración, se determinó el rango lineal, el límite de detección y el límite de

cuantificación, para optimizar las condiciones de preparación de muestra. Se desarrolló un método de preparación de muestras a partir de la experiencia del grupo de investigación de Espectrometría de Masas Bioanalítica del CIBION^{232,233}. La metodología de la preparación de las muestras de cTb involucra la siembra de 3×10^5 células Swan 71 en placas p60, el quenching del metabolismo celular y la lisis con N₂ líquido, la cosecha del endometaboloma con metanol (Fisher Scientific, Nuevo Hampshire, EEUU), la separación de proteínas por centrifugación, la posterior liofilización del sobrenadante y reconstitución de los residuos secos en una solución de composición igual a la inicial de la fase móvil utilizada en el análisis cromatográfico. Para la construcción de las curvas de calibración se realizaron diluciones seriadas a partir de una solución madre para cada uno de los 5 ácidos orgánicos y de las sustancias propuestas como candidatos a estándares internos. Se evaluó el efecto del proceso de liofilización a partir de la comparación de las sensibilidades de calibración. Se realizaron curvas de calibración con liofilización en matriz para evaluar su efecto y se analizaron diferentes tipos de muestras de control de calidad para evaluar la variabilidad experimental e instrumental.

3.8. Seahorse: Ensayo de estrés glucolítico.

1.5×10^5 Mo obtenidos como se describió previamente fueron sembrados en placas específicas *XFp cell culture microplates* (Agilent, California, EEUU) previamente tratadas con PEI (MilliporeSigma, Massachusetts, EEUU). Se incubaron por 5 días en RPMI-1640 10% SFB suplementado con M-CSF 50ng/ml, luego se lavaron y se incubaron con los estímulos en RPMI-1640 2% SFB por 18hs. A continuación se realizó el ensayo de estrés glucolítico mediante la contratación del STAN "Seahorse" dirigido por la Dra. Morelli en Instituto Leloir. El ensayo de estrés glucolítico mide la tasa de acidificación extracelular (ECAR) como indicador de la actividad glucolítica. Brevemente, para la medición de ECAR, el medio se descartó y los MØ fueron incubados en DMEM XF base (MilliporeSigma, Massachusetts, EEUU) suplementado con 2mM de glutamina, 5.5 mM de glucosa y 1 mM de piruvato, pH 7.4. Las placas se mantuvieron a 37°C durante 45 minutos y se colocaron en el analizador de flujo extracelular *Seahorse XFp*. (Agilent, California, EEUU). La ECAR se determinó al comienzo del ensayo y después de la adición secuencial de D-glucosa 10 mM, oligomicina 1 μ M y 2-DG 100 mM.

3.9. Viabilidad celular por calceína

Células Swan 71 (3×10^4 /pocillo) fueron sembradas en placas de 24 pocillos en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. Luego el medio se reemplazó por DMEM-F12 2% SFB, RPMI-1640 10% SFB ó RPMI-1640 2% SFB por 24hs. Para evaluar la viabilidad, se incubaron por 20min a T_{amb} en una solución de calceína $0.01\mu\text{M}$ (BioLegend Inc, California, EEUU) en PBS, se despegaron y se resuspendieron en el medio correspondiente a 37°C por 10min, y luego se adquirieron los datos por citometría de flujo.

3.10. Ensayo de migración

Para evaluar la capacidad de migración de células trofoblásticas, se realizaron ensayos de cierre de herida en monocapa. Células Swan 71 (4×10^4 /pocillo) fueron sembradas en placas de 24 pocillos en DMEM-F12 10% SFB hasta 100% confluencia, y se realizó una herida con un *tip* estéril sobre la monocapa, la cual fue fotografiada para determinar el tamaño de la herida a tiempo 0. Se reemplazó el medio por DMEM-F12 ó RPMI-1640 2% SFB sin/con los estímulos por 16hs, y se tomaron fotografías nuevamente. Para fotografiar la misma área en cada tiempo, se trazaron líneas rectas horizontales debajo de las placas atravesando cada pocillo y las heridas se realizaron perpendicularmente a éstas, de modo de poder ubicar un único campo fotográfico en todos los tiempos. Las fotografías fueron adquiridas con objetivo 10X y analizadas con el software ImageJ® (NIH, Maryland, EEUU). Se calculó el porcentaje de cierre de herida respecto al tiempo 0 como previamente²¹⁴.

3.11. Análisis de expresión de ARNm

Células Swan 71 o BeWo (4×10^4 /pocillo) fueron sembradas en placas de 24 pocillos en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. Se añadieron los estímulos por distintos tiempos en DMEM-F12 2% SFB. Se descartó el medio y las células fueron cosechadas y conservadas en TRI REAGENT (Molecular Research Center Inc, EEUU) a -20°C hasta realizar la extracción de ARN. En el caso de las células transfectadas con siRNA de VIP, se cosecharon las células finalizadas las 72 h de cultivo²¹⁴. Los Mo (4×10^5 /pocillo) fueron adheridos como se describió previamente e incubados con los estímulos en RPMI-1640 2% SFB por 18hs y luego cosechados y conservados en TRI REAGENT. Para el análisis de expresión de ARNm de placentas y fetos, los tejidos se obtuvieron como se indicó

previamente, se retiró la decidua de las placentas, se colocaron en TRI REAGENT y procesaron con Ultra Turrax (IKA, Alemania).

3.11.1. Extracción de ARN

El ARN fue aislado mediante TRI REAGENT siguiendo las recomendaciones del comerciante. Brevemente, se añadió 1/5 de volumen de cloroformo y se centrifugó a 12000g por 15min a 4°C. Luego se recuperó la fase acuosa, en la cual se encuentra el ARN soluble. Se añadió isopropanol en relación 1:1, se incubó 8 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000g por 10min a 4°C, quedando el ARN en el pellet. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 500 µl de etanol 75% por centrifugación a 7500g por 5min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y luego de evaporado el etanol, el ARN fue resuspendido en H₂O_d. El ARN fue incubado 10 min a 60°C para desestabilizar su estructura secundaria y luego fue cuantificado a 260 nm en NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EEUU). Cuando no se realizó la retrotranscripción inmediatamente después, el ARN fue conservado a -80°C hasta su utilización.

3.11.2. Obtención de ADNc y ensayos de RT-qPCR

Para la retrotranscripción de ARN a ADNc, 1 µg de ARN total fue tratado con DNasa I (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) para evitar una posible contaminación con ADN durante la extracción. Para esto se incubaron las muestras con 1 µl de DNasa y 1 µl de *buffer* 10X por 15 min a temperatura ambiente, se añadió 1 µl de EDTA para detener la reacción enzimática y se incubaron 10 min a 65°C. La retrotranscripción fue realizada con kit de transcriptasa reversa MMLV, inhibidor de RNasa y oligodT (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) en una termocicladora MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc, Massachusetts, EEUU) utilizando un programa de 60 min a 42°C. El ADNc se conservó a -20°C. Para la amplificación de los genes de interés mediante RT-PCR en tiempo real, 100 ng de ADNc fueron incubados con FastStart SYBR Green Master (Roche-Sigma, San Luis, Misuri, EEUU) y 0.25 µM de los *primers* correspondientes sentido y antisentido (Tabla 1; MacroGen, Seúl, Corea del Sur; Fagos Ruralex, Buenos Aires, Argentina; Biodynamics, Argentina) en una termocicladora Bio-Rad iQ2 para RT-qPCR (Bio-Rad, California, EEUU). Se utilizaron programas de 2 o 3 pasos dependiendo del gen: 10min a 95°C, (10seg 95°C, 40seg X°C)x40; o 10min a 95°C, (20seg 95°C, 20seg X°C, 20seg 72°C)x40. Las temperaturas de *annealing* (T_a) se indican en la Tabla 1. Los datos fueron analizados con el método $2^{-\Delta CT}$ ó $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizando a la expresión de los genes constitutivos *gapdh*, *ywhaz*, *β2 microglobulina* o *s29*, dependiendo el caso.

Tabla 1 | Primers empleados en RT-qPCR.

Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')	T _a (°C)
<i>β2 microglobulin human</i>	AAGCAGCATCATGGAGGTTTG	GAGCTACCTGTGGAGCAACC	58
<i>fatp1 human</i>	CCGGAATTGACTGTGACCACTT	CACGCAGTGCAGGGTTCA	60
<i>fatp2 human</i>	CACAGGTCTTCCAAAAGCAGC	AGTCCGCAAGGCAAGAGTAG	60
<i>fatp4 human</i>	GAACCGCAATGAGTTCGTGG	TGGACCTCACAGATGGCTGA	60
<i>gapdh human/mouse</i>	ATCACCATCTCCAGGAGCGA	GGTTCACACCCATGACGAAC	60
<i>glut1 human</i>	ATGGCGGGTTGTGCCATA	ATAGGACATCCAGGGTAGCTGCTCC	58
<i>glut3 human</i>	CGAGACCCAGAGATGCTGTAATG	TGGAAAGAGCCGATTGTAGC	59
<i>il-1β human</i>	GTCATTCGCTCCACATTCT	ACTTCTTGCCCCCTTTGAAT	60
<i>irg1 human</i>	TGCTGCTTTTGTGAACGGTG	ACTTTGGACTCCTTGGCAGG	60
<i>mct1 human</i>	GCCACCACTTTTAGGTCCGG	TGATGCCCATGCCAATGAAG	60
<i>mct4 human</i>	CCTCGTGGTCTTCTGCATCT	TACATGTAGACGTGGGTCCG	60
<i>mtor human</i>	TTTAGCGGTGATGCAATGG	GTCATAGCAACCTCAAAGCA	60
<i>ppar-γ human</i>	GGTTGACACAGAGATGCCATTTC	TGGAGTAGAAATGCTGGAGAAGTC	62
<i>snat1 human</i>	AGCCACCTCTACAGAACAC	GTAACATACCACCAGAACGC	60
<i>snat2 human</i>	CCGCAGCCGTAGAAGAATGA	GCCAGACGGACAATGAGAAGAA	61
<i>tnf-α human</i>	GCCTCTTCTCCTCCTGATCG	CAGCTTGAGGGTTTGCTACA	60
<i>ywhaz human</i>	CCTGCATGAAGTCTGTAAGTGAAG	TTGAGACGACCCTCCAAGATG	60
<i>s29 mouse</i>	GGAGTCAACCCACGGAAGTTCGG	GGAAGCACTGGCGGCACATG	62
<i>fabp4 mouse</i>	TTCCTTCAAAGTGGGCGTGG	CGCCTTTCATAACACATTCCACCA	60
<i>fatcd36 mouse</i>	TGGCCAAGCTATTGCGACAT	ACACAGCGTAGATAGACCTGC	60
<i>glut1 mouse</i>	GATCCCAGCAGCAAGAAGGTG	GCGGTGGTCCATGTTTGATTG	61
<i>igfII mouse</i>	CGCTTCAGTTTGTCTGTTCCGG	AGCAGCACTCTCCACGATG	60
<i>leptinR mouse</i>	ATCGTTCTGCAAATCCAGGTGT	ATCGTTGTGTTCCGGTGGTC	60
<i>mtor mouse</i>	GCATTCGACCGTCCGCTTCCAC	CGCCGAGTCCGTTCTCTCC	64
<i>snat2 mouse</i>	TGTGGGCAGTGGAAATCCTTGG	TCGTTGGCAGTCTTGAGGAGG	62
<i>stra6 mouse</i>	GCTTTGGGATCGTCTCTCT	TGAAGATTGGCCCTGTGTGT	60

3.12. Obtención de proteínas y western blotting

Células Swan 71 o BeWo (2.5×10^5 /pocillo) fueron sembradas en placas de 6 pocillos en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. Para evaluar la expresión de proteínas en células tratadas con VIP, se añadió VIP 50/100nM en DMEM-F12 2% SFB por 6hs y las células se recolectaron con *buffer* RIPA suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas para la extracción y cuantificación de proteínas. Para los ensayos de fosforilación de mTOR y S6, VIP 50 nM se añadió durante 20 min en DMEM-F12 2% o 0% SFB. Se añadió rapamicina 100 nM o BI-D1870 10 μ M 20min antes de los estímulos. Las células se cosecharon con *buffer* RIPA suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas y 1 mM ortovanadato de sodio para la inhibición de fosfatasa. La extracción de proteínas se realizó con ciclos de congelado y descongelado y centrifugación a 13000g durante 15 minutos, obteniendo el sobrenadante. Para células transfectadas con siRNA de VIP, una vez finalizada la transfección, las células fueron lavadas con PBS, lisadas con 100 μ l de *buffer* de lisis y siembra (Tris-

HCl 200 mM, pH 6.8; SDS 8%; azul de bromofenol 0.4% p/v; glicerol 40%; β -mercaptoetanol 400 mM) y calentadas por 4 min a 100°C. Luego se centrifugaron a 17000g por 15 min. La cuantificación de proteínas del extracto se realizó utilizando kit microBCA. Se mezclaron 30 o 50 μ g de extracto de proteína con Laemmli Sample *Buffer* 2X (BioRad, California, EEUU) que contenía 0,05% de β -mercaptoetanol. Las muestras de proteínas fueron sembradas en cada calle y en cada gel fue incluido un marcador de peso molecular pre-coloreado (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EEUU). Las muestras se sometieron a electroforesis SDS-PAGE (SDS-PAGE Running *Buffer*: Tris 125 mM, glicina 975 mM, SDS al 0,25 %, pH 8,3) utilizando geles de poli(acrilamida) de diferentes tamaños de poros (%T) en gel separador según las proteínas a separar. Las concentraciones en el gel concentrador (T 4%) fueron: acrilamida 39 g/l; bisacrilamida 1 g/l; SDS 1 g/l en Tris-HCl 125 mM, pH 6,8. Como catalizador de la polimerización se empleó N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED = 0,770,02 g/l) 0,3 ml/l y persulfato de amonio 0,37 g/l como iniciador. Las concentraciones en el gel separador fueron: SDS 1 g/l; TEMED 0,3 ml/l; persulfato de amonio 0,37 g/l en Tris-HCl 375 mM; las concentraciones de acrilamida y bisacrilamida variaron según el %T requerido; pH 8,8). Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (NC) durante 1:15 h (*buffer* de transferencia: Tris 25 mM, glicina 195 mM, SDS al 0,05 %, pH 8,3 y metanol al 20 % (v/v)). La electroforesis fue desarrollada a corriente constante de 20 mA durante el proceso de isotacoforesis en el gel concentrador y de 25 mA durante el desarrollo electroforético en el gel separador²¹⁴. Las NC fueron bloqueadas por 1 h de incubación en solución *buffer* Tris (25 mM Tris, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7.4) que contenía 0,1% Tween 20 y 0,5% leche descremada en polvo. Luego, las NC se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos monoclonales anti p-mTOR humano (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EEUU), anti GLUT1 humano (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EEUU), anti p-S6 humano (Cell Signaling, Massachusetts, EEUU), anti β -actina humano (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EEUU), anti α -tubulina humana (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUU) o anti GAPDH humano (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUU). Después de lavar con TBS–0.1% Tween 20, las NC fueron incubadas con anticuerpo HRP (*horseradish peroxidase-conjugated antibody*) anti-ratón o anti-conejo (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EEUU) durante 1 h a Tamb. Se lavaron, y se detectaron las señales de anticuerpos específicos utilizando Chemiluminescence system ECL Plus kit y analizador de imágenes luminiscentes Analyzer Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Illinois, EEUU). Para el *stripping*, las NC se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en *Restore Western Blot Stripping Buffer* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EEUU). Después del lavado, las NC se bloquearon nuevamente y el protocolo se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ®.

3.13. ELISA

La concentración de las citoquinas IL-1 β e IL-10 fue evaluada en los sobrenadantes de MØ mediante ensayos de ELISA tipo sándwich utilizando kits comerciales (Becton Dickinson, San José, CA, US), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, los anticuerpos de captura específicos disueltos en Na₂CO₃ fueron incubados en la placa de 96 pocillos de mitad de área para ELISA por 18h a 4°C. Se lavó la placa cinco veces con solución de lavado (Tween-20 0,05% en PBS) y se bloqueó con SFB 10% en PBS por 1h a Tamb y en agitación. Se retiró la solución de bloqueo, se sembraron las muestras y se incubó 2h a Tamb y agitación para IL-1 β y durante la noche a 4°C para IL-10. Se lavó cinco veces con solución de lavado y se añadió el anticuerpo conjugado con biotina específico para cada citoquina en conjunto con la estreptoavidina conjugada a peroxidasa (SAV-HRP). Luego de una hora, se lavó 7 veces con solución de lavado y se añadió el sustrato cromogénico Tetrametilbencidina TMB Ultra (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EEUU). Dentro de los 30 minutos siguientes se frenó la reacción con solución de stop (H₂SO₄ 2N) y la densidad óptica fue medida a 450nm con corrección de 570nm en un lector de ELISA. Los controles negativos incluyeron pocillos con todos los reactivos reemplazando las muestras por solución de bloqueo (blanco). Se realizó una curva estándar de calibración en paralelo a las muestras en todos los casos, y la concentración de citoquina se obtuvo por interpolación en la curva standard. Cuando fue necesario, las muestras se diluyeron hasta entrar en la zona lineal.

3.14. Análisis de expresión de proteínas por citometría de flujo

Células Swan 71 o BeWo (4×10^4 /pocillo) fueron sembradas en placas de 24 pocillos en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. A continuación, las células fueron estimuladas con VIP 50nM o rapamicina 100 nM por 6h ó 24hs respectivamente en DMEM-F12 2% FBS. Para la detección de VIP, la secreción proteica fue inhibida con StopGolgi por 4hs (Becton Dickinson, California, EEUU). Para la detección en células silenciadas para VIP, esta se realizó como se describió previamente. Las células fueron despegadas, fijadas y permeabilizadas con kit Cytfix/CytopermTM plus según instrucciones del fabricante (Becton Dickinson, California, EEUU). Las células fueron lavadas e incubadas por 1h a Tamb ó durante la noche a 4°C dependiendo el anticuerpo, con anticuerpos monoclonales de ratón anti SNAT1 (Abcam, Cambridge, RU), de ratón anti SNAT2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUU), de conejo anti VIP (Abcam, Cambridge, RU), de ratón anti GLUT3 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUU), de ratón anti mTOR (Cell Signaling, Massachusetts, EEUU). Se realizaron dos lavados y se incubaron por 40min a Tamb con anticuerpo secundario anti

ratón-Alexa 488 o anti conejo-Alexa 647 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EEUU). Se realizaron dos lavados y las células se resuspendieron en SFB 2% en PBS a 4°C para análisis por citometría de flujo. Para la marcación de CD14, CD86 y TNF- α en M \emptyset , las células se diferenciaron como se describió previamente, se añadieron los estímulos por 18hs, se realizó un lavado y se incubaron en PBS 2% SFB durante 40min a Tamb con anticuerpos monoclonales anti-CD14 APC (Becton Dickinson, San José, CA, EEUU), anti-CD86 PE (Becton Dickinson, San José, CA, EEUU), anti-TNF- α PE (Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EEUU). Las células fueron lavadas y resuspendidas en SFB 2% en PBS a 4°C para análisis por citometría de flujo. Los datos se adquirieron en un citómetro® FACS Aria II ó Accuri 6C Plus (Becton Dickinson, San José, CA, EEUU) y se analizaron con el software FlowJo (<http://www.flowjo.com/>).

3.15. ROS totales

Células Swan (4×10^4 /pocillo) fueron sembradas en placas de 24 pocillos en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. SLuego las células fueron estimuladas con VIP 50nM por 24hs en DMEM-F12 2% SFB. Finalizada la estimulación, se añadió 10 μ M de la sonda diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) por 30min. Las células fueron lavadas con PBS, despegadas y resuspendidas en SFB 2% en PBS a 4°C para análisis por citometría de flujo.

3.16. Análisis estadístico

Cuando se utilizaron pruebas paramétricas, se utilizaron los test de t de Student o ANOVA de uno o dos factores, para muestras apareadas o no, con comparaciones múltiples de Dunnett o de Tukey. De ser necesario, se utilizó corrección de Welch o se modelaron las varianzas y se emplearon comparaciones múltiples de LSD Fisher. Para pruebas no paramétricas se utilizaron las pruebas de Mann Whitney, Wilcoxon, Kruskal Wallis o Friedman con comparaciones de Dunn's. Se utilizó un nivel de significancia menor del 5% para rechazar la hipótesis nula. Todos los datos fueron analizados utilizando los softwares GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA) e Infostat (UNC, Córdoba, Argentina).

4.

RESULTADOS

4.1. CAPÍTULO I

ROL DE VIP EN EL METABOLISMO DE LA CÉLULA CITOTROFOBLÁSTICA

4.1.1. VIP induce la rápida incorporación de glucosa y la expresión de los transportadores GLUT1 y GLUT3 en líneas celulares citotrofoblásticas

Teniendo en cuenta la alta tasa metabólica reportada de las células CTB, que los procesos de migración, invasión y remodelación de vasos requieren de un activo metabolismo, y basándonos en que VIP modula diversas funciones en células trofoblásticas de primer trimestre, nos propusimos estudiar en primer lugar el efecto de VIP en el transporte de glucosa, principal sustrato energético para la placenta. Para esto, realizamos un ensayo que mide la incorporación de glucosa en células individuales basado en la incubación con un análogo fluorescente de la D-glucosa, el 2-Deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose (2-NBDG), seguido de su detección por citometría de flujo. En primer lugar, realizamos la caracterización del transporte de 2-NBDG y describimos su cinética de incorporación (Fig. 13). Para esto, incubamos células CTB Swan 71 con 2-NBDG durante distintos tiempos y observamos un aumento del porcentaje de células positivas (Fig. 13A), así como de la intensidad de fluorescencia media (IFM) en función del tiempo (Fig. 13B). Este ensayo fue realizado en ausencia/presencia de Floretin, un inhibidor del transporte, lo que nos permitió calcular la incorporación específica como la diferencia entre la incorporación total observada y la no específica. La Figura 13B muestra la IFM en función del tiempo para la incorporación específica. En ambos casos se observaron niveles de saturación esperables para los sustratos que se incorporan mediante transportadores debido al equilibrio entre la incorporación y la metabolización de la sonda. Esto nos permitió definir un tiempo de entre 5 y 10 min de incubación, con alto porcentaje de células positivas y en una zona lineal de la IFM, para realizar los siguientes ensayos en presencia de los estímulos. La Figura 13C muestra la IFM en función de concentraciones crecientes de glucosa, que confirma el ajuste a la cinética de Michaelis-Menten para transporte por difusión facilitada, y nos permitió calcular la constante de afinidad (K_m) en nuestro modelo, que resultó del orden de 1 mM.

A continuación, investigamos el efecto de VIP en la incorporación de glucosa. Como se muestra en la Figura 13D, VIP indujo de manera dependiente de la concentración un aumento significativo de la incorporación de glucosa en células citotrofoblásticas de primer trimestre.

Teniendo en cuenta que las concentraciones efectivas de VIP tienen un rango entre 10 y 100 nM, analizamos el efecto de 50nM de VIP ó 50 ng/ml del factor inhibidor de la leucemia (LIF), una citoquina de la familia gp130 implicada en el proceso de placentación que induce la incorporación de glucosa en músculo esquelético de ratón²³⁴. La Figura 13E muestra que VIP a tiempos cortos de incubación aumentó la incorporación de 2-NBDG en un grado similar al de LIF en las líneas celulares citotrofoblásticas Swan 71 y BeWo. En consistencia con el resultado obtenido por citometría de

flujo, la evaluación por microscopía de fluorescencia también mostró que VIP aumentó la incorporación de 2-NBDG en ambas líneas celulares (Fig. 13F).

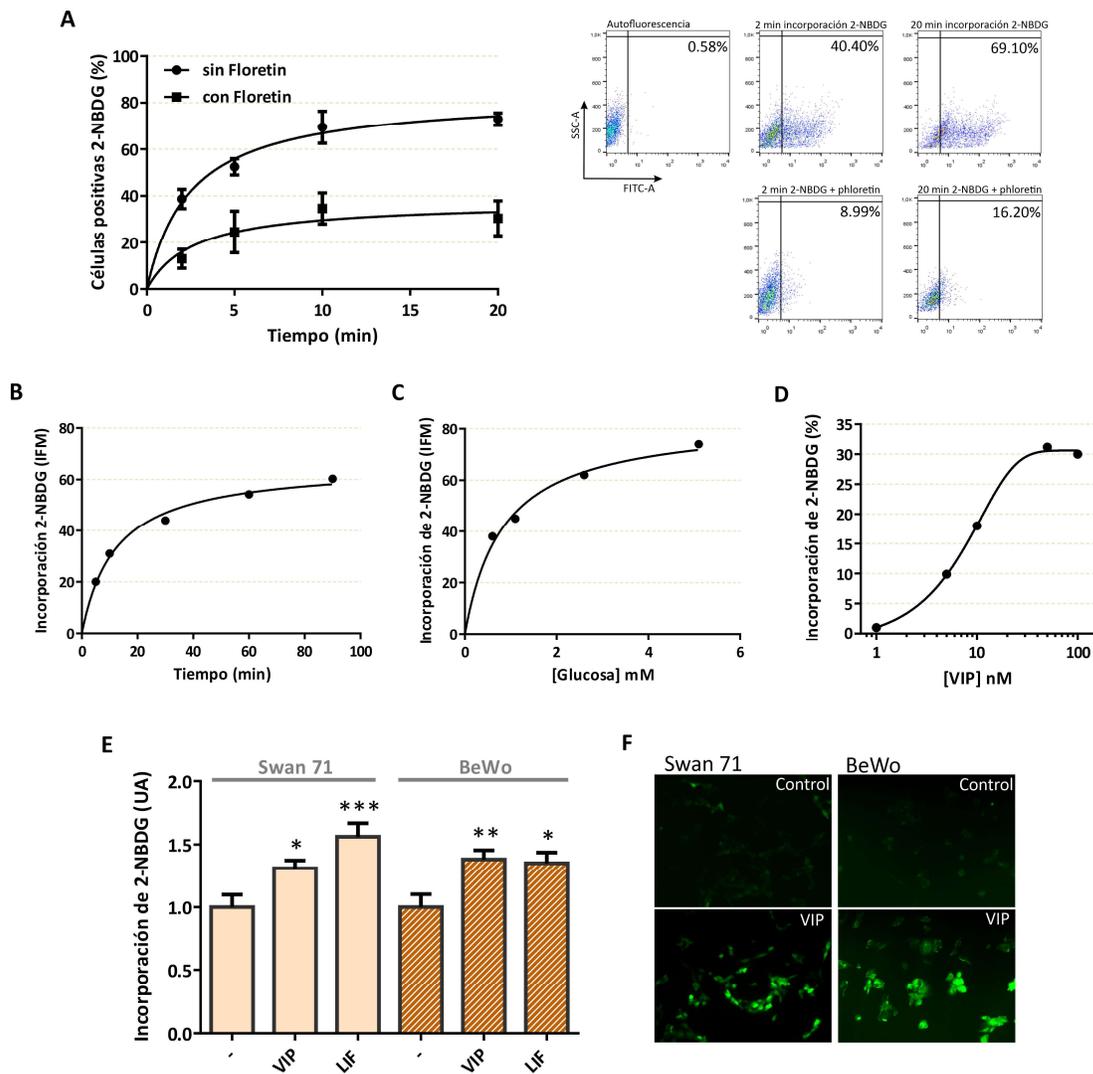


Figura 13 | Caracterización de la incorporación de 2-NBDG y efecto de VIP en líneas celulares humanas derivadas de citotrofoblasto. Células Swan 71 fueron cultivadas hasta subconfluencia, se lavaron con PBS frío y el medio se reemplazó por DMEM-F12 libre de glucosa. Se añadió el análogo fluorescente de la glucosa 2-NBDG durante diferentes tiempos (A, B) ó 10 min (C, D, E), se lavó con PBS frío y se adquirieron los datos por citometría de flujo. (A) Células positivas para 2-NBDG a los 2-20 min en ausencia/presencia de 1 mM del inhibidor del transporte Floretin. Se muestran *dots plots* representativos del control de autofluorescencia, y de 2 y 20 min de incubación con 2-NBDG en ausencia/presencia de Floretin. Cada punto representa la Media \pm E.E. Los resultados en (B-E) se expresan como la diferencia entre sin/con 1 mM Floretin. (B) Intensidad de fluorescencia media (IFM) luego de la incubación con 2-NBDG durante 5-90 min. Los gráficos son representativos de 3 experimentos independientes. (C) IFM luego de 10 min de incubación con 2-NBDG suplementado con 0.5, 1, 2.5 ó 5 mM de glucosa. Los gráficos son representativos de 3 experimentos independientes. (D) Incorporación de 2-NBDG en presencia de 1–100 nM de VIP expresado como porcentaje frente al valor basal tomado como 1. El VIP se agregó 10 min antes de la adición de 2-NBDG durante otros 10 min. (E) Incorporación de 2-NBDG en células Swan 71 (barras lisas) y BeWo (barras rayadas) incubadas en ausencia/presencia de VIP 50 nM o LIF 50 ng/ml (VIP n=9, LIF n=6). Los resultados se expresan como Media \pm

E.E. ANOVA con post test de Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (F) Microscopía de fluorescencia representativa luego de 3 min de incubación con 2-NBDG sin/con VIP 50 nM.

Teniendo en cuenta que VIP indujo la rápida incorporación de glucosa en ambas líneas celulares, quisimos evaluar si VIP también induce la expresión de los principales transportadores de glucosa presentes en la placenta, GLUT1 (SLC2A1) y GLUT3 (SLC2A3). Para esto, células Swan 71 y BeWo fueron incubadas con VIP 50-100nM durante 6 h y luego evaluamos la expresión de ARNm por RT-qPCR y los niveles de proteína por *western blot* (GLUT1) ó citometría de flujo (GLUT3) (Fig. 14). Observamos que VIP 50nM aumentó la expresión de ambos transportadores en las líneas (Fig. 14A, B, paneles izquierdos), así como los niveles de la proteína GLUT1 en Swan 71 (Fig. 14A, panel derecho), sin embargo, no detectamos diferencias en los niveles proteicos de GLUT3 (Fig. 14B, panel derecho).

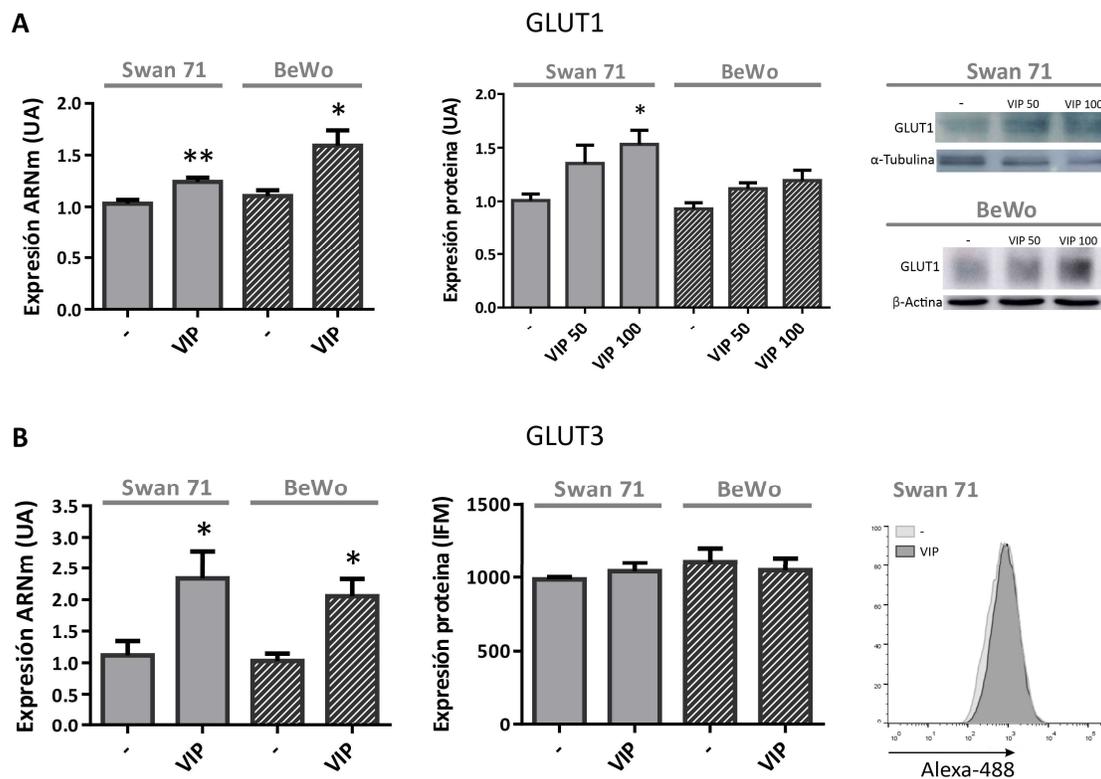


Figura 14 | VIP induce la expresión de transportadores de glucosa en líneas celulares humanas derivadas de citotrofoblasto. Células Swan 71/BeWo fueron cultivadas hasta subconfluencia y se añadió VIP 50/100 nM durante 6h en DMEM-F12 2% SFB, luego fueron cosechadas para el análisis de expresión de ARNm ó proteína como se describe en Materiales y métodos. Para el análisis de ARNm, se realizó RT-qPCR y se analizaron los resultados empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizado a la expresión de *gapdh* endógeno. Para el análisis proteico se realizó *western blot* normalizando a α -tubulina o β -actina (GLUT1) ó citometría de flujo (GLUT3). (A) Expresión de ARNm (n=6) y proteína (n=3) de GLUT1. El panel derecho muestra las líneas correspondientes a α -tubulina, β -actina y GLUT1. (B) Expresión de ARNm (n=5 para Swan 71 y n=4 para BeWo), y proteína (n=3).

El panel derecho muestra un histograma representativo. Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba t de Student o ANOVA con comparaciones múltiples de Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.2. La incorporación de glucosa inducida por VIP está mediada por la señalización de PKA, MAPK, PI3K y mTOR

Con el fin de dilucidar los mecanismos involucrados en el efecto de VIP sobre la regulación del transporte de glucosa, estudiamos las principales vías de señalización río abajo descritas para la activación de los receptores específicos VPAC1 y VPAC2: proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC) y MAP quinasas (MAPK). Los ensayos de incorporación de 2-NBDG mostraron que el pretratamiento de las células CTB con el inhibidor de PKA H89 o el inhibidor de MEK PD 98059 impidió el aumento de la incorporación de 2-NBDG inducida por VIP 50 nM, mientras que el inhibidor de PKC STP mostró la misma tendencia, pero la disminución no fue significativa (Fig. 15A). Se ha reportado previamente que PI3K induce la activación del complejo mTOR^{157,235} y que el complejo mTOR es activado por cAMP, induciendo a su vez la translocación de GLUT1 a la membrana plasmática^{236,237}. Con base en esta evidencia, y teniendo en cuenta que la activación de los receptores VPACs pueden inducir la síntesis de cAMP, analizamos el papel de la activación de PI3K y mTOR en la regulación de la incorporación de glucosa inducida por VIP. Como se muestra en la Figura 15B, tanto el inhibidor de PI3K Ly294502 como el inhibidor de mTOR rapamicina impidieron el aumento de la incorporación de 2-NBDG inducida por VIP.

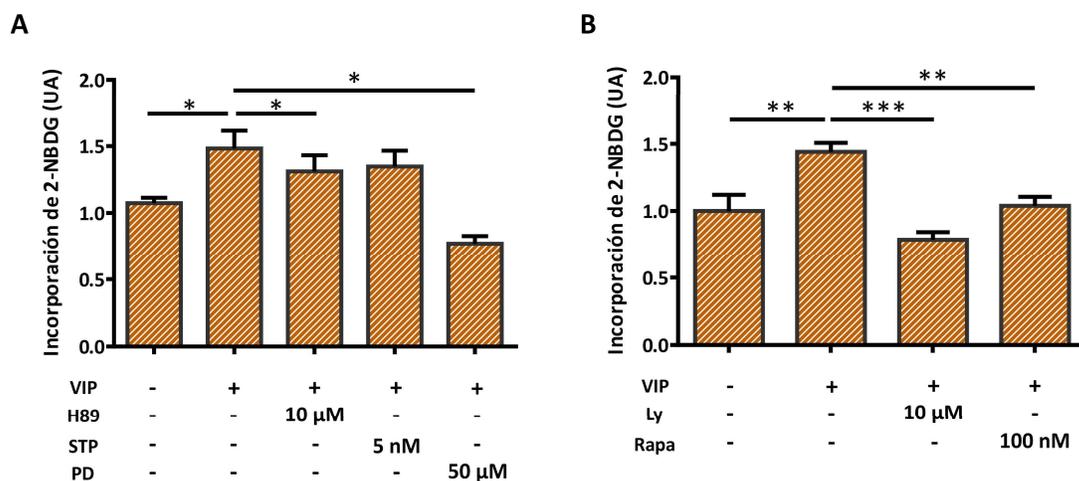


Figura 15 | VIP induce la incorporación de glucosa a través de las vías PKA, MAPK, PI3K y mTOR en líneas celulares humanas derivadas de citotrofoblasto. Células BeWo fueron cultivadas hasta subconfluencia, incubadas en DMEM-F12 sin glucosa, y se añadieron los inhibidores durante 20 min antes de la adición de VIP 50 nM durante 10 min y 2-NBDG durante otros 10 min. Las células se lavaron con PBS frío y se adquirieron los datos por citometría de flujo. (A) Incorporación de 2-NBDG en ausencia/presencia de VIP 50 nM y H89 10 μ M (inhibidor de PKA), STP 5 nM (inhibidor de PKC) o PD98059 50 μ M (inhibidor de MEK). (B) Incorporación de 2-

NBDG en ausencia/presencia de VIP 50 nM y Ly294502 10 μ M (inhibidor de PI3K) o rapamicina 100 nM (inhibidor de mTOR) (n=5). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. ANOVA de medidas repetidas con comparaciones múltiples de Dunnett, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

4.1.3. VIP induce la incorporación de aminoácidos por el Sistema A de transportadores de aminoácidos neutros acoplados al sodio (SNAT)

Los aminoácidos neutros que se transportan acoplados a Na⁺ son otra de las fuentes principales de energía para las células Tb, en especial la glutamina transportada principalmente por SNAT1. Considerando que el efecto de VIP sobre la incorporación de glucosa involucra la participación de mTOR, y teniendo en cuenta la implicancia de mTOR en la actividad del sistema A de transporte de aminoácidos, a continuación, quisimos evaluar el efecto de VIP sobre la actividad de los transportadores del Sistema A en líneas celulares Swan 71 y BeWo. Para cuantificar la incorporación utilizamos un sustrato específico de los transportadores SNAT marcado con carbono-14, [14 C]-acidometilaminoisobutírico (¹⁴C-MeAIB). En primer lugar cuantificamos la incorporación de ¹⁴C-MeAIB en *buffer* Tyrode con o sin sodio para transporte no específico (Fig. 16A). La actividad del sistema A se calculó en todos los casos restando la incorporación de ¹⁴C-MeAIB en ausencia de sodio. Como se muestra en Figura 16B, VIP indujo un aumento significativo de la actividad del Sistema A en ambas líneas celulares. Evaluamos también la expresión de dos de los principales transportadores del Sistema A presentes en la placenta humana: SNAT1 y SNAT2. Observamos que VIP no solo indujo la actividad sino también la expresión del ARNm y de la proteína de SNAT1 en células Swan 71, no así en BeWo, y si bien se observó una tendencia similar en la expresión de ARNm de SNAT2, las diferencias no fueron significativas (Fig. 16C, D).

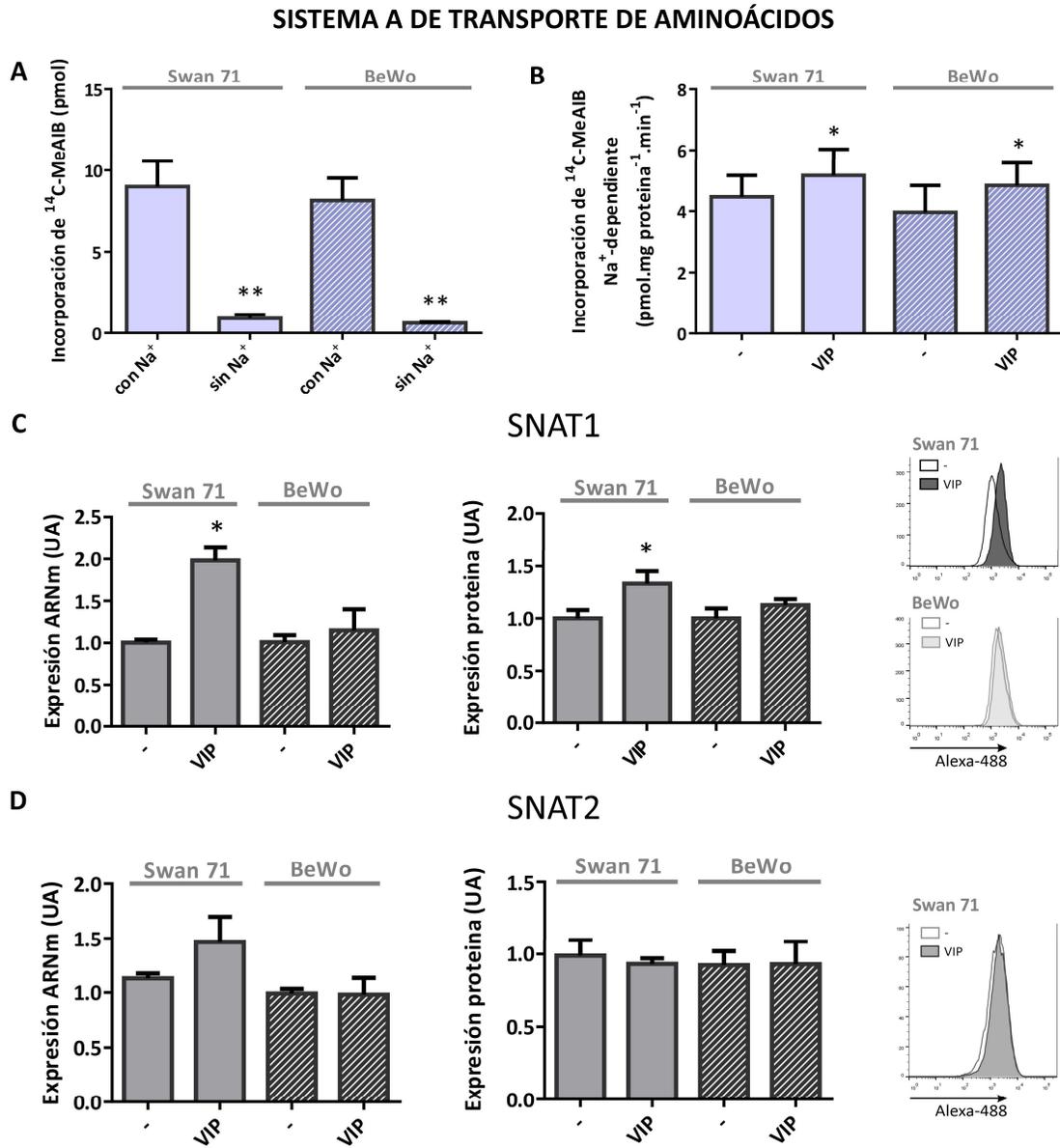


Figura 16 | VIP estimula la actividad del sistema A de transporte de aminoácidos y la expresión de SNAT1 en líneas celulares humanas derivadas de citotrofoblasto. (A, B) Células Swan 71/BeWo fueron cultivadas hasta subconfluencia y se incubaron con VIP 50 nM en DMEM-F12 2% SFB durante 20 min, luego se lavaron con buffer Tyrode con/sin Na^+ y se añadió $^{14}\text{C-MeAIB}$ durante 8 min. Se realizó un lavado con buffer Tyrode frío sin Na^+ y las células fueron lisadas con H_2O destilada durante 1 h. Los datos fueron adquiridos en contador de centelleo. (A) Caracterización de la incorporación de $^{14}\text{C-MeAIB}$ dependiente de Na^+ en Swan 71/BeWo (n=4). Los resultados se expresan en pmol de $^{14}\text{C-MeAIB}$. (B) Incorporación de $^{14}\text{C-MeAIB}$ dependiente de Na^+ en ausencia/presencia de VIP 50 nM. Los resultados se expresan como la diferencia entre con/sin Na^+ (n=4), en pmol $^{14}\text{C-MeAIB}$.mg prot $^{-1}$.min $^{-1}$. (C) Expresión de ARNm y proteína SNAT1. Las células se cultivaron como previamente y se añadió VIP 50 nM durante 6 h. Las células se cosecharon para el análisis de ARNm por RT-qPCR (n=4) o análisis de proteína por citometría de flujo (n=5). (D) Expresión de ARNm (n=7) y proteína de SNAT2 (n=5 para Swan 71, n=3 para BeWo). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba t de Student, *p<0.05, **p<0.01.

4.1.4. Relevancia de VIP endógeno en la incorporación de nutrientes y regulación cruzada entre VIP y el sensor de nutrientes mTOR

Sobre la base de que las células CTB sintetizan VIP, y que el VIP regula la función citotrofoblástica de modo autócrino, realizamos ensayos de pérdida de función para investigar la relevancia de VIP endógeno en la regulación de la incorporación de glucosa. Para esto, utilizamos un siRNA de VIP para silenciar la expresión del péptido en células Swan 71 y BeWo, y luego de 72h de incubación, confirmamos una disminución de hasta un 50% de VIP en comparación con las células transfectadas con un siRNA scrbl control. En estas células, cuantificamos la incorporación de 2-NBDG y evaluamos la expresión de transportadores (Fig. 17). Los resultados que se muestran en la Figura 17A indican que el silenciamiento de VIP redujo la incorporación de glucosa en ambas líneas celulares, lo que sustenta la participación de VIP endógeno en el transporte de glucosa en las células CTB de primer trimestre. A su vez, las Figuras 17B y C muestran que la expresión de ARNm *glut1* y *glut3* así como de *snat1* y *snat2* se encuentra disminuida, sugiriendo que el VIP endógeno no solo participa del mantenimiento de la incorporación de glucosa sino también de la incorporación de aminoácidos por el sistema A.

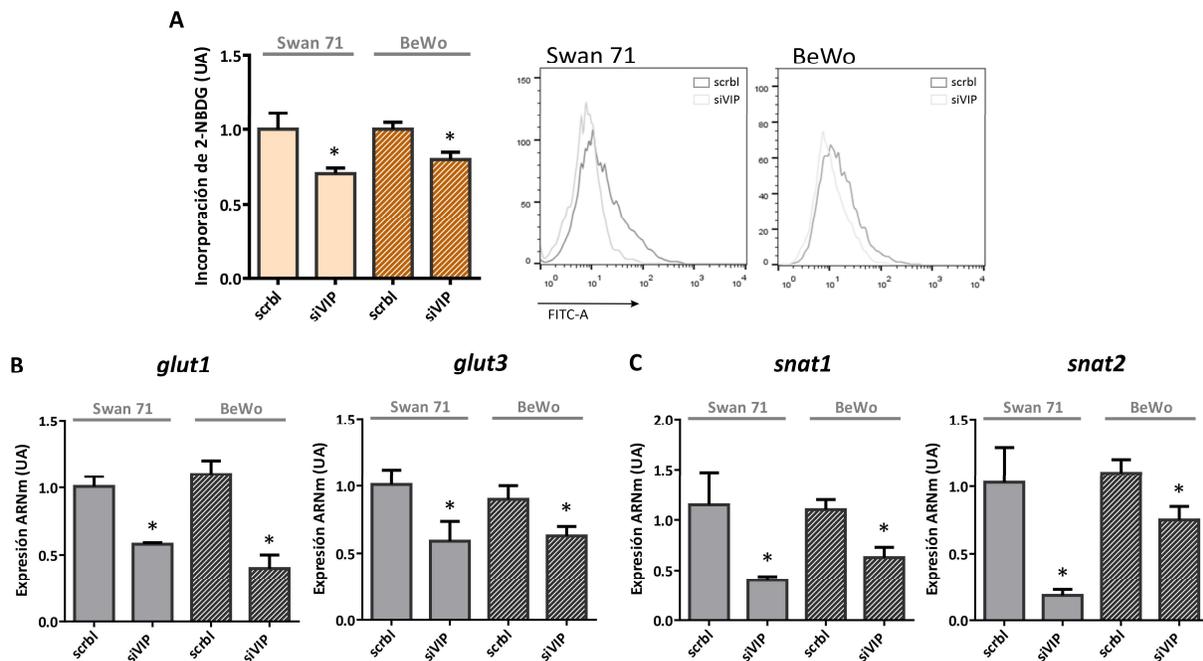


Figura 17 | Rol de VIP endógeno en la modulación del metabolismo celular de líneas celulares humanas derivadas de citotrofoblasto. Células Swan 71/BeWo fueron cultivadas en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. El medio fue reemplazado por medio de transfección OptiMEM® y las células fueron transfectadas con siRNA de VIP (100 nM) ó un siRNA control (scrbl) por 24 h. A continuación se adicionaron 500µl de DMEM-F12 10% SFB por 24 h más, y luego se reemplazó el medio por DMEM-F12 2% SFB. (A) Incorporación de 2-NBDG luego de 72hs de transfección (n=4). (B, C) Las células se cosecharon como

previamente para el análisis de ARNm por RT-qPCR (n=3). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba t de Student, *p<0.05.

Considerando que VIP indujo la incorporación rápida de glucosa a través de la vía de mTOR, también la actividad del sistema A de transporte de aminoácidos cuya activación ha sido ampliamente reportada por esta misma vía^{153,156}, y que el silenciamiento de VIP resultó en una disminución en la incorporación de glucosa y expresión de transportadores, nos focalizamos en explorar el vínculo entre mTOR y VIP en estas células.

En primer lugar, observamos que VIP indujo la transcripción de mTOR (Fig. 18A) así como la fosforilación de la proteína (Fig. 18B). En concordancia con la participación de las vías de fosforilación de mTOR activadas por VIP en células CTB, VIP también indujo la fosforilación de S6, un sustrato río abajo de la activación de mTOR, y este efecto fue inhibido por rapamicina (Fig. 18C). Mas aún, observamos que las células silenciadas para VIP presentaron menor expresión de mTOR tanto a nivel de ARNm como de proteína (Fig. 18D). Por otro lado, la inhibición de la actividad de mTOR con rapamicina resultó en una disminución en la expresión de VIP endógeno (Fig. 18E). En conjunto, estos resultados muestran una interacción cruzada o recíproca entre VIP y el sensor de nutrientes mTOR.

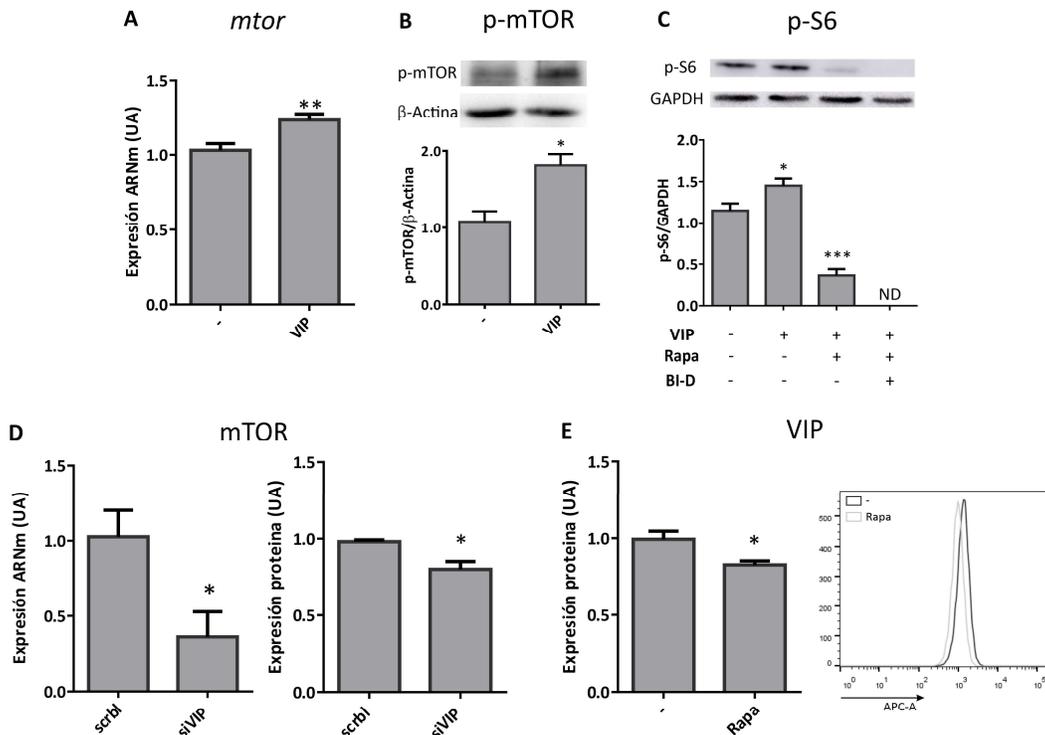


Figura 18 | Regulación cruzada de mTOR y VIP en células citotrofoblásticas. Células Swan 71 fueron cultivadas en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. Se añadió VIP 50 nM, Rapamicina 100 nM o BI-D1870 10 μ M (inhibidor de RSK) en DMEM-F12 2% SFB durante 6h (A), 20min (B, C), o 24h (E). En (D) las células

fueron silenciadas para VIP como previamente. (A) Expresión de ARNm de *mtor*. Las células se cosecharon como previamente para el análisis de ARNm por RT-qPCR (n=6). (B) Fosforilación de mTOR. Se realizó un ensayo de *western blot* para detectar p-mTOR y se normalizó a la expresión de β -actina (n=4). La imagen muestra las líneas correspondientes a p-mTOR y β -actina. Las transferencias se realizaron en las mismas condiciones experimentales. (C) Fosforilación de S6. Se realizó un ensayo de *western blot* para p-S6 y se normalizó a la expresión de GAPDH (n=3). La imagen muestra las líneas correspondientes a p-S6 y GAPDH. Las transferencias se realizaron en las mismas condiciones experimentales. (D) Expresión de mTOR en células silenciadas para VIP. Las células se cosecharon para el análisis de ARNm por RT-qPCR (n=3) o análisis de proteína por citometría de flujo (n=3). (E) Expresión de VIP. La secreción de proteínas fue inhibida por la incubación con Stop Golgi® durante 4 h y se evaluó la expresión de VIP por citometría de flujo (n=3). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba t de Student o ANOVA con comparaciones múltiples de Dunnett, *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001.

4.1.5. VIP estimula la utilización de glucosa por vía glucolítica y la fosforilación oxidativa para acelerar la migración de células trofoblásticas sin modular la producción de lactato

Como hemos mencionado previamente en la introducción, las células CTB poseen una alta tasa glucolítica con producción de lactato y una alta FOSFOX. Habiendo observado que VIP induce la incorporación tanto de glucosa como de aminoácidos, y basándonos en que VIP regula funciones celulares como la migración y la invasión, quisimos explorar cuáles de estas vías metabólicas se activan o modulan en respuesta al VIP, y su relevancia en la función celular. Para esto, realizamos un ensayo de cierre de herida en una monocapa de células Swan 71, cuantificando el porcentaje de cierre luego de 16h de estimulación con VIP 50nM en ausencia/presencia del inhibidor de la glucólisis 2-Deoxi-D-gluosa (2-DG) 10mM y/o el inhibidor del complejo I de la ETC Rotenona 100nM (Fig. 19). Observamos que tanto en presencia de 2-DG como de Rotenona individualmente, VIP no aumentó la migración, sugiriendo la participación de ambas vías en el efecto. Cuando los inhibidores fueron adicionados a la vez, bloqueando las vías en simultáneo, las células migraron significativamente menos. A su vez, cabe destacar que el porcentaje de cierre de herida en presencia de los inhibidores individualmente tanto en presencia como en ausencia de VIP no difirió de la condición basal, indicando que las células CTB son capaces de adaptar su metabolismo y mantener su funcionalidad basal utilizando principalmente la glucólisis, así como la FOSFOX, probablemente con sustratos provenientes de otras vías como aminoácidos o ácidos grasos.

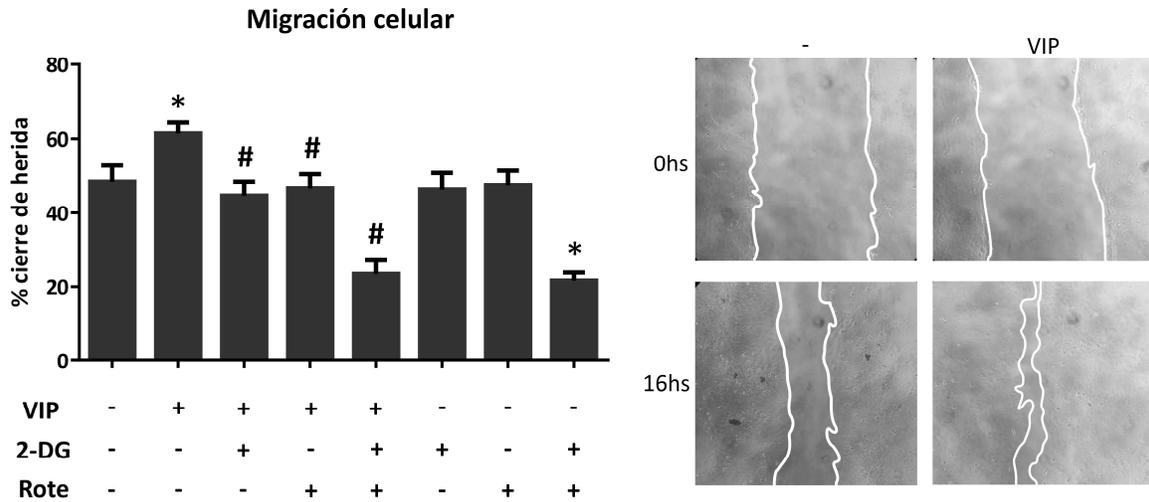


Figura 19 | Dependencia de la glucosa y de la fosforilación oxidativa en la inducción de la migración de Tb por VIP. Células Swan 71 fueron cultivadas en DMEM-F12 10% SFB hasta 100% de confluencia. Se realizó una herida y se añadió VIP 50 nM, 2-DG 10 mM y/o Rotenona 100 nM en DMEM-F12 2% SFB por 16 h. Se obtuvieron fotografías y se calculó el porcentaje de cierre de herida como la proporción del área de herida cerrada a 16 h respecto a 0 h. Los resultados se expresan como Media \pm E.E. de al menos 4 experimentos. ANOVA con comparaciones de Sidak, * $p < 0.05$ respecto al control, # $p < 0.05$ respecto a VIP 50 nM. El panel derecho muestra fotografías representativas (objetivo 10x).

La glucosa que ingresa a la célula es fosforilada en su carbono-6, convirtiéndose en glucosa-6-P. Ésta puede ser oxidada en la vía de las pentosas fosfato (PPP) ó continuar la vía glucolítica generando ATP y dando piruvato, que a su vez podrá ser convertido a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa, ó ingresar a la mitocondria, producir Acetil-CoA y ser intermediario del TCA aumentando la FOSFOX. Teniendo en cuenta que VIP aumentó la incorporación de glucosa, que la glucólisis fue necesaria para suplir las demandas energéticas induciendo un aumento en la función celular, y también fue necesaria la FOSFOX, quisimos estudiar la vía de utilización de la glucosa incorporada. En primer lugar evaluamos si el aumento en la incorporación de glucosa por VIP se mantenía en el tiempo y repetimos el ensayo luego de 24h de estimulación (Fig. 20A). Observamos que si bien las diferencias no fueron significativas, se mantuvo la misma tendencia. Las células CTB producen y liberan grandes cantidades de lactato y como se ha reportado recientemente, liberarían incluso mayor cantidad de lactato que las STB⁸¹. Dado que es necesaria una alta concentración de lactato en el microambiente para las primeras etapas del desarrollo embrionario, que el lactato regula procesos fisiológicos como la angiogénesis, la permeabilidad vascular, y modula la tolerancia inmunológica¹⁰⁰, cuantificamos la concentración de lactato extracelular liberado a lo largo de 24h y 48h de incubación con VIP 50nM. No encontramos diferencias significativas respecto a la producción basal de lactato (Fig. 20B) ni en la expresión de ARNm de sus transportadores *mct1* y *mct4* (Fig.

20C), por lo que la diferencia de glucosa incorporada frente a la estimulación con VIP no estaría siendo metabolizada a lactato. La co-incubación de VIP con 2-DG impidió su producción, mientras que la co-incubación con Rotenona y el bloqueo del TCA/ETC tendió a correr el equilibrio aumentándola.

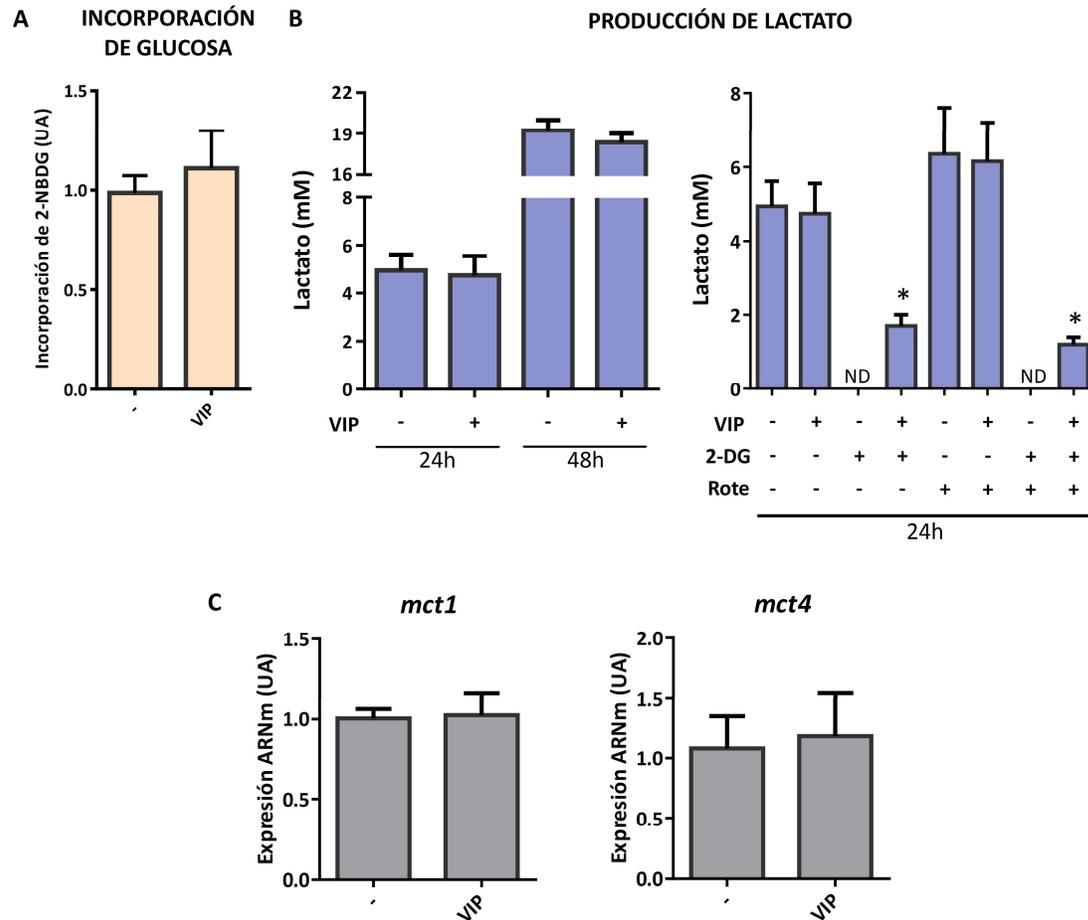


Figura 20 | Modulación de la producción de lactato y expresión de transportadores de monocarboxilatos en células citotrofoblásticas estimuladas con VIP. Células Swan 71 cultivadas en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia fueron estimuladas con VIP 50 nM, en presencia/ausencia de 2-DG 10 mM y/o Rotenona 100 nM en DMEM-F12 2% SFB por 6hs (C), 24hs o 48hs (A, B). (A) Incorporación de glucosa luego de 24hs de incubación con VIP 50nM (n=3). (B) Producción de L-lactato cuantificada en el medio extracelular con el equipo Accutrend Plus System (n=3). (C) Expresión de ARNm de transportadores de lactato *mct1* y *mct4*. Las células se cosecharon como previamente para el análisis de ARNm por RT-qPCR (n=4). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba t de Student ó ANOVA con comparaciones múltiples de Dunnett, *p<0.05.

4.1.6. Detección de ácidos orgánicos intermediarios de glucólisis o TCA en líneas celulares citotrofoblásticas

Basándonos en que VIP indujo la incorporación de glucosa y que esto no se tradujo en un aumento en la liberación de lactato, hipotetizamos que podría haber un aumento en los niveles de piruvato intracelular, así como una modulación de los niveles de otros metabolitos intermediarios del TCA relevantes como el citrato y el succinato. El aumento de citrato se reporta asociado a la inhibición de la glucólisis, el TCA y la β -oxidación²³⁸, mientras que el aumento excesivo de succinato puede estimular una respuesta inflamatoria en otros modelos^{115,239}. En el marco de esta hipótesis, iniciamos una colaboración con el Laboratorio de Espectrometría de Masas en el CIBION para desarrollar, en una primera aproximación, un método semi-dirigido de detección simultánea de metabolitos intracelulares involucrados en el metabolismo de las células CTB en condiciones basales y frente a la estimulación con VIP. La Tabla 2 muestra los parámetros de los estándares puros de los ácidos carboxílicos y en la Figura 21 se observan los cromatogramas extraídos de iones para dichos estándares.

Tabla 2 | Análisis de estándares puros de ácidos carboxílicos por UPLC-QTOF-MS. Tr: Tiempo de retención.

ANALITO	FÓRMULA MOLECULAR	pka	Tr (min)	[M-H] ⁻ teo	[M-H] ⁻ exp
Ácido Pirúvico	C ₃ H ₄ O ₃	2,6	1,10	87,0082	87,0081
Ácido Láctico	C ₃ H ₆ O ₃	3,8	1,45	89,0239	89,0237
Ácido Cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	3,1;	2,26	191,0192	191,0193
Ácido Succínico	C ₄ H ₆ O ₄	4,2; 5,6	2,83	117,0188	117,0190

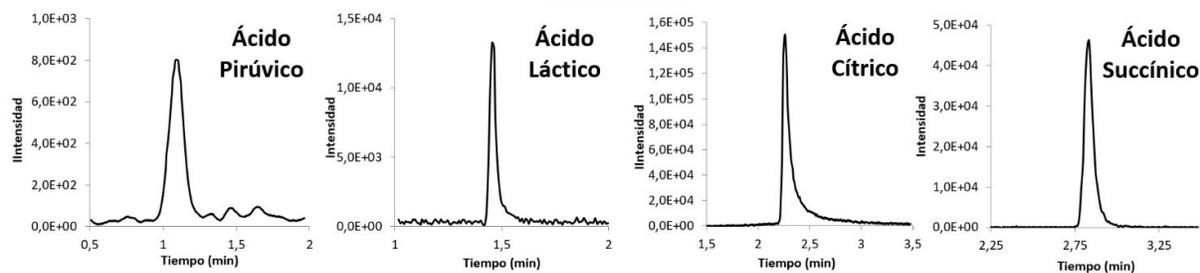


Figura 21 | Cromatogramas extraídos de iones. Detección de ácido pirúvico, ácido láctico, ácido cítrico y ácido succínico por UPLC-QTOF-MS en soluciones de estándares.

Como se observa en la Figura 22, el ácido pirúvico, el ácido láctico, el ácido cítrico, y el ácido succínico fueron detectados en las células CTB. Datos preliminares muestran menores niveles de lactato intracelular en células Swan 71 estimuladas con VIP 50nM por 18h.

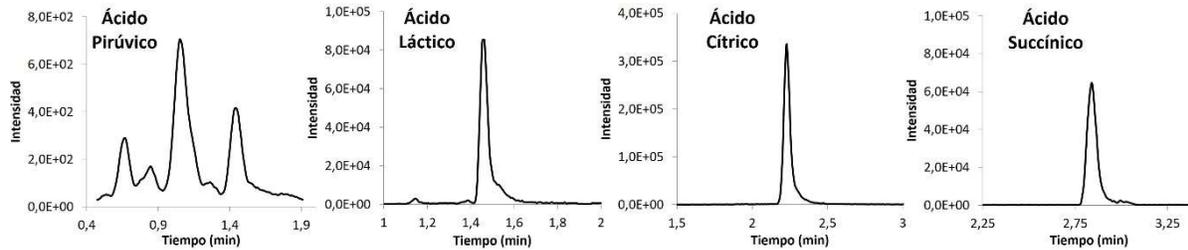


Figura 22 | Detección basal de ácido pirúvico, ácido láctico, ácido cítrico y ácido succínico en células citotrofoblásticas. Células Swan 71 fueron cultivadas en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. Se realizó la extracción de metabolitos empleando nitrógeno líquido y metanol y se realizó una cromatografía en fase reversa por UPLC-ESI-QTOF-MS permitiendo la determinación simultánea de los ácidos orgánicos, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestran ejemplos de cromatogramas extraídos de iones.

Hasta aquí, los resultados presentados indican que VIP induce una rápida incorporación y metabolismo de glucosa y aminoácidos, estimulando la migración celular a través de la glucólisis y la fosforilación oxidativa (Fig. 23).

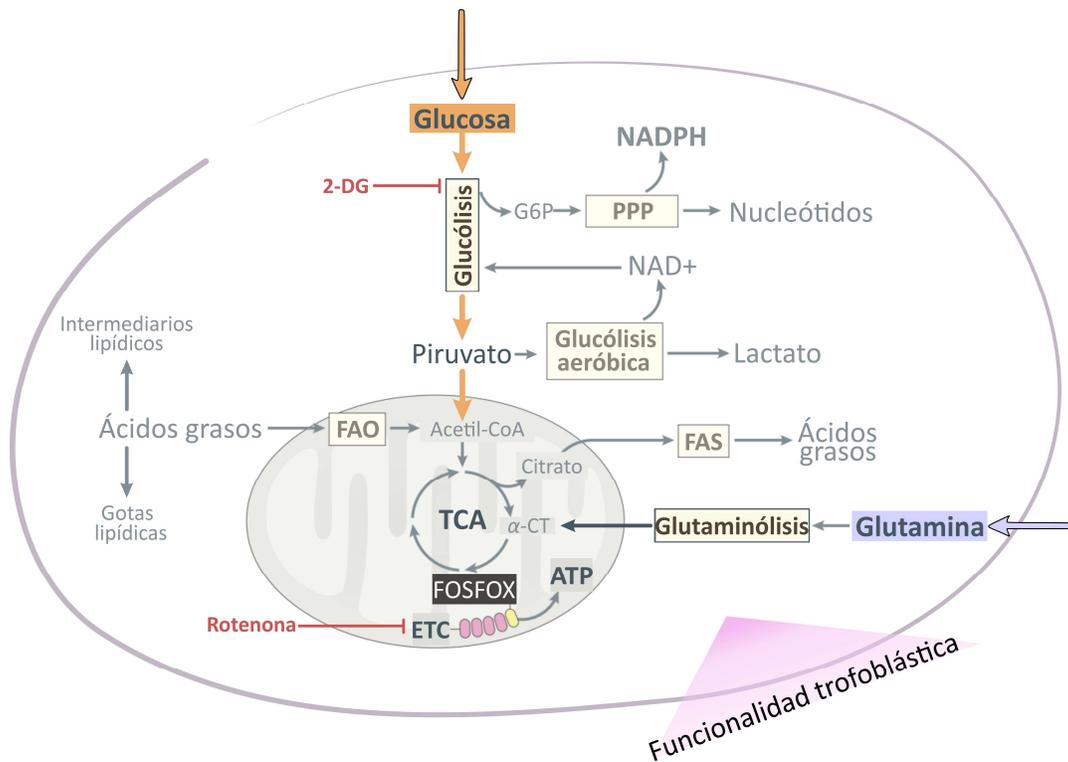


Figura 23 | Resumen de vías metabólicas implicadas en el efecto de VIP. 2-DG: 2-Deoxiglucosa, ETC: Cadena de transporte de electrones, FAS: Síntesis de ácidos grasos, FAO: Oxidación de ácidos grasos, FOSFOX: Fosforilación oxidativa, G6P: Glucosa-6-fosfato, PPP: Vía de las pentosas fosfato, TCA: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Modificado de Muri et al. *Nat. Rev. Imm.* (2021)⁸³.

4.1.7. VIP induce la incorporación de ácidos grasos de cadena larga, la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas y tiende a reducir los niveles de ROS celular

Las células CTB presentan altos niveles de FOSFOX⁸¹ y ésta es sostenida por sustratos provenientes tanto de la glucólisis como de la metabolización de aminoácidos y ácidos grasos por β -oxidación. Por otro lado, VIP indujo la incorporación de glucosa así como de aminoácidos en las células CTB que, además, son productoras de mediadores lipídicos como prostaglandinas, eicosanoides y tromboxanos¹⁰⁹. Sobre esta base nos preguntamos a continuación si VIP modula también el transporte de ácidos grasos de cadena larga. Para evaluar la incorporación, utilizamos el análogo de un ácido graso fluorescente de cadena larga BODIPY-FL C₁₂, que es transportado por transportadores de LCPUFAs como FATP1,2,4 que se expresan en células CTB^{107,240}. En primer lugar caracterizamos la cinética de incorporación en función de la concentración de sonda y en función del tiempo y observamos que el transporte es saturable (Fig 24A), definiendo una concentración de 5 μ M y un intervalo de 5-10min de incubación para evaluar la incorporación en presencia de los estímulos. En la Figura 24B se observa que el bloqueo de la ETC con Rotenona generó un aumento rápido que se redujo a las 24h volviendo a los niveles basales. Evaluamos entonces el transporte en presencia de VIP 50nM a distintos tiempos y observamos un aumento en la incorporación luego de 24h de estimulación (Fig. 24C).

INCORPORACIÓN DE LCFAS

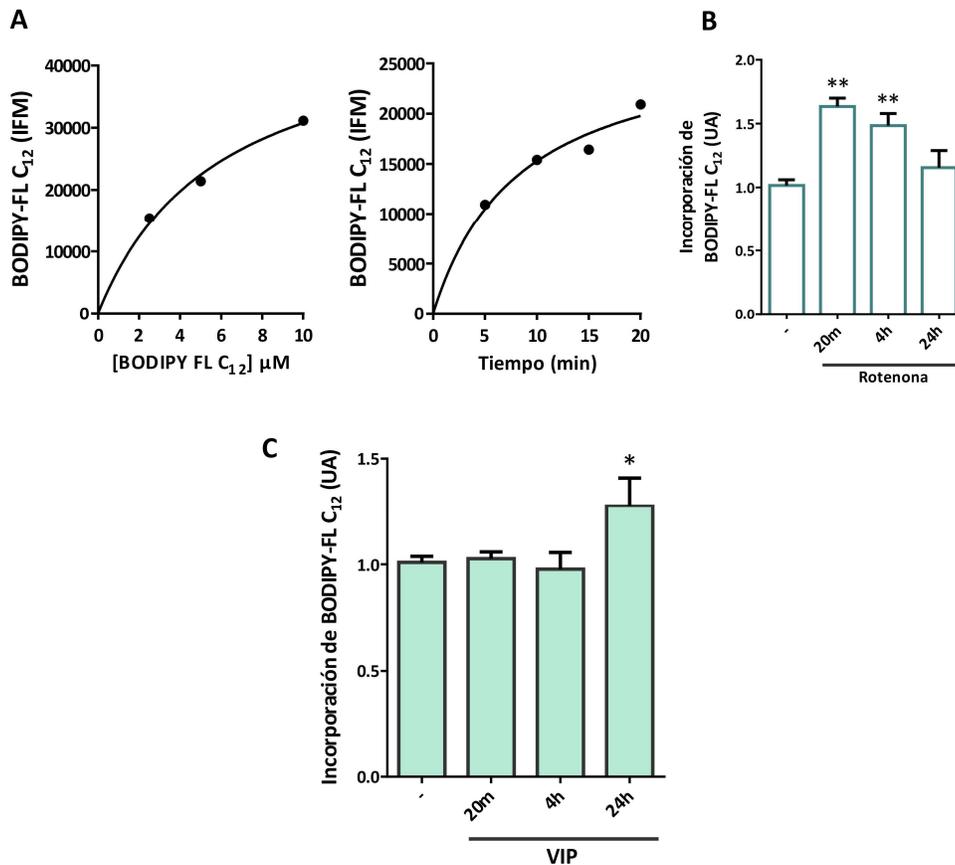


Figura 24 | VIP induce la incorporación de ácidos grasos de cadena larga en células citotrofoblásticas. Células Swan 71 fueron cultivadas en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia. Se añadió la sonda BODIPY-FL C₁₂ conjugado con BSA libre de ácidos grasos en RPMI-1640 en distintas concentraciones y por distintos tiempos, y los datos fueron adquiridos por citometría de flujo. (A) Caracterización de la incorporación de BODIPY-FL C₁₂. Los puntos son representativos de 3 experimentos diferentes. (B) Incorporación de BODIPY-FL C₁₂ en ausencia/presencia de Rotenona 100 nM por distintos tiempos (n=3). (C) Incorporación de BODIPY-FL C₁₂ en ausencia/presencia de VIP 50 nM por distintos tiempos (n=5). (C) Los resultados se expresan como Media ± E.E. ANOVA con comparaciones múltiples de Dunnett, *p<0.05, **p<0.01.

Estos resultados parecen indicar que VIP induce una rápida incorporación y metabolismo de glucosa y aminoácidos, y desencadena un posterior *switch* hacia la incorporación de ácidos grasos.

Evaluamos a continuación el efecto de VIP en la expresión de ARNm de tres transportadores principales de LCPUFAs presentes en células CTB: FATP1, FATP2 y FATP4, que en distintos modelos han presentado actividad acil-CoA sintetasa, activadora de los ácidos grasos libres al formar acil-CoAs que luego pueden ser metabolizados por distintas vías y ser oxidados por FAO o ser intermediarios y señalizadores celulares^{110,113,241-243}. La incubación con VIP 50nM aumentó la expresión de *fatp2* (Fig. 25B), uno de los transportadores con mayor expresión en cTb y que se encuentra alterada en

patologías como PE o RCF¹¹². A su vez, indujo una tendencia al aumento de *fatp4* (Fig. 25A, C), que en otros modelos se ha visto asociado a un aumento en la FAO²⁴⁴. Como se ha mencionado en la introducción, el receptor nuclear PPAR- γ regula diversos procesos celulares y principalmente la expresión de genes involucrados en el metabolismo energético y de lípidos, entre ellos los FATPs, y especialmente en células EVT su activación regula la diferenciación y su capacidad invasiva²⁴⁵. A su vez, los ácidos grasos libres son ligandos naturales de la activación de este receptor. Evaluamos entonces la expresión de ARNm de *ppar- γ* luego de la incubación con VIP 50nM por distintos tiempos y observamos que a tiempos cortos VIP tendió a aumentar su expresión, mientras que a 24h su expresión se observó reducida en concordancia con el aumento de *fatp2*²⁴⁶. El hecho de que VIP estimule la incorporación de ácidos grasos de cadena larga recién a las 24 h (Fig. 24), y de que esta modulación inversa y simultánea de la expresión de *fatp2* y PPAR- γ por VIP coincida a las 24 h (Fig. 25B, D) sugiere un mecanismo para prevenir la activación excesiva de PPAR- γ por dichos ácidos grasos libres de cadena larga.

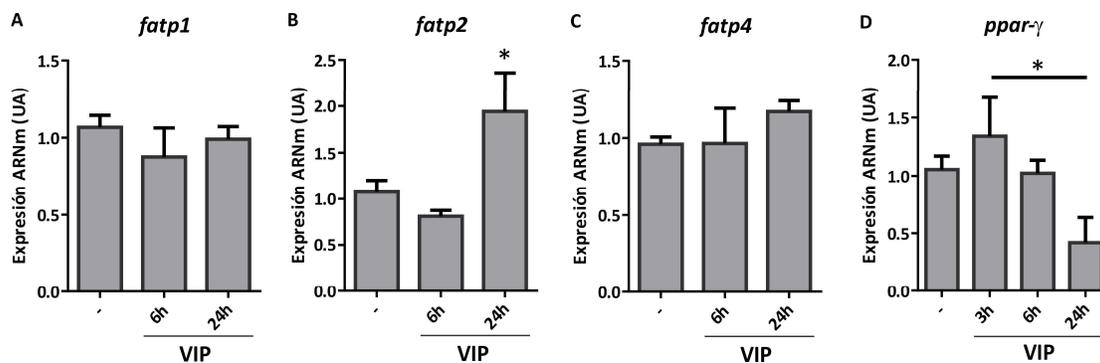


Figura 25 | Modulación de la expresión del factor de transcripción *ppar- γ* y de transportadores de LCFAs en células citotrofoblásticas estimuladas con VIP. Células Swan 71 fueron cultivadas en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia y se incubaron con VIP 50 nM en DMEM-F12 2% SFB por 6hs o 24hs. Las células se cosecharon como previamente para el análisis de ARNm por RT-qPCR de 3 transportadores de ácidos grasos de cadena larga (A) *fatp1* (n=3), (B) *fatp2* (n=3), (C) *fatp4* (n=3), y (D) el factor de transcripción *ppar- γ* (n=3), y se analizaron los resultados empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizado a la expresión de *gapdh* o *ywhaz* endógeno. Los resultados se expresan como Media \pm E.E. ANOVA con modelado de varianzas con comparaciones múltiples de LSD Fisher, *p<0.05.

Las células CTB poseen gotas lipídicas citoplasmáticas que pueden almacenarse como reserva energética^{172,247}. A continuación evaluamos si la estimulación con VIP podía no solo inducir la incorporación de ácidos grasos de cadena larga, sino también el aumento de gotas lipídicas. Para esto utilizamos la sonda BODIPY 493/503 que difunde por la membrana y se une a lípidos neutros citoplasmáticos. Observamos que VIP 50nM aumentó las gotas lipídicas a las 4h y a las 24h (Fig. 26A). Compuestos como la rapamicina que inhibe a mTOR, o medios muy restrictivos como el medio

mínimo EBBS o DMEM-F12 sin glucosa durante 4 h, indujeron la acumulación de gotas como se ha reportado previamente en otros modelos²⁴⁸ (Fig 26B).

Dado que el estrés celular, la disfuncionalidad mitocondrial, así como la alta producción de ROS también pueden inducir un aumento de las gotas lipídicas²⁴⁸, evaluamos la viabilidad mitocondrial luego de la estimulación con VIP 50nM por 4 y 24h. Utilizamos las sondas fluorescentes MitoTracker CMXRos y Mitospy green para cuantificar el potencial de membrana y la masa mitocondrial respectivamente, y evaluamos el *ratio* entre estos dos parámetros. La Figura 26C muestra que no hubo diferencias entre condiciones. Por otro lado, al forzar la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos inhibiendo la glucólisis con 2-DG, las células son capaces de adaptar su metabolismo manteniendo la funcionalidad mitocondrial. Estos resultados concuerdan con que VIP aumenta las gotas lipídicas citoplasmáticas como depósito energético y estimula la FOSFOX sin alterar la funcionalidad mitocondrial.

Nuestros resultados hasta aquí muestran que VIP estaría favoreciendo la producción de intermediarios del TCA/FOSFOX, y teniendo en cuenta que la FOSFOX es uno de los principales generadores de especies reactivas del oxígeno (ROS) celular, evaluamos luego la producción de ROS en presencia de VIP por citometría de flujo empleando la sonda DCFH-DA. En la Figura 26D se observa que VIP 50 nM tendió a reducir los niveles de ROS celular luego de 24h. Este resultado indicaría que en presencia de VIP la funcionalidad mitocondrial se encuentra optimizada, generando ATP por FOSFOX pero al mismo tiempo amortiguando el aumento de ROS.

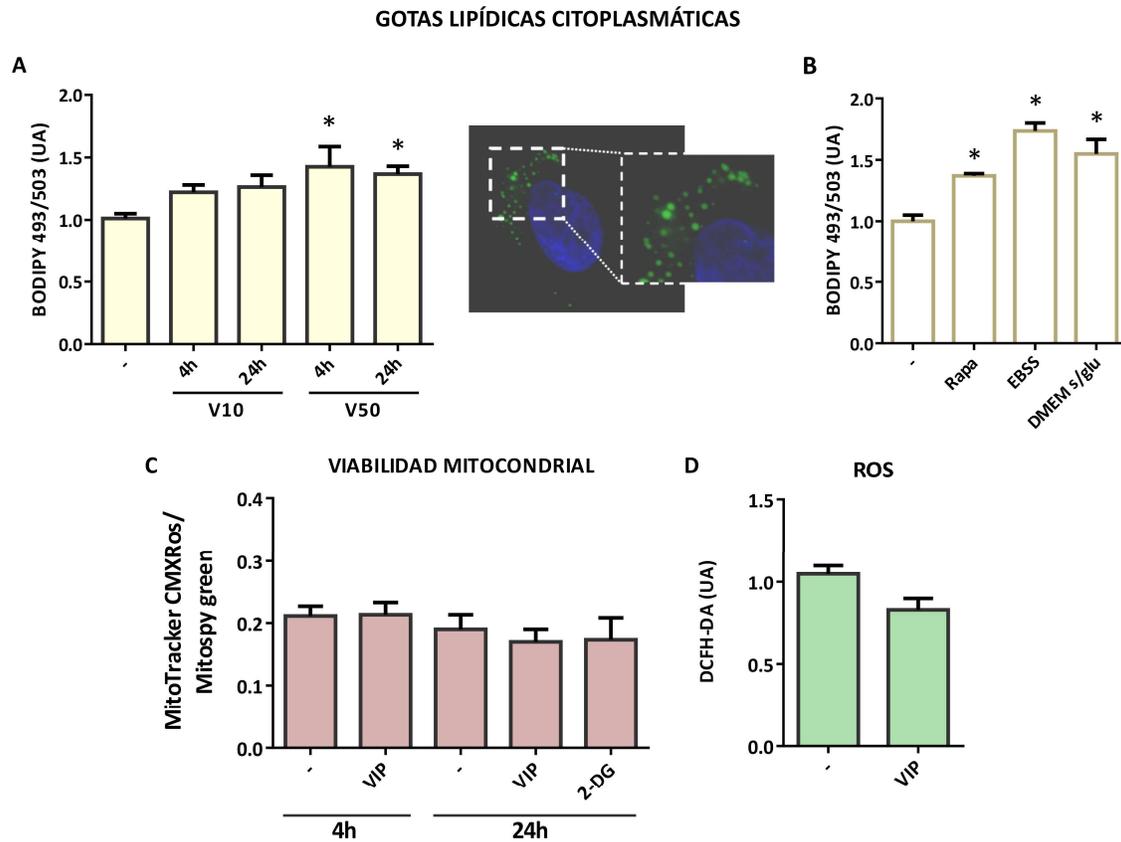


Figura 26 | VIP induce un aumento de gotas lipídicas neutras citoplasmáticas sin modificar la funcionalidad mitocondrial. Células Swan 71 fueron cultivadas en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia y se incubaron con VIP 10/50 nM o Rapamicina 100 nM en DMEM-F12 2% SFB, medio mínimo EBSS o medio DMEM-F12 sin glucosa por 4hs o 24hs. Luego fueron lavadas, y se incubaron con BODIPY 493/503 0.5 μ g/ml para cuantificar las gotas lipídicas citoplasmáticas (A, B), con MitoTracker CMXRos 250 nM (potencial de membrana mitocondrial) y MitospY green 250 nM (masa mitocondrial) para evaluar la viabilidad mitocondrial (C), o con DCFH-DA para evaluar la producción de ROS celular total (D). Los datos fueron adquiridos por citometría de flujo y en (A) se observa una microscopía de fluorescencia representativa. (A, B) Acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas (A: n=3; B: n=4). (C) Viabilidad mitocondrial expresada como el *Ratio* entre ambas sondas (n=4). (D) Producción de ROS celular total (n=3). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba t de Student o ANOVA de uno o dos factores, *p<0.05.

La Figura 27 muestra un resumen de las vías metabólicas involucradas en el efecto de VIP evaluadas hasta aquí.

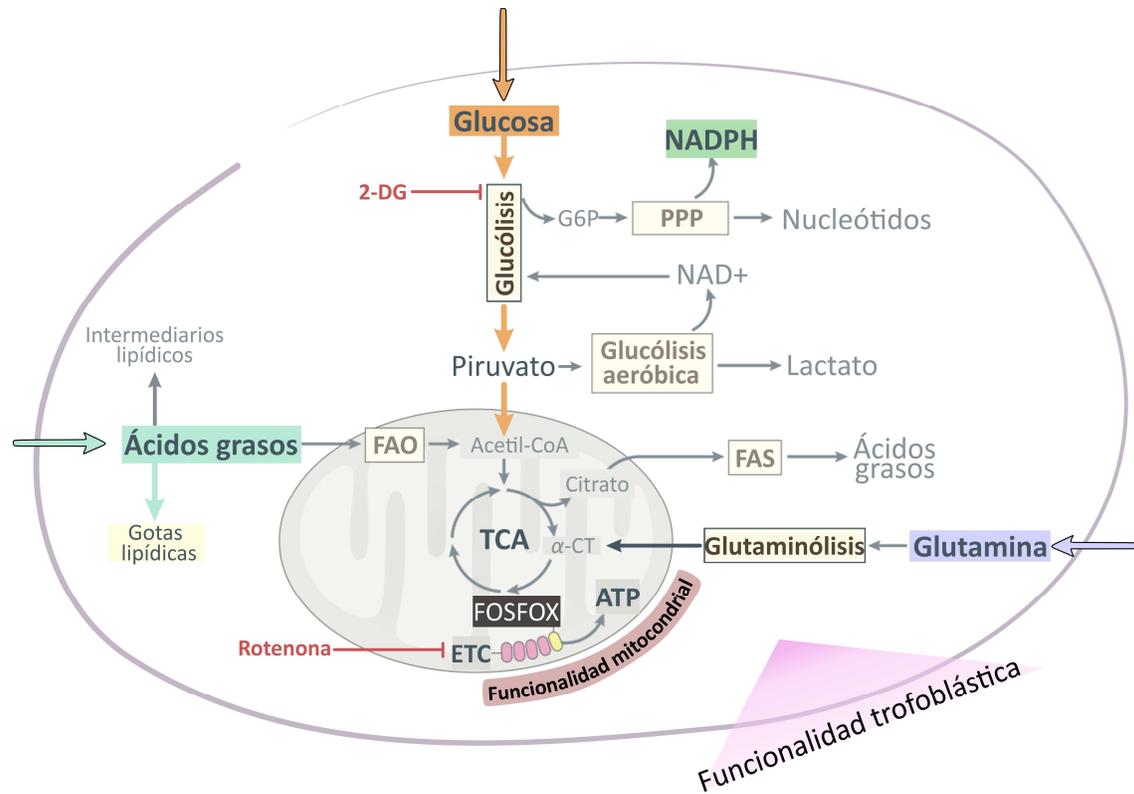


Figura 27 | Resumen de vías metabólicas implicadas en el efecto de VIP. 2-DG: 2-Deoxiglucosa, ETC: Cadena de transporte de electrones, FAS: Síntesis de ácidos grasos, FAO: Oxidación de ácidos grasos, FOSFOX: Fosforilación oxidativa, G6P: Glucosa-6-fosfato, PPP: Vía de las pentosas fosfato, TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Modificado de *Muri et al. Nat. Rev. Imm. (2021)*⁸³.

4.1.8. Perfil de respuesta citotrofoblástica en RPMI-1640 y DMEM-F12

Teniendo en cuenta que el medio de cultivo DMEM-F12 es un medio altamente enriquecido, con una alta concentración de glucosa, y contiene ácido linoleico y ácido lipoico, nos resultó relevante estudiar si frente a una alteración en la disponibilidad de nutrientes, las células CTB respondían de igual modo. Para esto, expusimos a las células al medio RPMI-1640, también enriquecido, pero que contiene menor concentración de glucosa, no contiene ácidos grasos de cadena larga y contiene glutatión reducido (Fig. 28A). En primer lugar confirmamos que no se modificó la viabilidad celular -evaluado mediante ensayo de calceína- luego de incubar a las células CTB en DMEM-F12 o RPMI-1640 10% SFB ó 2% SFB. Los porcentajes de migración evaluados en un ensayo de cierre de herida a 7h se mantuvieron similares a los porcentajes de migración en DMEM-F12. Basándonos en estos resultados, incubamos a las células por tiempos prolongados en RPMI-1640 2% SFB con VIP 50nM y repetimos los ensayos de incorporación de glucosa y ácidos grasos, evaluamos la presencia de gotas lipídicas, y evaluamos el porcentaje de cierre de herida. VIP luego de

24h en RPMI-1640 presentó los mismos efectos que en DMEM-F12, tendiendo a aumentar la incorporación de glucosa (Fig. 28B), aumentando la de ácidos grasos de cadena larga (Fig. 28C), así como las gotas lipídicas neutras citoplasmáticas (Fig. 28D). En cuanto a la funcionalidad trofoblástica, VIP también indujo la migración celular luego de 16h de incubación (Fig. 28E).

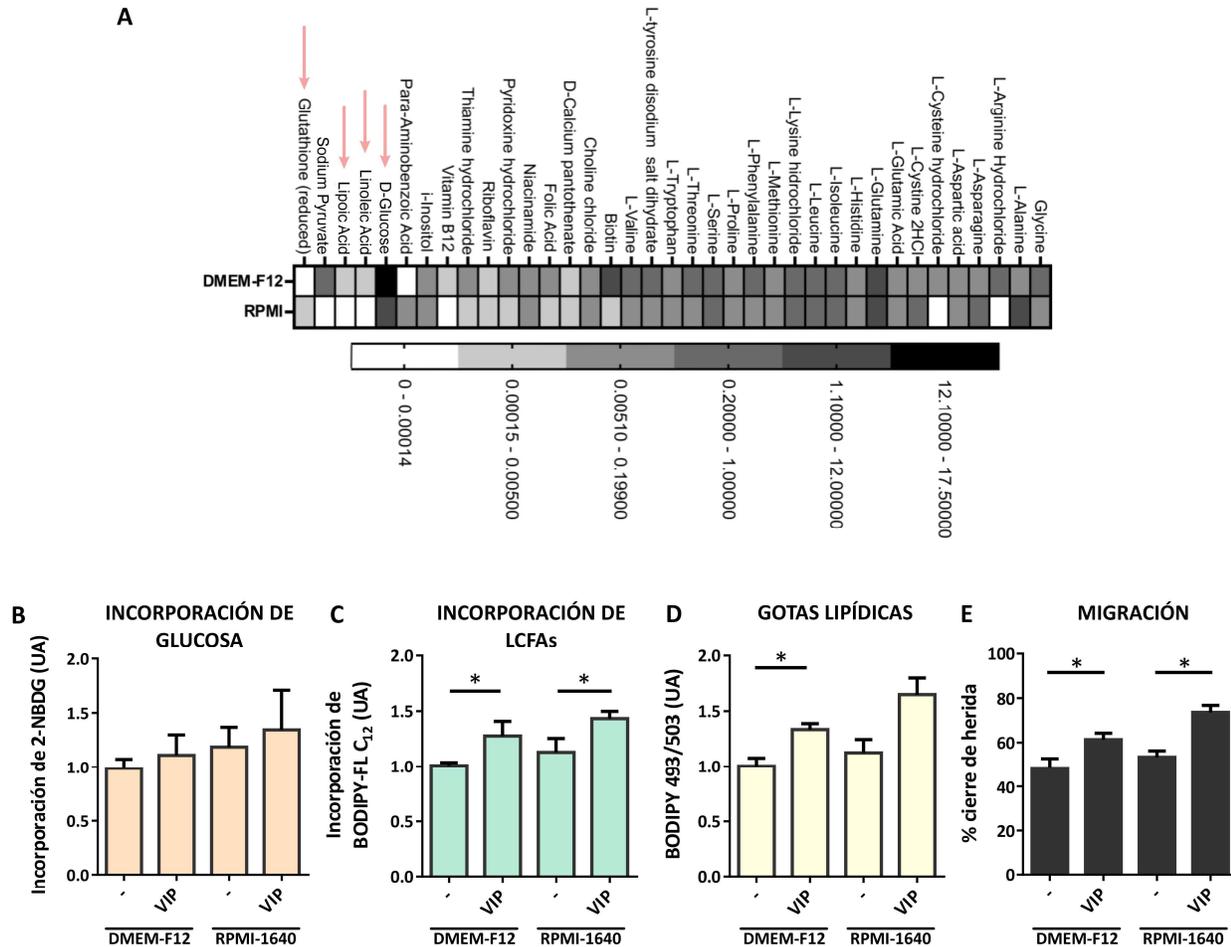


Figura 28 | Efecto de la variación en la composición nutricional del microambiente celular sobre la reprogramación metabólica inducida por VIP. Células Swan 71 fueron cultivadas en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia y el medio fue reemplazado por DMEM-F12 2% SFB o RPMI-1640 2% SFB en ausencia/presencia de VIP 50 nM durante 16 (E) o 24h (B, C, D). (A) Composición de medios DMEM-F12 y RPMI-1640. (B) Incorporación de 2-NBDG (DMEM-F12 n=3; RPMI-1640 n=3). (B) Incorporación de BODIPY-FL C₁₂ (DMEM-F12 n=5; RPMI-1640 n=3). (C) Gotas lipídicas citoplasmáticas marcadas con BODIPY 493/503 (DMEM-F12 n=3; RPMI-1640 n=2). (D) Ensayo de cierre de herida (DMEM-F12 n=5; RPMI-1640 n=3). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. ANOVA con comparaciones múltiples de Dunnett, *p<0.05.

En conjunto, estos resultados revalidan/reafirman el rol de VIP como regulador del metabolismo celular CTB, favoreciendo la obtención de sustratos energéticos que son requeridos para el propio metabolismo del citotrofoblasto de primer trimestre.

4.1.9. Efecto de VIP sobre el transporte de glucosa a través de una monocapa de células trofoblásticas

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo utilizando un modelo de gestación murina deficiente en VIP demostraron que sitios de implantación VIP+/- presentan fetos de menor peso para la edad gestacional sin cambios en pesos de las placentas a dg 14.5, sugiriendo un rol relevante de VIP endógeno en el crecimiento fetal³². Los resultados hasta aquí presentados muestran que VIP promueve la incorporación de nutrientes y modula el metabolismo de las células derivadas de citotrofoblasto humano de primer trimestre, favoreciendo funciones celulares como la migración. Teniendo en cuenta los antecedentes que muestran el rol embriotrófico de VIP y su participación en el desarrollo neuronal en modelos murinos, y más recientemente su rol en la placentación³², y habiendo observado en esta Tesis que VIP modula el metabolismo de células BeWo derivadas de citotrofoblasto humano -similares a CTBv y con capacidad de sincicializar-, nos preguntamos a continuación si VIP se encontraba también involucrado en la modulación del transporte de nutrientes a través de la placenta. Como primera aproximación, realizamos un ensayo de transporte transcelular de glucosa *in vitro* a través de una monocapa de células BeWo en presencia de VIP exógeno 50nM. Para esto utilizamos un sistema de *transwells* con un compartimento donador conteniendo medio de cultivo con 5mM glucosa y un compartimento aceptor libre de glucosa, de modo que ésta es transferida a través de la monocapa celular. Incubamos a las células en ausencia/presencia de VIP y del inhibidor del transporte Floretin, y evaluamos la concentración de glucosa en el compartimento aceptor en función del tiempo. Observamos que en presencia de VIP, las células tendieron a incorporar y transferir mayor cantidad de glucosa (Fig. 29), sugiriendo que VIP estaría involucrado no solo en la incorporación de nutrientes y el metabolismo de la propia célula citotrofoblástica, sino también en la incorporación y estimulación del transporte hacia el feto a través del trofoblasto veloso.

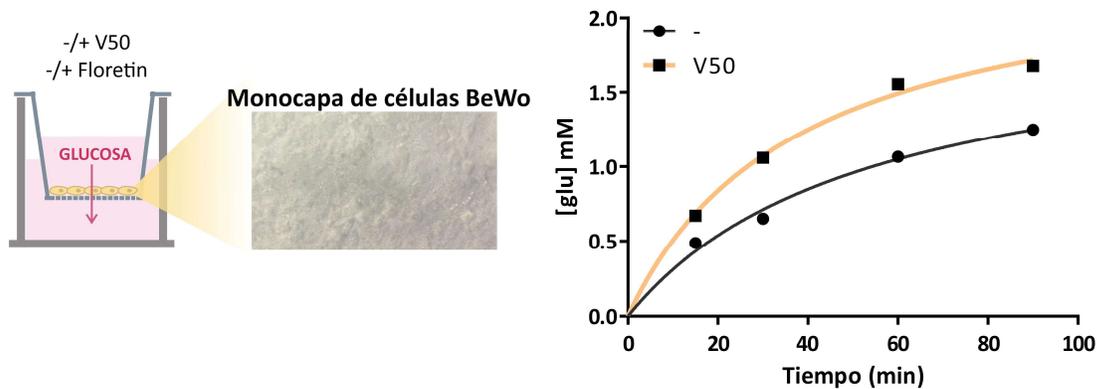


Figura 29 | VIP estimula el transporte transcelular de glucosa a través de una monocapa de células BeWo en un sistema *in vitro* de transwells. Células BeWo fueron sembradas en DMEM-F12 10% SFB sobre *transwells* de 0,4 μm hasta confluencia. Se reemplazó el medio de los compartimentos donador y receptor por buffer salino EBSS en ausencia/presencia de VIP 50 nM por 15 min y luego se añadió glucosa en el compartimento donador (5 mM) (t_0). Se tomaron alícuotas del compartimento receptor a distintos tiempos (0-90 min) y la concentración de glucosa se determinó utilizando un kit colorimétrico realizando una curva de calibración con distintas concentraciones conocidas de glucosa. Los ensayos se realizaron en ausencia/presencia de Floretin 1 mM, y el transporte por difusión facilitada fue calculado como la diferencia en ausencia y presencia del inhibidor. Se muestran los resultados obtenidos de un ensayo representativo.

4.1.10. Efecto *in vivo* de VIP sobre la regulación del transporte de nutrientes a través de la placenta y su impacto sobre el crecimiento fetal

Para profundizar en el rol de VIP sobre la regulación del transporte de nutrientes a través de la placenta y su implicancia en el crecimiento fetal, estudiamos a continuación la regulación metabólica en los sitios de implantación de distintos modelos de gestación murina: gestación normal (cruza WTxWT), deficiente en VIP solo a nivel placentario/fetal (WTxKO) o deficiente a nivel placentario y materno (HT, madre heterocigota, placenta/feto de distintos genotipos).

En primer lugar investigamos el efecto de la deficiencia de VIP placentaria en un entorno materno con niveles de VIP normales, empleando el modelo murino de cruce de hembras C57BL/6 VIP+/+ con machos VIP-/- (WTxKO) (Fig. 30A). Resultados de nuestro laboratorio describieron que la haploinsuficiencia de VIP trofoblástico en este modelo resultó en una capacidad de migración e invasión reducidas, menor expresión de marcadores proangiogénicos y antiinflamatorios, con una estructura placentaria alterada³². Observamos que las cruces WTxKO también presentaron RCF a dg 17.5 (Fig. 30B), y que no hubo cambios en el peso y tamaño de la placenta (Fig. 30C)³². Esto nos planteó una nueva pregunta: si el peso fetal reducido en este modelo es consecuencia principalmente de una alteración en el metabolismo.

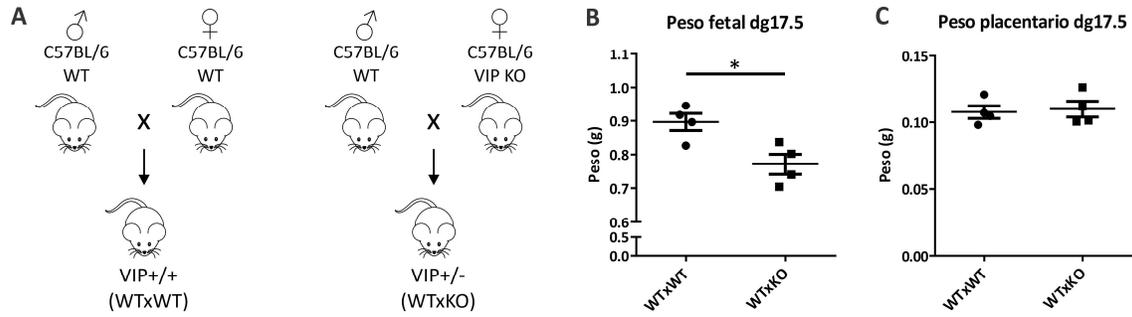


Figura 30 | Los fetos VIP+/- de cruces WTxKO presentan menor peso al dg17.5 sin cambios en el peso de la placenta. (A) Modelo de cruces empleadas. Tanto las crías como las placentas tienen el genotipo indicado en cada caso. (B, C) Peso de las placentas y fetos en cruces WTxWT y WTxKO al dg17.5. Los valores de las placentas y los fetos de cada camada fueron promediados y cada punto representa la media de la camada (n=4 hembras preñadas en cada condición). Los resultados se expresan como Media ± E.E. Prueba t de Student, *p<0.05.

Para explorar los posibles mecanismos metabólicos que se activan frente a la deficiencia de VIP en los sitios de implantación y que resultan en un menor peso fetal, en primer lugar, realizamos ensayos *ex vivo* tratando explantos de placentas murinas con un antagonista específico de los receptores de VIP, H-9935 híbrido de neurotensina 6-11-VIP7-28 (antVIP). Este abordaje nos permitió evaluar el efecto de VIP endógeno sobre la incorporación de glucosa por la placenta en condiciones controladas *ex vivo*. Para ello obtuvimos sitios de implantación de cruces VIP+/+ C57BL/6 a dg 14.5 y 17.5, se diseccionaron los fetos del tejido uterino y se separaron las placentas (Fig. 31A). Cada placenta se lavó exhaustivamente y se dividió en cuatro explantos similares, que fueron pesados y luego incubados en ausencia/presencia de distintas concentraciones de antagonista de VIP durante 1h. Luego se cuantificó la incorporación de glucosa por incorporación de 2-NBDG y la actividad del Sistema A de transporte de aminoácidos por incorporación de ¹⁴C-MeAIB como se describe en detalle en Materiales y Métodos. Se observa en la Figura 31 que la incubación con 100nM de antVIP redujo la incorporación de 2-NBDG al dg 14.5 (Fig. 31B) así como la incorporación de ¹⁴C-MeAIB al dg 17.5 (Fig. 31C), indicando que la señalización mediada por VIP endógeno es necesaria para mantener la incorporación de glucosa y aminoácidos neutros acoplados a Na⁺ en la placenta. El tratamiento con 50nM de antVIP también redujo la incorporación de 2-NBDG aunque este cambio no fue significativo (Figura 31B).

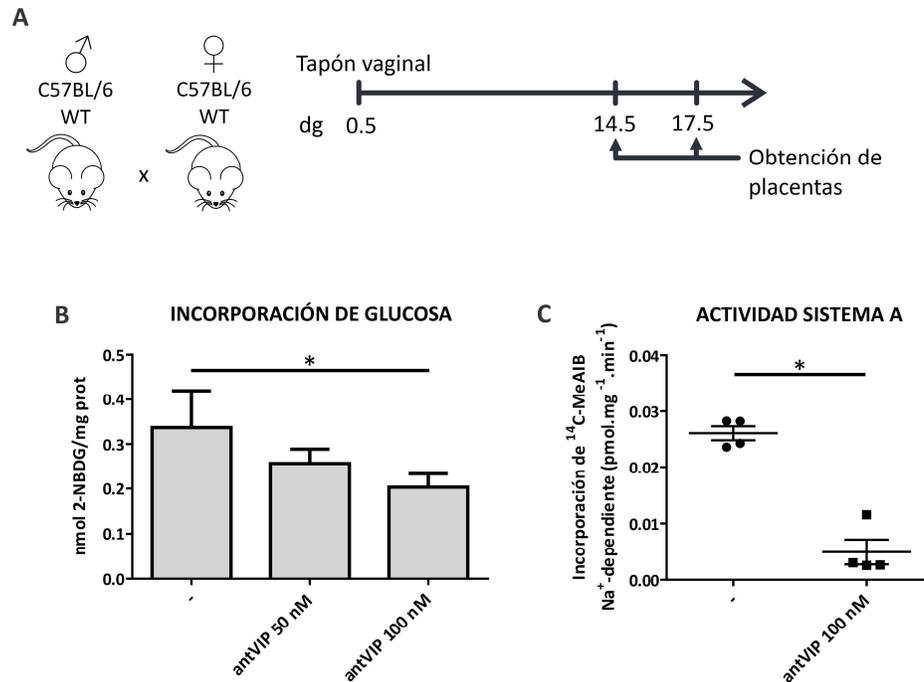


Figura 31 | El antagonista de receptores VPAC disminuye la incorporación de glucosa y la actividad del sistema A en explantos de placentas VIP+/+. (A) Esquema de trabajo. (B, C) Explantos de placentas VIP+/+ fueron incubados en DMEM-F12 2% SFB en ausencia/presencia de antagonista de receptores de VIP (antVIP) por 1h. Para evaluar la incorporación de glucosa, cada explanto fue incubado con 2-NBDG 200 μ M por 10min, se procesó en homogeneizador UltraTurrax en buffer de lisis RIPA, se centrifugó y la fluorescencia en el sobrenadante fue cuantificada en fluorímetro (n=3). Para evaluar la actividad del Sistema A, cada explanto se incubó con ¹⁴C-MeAIB en buffer Tyrode con/sin Na⁺ por 30min, las células fueron lisadas en H₂O_a y se realizó la medición en contador de centelleo. Los resultados se expresan como la diferencia entre la incorporación con/sin Na⁺, en pmol ¹⁴C-MeAIB.mg plac⁻¹.min⁻¹ (n = 4). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba de Friedman o Mann Whitney, *p<0.05.

Teniendo en cuenta que el antVIP bloqueó la incorporación de glucosa en explantos *ex vivo*, y que este sustrato es una de las principales fuentes de energía para el crecimiento fetal, exploramos a continuación el rol de VIP endógeno *in vivo* en la regulación del metabolismo de la placenta, la incorporación de glucosa y el transporte transplacentario hacia el feto por incorporación de la sonda 2-NBDG en este modelo *in vivo*. Para esto, hembras WT C57BL/6 fueron apareadas con machos VIP KO y al dg17.5 se les inyectó i.p. un bolo de 3 mM de 2-NBDG en solución salina (Fig, 32A). Luego de 90min se obtuvieron las placentas y los fetos, y se cuantificó la fluorescencia en los distintos tejidos. Para calcular la incorporación de glucosa por la placenta y el transporte transplacentario hacia el feto, definimos los parámetros que se muestran en la Figura 32B. Teniendo en cuenta que la sonda fluorescente es transportada *in vivo* hacia el feto por transporte transplacentario, y que la normalización al peso fetal en este modelo no resulta adecuada dado el menor peso fetal, definimos la incorporación total de glucosa por la placenta como la suma de la

fluorescencia de 2-NBDG medida en la placenta y el feto normalizado al peso de la placenta ((nmol de 2-NBDG en placenta + nmol de 2-NBDG en feto)/g de placenta), mientras que la fluorescencia determinada en la placenta sola representa la cantidad de 2-NBDG que fue incorporada por la placenta pero no fue transportada hacia el feto (nmol 2-NBDG placenta/g placenta). El transporte transplacentario se calculó como la fluorescencia determinada en el feto normalizado al peso de la placenta (nmol 2-NBDG feto/g placenta). La incorporación de glucosa fetal neta se calculó como nmol de 2-NBDG feto/g de feto.

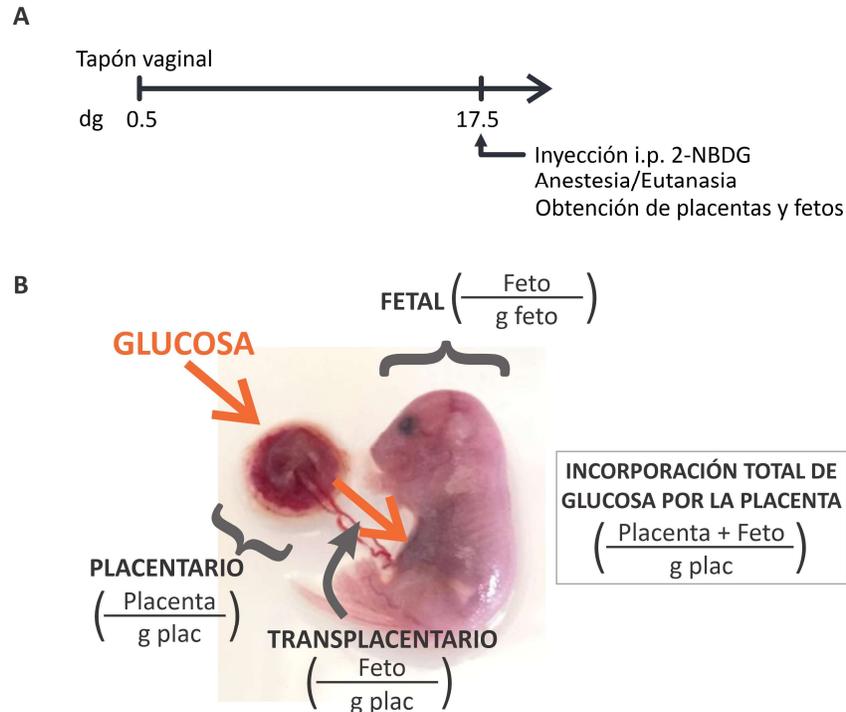


Figura 32 | Esquemas de trabajo en modelos *in vivo* y análisis de los datos obtenidos. (A) Esquema de trabajo. (B) Cálculos utilizados para cuantificar el transporte de glucosa.

Contrario a lo que esperábamos, en los sitios de implantación WTxKO respecto a los WTxWT observamos un mayor contenido de glucosa en las placentas (Fig. 33A) y una tendencia al aumento en la incorporación total de glucosa (Fig. 33B). El hecho de que el aumento en aproximadamente 40% haya sido similar para la placenta sola y para la incorporación total, sugiere que este aumento estaría causado principalmente por una mayor incorporación en la placenta. De hecho, al evaluar el transporte transplacentario evaluado en función del peso de la placenta (Fig. 33C) se observa una tendencia al aumento similar, y como era esperable, esta diferencia se hace más evidente cuando es normalizado al peso fetal (Fig. 33D).

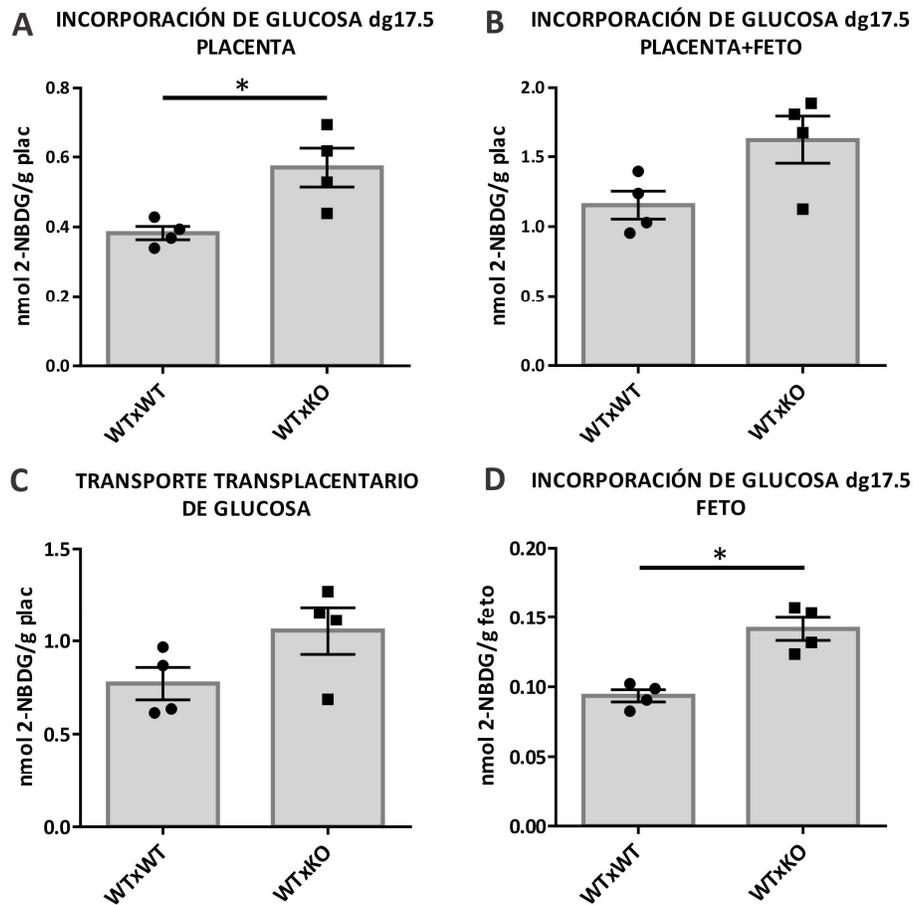


Figura 33 | Las placentas VIP^{+/-} de cruces WTxKO presentan mayor incorporación de glucosa respecto a placentas *wild type*. Hembras WT preñadas fueron inyectadas intraperitonealmente en el dg17.5 con un bolo de 3mM de 2-NBDG. Luego de 90min, placentas y fetos fueron obtenidos y la fluorescencia fue cuantificada como se describe en Materiales y Métodos. Los valores de las placentas y los fetos de cada camada fueron promediados y cada punto representa la media de la camada (n=4 hembras preñadas en cada condición). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn's (ver Materiales y Métodos). *p<0.05

Como hemos mostrado previamente en modelos *in vitro* con células humanas, VIP presenta una regulación cruzada con el sensor de nutrientes mTOR. Para evaluar si la incorporación aumentada de glucosa podía deberse a una regulación alterada de genes como mTOR o los transportadores GLUT en sitios de implantación VIP^{+/-}, placentas y fetos de cruces WTxKO fueron obtenidos en dg14.5 y se procesaron para obtener ARNm. En línea con el aumento en la incorporación de glucosa, observamos un aumento en la expresión de *glut1* tanto en las placentas como en los fetos VIP^{+/-} (Fig. 34). Observamos que mTOR también se encontraba aumentado en ambos tejidos, aunque las diferencias solo fueron estadísticamente significativas en los fetos. Teniendo en cuenta que la deficiencia de VIP en células trofoblásticas humanas *in vitro* (Fig. 17) como el antagonismo del efecto de VIP en placentas murinas *ex vivo* (Fig. 31) produjo una disminución de la expresión y actividad de los transportadores, el aumento en la expresión de *glut1* observado *in*

vivo sugiere la activación de mecanismos compensadores en los sitios VIP+/- balanceando la pérdida de peso fetal que se observa en el modelo (Fig. 30). Incluso, este aumento de la expresión y actividad de GLUT1 no pareciera alcanzar para compensar los pesos respecto a los fetos VIP+/+ y, en función de explorar qué otros mecanismos podrían estar actuando en esta regulación metabólica alterada, evaluamos la expresión placentaria de varios genes involucrados en el metabolismo y crecimiento fetal como el factor de crecimiento *igf1l*, el receptor de leptina (*lepR*), el transportador del sistema A de transporte de aminoácidos *snat2*, el receptor *fat/cd36* y la proteína transportadora *fabp4* asociados ambos al metabolismo de ácidos grasos, y el receptor celular de la proteína de unión a retinol *stra6*. No encontramos diferencias significativas en ninguno de los genes evaluados, si bien se observó una tendencia a la disminución en *igf1l* y en *lepR* (Fig. 34).

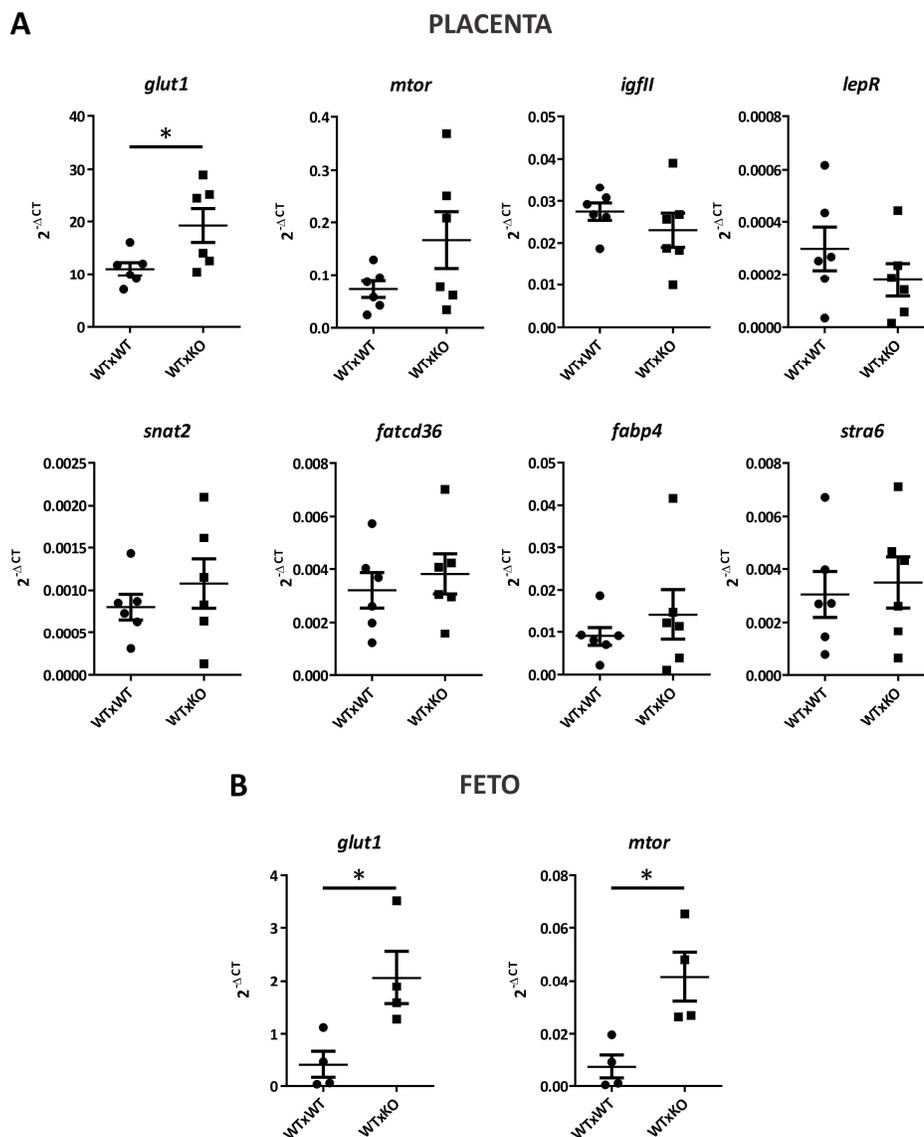


Figura 34 | La deficiencia de VIP en el sitio de implantación induce cambios en la expresión de genes asociados al transporte de nutrientes. Placentas de cruza VIP WTxWT y VIP WTxKO se obtuvieron en dg14.5.

Los niveles de ARNm se evaluaron mediante RT-qPCR como se describe en Materiales y Métodos. Los datos se analizaron empleando el método $2^{-\Delta CT}$, y relativizando a la expresión de *gapdh* o *s29*. Los valores de las placentas y los fetos de cada camada fueron promediados y cada punto representa la media de la camada ($n=6$ para placentas y $n=4$ para fetos). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba de Mann-Whitney, * $p < 0.05$.

En los reportes previos del modelo de hapoinsuficiencia de VIP en entornos maternos normales, que muestran que esta craza presenta una estructura placentaria alterada, menor expresión de factores proangiogénicos y antiinflamatorios y menor reclutamiento de células Treg, hemos demostrado que una inyección de VIP al dg6.5 restableció el peso fetal³². En este modelo, pudimos evaluar de forma preliminar la expresión de *glut1* y *mTOR* al dg14.5 luego de la inyección de VIP en etapas tempranas. Observamos que para ambos genes y ambos tejidos, los valores disminuyeron hasta valores similares a las cruza WTxWT (Fig 35A, B), indicando que una sola inyección de VIP en una ventana de tiempo temprana es capaz de restituir la funcionalidad trofoblástica restaurando su metabolismo.

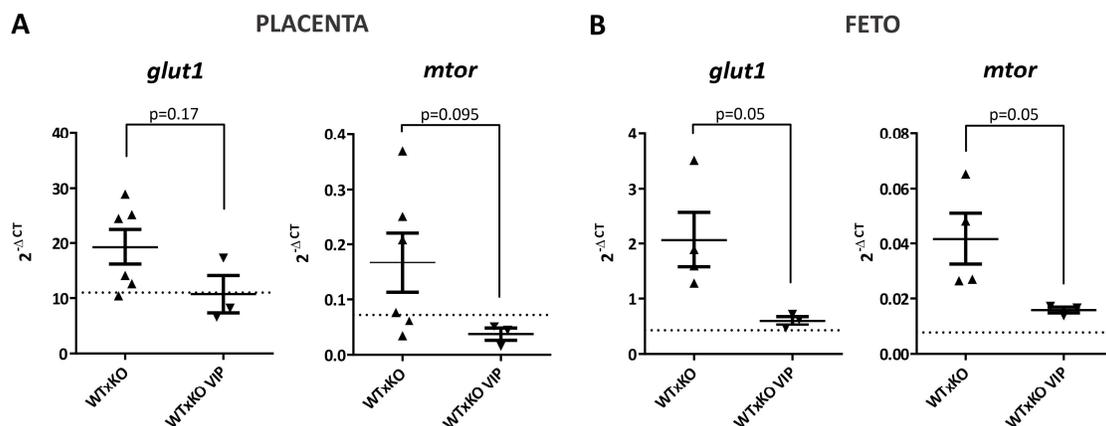


Figura 35 | La inyección de VIP al dg6.5 tiende a reestablecer la expresión de *glut1* y *mTOR* en placentas y fetos VIP+/- de cruza WTxKO. Hembras preñadas de cruza WTxKO fueron inyectadas intraperitonealmente con PBS o VIP 2 nmol/raton al dg6.5. Las placentas y fetos se obtuvieron en dg14.5 y se procesaron para la cuantificación de ARNm mediante RT-qPCR como previamente. La línea punteada representa la media para placentas y fetos de cruza WTxWT. Los valores de las placentas y los fetos de cada camada fueron promediados y cada punto representa la media de la camada de al menos 3 ratones. Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba de Mann-Whitney.

Los resultados hasta aquí reportados muestran que en un ambiente materno con niveles normales de VIP, la deficiencia trofoblástica/fetal resulta en una incorporación aumentada de glucosa por la placenta que no parecería llegar a compensar las demandas fetales para suplir la restricción en el crecimiento. Como hemos mencionado previamente, el VIP presente en la interfase

materno-fetal no solo es sintetizado y liberado por las células trofoblásticas, sino que la producción de VIP es también materna^{204,249}. Nuestra siguiente pregunta entonces fue si la deficiencia materna de VIP estaba también implicada en adaptaciones metabólicas de placentas y fetos. Para esto, realizamos cruzas de hembras VIP+/- con machos VIP+/- (HTxHT), y llevamos adelante el mismo ensayo de incorporación de glucosa *in vivo* descrito previamente (Fig. 36A). Este modelo nos permitió evaluar el metabolismo de la placenta para los distintos genotipos en un ambiente materno deficiente en VIP. La Figura 36B muestra que no hubo diferencias en la incorporación de glucosa entre los sitios de implantación VIP+/, VIP+/- y VIP-/- provenientes de las cruzas HTxHT, lo que nos llamó la atención teniendo en cuenta los resultados anteriores. Una posibilidad es que la deficiencia de VIP materna podría preponderar frente al posible efecto compensatorio fetal y modular el metabolismo. Para evaluar esta posibilidad, comparamos la incorporación de glucosa entre los sitios de implantación VIP+/- de las cruzas WTxKO *versus* los VIP+/- de las cruzas HTxHT, de modo de poder evaluar la contribución materna en el metabolismo de la placenta y la regulación de la incorporación de glucosa. Tanto la glucosa placentaria como la incorporación total de glucosa por la placenta se encontraron aumentadas en los sitios de implantación VIP+/- de las cruzas HTxHT en comparación con las cruzas WTxWT (Fig. 36C panel izquierdo). A su vez, se observó un aumento significativo en el transporte transplacentario de glucosa (Fig. 36C panel derecho). Estos resultados sugieren que las diferencias entre ambos aumentos compensatorios, tanto para la incorporación por la placenta como para el transporte transplacentario observados en los sitios deficientes de madres normales o VIP+/-, dependen en última instancia de los aportes de VIP materno.

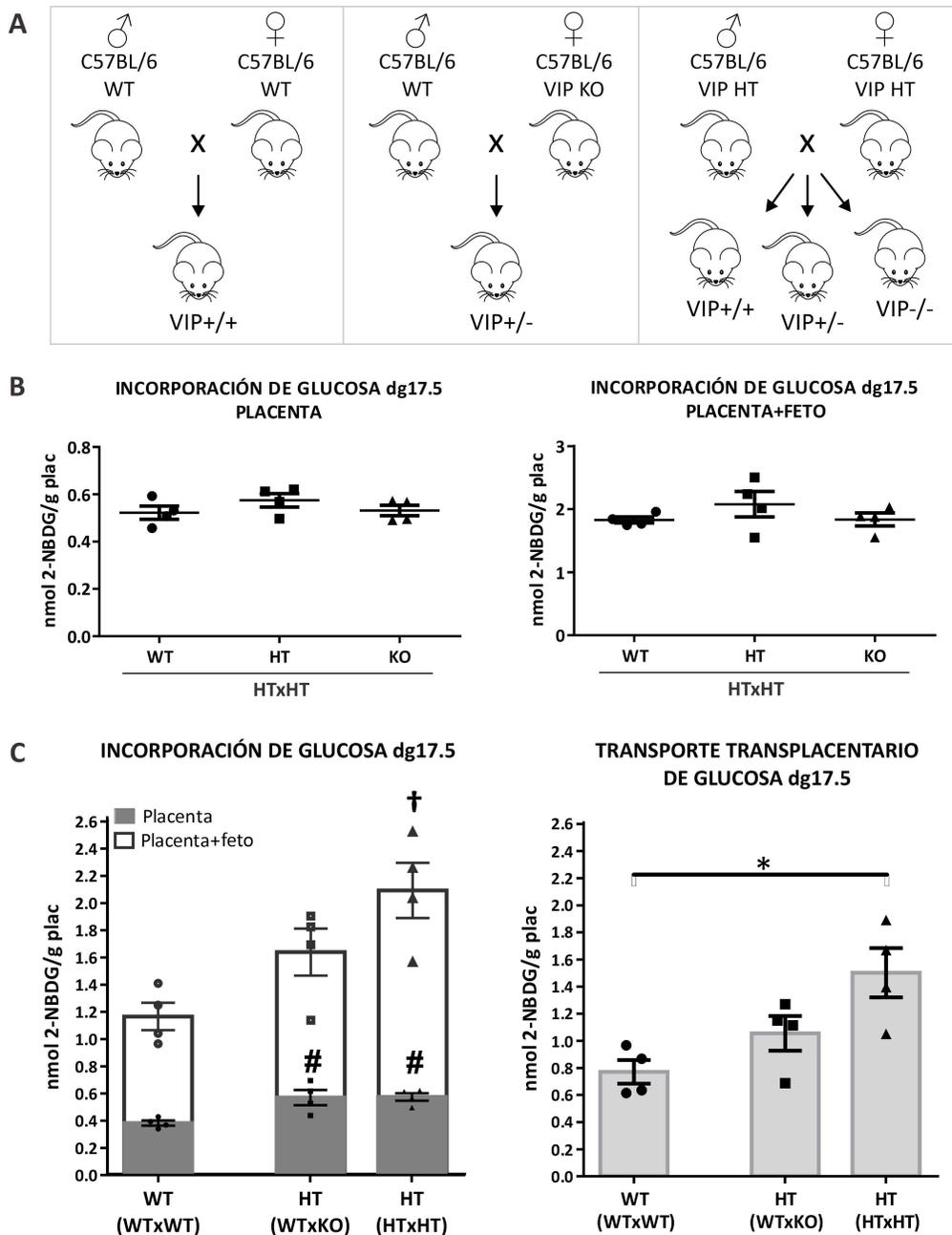


Figura 36 | Incorporación de glucosa y transporte transplacentario en sitios de implantación de cruas HTxHT. (A) Modelo de cruas empleadas. (B, C) Hembras HT preñadas fueron inyectadas con un bolo de 2-NBDG como previamente y se calculó la incorporación como se describió previamente (Fig. 32). (B) Incorporación de 2-NBDG por la placenta en los distintos genotipos de cruas HTxHT. (C) Incorporación de glucosa en sitios VIP+/- provenientes de las distintas cruas. Los valores de las placentas y los fetos de cada camada fueron promediados y cada punto representa la media de la camada (n=4 hembras preñadas en cada condición). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn's. Panel izquierdo: #p<0.05 vs. WTxWT para incorporación de la placenta, †p<0.05 vs. WTxWT para incorporación total placenta+feto. Panel Derecho: *p<0.05.

Considerando que previamente se han reportado retrasos en el desarrollo en la descendencia HTxHT luego del nacimiento²⁰⁹, y que en este trabajo observamos alteraciones metabólicas en los sitios de implantación de cruza HTxHT aún más pronunciadas que en los sitios WTxKO, a continuación evaluamos si en las cruza HTxHT los distintos genotipos presentaban alteraciones en el peso fetal. La Figura 37A muestra que las hembras VIP+/- al dg17.5 no presentan diferencias en el peso respecto a las hembras VIP+/. Más aún, observamos que las placentas y fetos VIP+/, VIP+/- and VIP-/- de las cruza HTxHT no presentaron pesos diferentes entre ellos ni en comparación con los WTxWT (línea punteada) (Fig. 37C).

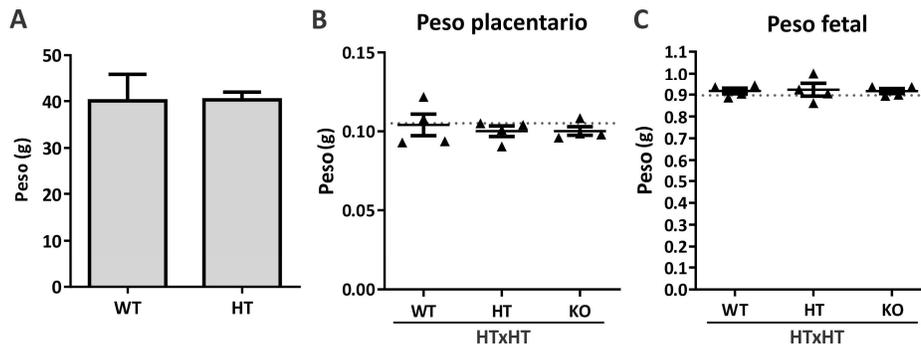


Figura 37 | Los pesos de placentas y fetos VIP+/, VIP+/- y VIP-/- de las cruza HTxHT no difieren de las cruza WTxWT. (A) Peso de hembras al dg17.5 de al menos 4 hembras preñadas. (B, C) Peso de placentas y fetos de sitios de implantación VIP+/, VIP+/- y VIP-/- de embarazos VIP HTxHT. La línea punteada representa el peso VIP+/- en embarazos WTxWT. Los valores de las placentas y los fetos de cada camada fueron promediados y cada punto representa la media de la camada (n=4 hembras preñadas en cada condición). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba t de Student o ANOVA con comparaciones múltiples de Tukey.

Estos resultados *in vivo* en modelos murinos muestran que la deficiencia de VIP resulta en adaptaciones en la placenta incrementando la incorporación de la glucosa y el transporte hacia el feto, siendo los efectos maternos prevalentes sobre la deficiencia de VIP fetal en tales mecanismos compensatorios.

4.2. CAPÍTULO II
INTERACCIÓN INMUNE-
TROFOBLÁSTICA

Como se ha mencionado en la introducción, el útero gestante tiene características singulares desde el punto de vista inmunológico: en un período de unas pocas semanas tiene lugar una extendida remodelación tisular con abundante infiltración leucocitaria sin pérdida de la homeostasis, y las células citotrofoblásticas funcionan como articuladoras de la inmuno-cooperación materno-fetal para mantener esta homeostasis.

El metabolismo de los macrófagos se encuentra estrechamente relacionado con su activación y su perfil efector, y aún no hay reportes que vinculen el metabolismo de cTb-MØ en el diálogo. Cada programa metabólico y la consecuente adquisición de su fenotipo funcional son específicos en cada contexto, por lo que nos resultó de particular interés estudiar los mecanismos de reprogramación metabólica que intervienen en esta interacción. Para ello, nuestro siguiente objetivo fue evaluar la reprogramación metabólica de monocitos y macrófagos frente a células citotrofoblásticas, y la eventual regulación bidireccional del metabolismo de las cTb.

Para poder evaluar la reprogramación metabólica en Mo y MØ maternos por factores liberados por las células CTB, éstos fueron expuestos a medios condicionados (MC) de células CTB (MC-Tb), obtenidos por cultivo de células Swan 71 o HTR-8 en RPMI-1640 2% SFB, que como mostramos en la Figura 28 se comportan de manera similar a las células incubadas en DMEM-F12 2% SFB. Los Mo fueron obtenidos por siembra sobre colchón de Ficoll de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de dadoras sanas, seguido por la purificación por gradiente de Percoll. Éstos fueron utilizados para llevar a cabo los ensayos de metabolismo en Mo, o sembrados y diferenciados in vitro con M-CSF para realizar los ensayos de metabolismo en MØ, como se describe en detalle en Materiales y Métodos.

4.2.1. El medio condicionado de células citotrofoblásticas modela el perfil metabólico de monocitos CD14+

En primer lugar evaluamos la incorporación de glucosa en los Mo incubados con MC-Tb de células Swan 71, en ausencia/presencia de 100ng/ml de LPS de *E. coli*. Este estímulo proinflamatorio altamente descrito, induce la incorporación de glucosa^{136,250}, activando el receptor TLR4 -cuya activación ha sido reportada también por factores liberados en los procesos inflamatorios estériles en condiciones fisiológicas^{251,252}. Por todo lo anterior, nos resultó un estímulo adecuado que nos permitió desafiar a los Mo luego de la pre-incubación con MC-Tb para evaluar posibles rearrreglos metabólicos, como se ha reportado previamente para ensayos funcionales^{70,253,254}.

Para poder explorar la modulación rápida del metabolismo glucolítico, los Mo se incubaron con anticuerpo anti-CD14, se expusieron a los estímulos por 20min, y se evaluó la incorporación de

glucosa por incorporación de la sonda 2-NBDG como previamente. Inicialmente observamos que todas las células CD14+ incorporaron la sonda. En estas células doble positivas distinguimos dos poblaciones, una de mayor incorporación que la otra (Fig. 38A). El porcentaje de células de la población con mayor incorporación no difirió entre los Mo sin tratar y los tratados con MC-Tb (Fig. 38B). El LPS indujo un aumento en dicho porcentaje como esperábamos, y observamos que este aumento fue bloqueado por la pre-incubación con MC-Tb (Fig. 38B panel izquierdo). Este resultado fue confirmado repitiendo el ensayo en presencia del MC-Tb de la línea celular HTR-8 (Fig 38B panel derecho). Para poder evaluar si este efecto rápido de bloqueo se sostenía en el tiempo, los Mo fueron adheridos e incubados por 18h en las mismas condiciones y se repitió el ensayo de incorporación. Luego de 18h observamos una sola población que se distribuyó homogéneamente (Fig. 38C), que en presencia del MC-Tb los Mo tendieron a incorporar más glucosa, y que al igual que lo observado a tiempo corto, el MC-Tb bloqueó el aumento inducido por LPS (Fig 38D). La Figura 38E muestra la expresión de ARNm de GLUT1, el principal transportador de glucosa en monocitos cuya expresión tiende a aumentar por LPS, pero esta no disminuye cuando se preincuba con el MC-Tb, sugiriendo que el bloqueo observado en la incorporación a las 18 h (Fig. 38D) no estaría relacionado con menor expresión del transportador.

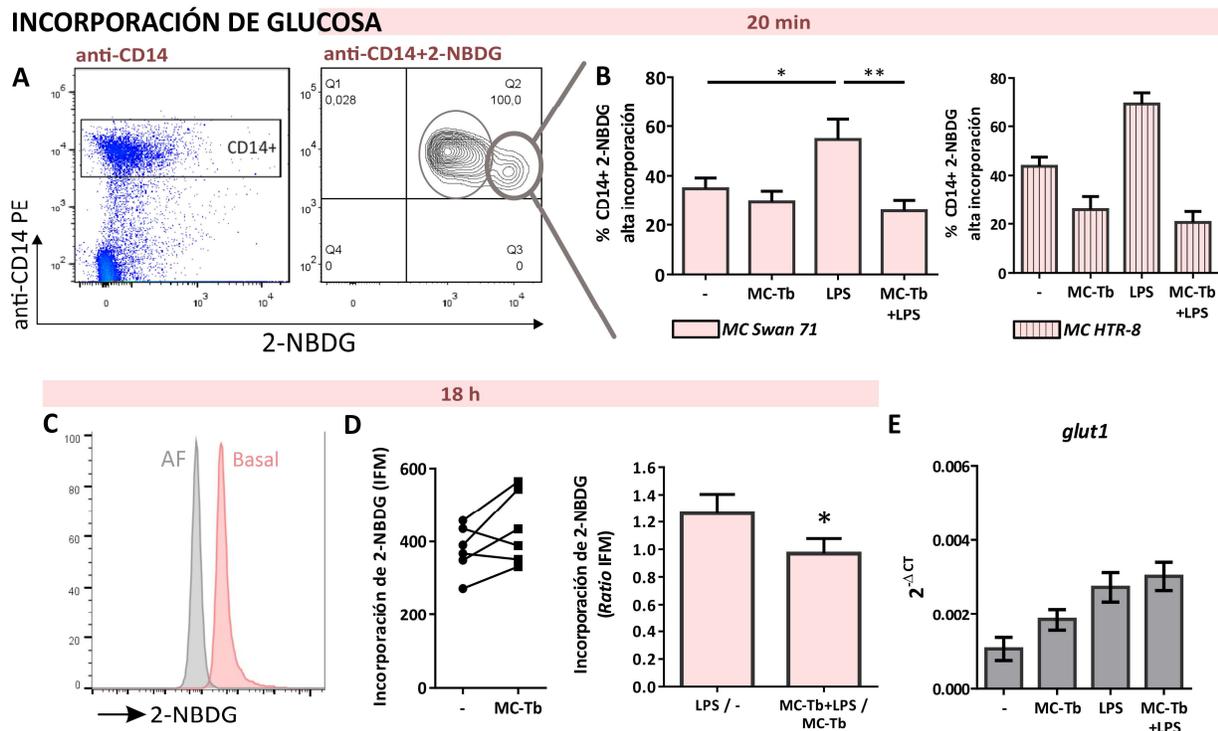


Figura 38 | El medio condicionado de las células citotrofoblásticas modula la incorporación de glucosa en monocitos humanos CD14+. Monocitos obtenidos de sangre periférica por purificación por Ficoll y Percoll fueron incubados por 20min (A, B) o 18hs (C, D, E) con MC-Tb (Swan 71 o HTR-8), LPS *E. Coli* 100ng/ml (LPS) o MC-Tb+LPS. Los monocitos fueron incubados con anti-CD14 antes o después de los estímulos para 20min o 18h respectivamente. Se añadió 2-NBDG 100 μ M por 5min y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo.

(A) *Dot plot* y *plot* de densidad de las poblaciones de monocitos, representativos de autofluorescencia e incorporación basal respectivamente. (B) Porcentaje de células de alta incorporación luego de 20min de estimulación. MC-Tb de líneas celulares Swan 71 (n=12) y HTR-8 (n=2). (C) Histograma representativo de la incorporación a 18hs. (D) Incorporación Basal vs. MC-Tb y relación en la incorporación de glucosa de LPS vs. Basal y MC-Tb+LPS vs. MC-Tb para MC de la línea Swan 71 (n=6). (E) Expresión de ARNm de *glut1* por RT-qPCR (n=2). Se analizaron los resultados empleando el método $2^{-\Delta CT}$ normalizado a la expresión del gen β -*microglobulina*. Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba t de Student o ANOVA con comparaciones múltiples de Tukey, *p<0.05, **p<0.01.

Teniendo en cuenta que los ácidos grasos cumplen un rol fundamental en la función celular de Mo/MØ, desde el aporte de energía por FAO para sostener la FOSFOX, la generación de mediadores lipídicos, así como la formación de “lipid rafts”, evaluamos a continuación la incorporación de ácidos grasos de cadena larga por incorporación de la sonda BODIPY-FL C₁₂ como previamente (Fig. 39). Observamos que todas las células CD14+ incorporan la sonda (Fig. 39A) y confirmamos que el transporte en estas células tiene una cinética compatible con la difusión facilitada por transportadores (Fig. 39B). Evaluamos en primer lugar la incorporación en los Mo incubados con el MC-Tb de células Swan 71 en ausencia/presencia de LPS a tiempos cortos y no observamos diferencias con los Mo basales (Fig. 39C). Con la misma premisa que para la incorporación de glucosa, evaluamos la incorporación luego de 18h de estimulación y observamos que el MC-Tb estimuló en aproximadamente 4 veces su incorporación (Fig. 39D). El LPS también indujo la incorporación, aunque en menor medida que el efecto observado en glucosa, y cuando los estímulos fueron añadidos en simultáneo se observó un aumento aún mayor. Este resultado también fue confirmado repitiendo el ensayo con el MC-Tb de la línea celular HTR-8 (Fig. 39E). Teniendo en cuenta la diversidad de funciones de estos ácidos grasos en los distintos perfiles de Mo/MØ, los resultados previos que muestran que el MC-Tb induce un perfil funcional M2-*like*^{255,256}, y el hecho de que el aumento en la incorporación en MC-Tb+LPS fue aproximadamente la suma de ambos estímulos individuales, este resultado sugiere que los ácidos grasos incorporados en las distintas condiciones tendrían distintos destinos celulares cumpliendo diversas funciones y no solo como sustratos metabólicos. La Figura 39F muestra la expresión del ARNm del transportador de LCPUFAs FATP2 -uno de los transportadores expresados en Mo- donde se observa que el LPS indujo su aumento, sin embargo el MC-Tb no parece modular su expresión. En línea con el aumento observado en la incorporación de ácidos grasos, observamos también un aumento en las gotas lipídicas citoplasmáticas (Fig. 39G).

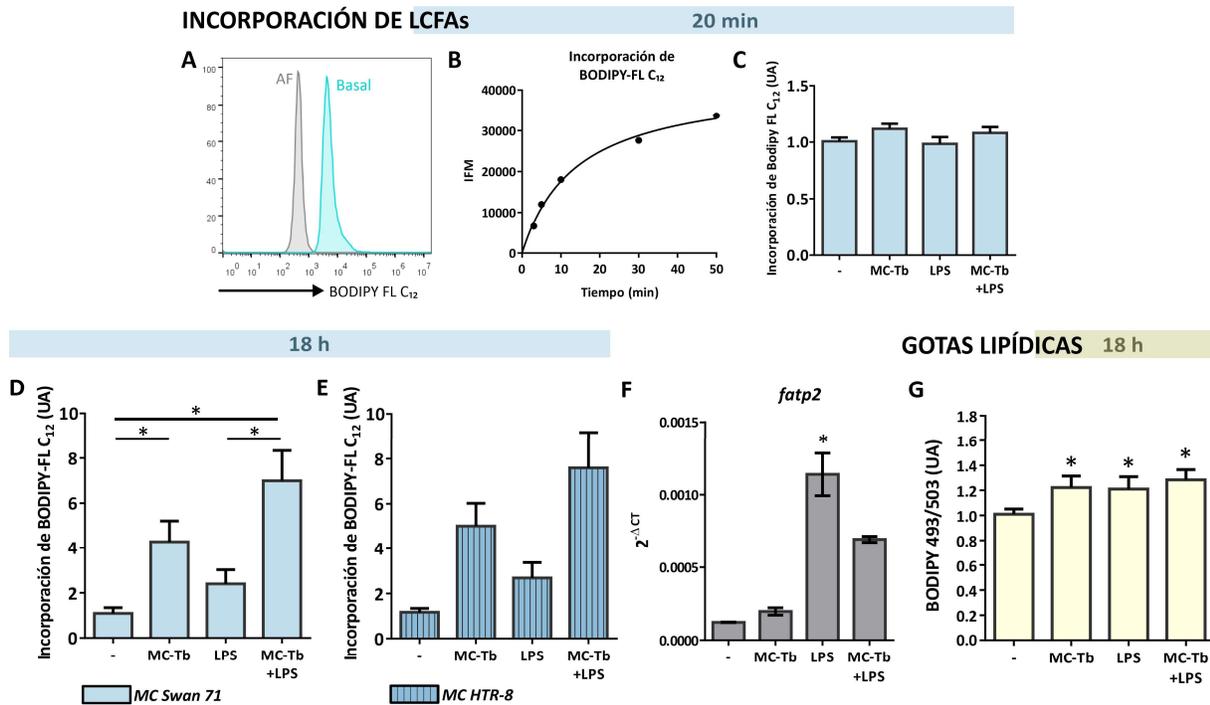


Figura 39 | El medio condicionado de las células citotrofoblásticas induce la incorporación de ácidos grasos de cadena larga e induce la acumulación de gotas lipídicas neutras citoplasmáticas en monocitos humanos CD14+. Los monocitos fueron obtenidos y tratados como previamente (Fig. 34). Se añadió BODIPY-FL C₁₂ 5 μ M por distintos tiempos (B) o 5min (C, D, E) ó BODIPY 493/503 0.5 μ g/ml por 15min (G) y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. (A) Histograma representativo de incorporación basal. (B) IFM de la incorporación de BODIPY-FL C₁₂ 5 μ M en función del tiempo. (C) Incorporación luego de 20min de estímulo para MC-Tb de la línea celular Swan 71 (n=11). (D, E) Incorporación luego de 18h de estímulo para MC-Tb de las líneas celulares Swan 71 (n=8) y HTR-8 (n=2). (F) Expresión de ARNm del transportador de LCPUFAs *fatp2* (n=3). (G) Gotas lipídicas citoplasmáticas luego de 18h de estimulación de al menos 3 ensayos independientes. Los resultados se expresan como Media \pm E.E. ANOVA sin o con modelado de varianzas con comparaciones múltiples de Tukey o LSD Fisher respectivamente, o Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn, *p<0.05.

En conjunto, estos resultados indican que factores liberados por células CTB presentes en el MC tienen un efecto *per se* sobre el metabolismo de los Mo ya que inducen su reprogramación manteniendo la incorporación de glucosa y aumentando la de ácidos grasos. Asimismo, estos factores también condicionan diferencialmente la respuesta metabólica de Mo frente a estímulos inflamatorios como el LPS, con efectos rápidos (20 min) y en programas metabólicos más largos (18 h).

4.2.2. El medio condicionado de células citotrofoblásticas modela el perfil metabólico de macrófagos CD14+

Habiendo observado que el MC-Tb modula el perfil metabólico de Mo, quisimos evaluar si estos efectos se daban en los MØ. Para esto, diferenciamos a los Mo *in vitro* por 5 días en RPMI-1640 10% SFB suplementado con M-CSF 50 ng/ml. Luego, los expusimos a los mismos estímulos por 18h: MC-Tb, LPS 100 ng/ml ó MC-Tb+LPS. En primer lugar, confirmamos que el MC-Tb tiende a aumentar la expresión de IL-10 en estos MØ (Fig 40D), y que modula el efecto del LPS en la inducción de un perfil proinflamatorio clásico, reduciendo la expresión de CD86 (Fig. 40A) y de TNF- α (Fig. 40C), y con una tendencia similar en la producción de IL-1 β (Fig 40B) que además de ser una citoquina proinflamatoria característica, también actúa como citoquina pro-implantatoria²⁵⁷.

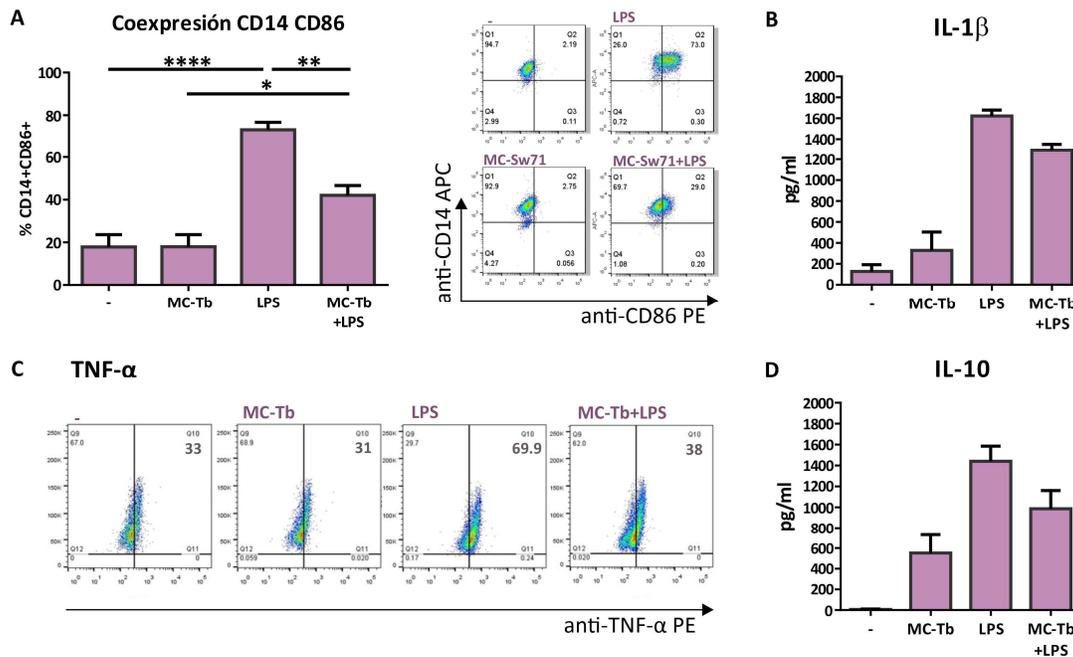


Figura 40 | El medio condicionado de células citotrofoblásticas modela el perfil funcional de macrófagos humanos. Los monocitos fueron obtenidos como previamente y diferenciados en RPMI-1640 10% SFB suplementado con M-CSF 50 ng/ml durante 5 días. A continuación, se incubaron con MC-Tb, LPS 100 ng/ml, o MC-Tb+LPS por 18hs y se analizó la expresión de CD14+CD86+ (A, n=4) y TNF- α (C) por citometría de flujo, y la producción de IL-1 β (B, n=2) e IL-10 por ELISA (D, n=2). En el panel derecho de (A) y en (C) se observan *dot plots* representativos. En (A, B, D) los resultados se expresan como Media \pm E.E. ANOVA con comparaciones múltiples de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Evaluamos a continuación el perfil metabólico de MØ en presencia de los mismos estímulos y observamos una reprogramación metabólica similar a la observada en Mo. En primer lugar el MC-Tb bloqueó la incorporación de glucosa inducida por LPS (Fig 41A,B) a 18h, y aunque a 20min los cambios no fueron significativos se observó la misma tendencia. Considerando que los MØ M1 estimulados con LPS incorporan más glucosa sosteniendo altos niveles de glucólisis²⁵⁰, evaluamos también la liberación de lactato por estos MØ. Dado que las células CTB son también productoras de lactato como mostramos previamente (Fig. 41), cuantificamos el lactato presente en el MC-Tb luego de 18h y restamos estos valores en los pocillos correspondientes al cuantificar el lactato producido por los MØ en presencia del MC-Tb (Fig. 41C). Observamos que los MØ estimulados con LPS liberaron mayor cantidad de lactato, mientras que el MC-Tb tendió a aumentarlo y la co-incubación no previno el aumento por LPS, si bien las diferentes dadoras respondieron diferencialmente en este ensayo (Fig. 41D). El MC-Tb también indujo la incorporación de ácidos grasos de cadena larga (Fig. 41E), al igual que el LPS, y en presencia de ambos estímulos se observó un efecto aditivo similar al observado en Mo.

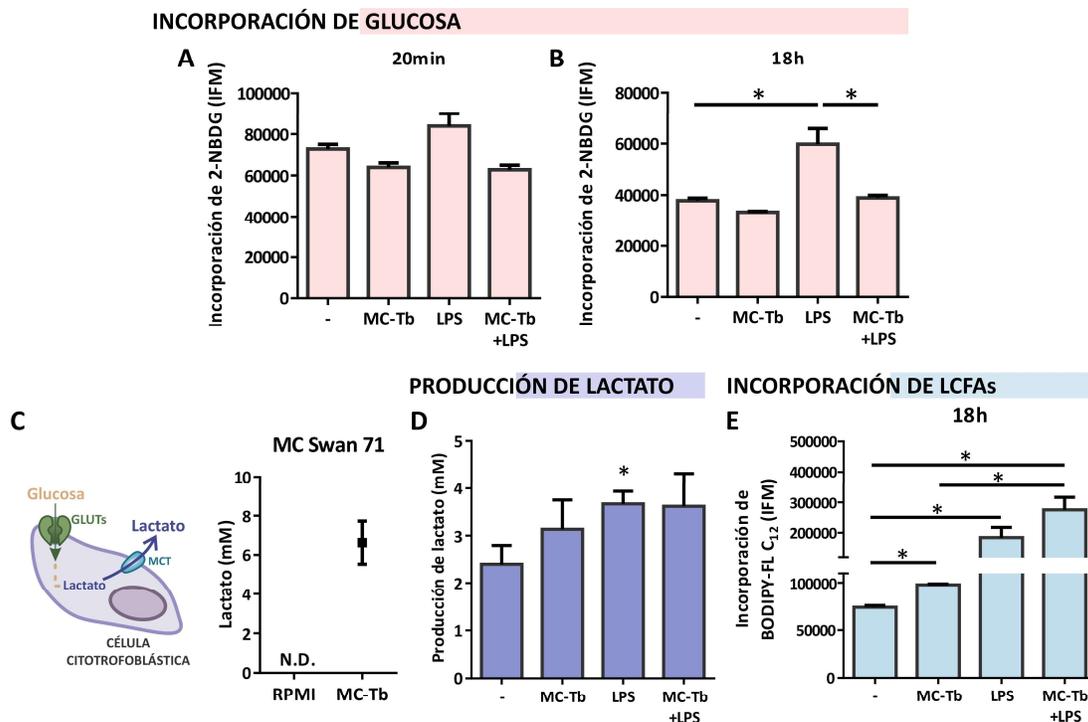


Figura 41 | El medio condicionado de células citotrofoblásticas induce la reprogramación metabólica no solo de monocitos sino también de macrófagos humanos. Los monocitos fueron obtenidos como previamente y diferenciados en RPMI-1640 10% SFB suplementado con M-CSF 50 ng/ml durante 5 días. Se incubaron con MC-Tb, LPS 100 ng/ml, o MC-Tb+LPS por 20min o 18hs y se evaluó la incorporación de glucosa con 2-NBDG (A, B, n=3), producción de L-lactato (D, n=5) e incorporación de LCFAs con BODIPY-FL C₁₂ (E, n=3) como previamente. (C) Esquema de producción de lactato por células Tb y cuantificación en el MC-Tb de Swan 71 (n=5). Los resultados se expresan como Media \pm E.E. ANOVA sin o con modelado de varianzas con comparaciones múltiples de Tukey o LSD Fisher respectivamente, *p<0.05.

Para poder dilucidar en profundidad el efecto del MC-Tb sobre el destino de la glucosa una vez incorporada y obtener una aproximación más precisa de la tasa de glucólisis en nuestro sistema, cuantificamos la tasa de acidificación extracelular, ECAR por sus siglas en inglés, mediante la utilización del equipo *Seahorse XFp extracellular flux analyzer*. El método consiste en la medición del pH en función del tiempo (mpH/min) frente a la adición de glucosa, oligomicina (desacoplante de FOSFOX de la ETC) y 2-DG, cuya correlación con las tasas de glucólisis ha sido ampliamente descrita²⁵⁸. Para esto, los Mo fueron diferenciados a MØ directamente en las placas de cultivo XFp específicas, estimulados y analizados en el equipo, como se describe en detalle en Materiales y Métodos. Los resultados preliminares hasta el momento muestran que los MØ estimulados con LPS aumentan la tasa de glucólisis cuando son incubados con glucosa, traducida en un aumento en la ECAR, comparado con los MØ no estimulados como ya fue reportado. En contraste, en presencia de MC-Tb la acidificación extracelular inducida por LPS se reduce levemente, aunque continúa siendo más elevada que en MØ no estimulados (Fig. 42), en línea con lo observado en la Figura 41D. El desacoplante de la FOSFOX-ETC oligomicina no aumentó en mayor medida la glucólisis en los MØ incubados con LPS, algo que se manifiesta solo en forma incipiente en presencia de MC-Tb, sugiriendo una reducida reserva glucolítica independiente de los estímulos en este sistema.

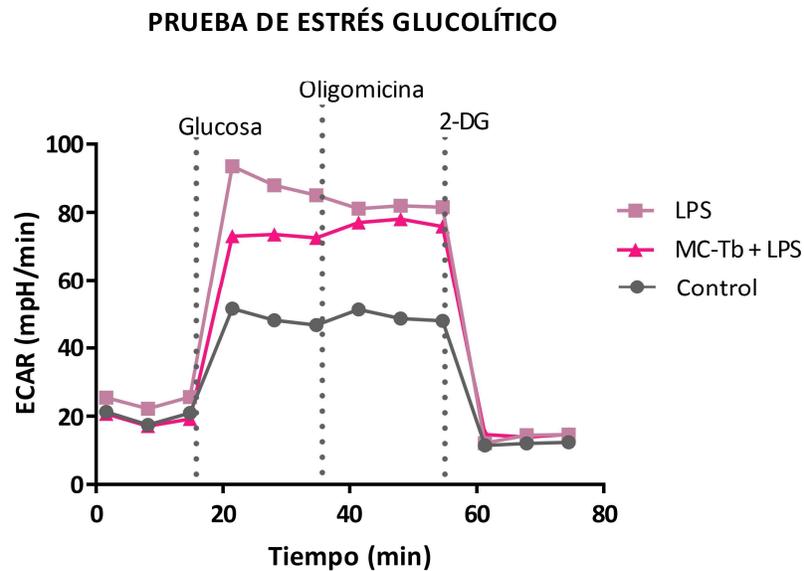


Figura 42 | El medio condicionado de células citotrofoblásticas modula la tasa de glucólisis inducida por LPS *E. coli*. Los monocitos fueron obtenidos como previamente y diferenciados en RPMI-1640 10% SFB suplementado con M-CSF 50 ng/ml durante 5 días. Se incubaron con MC-Tb, LPS 100 ng/ml, o MC-Tb+LPS por 18hs y se cuantificó la tasa de acidificación extracelular (ECAR) en la prueba de estrés glucolítico empleando el analizador de flujo extracelular *Seahorse XFp* como se describe en Materiales y métodos.

Los resultados presentados hasta aquí indican que los factores solubles liberados por células citotrofoblásticas inducen una reprogramación metabólica tanto en los M ϕ circulantes como en los M ϕ diferenciados, sin modificación en la incorporación de glucosa y orientada a una mayor incorporación y utilización de ácidos grasos, modulando a su vez la respuesta metabólica frente a estímulos proinflamatorios como el LPS. A su vez esta reprogramación sería rápida, conduciendo a los cambios funcionales que resultan en un perfil M2-like, como hemos reportado previamente.

4.2.3. El medio condicionado de macrófagos M1 reduce la incorporación de glucosa y la expresión de citoquinas proinflamatorias en células citotrofoblásticas

La población de M ϕ en la interfase está compuesta por un balance finamente regulado de perfiles M1/M2 hasta finales del primer trimestre y primera etapa del segundo trimestre, luego de la cual la población predominante es M2 hasta el parto. Algunos de los factores proinflamatorios liberados por los perfiles M1 como IL-1 β e IL-6 son factores proimplantatorios necesarios en una primera etapa para una correcta invasión y placentación. Sin embargo, un desbalance con aumento de M1 se encuentra asociado a una activación celular aberrante y un microambiente excesivamente inflamatorio con aumento de citoquinas proinflamatorias y el desarrollo de patologías como PE, RCF y RSA⁶². Por esto quisimos estudiar si los factores liberados por perfiles M1 condicionan metabólicamente a las células CTB. Para esto obtuvimos monocitos como se describió previamente, y estos fueron diferenciados *in vitro* en RPMI-1640 10% SFB suplementado con 50ng/ml de GM-CSF por 5 días, y luego por 2 días más en RPMI-1640 10% SFB suplementado con 50ng/ml de GM-CSF y LPS 100ng/ml. Los macrófagos fueron lavados exhaustivamente, se recolectaron los medios condicionados en RPMI-1640 2% SFB durante 18h (MC-M1) y las células CTB fueron incubadas con estos MC-M1 por 4h ó 18h (Fig. 43, esquema). Observamos que el MC-M1 no moduló la incorporación de glucosa a 4h (Fig. 43A), sin embargo a 18h disminuyó significativamente (Fig. 43B), en simultáneo con una menor expresión del ARNm de *glut1* y sin cambios en el ARNm de *glut3* (Fig. 43C). No observamos cambios en la incorporación de LCFAs ni a 4h ni a 18h (Fig. 43D, E), ni en la expresión de los transportadores FATPs (Fig. 43F), aunque encontramos una tendencia al aumento de las gotas lipídicas citoplasmáticas a 18h (Fig. 43H). Para confirmar que la disminución en la incorporación de glucosa y la tendencia al aumento en las gotas lipídicas no estuviera asociado a una disminución en la función celular, evaluamos la migración celular por ensayo de cierre de herida y no observamos diferencias (Fig. 43I). A su vez, evaluamos la expresión de citoquinas proinflamatorias en presencia del MC-M1 y también de LPS, para descartar que los efectos observados fueran producidos por trazas del estímulo presentes en el MC-M1, y observamos que la

estimulación con el MC-M1 resultó en una disminución en la expresión de *tnf-α* e *il-1β* (Fig. 43J, K), en concordancia con una menor incorporación de glucosa y una menor glucólisis.

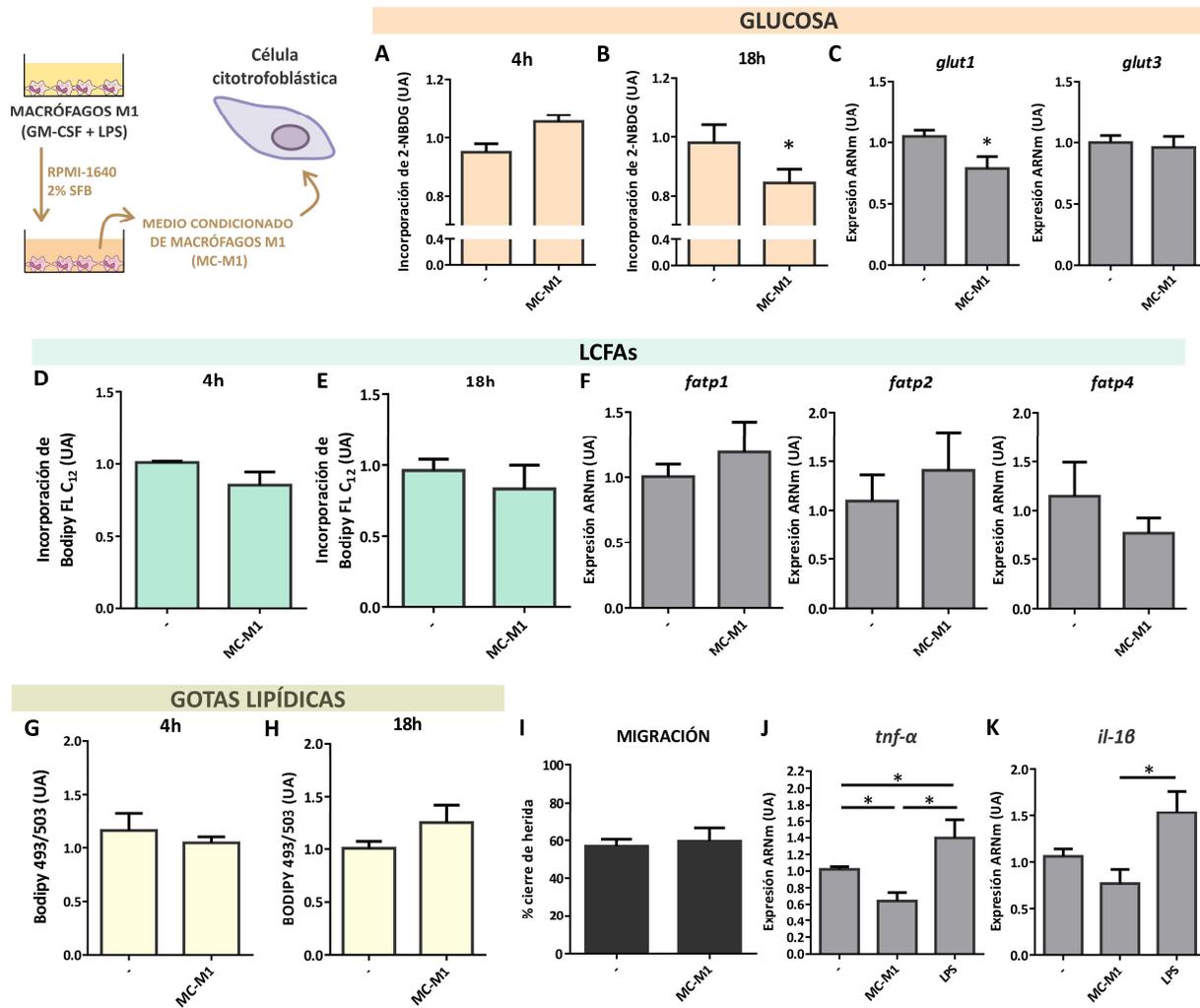


Figura 43 | El medio condicionado de macrófagos M1 reduce la incorporación de glucosa y la expresión de citoquinas proinflamatorias en células citotrofoblásticas. Células Swan 71 fueron cultivadas en DMEM-F12 10% SFB hasta subconfluencia y se incubaron por 4h, 16h o 18h con RPMI-1640 2% SFB o MC-M1 (obtenido como se observa en panel superior izquierdo, ver detalle en Materiales y Métodos). Se realizaron ensayos de incorporación de glucosa con 2-NBDG (A, n=4; B, n=5), de incorporación de LCFAs con BODIPY-FL C₁₂ (D, n=5; E, n=8), marcación de gotas lipídicas con BODIPY 493/503 (G, n=4; H, n=6), migración por ensayo de cierre de herida (I, n=6) o extracción de ARNm y análisis de expresión por RT-qPCR luego de 16hs de estimulación (C, F, J, K, n=4) como previamente. Los resultados se expresan como Media ± E.E. Prueba t de Student o ANOVA con comparaciones múltiples de Tukey, *p<0.05.

Los resultados obtenidos en este ensayo sugieren que los factores presentes en el MC-M1 no inducirían una activación del metabolismo de las células CTB sino lo contrario, manteniendo a éstas en un estado de quiescencia y antiinflamatorio, con menos glucólisis, consistente con el

mantenimiento de la homeostasis inmunológica una vez reclutados los MØ M1 a la interfase en cantidades reducidas.

4.2.4. El metabolito derivado del TCA itaconato evoca una respuesta metabólica similar a la inducida por MC-M1 en células citotrofoblásticas de primer trimestre

Los resultados anteriores nos llevaron a preguntarnos qué factores o metabolitos presentes en el MC-M1 podían estar induciendo este estado de quiescencia metabólica en las células CTB, disminuyendo la incorporación de glucosa y la expresión de citoquinas proinflamatorias sin modificar su migración. En los últimos años se ha propuesto al itaconato producido por MØ M1 estimulados con LPS como un metabolito inmunomodulador^{259,260}. La ruptura del TCA y la acumulación de citrato, junto con la acumulación de succinato, aumenta los niveles de ROS, estabiliza a HIF1a e induce la síntesis de IL-1 β , entre otras citoquinas inflamatorias. En paralelo, la inducción de la enzima aconitato decarboxilasa 1 (ACOD1, gen *irg1*), deriva el intermediario del TCA aconitato a itaconato, que inhibe a la SDH con acumulación de succinato, inhibe la glucólisis y la FOSFOX, y activa la vía de Nrf2 aumentando la expresión de genes antioxidantes y antiinflamatorios, disminuyendo los niveles de ROS y la producción de IL-1 β ^{132,261}. Aún está en discusión el mecanismo por el cual el itaconato sería exportado fuera de las células, pero se detecta extracelularmente y diversos trabajos muestran sus efectos sobre otros tipos celulares^{262,263}. Si bien la producción de itaconato ha sido descrita inicialmente frente a la activación por LPS en monocitos y macrófagos, recientemente se ha reportado aumentado en condiciones de inflamación estéril²⁶⁴, y un trabajo de 2022 refiere niveles desregulados de este metabolito asociados con complicaciones del embarazo como diabetes gestacional y PE²⁶⁵. Teniendo en cuenta estos antecedentes, quisimos evaluar el efecto del itaconato en el metabolismo de las células CTB. En la hipótesis de que el MC-M1 contiene itaconato, en primer lugar, evaluamos la expresión de *irg1* en Mo estimulados con LPS y observamos que el de ARNm se encuentra aumentado, y que ese aumento es prevenido por la coincubación de LPS con MC-Tb (Fig. 44A) confirmando un efecto modulador del MC-Tb que prevendría la ruptura del TCA característica de un perfil proinflamatorio. El MC-Tb *per se* no modificó la expresión de *irg1* en monocitos. Luego analizamos el efecto del MC-M1 en células Swan 71 comparado con el de LPS y de itaconato. La Figura 44B muestra que, si bien la expresión basal de *irg1* es muy baja, el LPS aumentó la expresión de la enzima y en una proporción mucho menor que en monocitos. Ni el MC-M1 ni el itaconato 7.5 mM agregado exógenamente modificaron la expresión de *irg1*, incluso este último la disminuyó levemente (Fig. 44B). Incubamos entonces a las células CTB con itaconato exógeno para evaluar sus efectos sobre la función y el metabolismo y observamos que la migración

celular no presentó diferencias (Fig. 44C), sin embargo en 3 de 4 dadoras se vio una disminución en el uptake de glucosa (Fig. 44D). El itaconato indujo la incorporación de ácidos grasos de cadena larga (Fig. 44E) y las células tendieron a acumular más gotas lipídicas citoplasmáticas (Fig. 44F).

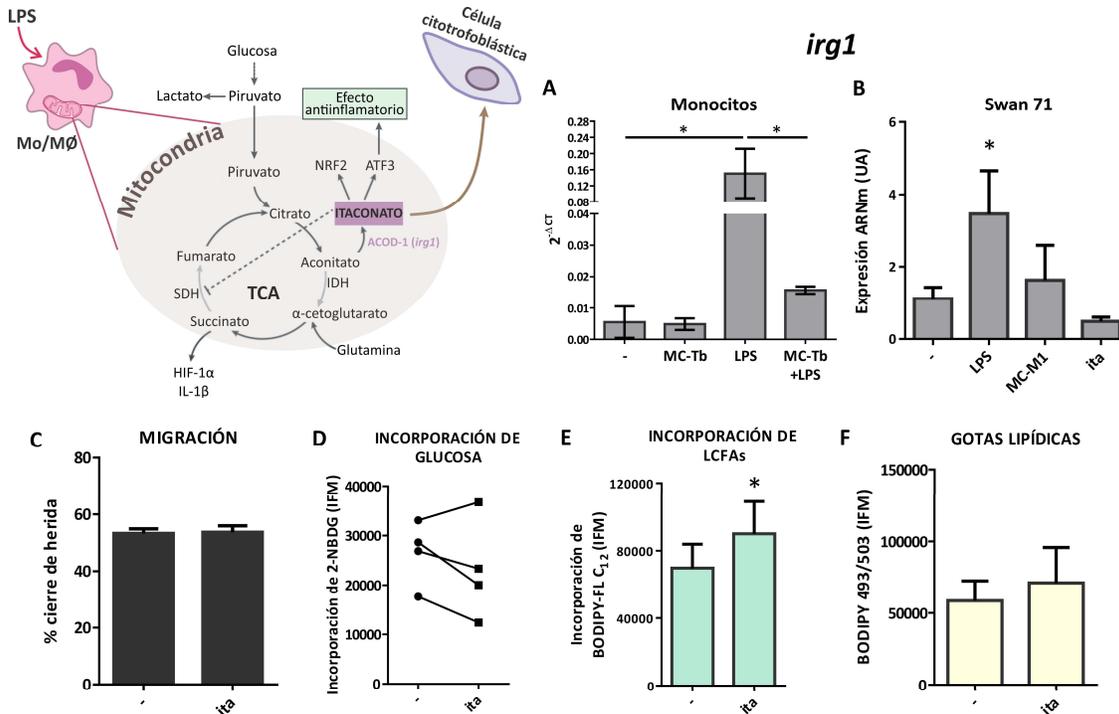


Figura 44 | El metabolito derivado del TCA itaconato evoca una respuesta metabólica similar al medio condicionado de M1 en células citotrofoblásticas. Esquema modificado de *O'Neill and Artyomov Nat. Rev. Immun. (2019)*. (A) Monocitos fueron obtenidos como previamente, incubados en ausencia/presencia de MC-Tb, LPS 100 ng/ml, o MC-Tb+LPS en RPMI-1640 2% SFB por 18hs y se evaluó la expresión de ARNm de *irg1* por RT-qPCR como previamente (n=3). (B) Células Swan 71 fueron cultivadas como previamente, incubadas con LPS 100 ng/ml, MC-M1 o Itaconato 7.5 mM por 18hs y se evaluó la expresión de ARNm de *irg1* por RT-qPCR como previamente de al menos dos ensayos (C, D, E, F) Células Swan 71 fueron incubadas con Itaconato 7.5 mM y se evaluó luego de 16hs su capacidad migratoria por ensayo de cierre de herida (C, n=3), y la incorporación de glucosa (D) la incorporación de LCFAs (E, n=3) y las gotas lipídicas citoplasmáticas (F, n=3) luego de 18h. Los resultados se expresan como Media \pm E.E. Prueba t de Student o ANOVA sin o con modelado de varianzas con comparaciones múltiples de Tukey o LSD Fisher respectivamente, *p<0.05.

Estos resultados junto a lo referido por otros autores²⁶⁵ apoyan la hipótesis de que el metabolito itaconato producido por Mo/M \emptyset en perfiles proinflamatorios podría estar presente en la interfase, generando en las células citotrofoblásticas un estado de quiescencia metabólica en el cual incorporan menos glucosa, no migran pero mantienen la incorporación de ácidos grasos y la integridad del TCA que podría favorecer el control del ambiente inflamatorio.

5. DISCUSIÓN

Los procesos de diferenciación e invasión de células CTB durante la implantación y placentación temprana, y el *diálogo* coordinado con los Mo y MØ deciduales que da lugar a la remodelación de arterias espiraladas y glándulas maternas, requieren un alto metabolismo tanto para la obtención de energía como para modelar los perfiles efectores celulares. La regulación de estos mecanismos es crítica para el normal desarrollo y posterior nutrición del feto, dado que las fallas durante estos procesos en la generación de la interfase materno-fetal conducen al desarrollo de patologías como la PE y la RCF, pero las causas moleculares que subyacen a estas complicaciones no están aún esclarecidas.

Teniendo en cuenta que VIP es un péptido pleiotrópico con funciones inmunomodulatorias y tróficas en diferentes modelos de gestación y que ha sido asociado a la regulación del metabolismo en otros modelos, nos resultó de gran relevancia estudiar su rol en la regulación del metabolismo celular citotrofoblástico así como en la regulación y transporte de glucosa a través de la placenta. La evidencia acumulada respalda el papel de VIP como un péptido regulador endógeno del metabolismo de cTb durante el embarazo temprano, a través de un mecanismo que involucra al sensor de nutrientes mTOR.

La línea celular citotrofoblástica humana Swan 71 semejante a EVT de primer trimestre y la línea BeWo más similar a CTBv, nos permitieron evaluar el rol del péptido en dos modelos que comparten características de CTB involucrados en distintos procesos de la interfase. Pudimos demostrar que VIP induce la incorporación rápida y específica de glucosa en estas células, cuantificada por la incorporación de un análogo fluorescente, e induce la expresión a tiempos más largos del transportador GLUT1 a nivel ARNm y proteína, y de GLUT3 a nivel ARNm pero sin modulación de la expresión de la proteína, al menos en los tiempos observados.

La incorporación de glucosa aumentó de modo similar en presencia de LIF, un estímulo proimplantatorio ampliamente descrito en modelos murinos, que ha sido asociado a la incorporación de glucosa en otros modelos de alto consumo energético^{26,234}. Más aún, en trabajos de nuestro laboratorio se demostró que LIF induce la expresión de VIP²¹⁴. Estos resultados se encuentran en línea con una regulación positiva de funciones celulares como la migración reportada previamente: en presencia tanto de VIP como de LIF la capacidad migratoria de las células Swan 71 y HTR-8 se encuentra aumentada²¹⁴.

La evaluación de la incorporación de glucosa a tiempos cortos de 20 min, así como de la expresión de sus transportadores, se sostiene en la existencia de diversos mecanismos que pueden colaborar en la inducción: la movilización rápida a membrana de vesículas intracelulares en donde se encuentran los transportadores ya sintetizados así como su fosforilación, y por otro lado la activación de vías de señalización asociadas al transporte rápido de este nutriente^{93,236,237,266}. En este sentido, el efecto rápido de VIP sobre la incorporación de glucosa y aminoácidos parece ser directo y

no mediado por la liberación de insulina o IGF1, principales señales extracelulares reportadas que promueven el crecimiento fetal^{154,156,267,268}, ya que el VIP se agrega solo durante un lapso de 20 minutos.

En línea con esto, también observamos, mediante la medición de la incorporación de un sustrato específico incorporado por el sistema A de transporte de aminoácidos neutros no esenciales acoplados a Na⁺, que VIP estimula la actividad de este sistema en ambas líneas celulares. VIP aumentó la expresión de mensajero y proteína de SNAT1 y el mensajero de SNAT2 sin cambios en la proteína en la línea Swan 71, mientras que en la línea BeWo no observamos diferencias para ninguno de los transportadores.

Esto podría tener relación con una metabolización y utilización distinta de los aminoácidos incorporados según el tipo celular teniendo en cuenta las diferencias entre ambas líneas. En concordancia con esto, un trabajo muestra que la deprivación de glutamina en células endoteliales causa defectos en la angiogénesis y una deficiente proliferación y migración, sin causar estrés energético pero produciendo una alteración de la anaplerosis del TCA, la síntesis de macromoléculas y la homeostasis REDOX²⁶⁹, mientras que otro trabajo muestra que el CTB y STB obtenidos de vellosidades a término no usarían principalmente glutamina para la obtención de energía²⁷⁰, sosteniendo que estos tipos celulares regularían el transporte hacia el feto en forma diferencial a los modelos en EVT.

Utilizando los mismos modelos celulares y silenciando la expresión endógena del péptido con un siRNA de VIP como en trabajos anteriores²¹⁴, demostramos también que la deficiencia de VIP en las cTb está asociada a una disminución en la incorporación de glucosa y una menor expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 y los transportadores de aminoácidos SNAT1 y SNAT2. Estos resultados concuerdan con los datos publicados previamente que muestran que el silenciamiento en estas células y la línea HTR-8 disminuye la migración celular²¹⁴, respaldando el papel de VIP como un péptido regulador endógeno en el metabolismo citotrofoblástico para sostener sus funciones invasivas.

Como mencionamos previamente, los receptores de VIP activan principalmente la vía de CRE/PKA, y señalizan por AMPc involucrando a la óxido nítrico sintasa, PKC, fosfatidilinositol 3-quinasa, MAPK, JAK/STAT y NF-κB. En nuestro modelo *in vitro*, observamos que la estimulación rápida del transporte de glucosa es mediada por la señalización de PKA, MAPK y PI3K, y si bien el efecto de la inhibición de PKC fue similar, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La fosforilación de los transportadores mediada por PI3K y mTOR se ha reportado en la incorporación de glucosa por células de grasa parda y células de adenocarcinoma de pulmón^{236,237}. A su vez, en las células BeWo el transporte de glucosa inducido por resistina implica la fosforilación mediada por MAPK²⁷¹. mTOR integra múltiples señales hormonales, de estrés y energía involucradas

en el crecimiento fetal y placentario. Tanto el transporte de glucosa como el de aminoácidos están regulados por mTOR en respuesta a señales maternas como IGF1, insulina y leptina cuyos efectos estimulan el transporte^{156,272-274}, o inhiben señales que disminuyen el transporte como adiponectina e hipoxia^{275,276}.

La estimulación de células CTB con VIP indujo un aumento en la expresión de *mTOR*, así como en su fosforilación y en la fosforilación de S6 que es fosforilada por S6K río abajo de mTOR, mientras que la fosforilación de S6 inducida por VIP fue bloqueada por la rapamicina, lo que sugiere que mTORC1 sería el principal complejo involucrado en esta señalización. Paralelamente, las células silenciadas en la expresión de VIP presentaron una disminución de la expresión basal de mTOR tanto a nivel transcripcional como de proteína. Recíprocamente, la inhibición de la actividad de mTOR con rapamicina redujo la expresión de VIP, lo que sugiere, en conjunto con los resultados anteriores, que la regulación de los niveles de VIP y la señalización activada por el péptido se encuentran río abajo de mTOR en estas células. Estas observaciones respaldan fuertemente la regulación cruzada de las vías de señalización de mTOR y VIP en células citotrofoblásticas, por lo que los niveles de VIP expresados por las células citotrofoblásticas, así como su capacidad de respuesta a la estimulación de VIP exógeno, parecen modular la capacidad de mTOR para integrar múltiples señales presentes en el medio. En condiciones en las que los niveles de VIP estuvieran disminuidos ó las células trofoblásticas fueran menos receptivas a la estimulación por VIP, la incorporación de glucosa y aminoácidos se vería disminuida, mientras que la absorción de nutrientes mediada por mTOR también se vería afectada, un escenario que se observa en varios modelos de RCF¹⁶⁴.

Luego de 24h de estimulación con VIP, la incorporación de glucosa no se mantuvo significativamente aumentada, si bien las diferencias fueron similares a las observadas a 20 minutos. En línea con esto, observamos que la aceleración de la capacidad migratoria por VIP que ya describimos y mencionamos en trabajos previos²¹⁴ fue bloqueada tanto por el bloqueo de la glucólisis con 2-DG como por el bloqueante del complejo I de la ETC, rotenona, luego de 16h, indicando que ambas vías son necesarias para inducir el aumento de la migración. Teniendo en cuenta los trabajos que muestran una alta glucólisis así como una alta FOSFOX en las CTB⁸¹, el hecho de que la incubación con los inhibidores por separado pero sin VIP no haya modificado la capacidad migratoria basal de las células está en línea con la propuesta de estos trabajos de una mayor plasticidad en las células CTB respecto a las STB⁸¹, donde la diferenciación parece disminuir el metabolismo general junto con el potencial mitocondrial y la producción de ATP, aunque la relación FOSFOX/glucólisis parece ser menor en CTB que en STB, y aún existen controversias^{81,82,270,277,278}. De este modo, frente al bloqueo de la glucólisis, la célula CTB es capaz de utilizar más FOSFOX incorporando precursores de otras vías, y en el caso contrario, puede aumentar su glucólisis para suplir las demandas de ATP. La inhibición tanto con 2-DG como con rotenona bloquea otros

procesos celulares con una reducción de aproximadamente el 20% de viabilidad celular luego de 48h²³¹, efecto que a 16h no observamos, pero que demuestra que la inhibición generalizada de una u otra vía no sería un proceso fisiológico normal y solo es útil en el contexto del estudio del sistema. Más aún, el bloqueo de ambas vías en simultáneo disminuyó la migración con una disminución generalizada de la viabilidad celular.

La glucosa incorporada basalmente por la célula para ejercer sus funciones incluye la metabolización por la PPP, la oxidación por glucólisis dando piruvato, y su conversión a lactato, o a acetil-CoA en la mitocondria ingresando en el TCA⁸⁰. El hecho de que VIP induzca la incorporación de glucosa y la migración celular, y que requiera ambas vías para producir este efecto, permite inferir que al menos un porcentaje de la glucosa extra incorporada es oxidada por glucólisis y luego ingresa en el TCA. De hecho, la incubación con VIP por 24h o 48h no moduló los niveles de lactato ni la expresión de sus transportadores, lo que resulta relevante teniendo en cuenta los resultados de otros trabajos que muestran que menor glucólisis y bajos niveles de lactato también se encuentran asociados a patologías como RSA y PE^{279,280}. Los niveles de concentración de lactato extracelular detectados fueron similares a los reportados en otro trabajo utilizando cultivos primarios de células trofoblásticas, lo que respalda un metabolismo similar en esta línea celular¹⁰⁰. En paralelo, avanzamos en un método de detección de metabolitos por UPLC-MS en colaboración con la Dra. Monge en el CIBION, tanto dirigido como no dirigido, para intentar esclarecer estas vías. En este sentido, un trabajo reciente empleó el cálculo de un *ratio* entre la concentración de citrato/piruvato para evaluar la contribución de glucosa al TCA en tejidos embrionarios durante la gestación²⁸¹.

Los ácidos grasos de cadena larga cumplen diversas funciones en estas células, desde el punto de vista energético aportando intermediarios al TCA por FAO así como siendo precursores biosintéticos para la síntesis de otras moléculas. En este sentido, teniendo en cuenta que el aumento de migración por VIP fue inhibido con rotenona, y los reportes que indican que la FAO se encuentra disminuida en embarazos con PE²⁸², nos resultó de interés poder evaluar el efecto de VIP en la incorporación de LCFAs. Observamos que a tiempos cortos esta incorporación no se modifica pero sí se encuentra aumentada a tiempos más largos. Es importante destacar que a 24h las concentraciones de glucosa en el medio aún se encontraban elevadas, descartando un posible cambio de metabolismo por deprivación. A diferencia de lo observado para la glucosa y los aminoácidos neutros, el mecanismo en este caso parecería ser a mayor plazo y no una activación directa de los transportadores por VIP. Esto parece coherente considerando que la glucólisis resulta en un aporte de ATP mucho más rápido que la FOSFOX con precursores de la FAO.

Esto último también va en línea con los resultados que obtuvimos al evaluar la expresión de *ppar-γ* y de 3 de los principales transportadores de LCFAs. Se reporta que el receptor nuclear PPAR-γ induce la expresión de FATP4, mientras que reduce la de FATP2²⁴³. En nuestro modelo, observamos

una tendencia al aumento en la expresión de *ppar-γ* a las 3h de incubación con VIP 50nM, con una caída a menos del 50% a las 24h. La expresión fue justamente la inversa en *fatp2*, que aumentó al doble a las 24h. Teniendo en cuenta que VIP induce el ingreso de LCFAs luego de 24h de estimulación y que estos activan a PPAR-γ, la inducción de su expresión a tiempos cortos donde el sustrato energético principal parece ser la glucosa y su posterior disminución, podrían estar funcionando como un mecanismo de control de la activación excesiva del receptor. En concordancia con su activación por VIP a tiempos más cortos, un trabajo reporta que en células HTR-8 la estimulación con LIF induce su migración vía PGE2¹⁰⁹, y más aún, un trabajo en EVT de cultivo primario muestra que el agonista pioglitazona promueve la migración celular vía IGF²⁸³.

También observamos que al estimular a estas células con VIP las gotas lipídicas se encontraron aumentadas, de modo que VIP no estaría sólo aumentando las funciones celulares, sino promoviendo la incorporación de nutrientes para reserva energética.

Con la base de que las gotas lipídicas pueden observarse en situaciones de estrés celular o privación de nutrientes²⁴⁸, realizamos también un ensayo de viabilidad mitocondrial que mostró que la estimulación con VIP no produjo alteraciones en la relación potencial de membrana/masa mitocondrial. Frente a niveles de ROS celular controlado, la vía de NF-κB se encuentra inactiva, mientras que si los niveles de ROS exceden la capacidad de amortiguación del sistema REDOX, esta vía es activada desencadenando la producción excesiva de factores inflamatorios como IL-1β, TNF-α, ciclooxigenasa-2 (COX-2), entre otros^{80,284}. VIP disminuyó los niveles de ROS luego de 24h de incubación, lo que indica que en presencia de VIP la funcionalidad mitocondrial está optimizada, y también sugiere que una parte de la glucosa incorporada podría estar siendo metabolizada por la PPP, generando más poder reductor por generación de glutatión reducido⁸⁰.

La evidencia presentada hasta aquí sostiene a VIP como un regulador del metabolismo de las células EVT durante estadíos tempranos.

Luego, teniendo en cuenta que fetos VIP deficientes presentaban menor peso para la edad gestacional³², como una primera aproximación a la pregunta de si los efectos de VIP involucraban la regulación del transporte de nutrientes a través de la placenta, empleamos un modelo *in vitro* de transporte a través de una monocapa de células BeWo y un modelo *ex vivo* de incorporación de nutrientes en explantos de placentas murinas VIP WT incubadas con antagonista de los receptores VPAC. Dado que observamos que VIP aumentó el transporte de glucosa transcelular *in vitro* y que el bloqueo *ex vivo* de la señalización por el VIP endógeno disminuyó la incorporación de nutrientes por la placenta, acorde a lo observado en líneas celulares, decidimos evaluar el transporte *in vivo* en cruces deficientes en VIP para estudiar su rol en el metabolismo de la placenta, y para esto

empleamos cruzas WTxKO y HTxHT para VIP, para poder distinguir los efectos de los aportes maternos y fetales.

Observamos que las placentas VIP+/- de embarazos WTxKO presentaron un aumento en la incorporación de glucosa, así como una mayor expresión de GLUT1 fetal y placentario en comparación con los sitios de implantación WTxWT, y la inyección de VIP al dg6.5 tendió a reestablecer los niveles de expresión. La incorporación de glucosa *in vivo* en las cruzas HTxHT se encontró aún más aumentada que en las cruzas de hembras WT cruzadas con machos KO. Además, mientras que los niveles de transporte transplacentario de glucosa en los sitios de implantación WTxKO muestran una pequeña tendencia al aumento, el transporte transplacentario en los sitios de implantación VIP+/- de hembras HT aumentó significativamente en comparación con las hembras VIP normales. Finalmente, en contraste con los fetos deficientes en VIP de los sitios de implantación WTxKO que crecieron en un ambiente materno VIP normal, los fetos VIP+/- de hembras HT no presentaron un peso fetal más bajo en comparación con los fetos control.

Con base en los trabajos que muestran la correlación positiva entre la incorporación de glucosa uteroplacentaria y el consumo de glucosa placentaria, y que una metabolización diferente por la placenta podría ser asociada a RCF, los resultados presentados aquí sugieren que el modelo de preñez deficiente en VIP utilizado al cruzar hembras WT con machos KO es un modelo adecuado para estudiar mecanismos involucrados en RCF, asociado a una mayor incorporación de glucosa por la placenta y transporte transplacentario. Este modelo parece adecuado para el estudio de vías metabólicas en placentas y fetos también a lo largo de distintos estadios de la preñez.

Nuestros reportes previos indicaron que el VIP producido por cTb es necesario para una apropiada placentación. Estos nuevos resultados muestran que incluso a niveles normales de VIP materno, los sitios de implantación de VIP+/- presentan alteraciones en la incorporación de glucosa que respaldan la relevancia de VIP placentario en la modulación del transporte de nutrientes a través de la placenta y el crecimiento fetal. Por lo tanto, a pesar de los mecanismos compensatorios desencadenados por la deficiencia de VIP como se observó en los sitios de implantación WTxKO, que indujeron un aumento de la incorporación de glucosa placentaria, otras vías metabólicas podrían estar afectadas subyacentemente al aumento de peso fetal en los fetos VIP+/-.

El hecho de que en explantos VIP WT incubados con antagonista de los receptores VPAC hayamos observado una reducción en la incorporación tanto de glucosa como de aminoácidos, sostiene el rol de VIP como péptido regulador endógeno del transporte, mientras que el aumento *in vivo* de la incorporación de glucosa estaría actuando como un mecanismo compensatorio asociado a otros factores del metabolismo de nutrientes en la placenta^{268,285}, en concordancia con cambios observados en el sistema de IGFs y leptina en modelos deficientes en VIP²⁸⁶. En este sentido,

Sferruzzi-Perri y colaboradores informaron una interacción similar entre el genotipo materno y placentario para reajustar la asignación de recursos en un modelo murino con embarazo deficiente en la isoforma p110a de PI3K, en donde placentas p110a+/- presentan adaptaciones funcionales para aumentar el transporte de nutrientes hacia el feto a pesar de tener una superficie reducida²⁸⁷. Teniendo en cuenta nuestros resultados que demuestran que VIP presenta una regulación cruzada con mTOR en líneas celulares trofoblásticas, y que en este modelo de RCF las cruas WTxKO presentaron una expresión aumentada de mTOR y GLUT1, los resultados sostienen que la deficiencia de VIP en cTb en última instancia resulta en la activación de vías de señalización que promueven cambios metabólicos, modulando la expresión de genes y aumentando la incorporación de glucosa.

Resulta importante destacar que si bien el transporte transplacentario en las cruas WTxKO resulta similar -o incluso mayor- al de las cruas WTxWT, los fetos presentan RCF, lo que sugiere que el transporte de glucosa de la placenta al feto no necesariamente correlaciona con la capacidad de utilización fetal de glucosa.

Por otro lado, la descendencia de embarazos HTxHT presenta retrasos en el desarrollo posnatal, independientemente de su genotipo, lo que sugiere que este déficit puede ser el resultado de una insuficiencia de VIP materno durante la embriogénesis y respalda el papel de VIP materno en la programación fetal. De hecho Lim et al reporta que al día 2 posnatal, las crías VIP+/- y VIP-/- poseen menor peso que las crías de la misma camada VIP+/^{209,288}. Nuestros resultados muestran que al dg17.5 los tres genotipos muestran aún los mismos pesos fetales, y similares a las cruas WTxWT. Sin embargo, el metabolismo en este estadio se encuentra ya desregulado, presentando un transporte exacerbado. El mecanismo compensatorio observado en este caso podría estar aún más exacerbado que el de cruas WTxKO por el ambiente materno deficiente en VIP, y el hecho de que los pesos sean similares a los fetos de cruas WTxWT sugiere que mayor transporte es necesario para suplir las demandas fetales.

Mayores estudios son necesarios para poder evaluar la asociación entre el transporte de aminoácidos y el transporte de glucosa en este modelo, ya que no podemos descartar que el incremento en la incorporación de glucosa sea una consecuencia de una disminución en el transporte de aminoácidos. El efecto de VIP descrito en el metabolismo de ácidos grasos²⁸⁹⁻²⁹² y los resultados presentados en esta Tesis que demuestran su rol en la incorporación por las células CTB sugiere que el metabolismo lipídico en los fetos VIP+/- también podría estar alterado contribuyendo a la disminución en la ganancia de peso.

Es interesante resaltar el hecho de que en las cruas HTxHT las alteraciones metabólicas parecen ser predominantemente causadas por el genotipo materno: el transporte transplacentario exacerbado y el peso normal al dg17.5 independientemente del genotipo fetal reflejan mecanismos

metabólicos compensatorios regulados por el entorno materno que ya se encuentra configurado en una nueva homeostasis.

VIP ha sido previamente propuesto como un sensor de nutrientes y antidiabético basado en su efecto estimulador a través de los receptores VPAC2 sobre la liberación de insulina dependiente de glucosa por los islotes pancreáticos de rata²⁹³. Estudios previos con ratones VIP KO mostraron un fenotipo que se asemeja a la diabetes en algunos aspectos, con niveles elevados de glucosa e insulina en ayunas y sin ayunar en plasma, pero con una respuesta de recompensa aumentada y disminuyendo la ingesta, lo que sugiere mecanismos que balancean el metabolismo frente a la deficiencia de VIP²¹⁹.

El análisis del comportamiento alimentario, las hormonas metabólicas y la composición de la masa corporal en ratones VIP KO de 5 a 22 semanas de edad, mostró un peso corporal reducido asociado con un patrón de secreción alterado de adiponectina, GLP-1, leptina, PYY e insulina²⁹².

Teniendo en cuenta que se sintetizan altos niveles de receptor de insulina y diferentes hormonas metabólicas en la placenta murina y humana^{285,294,295} y que los ratones VIP KO muestran niveles séricos elevados de insulina y leptina^{219,292}, es posible que la regulación por VIP de hormonas metabólicas sintetizadas por las células de la placenta esté produciendo la incorporación exacerbada y transporte transplacentario que observamos. De hecho, el embarazo se ha asociado con una condición fisiológica de resistencia a la insulina en humanos y ratones^{36,296} y cabe destacar que los niveles plasmáticos más altos de glucosa e insulina en la diabetes gestacional resultan en una producción reducida de VIP por las membranas fetales humanas y el tejido adiposo visceral *in vitro*²⁹⁷.

Durante la ventana de implantación, los M \emptyset exhiben principalmente un fenotipo M1, que se transforma en una población M1/M2 hasta finales del primer trimestre y la primera etapa del segundo trimestre⁷¹. Este balance entre M1/M2 es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica ya que un aumento en la población M1 y una disminución en la población M2 genera un ambiente proinflamatorio asociado a complicaciones en el embarazo como PE, RCF y RSA^{72,144}, con un aumento en citoquinas inflamatorias y una disminución de citoquinas antiinflamatorias.

Las células EVT secretan mediadores que reclutan y modulan el perfil de los Mo/M \emptyset educándolos en su respuesta efectora hacia perfiles M2-like^{6,72,255}. Las evidencias al momento sugieren que el inmunometabolismo en la interfase es clave determinando el mantenimiento de la homeostasis, sin embargo aún no hay abordajes que permitan identificar las principales vías metabólicas activadas en esta interacción²⁹⁸⁻³⁰⁰. Basándonos en estas evidencias, en el segundo capítulo de esta tesis estudiamos la reprogramación metabólica en el diálogo entre cTb y Mo/M \emptyset

con la hipótesis de que los rearrreglos metabólicos preceden a la adquisición del perfil funcional M2-*like* y que los perfiles presentes regulan a su vez el metabolismo citotrofoblástico. Tanto las células Swan 71 como las HTR-8 modulan estos perfiles hacia respuestas antiinflamatorias y tolerogénicas²⁵⁵, por lo que resultaron un modelo útil para este estudio *in vitro*. Más aún, resulta muy interesante el hecho de que la inducción de estos perfiles en MØ diferenciados *in vitro*, son similares a los obtenidos en los dMØ aislados de placentas de primer trimestre²¹⁰, teniendo en cuenta que la clasificación taxativa M1/M2 no siempre resulta representativa de las condiciones fisiológicas *in vivo*, donde los complejos estímulos del microambiente varían rápidamente resultando en una población heterogénea, por lo que cada caso debe ser estudiado en particular^{56,128,137}. Encontramos que factores presentes en el MC-Tb modulan el metabolismo de los Mo y MØ estimulando la incorporación de ácidos grasos y *educando* a estas células que responden metabólicamente diferente frente a un estímulo inflamatorio ampliamente descrito como LPS *E. coli*, en línea con la adquisición de un perfil mayormente antiinflamatorio. A su vez, encontramos también que los factores liberados por MØ con perfiles M1 regulan el metabolismo de las células CTB hacia un estado de quiescencia metabólica donde las células incorporan menos glucosa y su migración no difiere respecto al control sin estímulo. Presentamos evidencias a favor de un factor que posiblemente se encuentra en el MC, el metabolito itaconato, que podría estar involucrado en la modulación de este metabolismo, con mayor incorporación de ácidos grasos.

Teniendo en cuenta que los Mo son reclutados a la interfase y que una gran parte de los dMØ se originan de Mo circulantes³⁰¹, evaluamos en primer lugar la respuesta metabólica de los Mo frente a factores trofoblásticos presentes en MC-Tb de células Swan 71 y HTR-8, evaluando la incorporación de glucosa, la incorporación de LCFAs, la expresión de sus transportadores, y la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas. Todos estos ensayos fueron realizados a dos tiempos de estimulación, 20 minutos y 18h, teniendo en cuenta que la glucólisis es una vía que puede activarse rápidamente dando lugar a la generación de ATP de forma directa, y a su vez evaluando si los cambios observados se mantenían del mismo modo a lo largo del tiempo, dando lugar a la adquisición del perfil funcional²⁵⁰.

Los MC-Tb fueron obtenidos en medio RPMI-1640 2% SFB teniendo en cuenta que el DMEM-F12 2% SFB no resulta la mejor opción para el cultivo de Mo y MØ, y basándonos en resultados propios donde las CTB en ambos medios de cultivo mostraron un comportamiento similar. Aun así, confirmamos también que en ambos medios la respuesta de los Mo y MØ fue la misma.

Los Mo expuestos por 20 min al MC-Tb no presentaron cambios en la incorporación de glucosa comparados a los no estimulados, sin embargo al ser pre-incubados con el MC-Tb, la

respuesta frente a LPS fue inhibida. Es importante destacar que observamos dos poblaciones que incorporan glucosa en distintas cantidades. Teniendo en cuenta que entre los Mo circulantes se encuentran los de baja y alta expresión de CD16 y que los Mo intermedios que coexpresan CD14+CD16+ presentan mayor expresión del transportador GLUT1 y producción de citoquinas proinflamatorias, es una posibilidad que los altos respondedores pertenezcan a esta subpoblación, aunque aún no hemos podido confirmarlo en el laboratorio^{301,302}. Más aún, las células CD16+ patrullan evaluando el estado del endotelio e infiltrando los tejidos bajo condiciones normales así como en procesos inflamatorios³⁰¹. Sin embargo, luego de 18h toda la población de Mo respondió homogéneamente, indicando que la respuesta es similar en toda la población. Si bien la incorporación de glucosa frente al LPS fue inhibida por la co-incubación con MC-Tb por 18h, el MC-Tb *per se* tendió a aumentar la incorporación basal, resultado que se encuentra en línea con un metabolismo más activo y mayor incorporación de glucosa también en perfiles M2 respecto a MØ no activados^{128,303}. La expresión de *glut1* no correlacionó con los resultados de incorporación de glucosa, y se ha reportado que la citoquina IL-10 -que es producida por células CTB y Mo/MØ y está presente en el microambiente- inhibe la localización hacia la membrana de GLUT1 inducida por LPS, lo que sugiere que aunque la expresión se observe aumentada, estos transportadores podrían no estar habilitando el ingreso de glucosa²⁵⁴.

Observamos también que el MC-Tb indujo la incorporación de LCFAs, en concordancia con las observaciones que indican que la FAO es característica de perfiles tolerogénicos en estas células, y en línea con un trabajo reciente de análisis de secuenciación *single-cell* que muestra que los dMØ caracterizados por un metabolismo lipídico se encuentran disminuidos en mujeres con RSA²⁹⁸. El hecho de que los Mo estimulados con LPS hayan presentado una tendencia al aumento en la incorporación no resulta llamativo teniendo en cuenta que los LCFAs son también precursores de diversas moléculas como las prostaglandinas, eicosanoides y tromboxanos involucrados en respuestas inflamatorias, y también ocurre la acumulación de gotas lipídicas^{111,304}. En este sentido, observamos el aumento en la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas en todas las condiciones evaluadas. Las gotas lipídicas se reportan aumentadas en MØ en ambientes inflamatorios así como en ambientes antiinflamatorios dependiendo de los modelos evaluados y sosteniendo distintas funciones en cada caso, por ejemplo la acumulación para la posterior ruptura y formación de IL-6 sin oxidación de los LCFAs en el primero, y la acumulación para ruptura y posterior FAO/TCA en el caso de los TAMs^{304,305}, por lo que sería de interés a futuro confirmar la función de estas gotas en nuestro modelo.

Respecto a esto último, cabe destacar que los TAMs, que representan una población única *in vivo*, comparten diversas características con los dMØ y son un modelo interesante de estudio en

relación con los MØ de la interfase, del mismo modo que mencionamos anteriormente para células CTB invasivas, mostrando nuevamente la relevancia del *diálogo* entre ambos tipos celulares. En ambas situaciones se produce un alto reclutamiento de células inmunes por las células tumorales/CTB, que frente al microambiente adquieren perfiles más tolerogénicos y antiinflamatorios, estimulando la angiogénesis. El estudio del metabolismo en estos macrófagos TAMs muestra perfiles particulares intermedios pero del tipo M2-like con características similares a las adquiridas por los dMØ, con una activación de la glucólisis, mayor expresión de FAT/CD36 y metabolismo lipídico sosteniendo la FAO, pero también una mayor FAS, y un metabolismo alterado de glutamato, sosteniendo el crecimiento tumoral¹²⁵. Más aún, Wenes *et al* ha mostrado la relevancia de la vía de mTOR en un modelo tumoral murino, donde la activación de mTOR es antitumoral en TAMs en microambientes hipóxicos, pero protumoral en las células cancerosas¹²⁴.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en Mo que muestran que la modulación del metabolismo por los factores citotrofoblásticos sostiene la inducción de un perfil antiinflamatorio, evaluamos a continuación el efecto de estos mismos factores sobre MØ diferenciados, para analizar si esta reprogramación metabólica ocurre también en células residentes en el tejido, y evaluar su plasticidad. Para esto utilizamos un modelo *in vitro* de diferenciación a partir de Mo con M-CFS por 5 días, debido a su mayor similitud con perfiles M2 residentes en la placenta³⁰⁶. Previo al análisis de la reprogramación metabólica, confirmamos la adquisición de los perfiles funcionales en estos MØ luego de otras 24h de incubación con nuestros estímulos, lo que mostró que el MC-Tb *educa* fenotípicamente a estos MØ, respondiendo diferencialmente al LPS con la inhibición de marcadores proinflamatorios como CD86 y citoquinas proinflamatorias como TNF- α , induciendo además la producción de IL-10³⁰⁷. IL-1 β no solo es una citoquina proinflamatoria en contextos de infección sino que actúa como citoquina proimplantatoria durante la placentación y es inducida por MC-Tb en ausencia de LPS²⁵³, por lo que no es llamativo que se encuentre inducida en presencia de ambos estímulos, en paralelo con la disminución de los otros factores evaluados y la producción de IL-10.

Los MØ diferenciados expuestos a MC-Tb/LPS por 20min y 18h respondieron metabólicamente similar a los Mo, mostrando una inhibición en la incorporación de glucosa por LPS, pero que fue más marcada a 18h, y un aumento en la incorporación de LCFAs, reafirmando que tanto los Mo como los MØ son susceptibles a una reprogramación metabólica que sostenga la homeostasis en la interfase, y que esta inducción ocurre en paralelo con la adquisición del fenotipo. De hecho, los resultados preliminares del test de estrés glucolítico mostraron menor glucólisis para los macrófagos preincubados con MC-Tb, y el aumento en estas células respecto a la condición basal va en línea con los reportes que muestran que los MØ activados en perfiles M2 poseen mayor actividad glucolítica que los MØ no activados¹²⁸. Más aún, la oligomicina no produjo cambios observables en los MØ+LPS, y esto se condice con los reportes recientes que muestran que los MØ

humanos diferenciados con M-CSF y estimulados con LPS, prácticamente no dependen de la mitocondria para la producción de ATP¹²⁷. El hecho de que la liberación de lactato tienda a aumentar en los MØ estimulados con MC-Tb va en línea con lo anterior, y sugiere que las vías metabólicas activadas en la estimulación con LPS así como por el MC-Tb pueden coincidir en algunos puntos, pero sostienen procesos diferentes. Teniendo en cuenta el aporte de altas concentraciones de lactato presente en el MC-Tb, aún no hemos podido dilucidar sus efectos dependientes de receptores GPR81 ni a través de la incorporación por transportadores MCT en nuestro modelo. Se ha reportado el rol del lactato en la adquisición de perfiles M2-*like* en los TAMs⁹⁹, sin embargo estos estudios se encuentran hechos en modelos murinos donde la arginasa-1 cumple un rol fundamental en la adquisición de este perfil, y recientemente hay algunos trabajos que muestran que en humanos estos mecanismos no funcionarían del mismo modo¹²⁷. Otros trabajos con cTb reportan que el ácido láctico derivado de estas células podría inducir perfiles M2-*like* en ambientes de normoxia (5% de oxígeno en la placenta), y en ambientes de hipoxia/anoxia -con altas cantidades de ácido láctico- inducirían perfiles M1-*like* y esto se encuentra asociado a RSA¹⁰⁰. Resultados preliminares de nuestro laboratorio mostraron que el lactato puro en concentraciones similares a las que se detectan en el MC-Tb no induce los mismos rearrreglos metabólicos observados con el MC-Tb sobre los Mo, por lo que el rol de este metabolito en el metabolismo y la adquisición de perfiles M2-*like* aún requiere más estudio. Los efectos del lactato u otros metabolitos ácidos que eventualmente se encuentran en el MC-Tb no parecen estar relacionados con una reducción del pH extracelular, ya que los ensayos fueron realizados a pH dentro del rango 7-7.6. Teniendo en cuenta la diversidad de factores solubles y metabolitos que contiene el MC-Tb, resulta necesario continuar con la evaluación e identificación de los principales desencadenantes de las respuestas metabólicas y fenotípicas observadas. En línea con los resultados presentados en el primer capítulo de esta Tesis, que ponen de manifiesto el rol de VIP en el metabolismo de células CTB, resultados previos de nuestro grupo mostraron que células Swan 71 silenciadas para VIP son incapaces de inducir un fenotipo antiinflamatorio en Mo respecto a la inducción por células transfectadas con siRNA *srcbl*, y más aún, el MC-Tb de estas células falló en inducir un aumento en la eferocitosis por Mo, en comparación con el aumento observado por la estimulación con Swan 71 *srcbl*²¹⁴.

En consistencia con mayor glucólisis y un TCA interrumpido en los perfiles M1, un aumento en la población de MØ M1 resultaría en la acumulación de succinato, que ha sido previamente asociado a RSA y a la producción de ROS por una ETC reversa en situaciones de isquemia-reperfusión y condiciones de hipoxia³⁰⁸, lo que también se observa en embarazos con PE. Embarazos con RCF también han mostrado aumentada la enzima PDK1, que sostiene la inducción de perfiles M1, e inhibe a la enzima PDH reduciendo la actividad del TCA³⁰⁹.

Teniendo en cuenta estos reportes, y que la población de M \emptyset en la interfase en las primeras etapas de la placentación está compuesta por subpoblaciones M1 y M2, que promueven la inflamación inicial pero su relación y función debe mantenerse finamente controlada, nos resultó de interés estudiar el impacto de factores M1 sobre el metabolismo de las células CTB. Para esto, realizamos los ensayos ya descritos pero obteniendo MC-M1 luego de la incubación de M \emptyset con GM-CSF+LPS. Las células CTB respondieron disminuyendo la incorporación de glucosa y la expresión de *glut1* y de las citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α , sin modificar la incorporación de LCFAs ni la migración celular, resultados que difieren de la respuesta de estas células a la estimulación *in vitro* con LPS, donde la expresión de citoquinas proinflamatorias aumenta. En conjunto con los reportes de que los perfiles M1 inhiben la invasión trofoblástica, que un ambiente proinflamatorio excesivo resulta en una placentación deficiente³⁰¹, y nuestros resultados que muestran que la activación de la vía glucolítica y la FOSFOX en células CTB promueven las funciones celulares durante la placentación, las observaciones en células CTB+MC-M1 sugieren que se encuentran factores en el MC-M1 que modulan el metabolismo CTB y su función.

Entre los factores que pueden estar involucrados en los efectos del MC-M1 hipotetizamos que el itaconato tiene un papel como posible mediador debido a que es producido en alta concentración en Mo/M \emptyset frente a la estimulación con LPS y en situaciones fisiológicas de inflamación estéril, incluso detectándose desregulado en suero en pacientes con PE²⁶⁵. Resulta muy interesante en el microambiente proimplantatorio por su expresión a tiempos largos luego de la estimulación, y su acción de activación de un programa antiinflamatorio luego de la adquisición de perfiles M1. Frente al LPS, los M \emptyset acumulan grandes cantidades de itaconato intracelular. Hasta el momento, el punto de ruptura del TCA con inducción de itaconato e inhibición de la SDH/acumulación de succinato resulta de particular interés, teniendo en cuenta que la acumulación de succinato se propone asociada a la activación de un programa proinflamatorio, pero a la vez sería una señal de que el proceso inflamatorio está siendo atenuado. La incubación directa de CTB con el metabolito itaconato, aumentó la incorporación de LCFAs y tendió a aumentar las gotas lipídicas pero disminuyó la incorporación de glucosa sin modificar la migración. Aún falta mucha información sobre los mecanismos de exportación de itaconato fuera de la célula, y se ha propuesto que su acción extracelular está mediada por receptores específicos aunque se desconoce su estructura. Se ha logrado cuantificar en algunos trabajos la concentración de itaconato intracelular y extracelular en líneas celulares y en macrófagos de ratón que varían en rangos de mM y μ M respectivamente, sin embargo al momento las concentraciones extracelulares en M \emptyset humanos no están definidas^{262,310,311}.

En este sentido, es posible hipotetizar que la adquisición fisiológica de perfiles M1 en la interfase con funciones en la decidualización e implantación, vendría aparejado con la inducción de un programa que limite esta inducción con la producción de itaconato, regulando los perfiles metabólicos y funcionales de las CTB. Esta regulación metabólica parecería ser importante en el *switch* M1/M2 en las primeras etapas de la gestación, teniendo en cuenta la relevancia del cambio de perfil pro a antiinflamatorio para la evolución normal de la gestación. En línea con esta hipótesis, estamos avanzando en el abordaje metabólico que permitirá identificar este u otros metabolitos como mediadores de la comunicación inmune-trofoblástica en etapas tempranas de la gestación.

Hasta donde sabemos, este es el primer informe sobre el efecto de VIP en la incorporación de nutrientes por las células citotrofoblásticas y por la placenta tanto in vitro como in vivo. Los efectos tendrían relevancia en todas las etapas del embarazo considerando las diversas funciones de las células citotrofoblásticas que requieren fuentes de energía disponibles rápidamente al principio de la placentación. La regulación del metabolismo de las células citotrofoblásticas en el proceso de placentación resulta evidente para sostener un 'diálogo' trofoblasto-macrófago decidual regulado, manteniendo la homeostasis en el tejido y sosteniendo el crecimiento fetal.

La elucidación de las vías que modulan la incorporación y el transporte de nutrientes por las distintas células en la placenta, cuya regulación se asocia a complicaciones gestacionales como la preeclampsia, la RCF y la programación fetal de enfermedades de la vida adulta, es crucial para identificar genes marcadores como herramientas de diagnóstico. La predisposición a enfermedades en la descendencia por programación fetal sugiere que la detección temprana de alteraciones metabólicas placentarias podría prevenir enfermedades metabólicas en la vida adulta.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jarvis, G. E. Early embryo mortality in natural human reproduction: What the data say. *F1000Research* **5**, 2765 (2017).
2. Duttaroy, A. K. & Basak, S. Placentation as a Predictor of Feto-Placental Outcome: Effects of Early Nutrition. in *Early Nutrition and Lifestyle Factors* (2016). doi:10.1007/978-3-319-38804-5.
3. Burton, G. J., Fowden, A. L. & Thornburg, K. L. Placental origins of chronic disease. *Physiol. Rev.* **96**, 1509–1565 (2016).
4. Chassen, S. & Jansson, T. Complex, coordinated and highly regulated changes in placental signaling and nutrient transport capacity in IUGR. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1866**, 0–1 (2020).
5. Mor, G. & Cardenas, I. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 425–433 (2010).
6. Mor, G., Aldo, P. & Alvero, A. B. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 469–482 (2017).
7. Aplin, J. D., Myers, J. E., Timms, K. & Westwood, M. Tracking placental development in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16**, 479–494 (2020).
8. Norwitz, E. R., Schust, D. J. & Fisher, S. J. Implantation and the survival of early pregnancy. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1400–1408 (2001).
9. Usadi, R. S. *et al.* Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertil. Steril.* **79**, 970–974 (2003).
10. Dey, S. K. *et al.* Molecular cues to implantation. *Endocr. Rev.* **25**, 341–373 (2004).
11. Salamonsen, L. A., Nie, G., Hannan, N. J. & Dimitriadis, E. Society for reproductive biology founders lecture 2009. Preparing fertile soil: The importance of endometrial receptivity. *Reprod. Fertil. Dev.* **21**, 923–934 (2009).
12. Huppertz, B. Placental Origins of Preeclampsia: Challenging the Current Hypothesis. *Hypertension* **51**, 970–975 (2008).
13. Salamonsen, L. A. & Nie, G. Proteases at the endometrial-trophoblast interface: Their role in implantation. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **3**, 133–143 (2002).
14. Zhong, Y., Tuuli, M. & Odibo, A. O. First-trimester assessment of placenta function and the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Prenatal Diagnosis* vol. 30 293–308 (2010).
15. James, J. L., Stone, P. R. & Chamley, L. W. Cytotrophoblast differentiation in the first trimester of pregnancy: Evidence for separate progenitors of extravillous trophoblasts and syncytiotrophoblast. *Reproduction* **130**, 95–103 (2005).
16. Dasilva-Arnold, S., James, J. L., Al-Khan, A., Zamudio, S. & Illsley, N. P. Differentiation of first trimester cytotrophoblast to extravillous trophoblast involves an epithelial-mesenchymal transition. *Placenta* **36**, 1412–1418 (2015).
17. Knöfler, M. & Pollheimer, J. Human placental trophoblast invasion and differentiation: A particular focus on Wnt signaling. *Front. Genet.* **4**, 1–14 (2013).
18. Bischof, P. & Campana, A. Molecular mediators of implantation. *Bailliere's Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **14**, 801–814 (2000).
19. E. Davies, J. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation. *Cell Adhes. Migr.* **10**, 310–321 (2016).
20. Pijnenborg, R., Vercruyse, L. & Hanssens, M. The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. *Placenta* **27**, 939–958 (2006).
21. Weiss, G., Sundl, M., Glasner, A. & Huppertz, B. The trophoblast plug during early pregnancy: a deeper insight. *Histochem. Cell Biol.* **146**, 749–756 (2016).
22. Huppertz, B. Traditional and new routes of trophoblast invasion and their implications for pregnancy diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
23. Fitzgerald, J. S. *et al.* Governing the Invasive Trophoblast: Current Aspects on Intra- and Extracellular Regulation. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 492–505 (2010).
24. Moser, G. *et al.* Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. *Hum. Reprod.* **25**, 1127–1136 (2010).
25. Achache, H. & Revel, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum. Reprod. Update* **12**, 731–746 (2006).
26. Dimitriadis, E., Nie, G., Hannan, N. J., Paiva, P. & Salamonsen, L. A. Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 313–322 (2010).

27. Malassiné, A. & Cronier, L. Hormones and human trophoblast differentiation: A review. *Endocrine* **19**, 3–11 (2002).
28. Huppertz, B., Weiss, G. & Moser, G. Trophoblast invasion and oxygenation of the placenta: Measurements versus presumptions. *J. Reprod. Immunol.* **101–102**, 74–79 (2014).
29. Watson, E. D. *et al.* Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology* **20**, 180–193 (2005).
30. Moffett, A. & Loke, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 584–94 (2006).
31. Boyd, K. L., Muehlenbachs, A., Rendi, M. H., Garcia, R. L. & Gibson-Corley, K. N. Female Reproductive System. in *Comparative Anatomy and Histology* (eds. Treuting, P. M., Dintzis, S. M. & Montine, K. S. B. T.-C. A. and H. (Second E.) 303–334 (Academic Press, 2017). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00017-8>.
32. Hauk, V. *et al.* Trophoblast VIP deficiency entails immune homeostasis loss and adverse pregnancy outcome in mice. *FASEB J.* **33**, 1801–1810 (2019).
33. Bevilacqua, E., Lorenzon, A. R., Bandeira, C. L. & Hoshida, M. S. *Biology of the Ectoplacental Cone. The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy* (Elsevier, 2014). doi:[10.1016/b978-0-12-394445-0.00010-2](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394445-0.00010-2).
34. Winterhager, E. & Gellhaus, A. Transplacental Nutrient Transport Mechanisms of Intrauterine Growth Restriction in Rodent Models and Humans. *Front. Physiol.* **8**, 1–13 (2017).
35. Dilworth, M. R. & Sibley, C. P. Review : Transport across the placenta of mice and women. *Placenta* **44**, 1–6 (2012).
36. Szlapinski, S. K. *et al.* Altered pancreas remodeling following glucose intolerance in pregnancy in mice. *J. Endocrinol.* (2020) doi:[10.1530/JOE-20-0012](https://doi.org/10.1530/JOE-20-0012).
37. Ander, S. E., Diamond, M. S. & Coyne, C. B. Immune responses at the maternal-fetal interface. *Sci. Immunol.* **4**, (2019).
38. Fainboim, L. & Geffner, J. R. *Introducción a la inmunología humana.* (2011).
39. 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.* **69**, 359–368 (2013).
40. 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.* **1221**, 80–87 (2011).
41. Norwitz, E. R. *et al.* Molecular regulation of parturition: The role of the decidual clock. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, 1–20 (2015).
42. Pfaller, B., Bendien, S., Ditisheim, A. & Eiwegger, T. Management of allergic diseases in pregnancy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **77**, 798–811 (2022).
43. Gomez-Lopez, N., Guilbert, L. J. & Olson, D. M. Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 625–633 (2010).
44. Moffett, A. & Colucci, F. Uterine NK cells: Active regulators at the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.* **124**, 1872–1879 (2014).
45. Faas, M. M. & Vos, P. De. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta* **56**, 44–52 (2017).
46. Moffett-King, A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 656–663 (2002).
47. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621–667 (2002).
48. Liu, S. *et al.* The role of decidual immune cells on human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* **124**, 44–53 (2017).
49. Schumacher, A., Sharkey, D. J., Robertson, S. A. & Zenclussen, A. C. Immune Cells at the Fetomaternal Interface: How the Microenvironment Modulates Immune Cells To Foster Fetal Development. *J. Immunol.* **201**, 325–334 (2018).
50. Gori, S. *et al.* Decidualization Process Induces Maternal Monocytes to Tolerogenic IL-10-Producing Dendritic Cells (DC-10). *Front. Immunol.* **11**, 1–13 (2020).
51. Svensson-Arvelund, J. *et al.* The human fetal placenta promotes tolerance against the semiallogeneic fetus by inducing regulatory T cells and homeostatic M2 macrophages. *J. Immunol.* **194**, 1534–1544 (2015).
52. Teles, A. *et al.* Origin of Foxp3 + cells during pregnancy. *Am J Clin Exp Immunol* **2**, 222–233 (2013).
53. Saito, S., Nakashima, A., Shima, T. & Ito, M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 601–610 (2010).
54. Amsalem, H. *et al.* Identification of a Novel Neutrophil Population: Proangiogenic Granulocytes in Second-Trimester Human Decidua. *J. Immunol.* **193**, 3070–3079 (2014).
55. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev.*

- Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
56. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, 1–13 (2014).
 57. Mills, C. D. & Ley, K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. *J. Innate Immun.* **6**, 716–726 (2014).
 58. Krzyszczyk, P., Schloss, R., Palmer, A. & Berthiaume, F. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Front. Physiol.* **9**, 1–22 (2018).
 59. Thomas, A. C. & Mattila, J. T. ‘Of mice and men’: Arginine metabolism in macrophages. *Front. Immunol.* **5**, 1–7 (2014).
 60. Brancato, S. K. & Albina, J. E. Wound macrophages as key regulators of repair: Origin, phenotype, and function. *Am. J. Pathol.* **178**, 19–25 (2011).
 61. Wang, N., Liang, H. & Zen, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Front. Immunol.* **5**, 1–9 (2014).
 62. Zhang, Y. H., He, M., Wang, Y. & Liao, A. H. Modulators of the balance between M1 and M2 macrophages during pregnancy. *Front. Immunol.* **8**, 1–12 (2017).
 63. Li, M. *et al.* Modulation of Decidual Macrophage Polarization by Macrophage Colony-Stimulating Factor Derived from First-Trimester Decidual Cells: Implication in Preeclampsia. *Am. J. Pathol.* **186**, 1258–1266 (2016).
 64. Mor, G. & Abrahams, V. M. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 1–8 (2003).
 65. Tang, M. X., Hu, X. H., Liu, Z. Z., Kwak-Kim, J. & Liao, A. H. What are the roles of macrophages and monocytes in human pregnancy? *J. Reprod. Immunol.* **112**, 73–80 (2015).
 66. Grasso, E. N. Mantenimiento de la homeostasis inmunológica desde la decidualización a la implantación: relevancia del sistema VIP/VPAC. (2016).
 67. Parasar, P., Guru, N. & Nayak, N. R. Contribution of macrophages to fetomaternal immunological tolerance. *Hum. Immunol.* **82**, 325–331 (2021).
 68. Abrahams, V. M. & Mor, G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. *Placenta* **26**, 540–547 (2005).
 69. Koga, K., Aldo, P. B. & Mor, G. Toll-like receptors and pregnancy: Trophoblast as modulators of the immune response. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **35**, 191–202 (2009).
 70. Fest, S. *et al.* Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol. AJRI Off. J. Am. Soc. Immunol. Reprod. Int. Coord. Comm. Immunol. Reprod.* **57**, 55–66 (2007).
 71. Das, A. *et al.* Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am. J. Pathol.* **185**, 2596–2606 (2015).
 72. Ding, J. *et al.* Crosstalk Between Trophoblast and Macrophage at the Maternal-Fetal Interface: Current Status and Future Perspectives. *Front. Immunol.* **12**, 1–10 (2021).
 73. Renaud, S. J. *et al.* Activated macrophages inhibit human cytotrophoblast invasiveness in vitro. *Biol. Reprod.* **73**, 237–243 (2005).
 74. Renaud, S. J., Macdonald-Goodfellow, S. K. & Graham, C. H. Coordinated regulation of human trophoblast invasiveness by macrophages and interleukin 10. *Biol. Reprod.* **76**, 448–454 (2007).
 75. Grasso, E. *et al.* Differential migration and activation profile of monocytes after trophoblast interaction. *PLoS One* **9**, 1–10 (2014).
 76. Smith, S. D., Dunk, C. E., Aplin, J. D., Harris, L. K. & Jones, R. L. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am. J. Pathol.* **174**, 1959–1971 (2009).
 77. Anacker, J. *et al.* Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases. *Mol. Hum. Reprod.* **17**, 637–652 (2011).
 78. Thornburg, K. L. *et al.* Biological features of placental programming. *Placenta* **48**, S47–S53 (2016).
 79. Hebert, J. F. & Myatt, L. Placental mitochondrial dysfunction with metabolic diseases: Therapeutic approaches. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1867**, 165967 (2021).
 80. Aye, I. L. M. H., Aiken, C. E., Charnock-Jones, D. S. & Smith, G. C. S. Placental energy metabolism in health and disease—significance of development and implications for preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **226**, S928–S944 (2022).
 81. Kolahi, K. S., Valent, A. M. & Thornburg, K. L. Cytotrophoblast, Not Syncytiotrophoblast, Dominates Glycolysis and Oxidative Phosphorylation in Human Term Placenta. *Sci. Rep.* **7**, 42941 (2017).
 82. Fisher, J. J., Bartho, L. A., Perkins, A. V. & Holland, O. J. Placental mitochondria and reactive oxygen species in the physiology and pathophysiology of pregnancy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **47**, 176–184

- (2020).
83. Muri, J. & Kopf, M. Redox regulation of immunometabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 363–381 (2021).
 84. Pearce, E. L. & Pearce, E. J. Metabolic Pathways In Immune Cell Activation And Quiescence. *Immunity* **38**, 633–643 (2013).
 85. Hay, W. W. Regulation of placental metabolism by glucose supply. *Reprod. Fertil. Dev.* **7**, 365–375 (1995).
 86. Michelsen, T. M. *et al.* Uteroplacental Glucose Uptake and Fetal Glucose Consumption: A Quantitative Study in Human Pregnancies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **104**, 873–882 (2018).
 87. Barta, E. & Drugan, A. Glucose transport from mother to fetus-A theoretical study. *J. Theor. Biol.* **263**, 295–302 (2010).
 88. Hahn, T. *et al.* Localisation of the high affinity facilitative glucose transporter protein GLUT 1 in the placenta of human, marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) and rat at different developmental stages. *Cell Tissue Res.* **280**, 49–57 (1995).
 89. Hauguel-de Mouzon, S. *et al.* The GLUT3 glucose transporter isoform is differentially expressed within human placental cell types. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 2689–2694 (1997).
 90. Illsley, N. P. & Baumann, M. U. Human placental glucose transport in fetoplacental growth and metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1866**, 165359 (2020).
 91. Jansson, T., Wennergren, M. & Illsley, N. P. Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 1554–1562 (1993).
 92. Baumann, M. U., Deborde, S. & Illsley, N. P. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* **19**, 13–22 (2002).
 93. Xu, J. *et al.* Regulation of human trophoblast GLUT3 glucose transporter by mammalian target of rapamycin signaling. *Int. J. Mol. Sci.* (2015) doi:10.3390/ijms160613815.
 94. Illsley, N. P. & Sellersb, M. C. Glycaemic Regulation Placenta of Glucose Transporter Expression and Activity in the Human. *Placenta* 517–524 (1998).
 95. Correia-Branco, A. *et al.* Xanthohumol impairs glucose uptake by a human first-trimester extravillous trophoblast cell line (HTR-8/SVneo cells) and impacts the process of placentation. *Mol. Hum. Reprod.* **21**, 803–815 (2015).
 96. Patra, K. C. & Hay, N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem. Sci.* (2014) doi:10.1016/j.tibs.2014.06.005.The.
 97. Gardner, D. K. Lactate production by the mammalian blastocyst: Manipulating the microenvironment for uterine implantation and invasion? *BioEssays* **37**, 364–371 (2015).
 98. Gott, A. L., Hardy, K., Winston, R. M. L. & Leese, H. J. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* **5**, 104–108 (1990).
 99. Colegio, O. R. *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* **513**, 559–563 (2014).
 100. Gao, L. *et al.* Trophoblast-derived Lactic Acid Orchestrates Decidual Macrophage Differentiation via SRC/LDHA Signaling in Early Pregnancy. *Int. J. Biol. Sci.* **18**, 599–616 (2022).
 101. Vaughan, O. R., Rosario, F. J., Powell, T. L. & Jansson, T. *Regulation of Placental Amino Acid Transport and Fetal Growth. Molecular Biology of Placental Development and Disease* vol. 145 (Elsevier Inc., 2017).
 102. Desforges, M., Greenwood, S. L. L., Glazier, J. D. D., Westwood, M. & Sibley, C. P. P. The contribution of SNAT1 to system A amino acid transporter activity in human placental trophoblast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 130–134 (2010).
 103. Okamoto, Y. *et al.* Expression and regulation of 4F2hc and hLAT1 in human trophoblasts. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **282**, 196–204 (2002).
 104. Zaugg, J. *et al.* Small molecule inhibitors provide insights into the relevance of LAT1 and LAT2 in materno-foetal amino acid transport. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 12681–12693 (2020).
 105. Glazier, J. D. *et al.* Association between the activity of the system A amino acid transporter in the microvillous plasma membrane of the human placenta and severity of fetal compromise in intrauterine growth restriction. *Pediatr. Res.* **42**, 514 (1997).
 106. Cleal, J. K., Lofthouse, E. M., Sengers, B. G. & Lewis, R. M. A systems perspective on placental amino acid transport. *Journal of Physiology* (2018) doi:10.1113/JP274883.
 107. Kolahi, K., Louey, S., Varlamov, O. & Thornburg, K. Real-Time Tracking of BODIPY-C12 Long-Chain Fatty Acid in Human Term Placenta Reveals Unique Lipid Dynamics in Cytotrophoblast Cells. *PLoS One* 1–23 (2016) doi:10.1371/journal.pone.0153522.

108. Magnusson-Olsson, A. L., Lager, S., Jacobsson, B., Jansson, T. & Powell, T. L. Effect of maternal triglycerides and free fatty acids on placental LPL in cultured primary trophoblast cells and in a case of maternal LPL deficiency. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **293**, 1–33 (2007).
109. Horita, H., Kuroda, E., Hachisuga, T., Kashimura, M. & Yamashita, U. Induction of prostaglandin E2 production by leukemia inhibitory factor promotes migration of first trimester extravillous trophoblast cell line, HTR-8/SVneo. *Hum. Reprod.* **22**, 1801–1809 (2007).
110. Mashek, D. G., Li, L. O. & Coleman, R. A. Long-chain acyl-CoA synthetases and fatty acid channeling. *Future Lipidol.* **2**, 465–476 (2007).
111. Miles, E. A., Childs, C. E. & Calder, P. C. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) and the developing immune system: A narrative review. *Nutrients* **13**, 1–21 (2021).
112. Assumpção, R. P. *et al.* Fatty acid profile of maternal and fetal erythrocytes and placental expression of fatty acid transport proteins in normal and intrauterine growth restriction pregnancies. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **125**, 24–31 (2017).
113. Kazantzis, M. & Stahl, A. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 852–857 (2012).
114. Detraux, D. & Renard, P. Succinate as a New Actor in Pluripotency and Early Development? *Metabolites* **12**, (2022).
115. Mills, E. & O’Neill, L. A. J. Succinate: A metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol.* **24**, 313–320 (2014).
116. Brett, K. E., Ferraro, Z. M., Yockell-Lelievre, J., Gruslin, A. & Adamo, K. B. Maternal–Fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: The role of the placenta. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 16153–16185 (2014).
117. Vardhana, P. A. & Illsley, N. P. Transepithelial Glucose Transport and Metabolism in BeWo Choriocarcinoma Cells. *Placenta* 653–660 (2002).
118. Baumann, M. U., Zamudio, S. & Illsley, N. P. Hypoxic upregulation of glucose transporters in BeWo choriocarcinoma cells is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**, C477–85 (2007).
119. Sferruzzi-Perri, A. N. *et al.* An obesogenic diet during mouse pregnancy modifies maternal nutrient partitioning and the fetal growth trajectory. *FASEB J.* **27**, 3928–3937 (2013).
120. Constância, M. *et al.* Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 19219–19224 (2005).
121. Ganguly, A., Collis, L. & Devaskar, S. U. Placental glucose and amino acid transport in calorie-restricted wild-type and glut3 null heterozygous mice. *Endocrinology* **153**, 3995–4007 (2012).
122. Man, K., Kuttyavin, V. I. & Chawla, A. Tissue Immunometabolism: Development, Physiology, and Pathobiology. *Cell Metab.* **25**, 11–26 (2017).
123. O’Neill, L., Kishton, R. & Rathmell, J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 553–565 (2016).
124. Wenes, M. *et al.* Macrophage Metabolism Controls Tumor Blood Vessel Morphogenesis and Metastasis. *Cell Metab.* **24**, 701–715 (2016).
125. Liu, Y. *et al.* Metabolic reprogramming in macrophage responses. *Biomark. Res.* **9**, 1–17 (2021).
126. Mathis, D. Organismal immunometabolism: advances in both directions. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 83–84 (2019).
127. Verberk, S. G. S. *et al.* An integrated toolbox to profile macrophage immunometabolism. *Cell Reports Methods* **2**, (2022).
128. Van den Bossche, J., O’Neill, L. A. & Menon, D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends Immunol.* **38**, 395–406 (2017).
129. Palsson-McDermott, E. M. *et al.* Pyruvate Kinase M2 Regulates Hif-1 α Activity and IL-1 β Induction and Is a Critical Determinant of the Warburg Effect in LPS-Activated Macrophages. *Cell Metab.* **21**, 65–80 (2015).
130. Tannahill, G. M. *et al.* Succinate is a danger signal that induces IL-1 β via HIF-1 α . *Nature* **496**, 238–242 (2013).
131. Mills, E. L. *et al.* Repurposing mitochondria from ATP production to ROS generation drives a pro-inflammatory phenotype in macrophages that depends on succinate oxidation by complex II. *Cell* **167**, 457 (2016).
132. Mills, E. L., Kelly, B. & O’Neill, L. A. J. Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat. Immunol.* **18**, 488–498 (2017).
133. Palsson-mcdermott, E. M. *et al.* Article Pyruvate Kinase M2 Regulates Hif-1 a Activity and IL-1 b Induction and Is a Critical Determinant of the Warburg Effect in LPS-Activated Macrophages. *Cell*

- Metab.* **21**, 65–80 (2015).
134. Mills, E. L. *et al.* Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature* **556**, 113–117 (2018).
 135. Caldwell, R. B., Toque, H. A., Narayanan, S. P. & Caldwell, R. W. Arginase: An old enzyme with new tricks. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 395–405 (2015).
 136. Lachmandas, E. *et al.* Microbial stimulation of different Toll-like receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes. *Nat. Microbiol.* **2**, (2016).
 137. Kang, S. *et al.* The spectrum of macrophage activation by immunometabolism. *Japanese Soc. Immunol.* 1–30 (2020).
 138. Thiele, K., Diao, L. & Arck, P. C. Immunometabolism, pregnancy, and nutrition. (2017).
 139. Wei, Y. *et al.* Metabolic Reprogramming of Immune Cells at the Maternal-Fetal Interface and the Development of Techniques for Immunometabolism. *Front. Immunol.* **12**, 1–14 (2021).
 140. Rees, A. *et al.* Immunometabolic adaptation and immune plasticity in pregnancy and the bi-directional effects of obesity. *Clin. Exp. Immunol.* **208**, 132–146 (2022).
 141. Redline, R. W. Placental Pathology: A Systematic Approach with Clinical Correlations. *Placenta* **29**, 86–91 (2008).
 142. Ishihara, N. *et al.* Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **186**, 158–166 (2002).
 143. Joo, E. H. *et al.* Effect of endogenous and exogenous oxidative stress triggers on adverse pregnancy outcomes: Preeclampsia, fetal growth restriction, gestational diabetes mellitus and preterm birth. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 144. Ning, F., Liu, H. & Lash, G. E. The Role of Decidual Macrophages During Normal and Pathological Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **75**, 298–309 (2016).
 145. Burton, G. J. & Jauniaux, E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **11**, 342–352 (2004).
 146. Reister, F. *et al.* The distribution of macrophages in spiral arteries of the placental bed in pre-eclampsia differs from that in healthy patients. *Placenta* **20**, 229–233 (1999).
 147. Faas, M. M., Spaans, F. & De Vos, P. Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia. *Front. Immunol.* **5**, 1–11 (2014).
 148. Zhang, S. *et al.* Placental adaptations in growth restriction. *Nutrients* **7**, 360–389 (2015).
 149. Lüscher, B. P. *et al.* Placental glucose transporter (GLUT)-1 is down-regulated in preeclampsia. *Placenta* **55**, 94–99 (2017).
 150. Janzen, C. *et al.* Placental glucose transporter 3 (GLUT3) is up-regulated in human pregnancies complicated by late-onset intrauterine growth restriction. *Placenta* **34**, 1072–1078 (2013).
 151. Challis, D. E., Pfarrer, C. D., Ritchie, J. W. K., Koren, G. & Adamson, S. L. Glucose Metabolism Is Elevated and Vascular Resistance and Maternofetal Transfer Is Normal in Perfused Placental Cotyledons from Severely Growth-Restricted Fetuses. *Pediatr. Res.* **47**, 309–315 (2000).
 152. Vangrieken, P. *et al.* Placental Mitochondrial Abnormalities in Preeclampsia. *Reprod. Sci.* 2186–2199 (2021).
 153. Roos, S., Lagerlof, O., Wennergren, M., Powell, T. L. & Jansson, T. Regulation of amino acid transporters by glucose and growth factors in cultured primary human trophoblast cells is mediated by mTOR signaling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **297**, 723–731 (2009).
 154. Forbes, K. & Westwood, M. The IGF axis and placental function. *Horm. Res.* **69**, 129–137 (2008).
 155. Sferruzzi-Perri, A. N., Sandovici, I., Constancia, M. & Fowden, A. L. Placental phenotype and the insulin-like growth factors: resource allocation to fetal growth. *Journal of Physiology* (2017) doi:10.1113/JP273330.
 156. Roos, S., Powell, T. L. & Jansson, T. Placental mTOR links maternal nutrient availability to fetal growth. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 295–298 (2009).
 157. Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471–484 (2006).
 158. Reiling, J. H. & Sabatini, D. M. Stress and mTOR signaling. *Oncogene* **25**, 6373–83 (2006).
 159. Rosario, F. J., Powell, T. L. & Jansson, T. Mechanistic target of rapamycin (mTOR) regulates trophoblast folate uptake by modulating the cell surface expression of FR-alpha and the RFC. *Sci. Rep.* **6**, 31705 (2016).
 160. Roos, S., Kanai, Y., Prasad, P. D., Powell, T. L. & Jansson, T. Regulation of placental amino acid transporter activity by mammalian target of rapamycin. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, 142–150 (2009).
 161. Knuth, A. *et al.* Placenta Growth Factor Induces Invasion and Activates p70 during Rapamycin

- Treatment in Trophoblast Cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **73**, 330–340 (2014).
162. Roos, S. *et al.* Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. *J. Physiol.* **582**, 449–459 (2007).
 163. Aiko, Y. *et al.* Differential levels of amino acid transporters System L and ASCT2, and the mTOR protein in placenta of preeclampsia and IUGR. *BMC Pregnancy Childbirth* **14**, 181 (2014).
 164. Dong, J. *et al.* Is there a definite relationship between placental mTOR signaling and fetal growth? *Biol. Reprod.* **103**, 471–486 (2020).
 165. Brunmeir, R. & Xu, F. Functional Regulation of PPARs through Post-Translational Modifications. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
 166. Peng, L. *et al.* Role of peroxisome proliferator-activated receptors (Ppars) in trophoblast functions. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–13 (2021).
 167. Bensinger, S. J. & Tontonoz, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* **454**, 470–477 (2008).
 168. Lalloyer, F. & Staels, B. Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 894–899 (2010).
 169. Wang, Q., Fujii, H. & Knipp, G. T. Expression of PPAR and RXR isoforms in the developing rat and human term placentas. *Placenta* **23**, 661–671 (2002).
 170. Schaiff, W. T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3874–3881 (2000).
 171. Tarrade, A. *et al.* PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 5017–5024 (2001).
 172. Liu, F. *et al.* Comparative Study of PPAR γ Targets in Human Extravillous and Villous Cytotrophoblasts. *PPAR Res.* **2020**, 9210748 (2020).
 173. Ahmadian, M. *et al.* PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* **19**, 557–566 (2013).
 174. Wang, S., Dougherty, E. J. & Danner, R. L. PPAR γ signaling and emerging opportunities for improved therapeutics. *Pharmacol. Res.* **111**, 76–85 (2016).
 175. Marion-Letellier, R., Savoye, G. & Ghosh, S. Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *Eur. J. Pharmacol.* **785**, 44–49 (2016).
 176. Duan, S. Z. *et al.* Hypotension, lipodystrophy, and insulin resistance in generalized PPARgamma-deficient mice rescued from embryonic lethality. *J. Clin. Invest.* **117**, 812–822 (2007).
 177. Said, S. I. The discovery of VIP: Initially looked for in the lung, isolated from intestine, and identified as a neuropeptide. *Peptides* **28**, 1620–1621 (2007).
 178. Waschek, J. A. VIP and PACAP: Neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair. *British Journal of Pharmacology* (2013) doi:10.1111/bph.12181.
 179. Jovanovic, S., Grbovic, L. & Jovanovic, A. Pregnancy does not alter the response of uterine arteries to vasoactive intestinal polypeptide. *Mol. Hum. Reprod.* **6**, 361–368 (2000).
 180. Ottesen, B. *et al.* Effects of VIP in the female genital tract. *Endocrinol. Jpn.* **27 Suppl 1**, 71–78 (1980).
 181. Colwell, C. S. *et al.* Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **285**, 939–949 (2003).
 182. Carmona-Alcocer, V. *et al.* Ontogeny of circadian rhythms and synchrony in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* **38**, 1326–1334 (2018).
 183. Korkmaz, O. T. & Tunçel, N. Advantages of Vasoactive Intestinal Peptide for the Future Treatment of Parkinson's Disease. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 4693–4701 (2019).
 184. Shi, L. *et al.* Vasoactive Intestinal Peptide Stimulates Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells Osteogenesis Differentiation by Activating Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway and Promotes Rat Skull Defect Repair. *Stem Cells Dev.* **29**, 655–666 (2020).
 185. Mukohyama, H., Ransjö, M., Taniguchi, H., Ohyama, T. & Lerner, U. H. The inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on osteoclast formation are associated with upregulation of osteoprotegerin and downregulation of RANKL and RANK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 158–163 (2000).
 186. Moody, T. W. & Jensen, R. T. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal peptide [Part 1]: biology, pharmacology, and new insights into their cellular basis of action/signaling which are providing new therapeutic targets. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **28**, 198–205 (2021).
 187. Gomariz, R. P. *et al.* An Overview of VPAC Receptors in Rheumatoid Arthritis: Biological Role and Clinical Significance. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **10**, 1–12 (2019).
 188. Couvineau, A. & Laburthe, M. VPAC receptors: Structure, molecular pharmacology and interaction with

- accessory proteins. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 42–50 (2012).
189. Murthy, K. S., Zhang, K. M., Jin, J. G., Grider, J. R. & Makhoulouf, G. M. VIP-mediated G protein-coupled Ca²⁺ influx activates a constitutive NOS in dispersed gastric muscle cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **265**, G660–G671 (1993).
190. Spengler, D. *et al.* Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* **365**, 170–175 (1993).
191. Straub, S. G. & Sharp, G. W. G. A wortmannin-sensitive signal transduction pathway is involved in the stimulation of insulin release by vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide. *J. Biol. Chem.* **271**, 1660–1668 (1996).
192. Toumi, F. *et al.* Vasoactive intestinal peptide induces IL-8 production in human colonic epithelial cells via MAP kinase-dependent and PKA-independent pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 187–191 (2004).
193. El Zein, N., Badran, B. & Sariban, E. VIP differentially activates α_2 integrins, CR1, and matrix metalloproteinase-9 in human monocytes through cAMP/PKA, EPAC, and PI-3K signaling pathways via VIP receptor type 1 and FPRL1. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 972–981 (2008).
194. Barrie, A. P., Clohessy, A. M., Buensuceso, C. S., Rogers, M. V. & Allen, J. M. Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide stimulates extracellular signal-regulated kinase 1 or 2 (ERK1/2) activity in a Ras-independent, mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1 or 2-dependent manner in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 19666–19671 (1997).
195. Lacombe, A. *et al.* Lack of vasoactive intestinal peptide reduces testosterone levels and reproductive aging in mouse testis. 153–160 (1998) doi:10.1677/JOE-07-0102.
196. Delgado, M. *et al.* Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylyl cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF- α and IL-6. *J. Immunol.* **162**, 1200–5 (1999).
197. Delgado, M. & Ganea, D. Inhibition of IFN- γ -Induced Janus Kinase-1-STAT1 Activation in Macrophages by Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylyl Cyclase-Activating Polypeptide. *J. Immunol.* **165**, 3051–3057 (2000).
198. Graf, A. H. *et al.* Localization and distribution of vasoactive neuropeptides in the human placenta. *Placenta* **17**, 413–421 (1996).
199. Marzioni, D. *et al.* Placental Expression of Substance P and Vasoactive Intestinal Peptide: Evidence for a Local Effect on Hormone Release. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 2378–2383 (2005).
200. Deutsch, P. J., Sun, Y. & Kroog, G. S. Vasoactive intestinal peptide increases intracellular cAMP and gonadotropin- α gene activity in JEG-3 syncytial trophoblasts: Constraints posed by desensitization. *J. Biol. Chem.* **265**, 10274–10281 (1990).
201. Ottesen, B. *et al.* Vasoactive intestinal polypeptide and the female genital tract: Relationship to reproductive phase and delivery. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **143**, 414–420 (1982).
202. Jovanovic, A., Grbovic, L. & Tulic, I. Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Hum. Reprod.* **4**, 71–76 (1998).
203. Basille, M. *et al.* Localization and characterization of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide receptors in the human cerebellum during development. *J. Comp. Neurol.* **496**, 468–478 (2006).
204. Spong, C. Y. *et al.* Maternal regulation of embryonic growth: The role of vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* **140**, 917–924 (1999).
205. Maduna, T. & Lelievre, V. Neuropeptides shaping the central nervous system development: Spatiotemporal actions of VIP and PACAP through complementary signaling pathways. *J. Neurosci. Res.* **94**, 1472–1487 (2016).
206. Loh, D. H. *et al.* Disrupted reproduction, estrous cycle, and circadian rhythms in female vasoactive intestinal peptide deficient mice. *J. Biol. Rhythms.* **29**, 355–369 (2015).
207. Hay, W. W., Catz, C. S., Grave, G. D. & Yaffe, S. J. Workshop summary: fetal growth: its regulation and disorders. *Pediatrics* **99**, 585–591 (1997).
208. Passemar, S. *et al.* VIP blockade leads to microcephaly in mice via disruption of Mcph1-Chk1 signaling. *J. Clin. Invest.* **121**, 3072–3087 (2011).
209. Lim, M. A. *et al.* Regardless of genotype, offspring of VIP-deficient female mice exhibit developmental delays and deficits in social behavior. *Int. J. Dev. Neurosci.* **26**, 423–434 (2008).
210. Papparini, D. E. *et al.* Vasoactive Intestinal Peptide shapes first trimester placenta trophoblast, vascular and immune cell cooperation. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 964–980 (2019).
211. Papparini, D. E. *et al.* Decidual factors and vasoactive intestinal peptide guide monocytes to higher migration, efferocytosis and wound healing in term human pregnancy. *Acta Physiol.* **232**, 0–3 (2021).
212. Fraccaroli, L. *et al.* VIP modulates the pro-inflammatory maternal response, inducing tolerance to

- trophoblast cells. *Br. J. Pharmacol.* **156**, 116–126 (2009).
213. Fraccaroli, L. *et al.* VIP boosts regulatory T cell induction by trophoblast cells in an in vitro model of trophoblast-maternal leukocyte interaction. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 49–58 (2015).
214. Vota, D. *et al.* Vasoactive Intestinal Peptide modulates trophoblast-derived cell line function and interaction with phagocytic cells through autocrine pathways. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
215. Grasso, E. *et al.* Impact of the Reticular Stress and Unfolded Protein Response on the inflammatory response in endometrial stromal cells. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
216. Grasso, E. *et al.* VIP induces the decidualization program and conditions the immunoregulation of the implantation process. *Mol. Cell. Endocrinol.* **460**, 63–72 (2018).
217. Cao, R. *et al.* Translational control of entrainment and synchrony of the suprachiasmatic circadian clock by mTOR/4E-BP1 signaling. *Neuron* **79**, 712–724 (2013).
218. Liu, D. *et al.* mTOR signaling in VIP neurons regulates circadian clock synchrony and olfaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E3296–E3304 (2018).
219. Martin, B. *et al.* Vasoactive intestinal peptide-null mice demonstrate enhanced sweet taste preference, dysglycemia, and reduced taste bud leptin receptor expression. *Diabetes* **59**, 1143–1152 (2010).
220. Talbot, J. *et al.* Feeding-dependent VIP neuron–ILC3 circuit regulates the intestinal barrier. *Nature* **579**, 575–580 (2020).
221. McCulloch, J. & Kelly, P. A. T. A functional role for vasoactive intestinal polypeptide in anterior cingulate cortex. *Nature* 438–440 (1983).
222. Magistretti, P. J., Cardinaux, J.-R. & Martin, J.-L. VIP and PACAP in the CNS: Regulators of Glial Energy Metabolism and Modulators of Glutamatergic Signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **865**, 213–225 (1998).
223. Felú, J. E., Mojena, M., Silvestre, R. A., Monge, L. & Marco, J. Stimulatory effect of the intestinal peptide PHI on glycogenolysis and gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Endocrinology* **112**, 2120–2127 (1983).
224. Åkesson, L., Ahre, B., Edgren, G. & Degerman, E. VPAC2-R Mediates the Lipolytic Effects of Pituitary Intestinal Polypeptide in Primary Rat Adipocytes. *Endocrinology* **146**, 744–750 (2015).
225. Straszewski-Chavez, S. L. *et al.* The Isolation and Characterization of a Novel Telomerase Immortalized First Trimester Trophoblast Cell Line, Swan 71. *Placenta* **30**, 939–948 (2009).
226. Aplin, J. D. *et al.* Trophoblast Differentiation: Progenitor Cells, Fusion and Migration - A Workshop Report. *Placenta* **27**, 141–143 (2006).
227. Graham, C. H. *et al.* Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Experimental Cell Research* vol. 206 204–211 (1993).
228. Pattillo, R. A. & Gey, G. O. The Establishment Trophoblastic of a Cell Line of Human Cells in Vitro1. *Cancer Res.* 1231–1236 (1968).
229. Kay, H. H., Zhu, S. & Tsoi, S. Hypoxia and Lactate Production in Trophoblast Cells. **28**, 854–860 (2007).
230. Cascone, T. *et al.* Increased Tumor Glycolysis Characterizes Immune Resistance to Adoptive T Cell Therapy. *Cell Metab.* **27**, 977–987.e4 (2018).
231. Kafer, D. *et al.* Targeting first trimester trophoblast cell metabolism modulates its susceptibility to Zika virus infection. *J. Cell. Physiol.* 1–12 (2023) doi:10.1002/jcp.30970.
232. Umansky, C. *et al.* Endogenous formaldehyde scavenges cellular glutathione resulting in redox disruption and cytotoxicity. *Nat. Commun.* **13**, (2022).
233. Martinefski, M. R. *et al.* Mass Spectrometry-Based Metabolic Fingerprinting Contributes to Unveil the Role of RSUME in Renal Cell Carcinoma Cell Metabolism. *J. Proteome Res.* **20**, 786–803 (2021).
234. Brandt, N. *et al.* Leukemia inhibitory factor increases glucose uptake in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **309**, E142–53 (2015).
235. Wieman, H. L., Wofford, J. A. & Rathmell, J. C. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3009–3020 (2006).
236. Olsen, J. M. *et al.* Glucose uptake in brown fat cells is dependent on mTOR complex 2-promoted GLUT1 translocation. *J. Cell Biol.* **207**, 365–374 (2014).
237. Makinoshima, H. *et al.* Signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/mammalian target of rapamycin (mTOR) axis is responsible for aerobic glycolysis mediated by glucose transporter in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung adenocarcinoma. *J. Biol. Chem.* **290**, 17495–17504 (2015).
238. Iacobazzi, V. & Infantino, V. Citrate-new functions for an old metabolite. *Biol. Chem.* **395**, 387–399 (2014).
239. Wang, X. H. *et al.* Low chorionic villous succinate accumulation associates with recurrent spontaneous abortion risk. *Nat. Commun.* **12**, (2021).

240. Schaffer, J. E. & Lodish, H. F. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* **79**, 427–436 (1994).
241. Kolahi, K. S., Valent, A. M. & Thornburg, K. L. Real-time microscopic assessment of fatty acid uptake kinetics in the human term placenta. *Placenta* **72–73**, 1–9 (2018).
242. Elchalal, U. *et al.* Insulin and fatty acids regulate the expression of the fat droplet-associated protein adipophilin in primary human trophoblasts. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **193**, 1716–1723 (2005).
243. Schaiff, W. T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- γ and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental Trophoblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 4267–4275 (2005).
244. Jeppesen, J. *et al.* Enhanced fatty acid oxidation and FATP4 protein expression after endurance exercise training in human skeletal muscle. *PLoS One* **7**, 4–12 (2012).
245. Fournier, T. *et al.* PPAR γ and human trophoblast differentiation. *J. Reprod. Immunol.* **90**, 41–49 (2011).
246. Vota, D. *et al.* Progesterone and VIP cross-talk enhances phagocytosis and anti-inflammatory profile in trophoblast-derived cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **443**, 146–154 (2017).
247. Genbacev, O., Demesy Jensen, K., Schubach Powlin, S. & Miller, R. K. In vitro differentiation and ultrastructure of human extravillous trophoblast (EVT) cells. *Placenta* **14**, 463–475 (1993).
248. Jarc, E. & Petan, T. Lipid droplets and the management of cellular stress. *Yale J. Biol. Med.* **92**, 435–452 (2019).
249. Spong, C. Y. *et al.* Regulation of postimplantation mouse embryonic growth by maternal vasoactive intestinal peptide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **897**, 101–8 (1999).
250. Nagy, C. & Haschemi, A. Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism : the process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway. **6**, 1–8 (2015).
251. Gong, T., Liu, L., Jiang, W. & Zhou, R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 95–112 (2020).
252. Saito Reis, C. A., Padron, J. G., Norman Ing, N. D. & Kendal-Wright, C. E. High-mobility group box 1 is a driver of inflammation throughout pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **85**, 1–14 (2021).
253. Aldo, P. B. *et al.* Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14+/CD16+ macrophages. *Am. J. Reprod. Immunol.* **72**, 270–284 (2014).
254. Ip, W. K. E., Hoshi, N., Shouval, D. S., Snapper, S. & Medzhitov, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science (80-.)*. **356**, 513–519 (2017).
255. Papparini, D. *et al.* Trophoblast cells primed with vasoactive intestinal peptide enhance monocyte migration and apoptotic cell clearance through $\alpha v \beta 3$ integrin portal formation in a model of maternal-placental interaction. *Mol. Hum. Reprod.* **21**, 930–941 (2015).
256. Paulomi, A. *et al.* Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14+/CD16+ macrophages. *Am J Reprod Immunol* **72**, 270–284 (2014).
257. Dimitriadis, E., White, C. A., Jones, R. L. & Salamonsen, L. A. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum. Reprod. Update* **11**, 613–630 (2005).
258. Divakaruni, A. S., Paradyse, A., Ferrick, D. A., Murphy, A. N. & Jastroch, M. *Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. Methods in Enzymology* vol. 547 (Elsevier Inc., 2014).
259. Mills, E. L. *et al.* Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature* **560**, 102–106 (2018).
260. Lampropoulou, V. *et al.* Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab.* **24**, 158–166 (2016).
261. O’Neill, L. A. J. & Artyomov, M. N. Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 273–281 (2019).
262. Hooftman, A. & O’Neill, L. A. J. The Immunomodulatory Potential of the Metabolite Itaconate. *Trends Immunol.* **40**, 687–698 (2019).
263. Peace, C. G. & O’Neill, L. A. J. The role of itaconate in host defense and inflammation. *J. Clin. Invest.* **132**, 1–10 (2022).
264. Wu, R., Kang, R. & Tang, D. Mitochondrial ACOD1/IRG1 in infection and sterile inflammation. *J. Intensive Med.* **2**, 78–88 (2022).
265. Rani Agarwal, N., Kachhawa, G., Oyeyemi, B. F. & Bhavesh, N. S. Metabolic profiling of serum and urine in preeclampsia and gestational diabetes in early pregnancy. *Med. Drug Discov.* **16**, 100143 (2022).
266. Riskin, A., Nannegari, V. H. & Mond, Y. Acute effectors of GLUT1 glucose transporter subcellular targeting in CIT3 mouse mammary epithelial cells. *Pediatr. Res.* **63**, 56–61 (2008).
267. Baumann, M. U. *et al.* Regulation of human trophoblast GLUT1 glucose transporter by Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I). *PLoS One* **9**, 1–8 (2014).

268. Sferruzzi-Perri, A. N., Sandovici, I., Constancia, M. & Fowden, A. L. Placental phenotype and the insulin-like growth factors: resource allocation to fetal growth. *J. Physiol.* **595**, 5057–5093 (2017).
269. Huang, H. *et al.* Role of glutamine and interlinked asparagine metabolism in vessel formation. *EMBO J.* **36**, 2334–2352 (2017).
270. Bucher, M., Kadam, L., Ahuna, K. & Myatt, L. Differences in glycolysis and mitochondrial respiration between cytotrophoblast and syncytiotrophoblast in-vitro: Evidence for sexual dimorphism. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
271. Di Simone, N. *et al.* Resistin modulates glucose uptake and glucose transporter-1 (GLUT-1) expression in trophoblast cells. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 388–397 (2009).
272. Jansson, T. & Powell, T. L. Role of placental nutrient sensing in developmental programming. *Clin. Obstet. Gynecol.* **56**, 591–601 (2013).
273. Jones, H. N., Jansson, T. & Powell, T. L. Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino acid transport in human primary trophoblast cells. *Diabetes* **59**, 1161–1170 (2010).
274. von Versen-Höynck, F., Rajakumar, A., Parrott, M. S. & Powers, R. W. Leptin Affects System A Amino Acid Transport Activity in the Human Placenta: Evidence for STAT3 Dependent Mechanisms. *Placenta* **30**, 361–367 (2009).
275. Rosario, F. J. *et al.* Chronic maternal infusion of full-length adiponectin in pregnant mice down-regulates placental amino acid transporter activity and expression and decreases fetal growth. *J. Physiol.* **590**, 1495–1509 (2012).
276. Nelson, D. M. *et al.* Hypoxia reduces expression and function of system A amino acid transporters in cultured term human trophoblasts. *Am. J. Physiol. Physiol.* **284**, C310–C315 (2003).
277. Fisher, J. J. *et al.* Mitochondrial isolation, cryopreservation and preliminary biochemical characterisation from placental cytotrophoblast and syncytiotrophoblast. *Placenta* **82**, 1–4 (2019).
278. Bustamante, J. *et al.* Oxygen metabolism in human placenta mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **46**, 459–469 (2014).
279. Zhu, Y. *et al.* Overexpression of lncRNA EPB41L4A-AS1 Induces Metabolic Reprogramming in Trophoblast Cells and Placenta Tissue of Miscarriage. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **18**, 518–532 (2019).
280. Bloxam, D. L., Bullen, B. E., Walters, B. N. J. & Lao, T. T. Placental glycolysis and energy metabolism in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **157**, 97–101 (1987).
281. Solmonson, A. *et al.* Compartmentalized metabolism supports midgestation mammalian development. *Nature* **604**, 349–353 (2022).
282. Bartha, J. L., Visiedo, F., Fernández-Deudero, A., Bugatto, F. & Perdomo, G. Decreased mitochondrial fatty acid oxidation in placentas from women with preeclampsia. *Placenta* **33**, 132–134 (2012).
283. Mayama, R., Izawa, T., Sakai, K., Suci, N. & Iwashita, M. Improvement of insulin sensitivity promotes extravillous trophoblast cell migration stimulated by insulin-like growth factor-I. *Endocr. J.* **60**, 359–368 (2013).
284. Burton, G. J. & Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **25**, 287–299 (2011).
285. Schanton, M., Maymó, J. L., Pérez-Pérez, A., Sánchez-Margalet, V. & Varone, C. L. Involvement of leptin in the molecular physiology of the placenta. *Reproduction* **155**, R1–R12 (2018).
286. Servoss, S. J. *et al.* IGF-I as a mediator of VIP/activity-dependent neurotrophic factor-stimulated embryonic growth. *Endocrinology* **142**, 3348–3353 (2001).
287. Sferruzzi-Perri, A. N., López-Tello, J., Fowden, A. L. & Constancia, M. Maternal and fetal genomes interplay through phosphoinositol 3-kinase(PI3K)-p110 α signaling to modify placental resource allocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 11255–11260 (2016).
288. Stack, C. M. *et al.* Deficits in social behavior and reversal learning are more prevalent in male offspring of VIP deficient female mice. *Exp. Neurol.* **211**, 67–84 (2008).
289. Åkesson, L., Åhrén, B., Edgren, G. & Degerman, E. VPAC2-R mediates the lipolytic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide in primary rat adipocytes. *Endocrinology* **146**, 744–750 (2005).
290. Richter, W. O., Robl, H. & Schwandt, P. Human glucagon and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) stimulate free fatty acid release from human adipose tissue in vitro. *Peptides* **10**, 333–335 (1989).
291. Hauner, H. *et al.* Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on glucose and lipid metabolism of isolated rat adipocytes. *Res. Exp. Med.* **188**, 189–195 (1988).
292. Vu, J. P. *et al.* Regulation of Appetite, Body Composition, and Metabolic Hormones by Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP). *J. Mol. Neurosci.* **56**, 377–387 (2015).
293. Tsutsumi, M. *et al.* A potent and highly selective VPAC2 agonist enhances glucose-induced insulin release and glucose disposal: A potential therapy for type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 1453–1460 (2002).

294. Desoye, G. & Hauguel-De Mouzon, S. The human placenta in gestational diabetes mellitus: The insulin and cytokine network. *Diabetes Care* **30**, (2007).
295. Louvi, A., Accili, D. & Efstratiadis, A. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev. Biol.* (1997) doi:10.1006/dbio.1997.8666.
296. Hill, D. J. Placental control of metabolic adaptations in the mother for an optimal pregnancy outcome. What goes wrong in gestational diabetes? *Placenta* **69**, 162–168 (2018).
297. Santangelo, C. *et al.* Cross-talk between fetal membranes and visceral adipose tissue involves HMGB1–RAGE and VIP–VPAC2 pathways in human gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* **56**, 681–689 (2019).
298. Yang, D. *et al.* HSP70 regulates lipid metabolism of decidual macrophages to maintain normal pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* **156**, 103829 (2023).
299. Chambers, M. *et al.* Macrophage Plasticity in Reproduction and Environmental Influences on Their Function. *Front. Immunol.* **11**, 1–16 (2021).
300. Jenkins, B. J., Rees, A., Jones, N. & Thornton, C. A. Does Altered Cellular Metabolism Underpin the Normal Changes to the Maternal Immune System during Pregnancy? *Immunometabolism* **3**, (2021).
301. Vishnyakova, P., Elchaninov, A., Fatkhudinov, T. & Sukhikh, G. Role of the monocyte–macrophage system in normal pregnancy and preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
302. Palmer, C. S., Cherry, C. L., Sada-ovalle, I., Singh, A. & Crowe, S. M. Glucose Metabolism in T Cells and Monocytes : New Perspectives in HIV Pathogenesis. *EBioMedicine* **6**, 31–41 (2016).
303. Tan, Z. *et al.* Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Participates in Macrophage Polarization via Regulating Glucose Metabolism. *J. Immunol.* **194**, 6082–6089 (2015).
304. van Dierendonck, X. A. M. H. *et al.* Triglyceride breakdown from lipid droplets regulates the inflammatory response in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**, 1–12 (2022).
305. Wu, H. *et al.* Lipid droplet-dependent fatty acid metabolism controls the immune suppressive phenotype of tumor-associated macrophages. *EMBO Mol. Med.* **11**, 1–17 (2019).
306. Svensson, J. *et al.* Macrophages at the Fetal–Maternal Interface Express Markers of Alternative Activation and Are Induced by M-CSF and IL-10. *J. Immunol.* **187**, 3671–3682 (2011).
307. Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O. & Lecureur, V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* **281**, 51–61 (2013).
308. Chouchani, E. T. *et al.* Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* **515**, 431–435 (2014).
309. Jones, R. *et al.* Mitochondrial and glycolysis-regulatory gene expression profiles are associated with intrauterine growth restriction. *J. Matern. Neonatal Med.* **33**, 1336–1345 (2018).
310. Peace, C. G. & O’Neill, L. A. J. The role of itaconate in host defense and inflammation. *J. Clin. Invest.* **132**, (2022).
311. Shi, X. *et al.* The signaling pathways and therapeutic potential of itaconate to alleviate inflammation and oxidative stress in inflammatory diseases. *Redox Biol.* **58**, 102553 (2022).